

MOIRA PEDROSO LEÃO

**FORMAÇÃO *IN VITRO* DA REDE DE FIBRINA DURANTE  
ATIVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS COM CLORETO  
DE CÁLCIO A 10% EM TEMPERATURA DE 37°C**

FLORIANÓPOLIS  
2002

MOIRA PEDROSO LEÃO

**FORMAÇÃO *IN VITRO* DA REDE DE FIBRINA DURANTE  
ATIVAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS COM CLORETO  
DE CÁLCIO A 10% EM TEMPERATURA DE 37°C**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós Graduação em Odontologia,  
mestrado acadêmico fora da sede –  
UNIVILLE, da Universidade Federal de  
Santa Catarina como requisito para a  
obtenção do título de Mestre em  
Odontologia, área de concentração:  
Implantodontia.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**

**FLORIANÓPOLIS  
2002**

MOIRA PEDROSO LEÃO

**FORMAÇÃO *IN VITRO* DA REDE DE FIBRINA DURANTE  
ATIVÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS COM CLORETO  
DE CÁLCIO A 10% EM TEMPERATURA DE 37°C**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Odontologia – opção Implantodontia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia, Mestrado Acadêmico Fora da Sede – UNIVILLE.

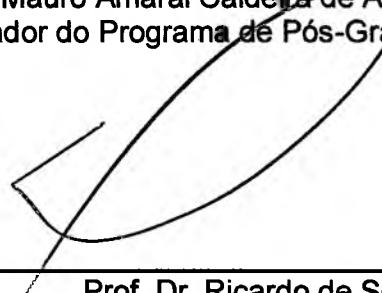
Joinville, 26 de agosto de 2002.



---

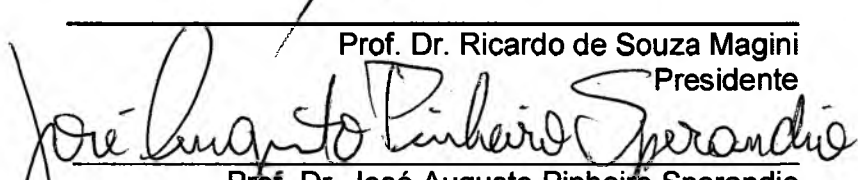
Prof. Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Banca Examinadora:



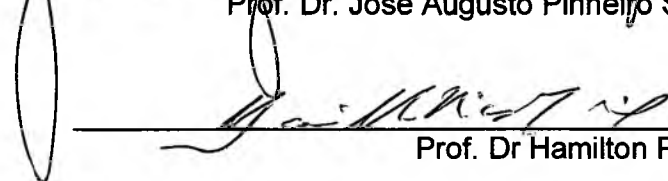
---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Presidente



---

Prof. Dr. José Augusto Pinheiro Sperandio  
Membro



---

Prof. Dr. Hamilton Pires Maia  
Membro

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que a cada dia me dá o dom da vida e à minha família que dá sentido a ela.

Ao meu pai Areonaldo Carlos Pedroso que através do seu exemplo como cirurgião-dentista competente, sério e respeitável, despertou em mim a vontade de exercer a odontologia dentro dos mais elevados preceitos de respeito ao paciente.

À minha mãe Regina Emília Pedroso que foi minha primeira professora e me ensinou que compartilhar o conhecimento é a melhor maneira de aprender.

Ao meu marido Roberto da Rocha Leão Neto que mais uma vez provou ser capaz de amar muito e ser incansavelmente tolerante, possibilitando que eu pudesse concluir com tranquilidade mais esta etapa.

À minha filha Laís Rocha Leão, companheira de todas as horas, que no alto dos 8 anos dividiu sem reclamar seus conhecimentos de informática me auxiliando em muito nas tarefas do computador e na organização do tempo, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Meus primeiros agradecimentos vão para o meu orientador Professor Dr. Ricardo de Souza Magini pela confiança depositada em mim e mais ainda pela sua habilidade em motivar as pessoas que culmina em contagiar a todos, criando a oportunidade de expor o que há de melhor em cada um. A sua postura me parece ser a melhor definição do professor da nova era.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores do mestrado em Odontologia da UFSC em especial ao Professor Dr. Antonio Carlos Cardoso, à Professora Liene Campos, ao Professor Sergio Fernando Torres de Freitas e ao Professor Mauro Amaral Caldeira de Andrada, a todos eles o meu muito obrigado pelos conselhos, pelas palavras encorajadoras e pelo apoio preciso e inquestionável.

Aos meus colegas de mestrado Diego Klee de Vasconcelos, Roberto Ramos Garanhani, Ricardo Hochheim Neto e Wilson Navarro Júnior que com muita alegria e profissionalismo foram meus grandes amigos e parceiros ímpares desta caminhada.

Aos colegas doutorandos da UFSC José Scarso Filho, Marco Antonio B. Pontual e José Nilo Oliveira Freire que com muita tranquilidade compartilharam gentilmente seus conhecimentos conosco, conhecimentos estes imprescindíveis para uma melhor compreensão do assunto estudado.

Ao Dr. Giorgio Roberto Baldanzi, chefe do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Curitiba que permitiu que pudessemos utilizar a estrutura do hospital da Universidade Federal do Paraná para a realização do trabalho experimental.

Meus agradecimentos de todo coração à Dr<sup>a</sup> Anália Maria B. Machado, responsável pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas, e à Dr<sup>a</sup> Lismara Kafka do Bonfim, responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas pela prontidão com que atenderam ao meu pedido e pelo grande auxílio ao compartilharem comigo seus amplos conhecimentos em Hemoterapia e Análises Clínicas, fundamentais para a confiabilidade do experimento realizado.

Agradeço também a todos os amigos e colegas da Universidade Federal do Paraná em especial ao Professor Hélio Paiva Pereira, ao Professor Jayme Bordini Jr e a Professora Maria Sueli Soares Leonardi pelo reconhecimento e apoio que venho recebendo durante todos estes anos de convívio dentro e fora desta instituição.

Finalmente, quero agradecer àqueles que fizeram o trabalho silencioso de bastidores, mas forneceram o suporte fundamental para que esta etapa pudesse ser concluída, são eles os doadores voluntários, a equipe no Biobanco e também os queridos amigos Lílian Cristiane Brunini Posseti, Marcelo Pulter, Roberto e Isabela Shimizu, Blanca Beatriz Diaz Alva, Norriê e Carla Gabardo.

**“Aprendendo e treinando,  
treinando e aprendendo.  
Assim é que se fazem coisas”**

**Richard Bach**

**LEÃO, Moira Pedroso. Formação *in vitro* da rede de fibrina durante ativação do plasma rico em plaquetas com cloreto de cálcio a 10% em temperatura de 37°C. 2002. 123 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – opção Implantodontia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Mestrado Acadêmico Fora da Sede – UNIVILLE, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.**

## **RESUMO**

Pesquisa que utiliza um coagulômetro para mensurar o tempo de coagulação do plasma rico em plaquetas (PRP) obtido com o uso do cloreto de cálcio a 10%. Objetiva analisar se é possível registrar com um coagulômetro a formação de uma rede de fibrina do PRP usando-se para a sua ativação apenas uma solução estéril de cloreto de cálcio a 10% e verificar se a temperatura constante de 37°C pode fornecer à técnica uma maior previsibilidade quanto ao tempo necessário para a coagulação. Oito amostras de plasma rico em plaquetas foram obtidas a partir da coleta e centrifugação do sangue de voluntários saudáveis conforme protocolo padronizado do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da cidade de Curitiba. Uma amostra de 1ml de plasma rico em plaquetas foi pipetado de um tubo de ensaio e levado para aquecimento prévio em banho-maria a 37°C por 5 min. Após o aquecimento, a amostra foi misturada por inversão a 40µl de cloreto de cálcio a 10%, também previamente aquecido a 37°C. Esta mistura permaneceu em tubo de ensaio em incubação a 37°C por mais 4 min, quando então foi novamente pipetado para que 200µl da mistura fossem colocados em cada uma das quatro cuvets de um coagulômetro. Este aparelho é dotado de um sistema de banho-maria seco a 37°C e, através de um sistema eletromagnético, detecta o início da formação da rede de fibrina pela inibição da movimentação da bilha metálica colocada no interior das cuvets. Em apenas um dos oito plasmas saudáveis avaliados o tempo de incubação após a mistura foi de apenas 2 min, visto que a coagulação desta amostra foi obtida com um tempo médio de 130 s. Os resultados mostraram que o tempo necessário para se promover a formação do coágulo variou aproximadamente de 2 a 10 min nos pacientes estudados após a mistura do plasma rico em plaquetas ao cloreto de cálcio a 10%, quanto se utiliza um aquecimento em banho-maria a 37°C. Concluiu-se que apesar de se obter um tempo maior para a formação da rede de fibrina com a mistura do cloreto de cálcio em relação à trombina, este tempo pode ser administrado pelo cirurgião, sem contudo incorporar à técnica os riscos inerentes ao uso de um material alógeno ou xenógeno. Novas pesquisas são necessárias no intuito de avaliar com maior precisão as reações que ocorrem durante a formação do coágulo e se este aquecimento prévio a 37°C alteram as propriedades desejáveis dos fatores de crescimento necessárias para a promoção do reparo tecidual.

**Palavras-chave:** plasma, cloreto de cálcio, plaquetas, implante dentário.



**LEÃO, Moira Pedroso. Formação in vitro da rede de fibrina durante ativação do plasma rico em plaquetas com cloreto de cálcio a 10% em temperatura de 37°C. 2002. 123 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – opção Implantodontia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Mestrado Acadêmico Fora da Sede – UNIVILLE, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.**

## **ABSTRACT**

Research that measures coagulation time of plasma rich in platelets (PRP) obtained with the use of 10% calcium chloride through a coagulation measurement device. Its objective is to analyze the possibility of registering, through a coagulation measurement device, the formation of a PRP fibrin net; using only a sterile solution calcium chloride activation and verify if the constant 37 degrees Celsius temperature can provide the technique with a higher level of previewing the necessary time for coagulation. 8 samples of plasma rich in platelet were obtained through the collecting and centrifugation of healthy voluntary blood according to the Hospital de Clínicas of Curitiba Blood Bank standard protocol. One sample of 1 ml of plasma rich in platelets was pipetted from a test tube and taken to pre-heating at 37 degrees Celsius for 5 minutes. After the heating, the sample was mixed by inversion with 40-ml calcium chloride 10%, which had previously been pre-heated at 37 degrees Celsius. This mixture remained in a test tube for incubation at 37 degrees Celsius for 4 more minutes, when then again pipetted so that 200 µl of this mixture were put in each one of the 4 cuvetes of a coagulation measurement device. This device has a system of dry heating at 37 degrees Celsius and, through an electromagnetic system, detects the beginning of the fibrin net formation by hindering the moving of the metal bilha put inside the cuvetes. In just one of the 8 healthy plasmas evaluated the time of incubation after the mixture was of only 2 minutes, once the coagulation of this sample was obtained with an average time of 130 seconds. The results revealed that the necessary time to promote the coagulation formation varied approximately from 2 to 10 minutes in patients studied after the mixture of plasma rich in platelets with 10% calcium chloride, when using heating at 37 degrees Celsius. It can be concluded that although the fibrin net formation compared to thrombin, this time can be administered by the surgeon without transmitting the to the technique the risks concerning allogenous or bovine origin material. New researches are necessary in order to evaluate the reactions occurring during the coagulation formation more precisely and if the pre-heating at 37 degrees Celsius alters in any way the desirable characteristics of growing factors, which are necessary to promote tissue repair.

**Key words:** plasma, calcium chloride, platelet, dental implantation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Células do tecido ósseo.	p. 25
Figura 2- Plaquetas íntegras.	p. 30
Figura 3- Plaquetas ativadas.	p. 30
Figura 4- Esquema da via extrínseca da coagulação.	p. 38
Figura 5- Esquema da via intrínseca da coagulação.	p. 40
Figura 6- Esquema da via comum da coagulação.	p. 41
Figura 7- Contagem das plaquetas no sangue total.	p. 46
Figura 8- Contagem das plaquetas no concentrado plaquetário.	p. 46
Figura 9- Plaquetas iniciando a ativação.	p. 48
Figura 10-Plaquetas ativadas.	p. 48
Figura 11-Coagulômetro.	p. 77
Figura 12-Bolsa tripla.	p. 79
Figura 13-Punção venosa.	p. 79
Figura 14-Retirada do Sangue.	p. 79
Figura 15-Hemomix.	p. 80
Figura 16-Pesagem da bolsa.	p. 81
Figura 17 -Primeira centrifugação das bolsas para a separação celular.	p. 81
Figura 18-Bolsa no extrator de plasma.	p. 81
Figura 19 -Concentrado de hemácias na primeira bolsa, PRP na segunda bolsa, terceira bolsa vazia.	p. 81
Figura 20- PRP e terceira bolsa vazia. Passagem interrompida pelo nó.	p. 82
Figura 21- Segunda centrifugação.	p. 82
Figura 22- Retirada do PPP no extrator de plasma.	p. 83
Figura 23- Plaquetas no fundo da segunda bolsa.	p. 83
Figura 24- Selamento das comunicação entre as bolsas.	p. 83
Figura 25- Pesagem do concentrado de plaquetas.	p. 83
Figura 26- Agitador de plaquetas.	p. 83
Figura 27- Gaveta do agitador contendo bolsas com plaquetas.	p. 83

Figura 28- PRP dos voluntários colhido da segunda bolsa após a segunda centrifugação.	p. 89
Figura 29- 1ml de PRP para o teste de coagulação.	p. 89
Figura 30- Cloreto de cálcio a 10%.	p. 90
Figura 31- Tubos contendo 1ml de PRP e 40 $\mu$ l de cloreto de cálcio sendo levados para o aquecimento prévio à mistura.	p. 90
Figura 32- Coagulômetro. Vista superior.	p. 91
Figura 33- Coagulômetro. Vista frontal.	p. 91
Figura 34- Bilha metálica.	p. 91
Figura 35- Colocação das bilhas metálicas nas cuvetes.	p. 91
Figura 36- Bilha no interior da cuvette.	p. 92
Figura 37- Pipetagem da mistura PRP+cloreto de Cálcio.	p. 92
Figura 38- Colocação no coagulômetro de 200 $\mu$ l da mistura.	p. 92
Figura 39- Formação do coágulo.	p. 92
Figura 40- Amostras de PRP.	p. 92
Figura 41- Colocação de 50 $\mu$ l de PRP nas cuvetes.	p. 93
Figura 42- Trombina ST4 1,5 U.	p. 93
Figura 43- Colocação de 50 $\mu$ l de trombina sobre o PRP.	p. 93
Figura 44- Formação do coágulo.	p. 93
Figura 45- Sangue autólogo sendo inserido dentro do dispositivo do PCCS.	p.119
Figura 46- Dispositivo interno.	p.119
Figura 47- PCCS	p.119
Figura 48- Bolsa com PRP ainda com botão plaquetário.	p.119
Figura 49- Distribuição homogênea das plaquetas no PRP.	p.119
Figura 50- PRP pronto.	p.119
Figura 51- Smart PreP.	p.120
Figura 52- Separação dos elementos do sangue. Botão plaquetário.	p.120
Figura 53- Sistema fechado de separação celular.	p.120
Figura 54- Materiais.	p.121
Figura 55- Dispersador.	p.121
Figura 56- Gel de plaquetas.	p.121

Figura 57- Centrífuga ACE.	p.121
Figura 58- Coleta do sangue em tubos.	p.122
Figura 59- Colocação inclinada dos tubos.	p.122
Figura 60-Primeira centrifugação.	p.122
Figura 61- Separação celular após primeira centrifugação.	p.122
Figura 62- Transferência do PRP juntamente com a primeira camada de células vermelhas.	p.122
Figura 63- Colocação do conteúdo aspirado em outro frasco.	p.122
Figura 64- Segunda centrifugação.	p.122
Figura 65- Botão plaquetário no fundo do tubo.	p.122
Figura 66- Retirada do plasma pobre em plaquetas.	p.123
Figura 67- Colocação do PPP em um recipiente estéril.	p.123
Figura 68- Retirada do plasma rico em plaquetas (PRP).	p.123
Figura 69- Separação do PPP (amarelo) do PRP (vermelho).	p.123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABB	- Associação Americana de Bancos de Sangue
CP	- Concentrado Plaquetário
CPDA	- Citrato-fosfato-dextrose ácida
DFDBA	- Osso seco congelado desmineralizado
EGF	- Fator de crescimento epidermal
ePTFE	- Politetrafluoretileno expandido
GBR	- Regeneração óssea guiada
FDBA	- Osso seco congelado
FGF	- Fator de crescimento de fibroblasto
IGF-I	- Fator de crescimento semelhante à insulina - I
IGF-II	- Fator de crescimento semelhante à insulina – II
PAF	- Fator ativador de plaquetas
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEP	- Plasma enriquecido com plaquetas
PF4	- Fator plaquetário 4
Pi	- Fosfato inorgânico
PRP	- Plasma rico em plaquetas
RPM	- Rotações por minuto
TIMP	- Tecido Inibidor de Metallo-proteinase
TGF- $\alpha$	- Fator de crescimento de transformação alfa
TGF- $\beta$	- Fator de crescimento de transformação beta
TTPA	- Tempo de tromboplastina parcial ativada
VG	- Volume globular

## LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	-	Cálcio
ml	-	Mililitro
$\mu$ l	-	Microlitro
$\mu$ m	-	Micrômetro
®	-	Marca registrada

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	p. 17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	p. 22
<b>2.1 Características morfofisiológicas do tecido ósseo</b>	p. 23
2.1.1 Aspectos fisiológicos e histológicos do tecido ósseo	p. 23
2.1.2 Fisiologia do tecido ósseo após a injúria	p. 28
2.1.2.1 Resposta tecidual frente à liberação dos fatores de crescimento	p. 29
2.1.2.1.1 Inflamação	p. 29
2.1.2.1.2 Proliferação	p. 31
2.1.2.1.3 Maturação	p. 31
<b>2.2 Hemostasia, fatores e mecanismos da coagulação sanguínea</b>	p. 32
2.2.1 Hemostasia	p. 32
2.2.1.1 Resposta vascular	p. 33
2.2.1.2 Atividade plaquetária	p. 33
2.2.1.3 Formação do coágulo	p. 34
2.2.2 Fatores da coagulação	p. 35
2.2.3 Mecanismos da coagulação	p. 37
2.2.3.1 Via extrínseca	p. 37
2.2.3.2 Via intrínseca	p. 38
<b>2.3 Plasma rico em plaquetas: características e aplicação clínica</b>	p. 43
2.3.1 Definição	p. 44
2.3.2 Composição química	p. 45
2.3.2.1 Plasma	p. 46
2.3.2.2 Leucócitos	p. 46
2.3.2.3 Plaquetas	p. 47
2.3.3 Fatores de crescimento	p. 48
2.3.3.1 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	p. 50
2.3.3.2 Fator de crescimento de transformação (TGF- $\beta$ )	p. 52
2.3.3.3 Fator de crescimento semelhante à insulina-I e II (IGF – I e II)	p. 54
2.3.4 Protocolos de obtenção do plasma rico em plaquetas	p. 56
2.3.4.1 Laboratório de análises clínicas ou bancos de sangue	p. 56
2.3.4.2 Consultório odontológico	p. 60
2.3.5.1 Características dos materiais de enxertos e a utilização clínica do plasma rico em plaquetas	p. 61
2.3.5.1 Plasma rico em plaquetas	p. 62
2.3.5.2 Plasma rico em plaquetas com enxerto autógeno	p. 63
2.3.5.3 Plasma rico em plaquetas com enxerto alógeno	p. 67
2.3.5.4 Plasma rico em plaquetas com enxerto xenógeno	p. 70
2.3.5.5 Plasma rico em plaquetas com enxerto aloplástico	p. 71
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	p. 74
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	p. 76
<b>4.1 Material</b>	p. 77
4.1.1 Equipamentos	p. 77
4.1.2 Material de consumo	p. 78
<b>4.2 Método</b>	p. 78

4.2.1	Punção venosa e retirada do sangue	p. 78
4.2.2	Separação celular	p. 80
4.2.3	Obtenção do concentrado de plaquetas	p. 82
4.2.4	Exames laboratoriais	p. 84
4.2.5	Ativação do plasma rico em plaquetas	p. 88
4.2.6	Testes com o coagulômetro	p. 90
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	p. 94
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	p. 99
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	p. 106
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	p. 108
	<b>ANEXOS</b>	p.114



## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas juntamente com o concentrado de hemácias e plasma criocipitado são os hemocomponentes mais utilizados na hemoterapia contemporânea (CATHERINE, 1996).

Na Odontologia, o plasma rico em plaquetas tem recebido uma atenção especial devido aos trabalhos apresentados utilizando-se este material com o objetivo de melhorar as respostas dos tecidos que sofreram uma injúria, quer seja de maneira acidental, por patologia ou cirurgia planejada.

Segundo Marx et al.(1998) o estudo dos tecidos tem mostrado grandes avanços no que diz respeito ao conhecimento do mecanismo de ação dos polipeptídios envolvidos no processo de reparação tecidual e, ao que parece, as respostas desejáveis ocorrem às expensas dos fatores de crescimento contido nas plaquetas sanguíneas, principalmente o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o Fator de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o Fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF- I e II).

Através do uso racional dos fatores de crescimento, por intermédio do plasma rico em plaquetas, é possível acelerar o processo de reparação tecidual bem como aumentar a previsibilidade das respostas teciduais de reparação após intervenções cirúrgicas que visam a reabilitação com implantes. Estas afirmações podem ser confirmadas através dos trabalhos de Marx e Garg (2002) que mostram que, quando se utilizam fatores de crescimento com finalidade reabilitadora é possível reduzir o tempo de espera entre a intervenção cirúrgica e a colocação de uma prótese odontológica pela metade, ou segundo Becker et al. (1992) esta redução pode ser de até um terço.

Com as descrições de Matras (1985) a cirurgia oral e maxilofacial começaram a conhecer as propriedades advindas do plasma sanguíneo. Utilizando a fibrina adesiva ele demonstrou que este hemocomponente tem a

capacidade de promover a anastomose microneural e microvascular, bem como possui ação hemostática em tecidos moles deficientes; também mostrou a possibilidade de substituir o material de sutura, na linha de descontinuidade pele/enxerto/pele, no procedimento de enxerto e, a reaproximação de pedaços de ossos fragmentados em fraturas complicadas e de difícil conclusão. Porém, de acordo com Anitua (1999) esta técnica jamais conquistou a aprovação unânime da comunidade científica mundial devido ao risco reportado da transmissão de doenças associadas com o seu uso, inclusive do vírus da imunodeficiência. Por esta razão, numerosas técnicas autólogas para a preparação e uso da fibrina adesiva estão sendo testadas. A utilização da fibrina autóloga, usada com sucesso por Tayapongsak et al. (1994) em reconstrução maxilar exige a cola de fibrina e a fibrina adesiva dos riscos potenciais inerentes ao uso de um material homogêneo. Entretanto, o complexo método de obtenção da fibrina motiva a procura do real mecanismo de ação deste material, objetivando a simplificação de sua técnica de obtenção (WHITMAN; BERRY; GREEN; 1997).

Seguindo-se este pensamento investigativo Marx et al. (1998), Antonaides e Willians (1983) e Robert e Spron (1993) expõem em suas publicações que, quando se marca os polipeptídios presentes no plasma utilizado para se obter a fibrina autóloga com anticorpo monoclonal, é possível registrar a presença abundante de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento de transformação alfa e beta (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ).

A literatura científica tem nos mostrado que, durante o estágio de coagulação, os fatores de crescimento atuam na organização dos fenômenos de cura e regeneração óssea. Portanto, parece evidente que a fibrina autóloga tem sua efetividade embasada não somente pela osseocondutividade, como suporte, mas também pela propriedade de estimular a atividade das células ósseas, através da ação dos polipeptídios presentes no plasma. Por esta razão, parece lógica a busca por uma modificação no processo de obtenção deste plasma com o intuito de viabilizar um aumento na oferta dos fatores de

crescimento no material a ser utilizado, para que através da ação dos fatores de crescimento, seja possível a tão desejada otimização da capacidade reparadora do tecido injuriado.

Conforme a definição de Anitua (1999) o plasma centrifugado contendo grande quantidade de plaquetas chama-se plasma rico em plaquetas (PRP) ou plasma enriquecido com plaquetas (PEP). Quando este plasma rico em plaquetas é ativado, forma-se um coágulo, e então ele assume um aspecto de gel. Esta consistência possibilita a sua permanência no local, bem como facilita o manuseio e introdução na ferida cirúrgica. Este hemocomponente portanto, tem provado ser próspero e livre de complicações quando é utilizado com a finalidade de reparar tecidos bucais. Segundo Whitman; Berry; Green (1997) a grande quantidade de plaquetas presentes neste gel traz citocinas e fatores de crescimento para o local da cirurgia que não iriam ocorrer com a cola de fibrina ou estariam em quantidade reduzidas em uma cicatrização normal.

No entanto, para que ocorra a coagulação do plasma rico em plaquetas e conseqüentemente, a formação de gel, têm se utilizado uma associação de cloreto de cálcio e trombina bovina (MARX, 1998), assim como outras substâncias coagulantes como a Botropase® (VERCELLOTTI; RUSSO; GIANOTTI, 2002) e a formulação ITA® (LANDESBERG; ROY; GLICKMAN, 2000) . A adição de componentes orgânicos alógenos ou xenógenos como estes, parece contrária à filosofia da técnica, que surgiu justamente com o intuito de diminuir os riscos de transmissão de doenças ou induzir possíveis reações imunológicas. Desta maneira este trabalho foi realizado com o intuito de testar através de um aparelho chamado coagulômetro, se é possível conseguir uma adequada coagulação do plasma rico em plaquetas utilizando-se apenas um componente inorgânico, o cloreto de cálcio a 10% para neutralizar a ação do anticoagulante à base de citrato, possibilitando o início das reações em cascatas inerentes aos fatores intrínsecos da coagulação presentes no plasma e, desta forma poder contribuir para o estabelecimento de um protocolo de trabalho confiável e previsível.

Para possibilitar que as informações contidas na literatura sejam de fácil leitura, assim como para que haja uma completa compreensão do experimento realizado, esta dissertação está dividida da seguinte maneira: revisão de literatura: nesta seção é possível encontrar a base fisiológica e técnica para a compreensão da pesquisa; proposição: explica os objetivos que se pretende alcançar ao se executar a pesquisa; material e método: nesta seção estão listados todo o material de consumo, os equipamentos utilizados e a descrição da metodologia empregada para a realização do experimento; resultados: através de tabelas os resultados do experimento estão disponibilizados de maneira muito objetiva; discussão: nesta seção são levantados os pontos relevantes em relação a pesquisa conforme são encontrados na literatura e uma análise crítica dos resultados está evidenciada; conclusões: nesta seção estão as conclusões primárias deste trabalho; referências bibliográficas: estão listados todos os autores e sites eletrônicos consultados; anexos: complementando o trabalho encontram-se nos anexos uma cópia do Termo de Consentimento Informado, bem como as fichas de anamnese que foram utilizadas para a triagem dos voluntários da pesquisa. Evidenciando uma tendência de mercado, encontram-se também nos anexos alguns modelos de centrífugas de pequeno porte que estão sendo comercializadas para uso em consultórios odontológicos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA<sup>1</sup>

A elaboração desta revisão de literatura através da compilação dos resultados encontrados por outros pesquisadores fornece o referencial teórico fundamental para a compreensão do experimento, bem como permite esclarecer a relevância clínica que a pesquisa oferece.

Desta maneira, por questões didáticas, a fundamentação teórica está descrita em seqüência lógica, sem levar em consideração a ordem cronológica de suas descobertas.

### 2.1 Características morfofisiológicas do tecido ósseo

A razão primária que nos leva a estudar a coagulação do plasma rico em plaquetas encontra-se na possibilidade da sua utilização clínica incrementando a síntese óssea. Por esta razão este capítulo foi incluído nesta revisão possibilitando a compreensão dos eventos celulares em resposta à ação bioquímica de substâncias que alteram a atividade das principais células relacionadas ao esqueleto.

#### 2.1.1 Aspectos fisiológicos e histológicos do tecido ósseo

O osso é um tecido metabolicamente ativo composto de fase mineral e orgânica que é refinadamente desenhado para dar suporte e sustentação às estruturas do corpo. Para realizar esta tarefa, ele é formado por uma combinação de osso compacto denso (cortical) e osso esponjoso (trabecular), que é reforçado nos pontos de estresse. A fase mineral do esqueleto corresponde aproximadamente a dois terços do seu peso, e o terço remanescente pela matriz orgânica, que consiste primariamente de colágeno, e glicoproteínas em menor quantidade como proteoglicanos, lipídeos e proteínas

---

<sup>1</sup> Baseada na NBR 10520:2002 da ABNT

não colágenas como osteopontin, osteonectina, osteocalcina (gla-proteína óssea) e matriz gla-proteica (SCHWARTZ et al., 1998).

Guyton e Hall (1997) relataram de maneira bastante interessante seu conceito de tecido ósseo, afirmando se tratar de um tecido composto por uma matriz orgânica dura que é muito fortalecida por depósitos de sais de cálcio, dando uma visão de unidade.

Várias células estão relacionadas ao tecido ósseo, mas o osteoblasto e o osteoclasto merecem uma especial atenção (FIG. 1). O osteoblasto tem a função de sintetizar os componentes da matriz orgânica e a prepara para a mineralização. A atividade de um osteoblasto varia de 1 a 10 semanas e, uma vez que ele está envolvido pela matriz mineralizada passa a se chamar osteócito. (HOLLINGER; BUCK; BRUDER, 1999).

Os osteócitos se comunicam uns com os outros e com as células de revestimento do osso através de seus prolongamentos citoplasmáticos. Os osteócitos têm a função de manter a matriz mineralizada e respondem rapidamente aos hormônios calcitropicos, movendo cálcio (Ca) e fosfato inorgânico (Pi) dentro e fora do osso mineralizado. As células da linha osteoblástica também estão envolvidas na produção de fatores parácrine e autócrine (citocinas e fatores de crescimento) que tem grande influência tanto na reabsorção óssea quanto na formação óssea. Os osteoblastos e osteócitos estão envolvidos diretamente na degradação e remodelação da matriz extracelular resultando em sua maturação e mineralização. A vida de um osteócito é de muitos anos, às vezes até décadas. Como não se reproduzem dependem da diferenciação dos osteoblastos para sua substituição (HOLLINGER; BUCK; BRUDER, 1999).



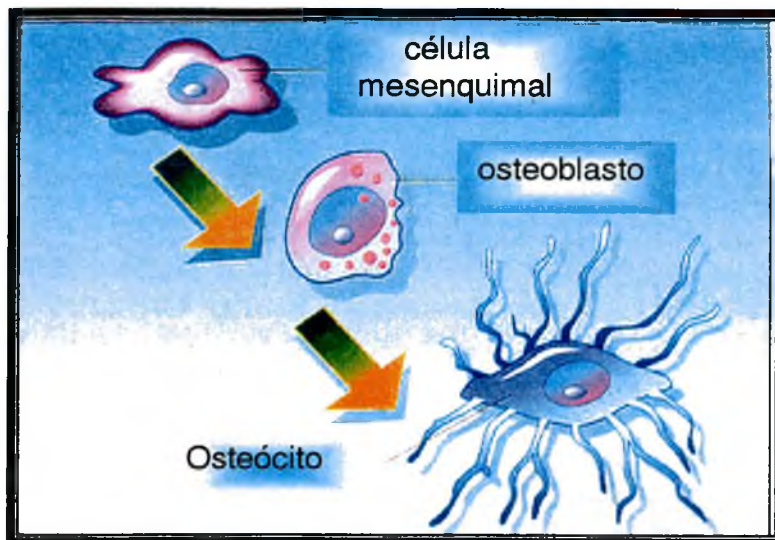


FIGURA 1- Células do tecido ósseo.  
Fonte - Marx e Garg (2002)

Os osteoclastos têm a função de reabsorver a fase mineral e orgânica do osso. Em conjunto, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos em um processo conhecido como remodelação, reorganizam e mantêm o esqueleto durante toda a vida do organismo. Os osteoclastos são derivados dos monócitos ou células semelhantes formados na medula óssea (GUYTON; HALL, 1997).

Macroscopicamente o osso consiste em dois tipos diferentes de tecido: cortical e esponjoso, ambos achados na maxila e mandíbula. O osso cortical é mais proeminente na mandíbula; ambos são encontrados no osso alveolar (SCHWARTZ et al., 1998).

O osso cortical corresponde a 80% do esqueleto e o esponjoso a 20%, porém, o osso esponjoso é metabolicamente mais ativo (HOLLINGER; BUCK; BRUDER, 1999).

Cada um destes tecidos é rigorosamente regulado e responde diferentemente aos hormônios, fatores de crescimento e a várias modalidades de tratamento. Alterações deste equilíbrio, local ou sistemicamente resultam em doenças caracterizadas por perda (periodontite e osteoporose) ou aumento da massa óssea (doença de Paget). Quando examinamos o osso sob luz

polarizada, um padrão lamelar bem definido é visível em cortical e esponjoso. Porém, se a renovação óssea é muito rápida ou anormal, ou durante a cicatrização, o modelo lamelar desaparece e osso primário é formado (GUYTON; HALL, 1997).

O osso cortical é constituído pelo sistema haversiano (osteon cortical) que se encontra circundando vasos sanguíneos centrais e que podem se ramificar dentro da córtex óssea. Especialmente as células do sistema haversiano ocupam uma área relativamente pequena. Em contraste, as células do osso medular ocupam uma grande porção da superfície. Esta observação pode explicar porque o osso cortical exibe menos atividade metabólica que o osso medular. O osso cortical é revestido pelo perióstio em uma superfície e endóstio em outra. A superfície endosteal do osso cortical exibe pronunciada atividade osteoblástica e osteoclástica. O perióstio é importante durante o crescimento, a remodelação óssea, a regeneração de defeitos periodontais e cicatrização ao redor de implantes. A remodelação óssea é o processo usado pelo osso para dar a forma a ele mesmo, criando um organismo com máxima resistência à compressão, que é associado com a formação e crescimento em crianças e adolescentes (SCHWARTZ et al., 1998).

O osso medular (esponjoso) consiste em trabéculas com espessura variando de 50 a 400µm. As trabéculas são intercomunicáveis numa forma de favo de mel típico, maximizando as propriedades mecânicas do tecido ósseo. Na remodelação óssea, o osso é constantemente reabsorvido em uma superfície seguido por uma fase de formação óssea. Nos adultos normais existe um equilíbrio entre a quantidade de osso reabsorvido pelos osteoclastos e a quantidade de osso formado pelos osteoblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1974).

Portanto, de acordo com Guyton e Hall (1997) o atual conceito de remodelação óssea é baseado na hipótese de que precursores de osteoclastos são ativados e se diferenciam em osteoclastos e iniciam o processo de

reabsorção. Esta fase é seguida por uma fase de formação óssea. O número de focos de formação óssea é chamado de frequência de ativação junto com a média individual dos dois processos, determina o índice de renovação óssea. Enquanto a reabsorção interna e aposição externa podem variar entre 10% a 20% do normal em diferentes doenças, a frequência de ativação pode variar acima de 50% a 100%.

Em muitas doenças, a frequência de ativação é o mais importante regulador da renovação e variações da massa óssea. O fim da reabsorção e início da formação da lacuna de reabsorção ocorre através de um mecanismo casado. O processo casado assegura que a quantidade de osso reabsorvido é equivalente à quantidade de osso repostado na subsequente fase de formação. A natureza da ativação e mecanismo casado é até agora desconhecido, embora alguns fatores de crescimento, tais como várias linfocinas, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento de transformação beta e prostaglandinas, tem sido proposto. Se a ativação de osteoblastos inicia simultaneamente com recrutamento osteoclástico, ou mais tarde durante o desenvolvimento lacunar, é até agora incerto. É sabido que proteínas secretadas pelos osteoblastos ou presente no soro que protege os cristais minerais, cria sítios de adesão para osteoclastos. Durante a reabsorção, os osteoclastos liberam no local os fatores de crescimento do osso. Esses fatores têm dois efeitos, inibição da função osteoclástica e estimulação da atividade osteoblástica. Além disso os osteoclastos produzem e liberam fatores que têm efeitos reguladores negativos sob eles mesmos e aumentam a função osteoclástica. Finalmente, quando os osteoclastos terminam seu processo de reabsorção, eles secretam proteínas que mais tarde servem como um substrato para adesão osteoblástica. Os osteoblastos ativos também produzem fatores locais, regulando a autócrine. (SCHWARTZ et al., 1998).

Com o envelhecimento, o osso passa por mudanças nas estruturas tridimensionais com profundo impacto nas características físicas. Este processo inicia-se aproximadamente entre 25 e 30 anos de idade no pico da

formação óssea. A partir daí, começa um declínio da massa óssea para homens e mulheres. A diminuição da massa óssea leva a um afinamento cortical devido à tunelização ou trabeculação do envelope cortical do endóstio com aumento do volume dos espaços medulares acompanhado por algum ganho no diâmetro ósseo (GUYTON; HALL, 1997).

Esta modificação do metabolismo ósseo de idosos talvez possa explicar as razões pelas quais o PRP mostra-se especialmente mais osteogênico, em modelos experimentais, quando utilizado em modelos idosos em comparação com modelos jovens.

### 2.1.2 Fisiologia do tecido ósseo após a Injúria

A intensa busca por compreender o processo da cicatrização da ferida abre a possibilidade de se intervir de maneira exógena visando uma maior previsibilidade, bem como a maximização deste processo (HOSGOOD, 1993).

Classicamente a cicatrização da ferida pode ser resumida da seguinte maneira: depois da resposta inflamatória transitória (1º dia), células mesenquimais indiferenciadas migram por quimiotaxia dentro da área do reparo e proliferam (3º dia); a proliferação de células é precedida pela diferenciação em condrócitos (5º ao 7º dia) e osteócitos (9º ao 12º dia) e finalmente a medula hematopoiética (12º dia) (HOWES et al., 1988).

Vários fatores de crescimento envolvidos na cicatrização da ferida têm sido identificados, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (HOLLINGER; BUCK; BRUDER, 1999).

Parece estar bem aceito, entretanto, o conceito que sugere que o processo de cicatrização é iniciado pelas plaquetas e ampliado ou sustentado por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (HOSGOOD, 1993).

#### 2.1.2.1 Resposta tecidual frente à liberação dos fatores de crescimento

O organismo reage de modo semelhante durante o processo de reparo ósseo e em alguns caminhos para o reparo da ferida nos tecidos moles (HOWES et al., 1988).

Em geral o processo inicia-se com uma inflamação, seguida de uma etapa de proliferação de células e, terminando com a maturação ou reestruturação do tecido.

##### 2.1.2.1.1 Inflamação

A resposta inflamatória é essencial para reparação e restauração da estrutura e função do tecido lesionado. As plaquetas são os primeiros elementos presentes no local da lesão, praticamente junto com a hemorragia. A perda da integridade endotelial dos vasos durante o trauma no tecido resulta na exposição de colágeno subepitelial tipo IV e V. Estas proteínas estruturais promovem então a agregação e ligação das plaquetas que resulta na ativação das mesmas (FIG. 2 e 3). A ativação das plaquetas suporta uma série de transformações estruturais e funcionais da coagulação. Em adição, as plaquetas segregam uma série de fatores incluindo serotonina, fibronectina, adenosina difosfato, tromboxane A<sub>2</sub>, fator plaquetário 4 (PF4), fator ativador de plaquetas (PAF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (HOLLINGER; BUCK; BRUDER, 1999)



Figura: 2 Plaquetas íntegras.

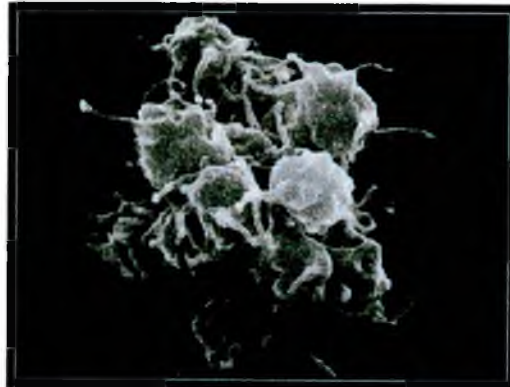


Figura 3: Plaquetas ativadas

Fonte: The Platelet Gel Network (2002)

O local de liberação dos fatores de quimiotaxia ordena a migração de neutrófilos e inicia-se o processo de diapedese (migração) entre as células endoteliais. Este fenômeno é realçado pelo aumento da permeabilidade capilar depois da liberação de várias substâncias vasodilatadoras na ferida, incluindo: serotonina, histamina, bradiquinina e metabólitos do ácido araquidônico. O fator plaquetário 4 (uma proteína dos grânulos alfa-plaquetários) é liberado pelas plaquetas dentro de segundos. O fator plaquetário 4 (PF4) é altamente quimiotático para as células inflamatórias e para os fibroblastos. O fator ativador de plaquetas (PAF) é um glicerofosfolípídeo grande liberado da membrana celular das plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e células inflamatórias. Ele é um potente mediador para a inflamação, quimiotático para neutrófilos e monócitos e ativador de macrófagos. Porém, diferentemente de outros fatores de crescimento, ele não é mitogênico (HOSGOOD, 1993).

A ativação, fagocitose ou lise dos neutrófilos libera o conteúdo dos seus grânulos dentro do espaço extracelular. Este conteúdo inclui enzimas tal como elase e collagenase que podem degradar o tecido conjuntivo do local da ferida. Embora ele possa auxiliar na remoção de tecidos lesionados, ele também pode causar injúrias. Subseqüentemente ao acúmulo de neutrófilos na ferida, monócitos tornam-se evidentes em resposta aos produtos quimioatraentes tal como os bacterianos, complementares e o mais potente de todos o TGF- $\beta$ . Os monócitos permanecem no local da injúria por 1 semana, durante este tempo

eles participam do debridamento, eventos microbicidas e orquestração dos eventos do reparo tecidual. Estes processos são levados para fora através de liberação de moléculas que influem em outras inflamações e células mesenquimais regulando suas funções (GUYTON; HALL, 1997).

#### 2.1.2.1.2 Proliferação

O reparo tecidual começa com uma pequena resposta inflamatória, embora o processo de inflamação ser integral para iniciação da atividade dos fibroblastos. Fatores liberados das plaquetas, monócitos e macrófagos, incluindo PF4, PDGF e TGF- $\beta$ , contribuem para o recrutamento de fibroblastos, sua proliferação e síntese de matriz (FRAY; WOOD, 1996); (HOSGOOD, 1993).

Nos tecidos os fibroblastos adquirem característica ultraestruturais, químicas e de função semelhante às células do tecido muscular liso, o que tem sido implicado à origem de contrações encontradas durante a cicatrização da ferida. O fator derivado de monócito, PDGF e TGF- $\beta$  também promovem angiogênese, que é necessária para a formação de tecido de granulação. A estimulação da síntese de matriz promovida por estes e outros fatores (interleucina-1 e fator de necrose tumoral) lideram a cicatrização e o reparo da injúria.(FRAY, T.; WOOD, E. J. 1996).

#### 2.1.2.1.3 Maturação

O processo de maturação da ferida envolve um processo dinâmico de degradação de colágeno e reorganização para maximizar a resistência da ferida. A enzima chave da degradação do colágeno é a colagenase e é secretada pelos fibroblastos como procolagenase. A procolagenase é subseqüentemente ativada para colagenase, necessitando de uma série de metalo-enzimas que requerem zinco. Entretanto, as células que produzem colagenase também têm se mostrado capaz de produzir um inibidor da

colagenase. Elas são coletivamente descritas como TIMP (Tecido Inibidor de Metaloproteinase). Os fatores de crescimento podem modular as expressões da colagenase através das células mesenquimais. Ambos, PDGF e TGF- $\beta$  tem sido demonstrado poder induzir a síntese de procólagenase, entretanto, TGF- $\beta$  pode bloquear a indução da procólagenase causada por outros fatores como o fator de crescimento endotelial (EGF). Em adição, TGF- $\beta$  induz a síntese das TIMP. Então, TGF- $\beta$  é capaz de reduzir a nova síntese de colágenase pelas células e melhora a capacidade das células para inibir outras fontes de atividade colagenolítica (HOSGOOD, 1993).

## **2.2 Hemostasia, fatores e mecanismos da coagulação sanguínea**

Como o objeto desta pesquisa é testar a utilização do cloreto de cálcio como o único agente coagulante incorporado diretamente ao plasma rico em plaquetas, é de fundamental importância a compreensão dos mecanismos pelos quais o organismo contém a hemorragia e restabelece a saúde do tecido para a partir daí desenvolver um raciocínio lógico que permita uma flexibilização da técnica de utilização clínica do plasma rico em plaquetas até então empregada.

### **2.2.1 Hemostasia**

O sangue circula no organismo em contato com o endotélio vascular. A fluidez do sangue depende da integridade do endotélio, da velocidade do fluxo sanguíneo e, possivelmente, da presença de heparina, como um anticoagulante natural produzido pelos mastócitos. Quando o sangue escapa do interior dos vasos ele perde a fluidez e torna-se viscoso. Em pouco tempo é formado um coágulo que, posteriormente se retrai, organiza ou dissolve. Este é o fenômeno normal da hemostasia, que compreende um conjunto de mecanismos que visam interromper a perda continuada de sangue (PERFUSION LINE, 2002).



A hemostasia é o resultado da ação conjunta de três mecanismos principais e independe da causa da lesão do vaso sanguíneo, que pode ser consequência de trauma, infecção, ruptura espontânea ou da secção cirúrgica planejada. Estes mecanismos são: a resposta vascular, a atividade plaquetária e a coagulação do sangue. Eles devem atuar em perfeita harmonia para que a hemostasia seja completa. A ausência ou a disfunção de qualquer um dos mecanismos torna a hemostasia deficiente e perpetua a perda sanguínea (GUYTON; HALL, 1997).

#### 2.2.1.1 Resposta vascular

Quando um vaso sanguíneo é lesado, ocorre imediata contração da sua parede, que reduz o fluxo de sangue no seu interior, na tentativa de interromper a perda de sangue. A contração da parede do vaso pode ser produzida por reflexos nervosos desencadeados pelo estímulo da dor. Quanto mais intenso é o trauma, tanto maior é o espasmo vascular. A redução de calibre do vaso resulta da contração das fibras musculares e pode durar até 20 ou 30 min. Os tecidos injuriados liberam substâncias, como a serotonina e a histamina. A serotonina induz vasoconstrição local que contribui para a eficiência do mecanismo vascular da hemostasia. Tanto a serotonina quanto a histamina, quando liberadas em grandes quantidades são absorvidas para a circulação sistêmica, onde tem efeito vasodilatador, que tende a reduzir a pressão arterial e, em consequência, minimizar a perda sangüínea (PERFUSION LINE, 2002).

#### 2.2.1.2 Atividade plaquetária

Quando as plaquetas entram em contato com os tecidos, na parede do vaso lesado, aderem à região da injúria e agregam-se a outras plaquetas, formando um tampão plaquetário, que busca obstruir a lesão vascular. A primeira reação das plaquetas em contato com superfícies não revestidas por endotélio, mesmo que de natureza biológica, é a adesão. O contato ativa as plaquetas que, imediatamente, aderem à superfície não endotelial. A seguir, as plaquetas

intumescem, assumem formas irregulares com prolongamentos ou pseudópodos, tornam-se pegajosas, secretam e liberam grandes quantidades de produtos, dentre os quais o difosfato de adenosina (ADP), a serotonina e o tromboxano A<sub>2</sub>. A presença da trombina contribui para acelerar a agregação das plaquetas, enquanto o tromboxano A<sub>2</sub> atua sobre as plaquetas próximas, agregando-as às plaquetas anteriormente ativadas, para continuar a formação do grumo plaquetário (THE PLATELET GEL NETWORK, 2002).

O número de plaquetas no local da ruptura do vaso é continuamente aumentado, reforçando a consistência do tampão plaquetário, para evitar o sangramento. O tampão plaquetário, embora seja um agregado frouxo de plaquetas, pode interromper o sangramento, se o orifício do vaso lesado for pequeno. Nas lesões maiores, contudo, torna-se necessária a formação de um coágulo sanguíneo, para completar a hemostasia. O grumo ou tampão plaquetário não oclui o vaso, apenas veda o orifício na sua parede. A serotonina liberada pelas plaquetas contribui para manter a vasoconstrição. A conversão do trifosfato de adenosina em difosfato, libera energia para produzir e manter a agregação das plaquetas. O fator IV plaquetário (cálcio) inibe a atividade anticoagulante da heparina liberada pelos mastócitos, para preservar o grumo e possibilitar a formação do coágulo (GUYTON; HALL, 1997).

#### 2.2.1.3 Formação do coágulo

A modificação de um conjunto de proteínas do plasma constitui o mecanismo final da hemostasia, que forma um coágulo no local da injúria do vaso. Substâncias da parede vascular lesada, das plaquetas e proteínas plasmáticas aderem ao local da lesão, iniciando o processo de coagulação do sangue. O coágulo é resultado de alterações complexas de um conjunto de proteínas do plasma, cuja etapa final é a transformação do fibrinogênio em fibrina. A fibrina é a matriz protéica do coágulo; forma um emaranhado a uma rede, na qual ficam retidas as plaquetas e células vermelhas que participam da composição do coágulo. O conjunto de proteínas plasmáticas que determina a

formação do coágulo é o sistema de coagulação. Após qualquer injúria da parede vascular, um coágulo começa a ser formado em 15 a 20 s. Em cerca de 3 a 6 min, a lesão do vaso é completamente ocluída pelo coágulo. Pouco tempo após sua formação completa, o coágulo se retrai. Este mecanismo força a aproximação das bordas da lesão do vaso, à qual o coágulo se encontra aderido, reforçando a hemostasia. Posteriormente o coágulo sofre o processo de organização, que consiste na invasão de fibroblastos, para formar o tecido conjuntivo cicatricial. O coágulo pode também ser dissolvido, como resultado da ação de enzimas proteolíticas. Em geral, ambos os mecanismos coexistem; o mais precoce é a lise ou dissolução de parte do coágulo, enquanto a sua organização completa em tecido conjuntivo fibroso demora de 5 a 10 dias (PERFUSION LINE, 2002).

### 2.2.2 Fatores da coagulação

O processo completo da coagulação do sangue envolve a participação de um grande número de substâncias, possivelmente mais de 50, identificadas no sangue e nos tecidos. Algumas dessas substâncias promovem a coagulação e são denominadas pró-coagulantes enquanto outras, inibem a coagulação, sendo denominadas anticoagulantes. Nas condições normais da circulação sanguínea, predomina a ação das substâncias anticoagulantes e o sangue se mantém líquido. Quando um vaso se rompe, a atividade dos pró-coagulantes torna-se predominante e se desenvolve o coágulo. (GUYTON; HALL, 1997).

A formação do coágulo ocorre em três etapas principais: um complexo de substâncias, denominado ativador da protrombina, é formado em resposta à ruptura de um vaso. O ativador da protrombina converte a protrombina em trombina. A trombina atua como uma enzima, para converter o fibrinogênio em filamentos de fibrina, que retém as plaquetas, hemácias e plasma, formando o coágulo propriamente dito. A formação do ativador da protrombina é o elemento principal no desencadeamento das reações que levam à formação do coágulo. A protrombina é uma proteína plasmática com peso molecular de

68.700 Dalton. Sua concentração no sangue é de 15 mg/100 ml. A protrombina é produzida no fígado, com utilização da vitamina K. A falta de vitamina K ou a existência de doenças hepáticas, podem impedir a formação da protrombina. Quando isso ocorre, a concentração plasmática da protrombina é baixa e pode tornar o indivíduo propenso a hemorragias (PERFUSION LINE, 2002).

A trombina é um fragmento da protrombina e tem o peso molecular de 33.700 Dalton. A velocidade de aparecimento da trombina depende do ativador da protrombina e do grau de trauma no vaso; o processo da coagulação depende da quantidade de trombina presente na circulação. A formação do coágulo de fibrina é iniciada pela ativação de proteínas que constituem um sistema complexo e não inteiramente conhecido, o sistema de coagulação. (GUYTON; HALL, 1997).

A formação do coágulo de fibrina é iniciada pela ação dos fatores da coagulação que são proteínas que atuam com reações em cadeia, em que uma reação desperta ou acelera a reação seguinte, "em cascata". Esses fatores são representados internacionalmente, por algarismos romanos. Eles reagem em cadeia, em uma determinada seqüência, diferente da sua seqüência numérica que representa simplesmente a ordem em que foram descobertos. O QUADRO 1 lista os fatores da coagulação na ordem numérica, acompanhados dos nomes pelos quais são mais conhecidos. A relação não inclui o fator VI, que ainda não foi identificado (PERFUSION LINE, 2002).

<b>Fatores</b>	<b>Sinônimos</b>
<b>Fator I</b>	<b>Fibrinogênio</b>
<b>Fator II</b>	<b>Protrombina</b>
<b>Fator III</b>	<b>Tromboplastina tecidual (Fator plaquetário III)</b>
<b>Fator IV</b>	<b>Cálcio</b>
<b>Fator V</b>	<b>Pró-acelerina</b>
<b>Fator VII</b>	<b>Acelerador da Pró-trombina, Pró-convertina</b>
<b>Fator VIII</b>	<b>Fator Anti-hemofílico A (FAH)</b>
<b>Fator IX</b>	<b>Fator Anti-hemofílico B (Fator Christmas)</b>
<b>Fator X</b>	<b>Fator Stuart-Prower (Anti-hemofílico C)</b>
<b>Fator XI</b>	<b>Precursor da Tromboplastina plasmática</b>
<b>Fator XII</b>	<b>Fator Hageman (Fator Anti-hemofílico D)</b>
<b>Fator XIII</b>	<b>Fator estabilizador da fibrina</b>

Quadro 1 – Fatores da Coagulação

### 2.2.3 Mecanismos da coagulação

Conforme a natureza do estímulo desencadeador, os mecanismos da coagulação do sangue, podem ocorrer seguindo duas vias distintas, conhecidas como via intrínseca e via extrínseca. As duas vias podem ser ativadas simultânea ou separadamente.

#### 2.2.3.1 Via extrínseca

A via extrínseca é a mais comum, ela ocorre pela lesão de vasos sanguíneos ou a partir de estímulos tissulares. Na via extrínseca, uma substância dos tecidos, a tromboplastina, é liberada no local da injúria do endotélio vascular e desencadeia as reações da coagulação. A tromboplastina tecidual ou fator III, se combina com o fator VII (acelerador da conversão da protrombina do soro), na presença do fator IV (cálcio), para ativar o fator X (Stuart-Prower), conforme FIG. 4 (PERFUSION LINE, 2002).

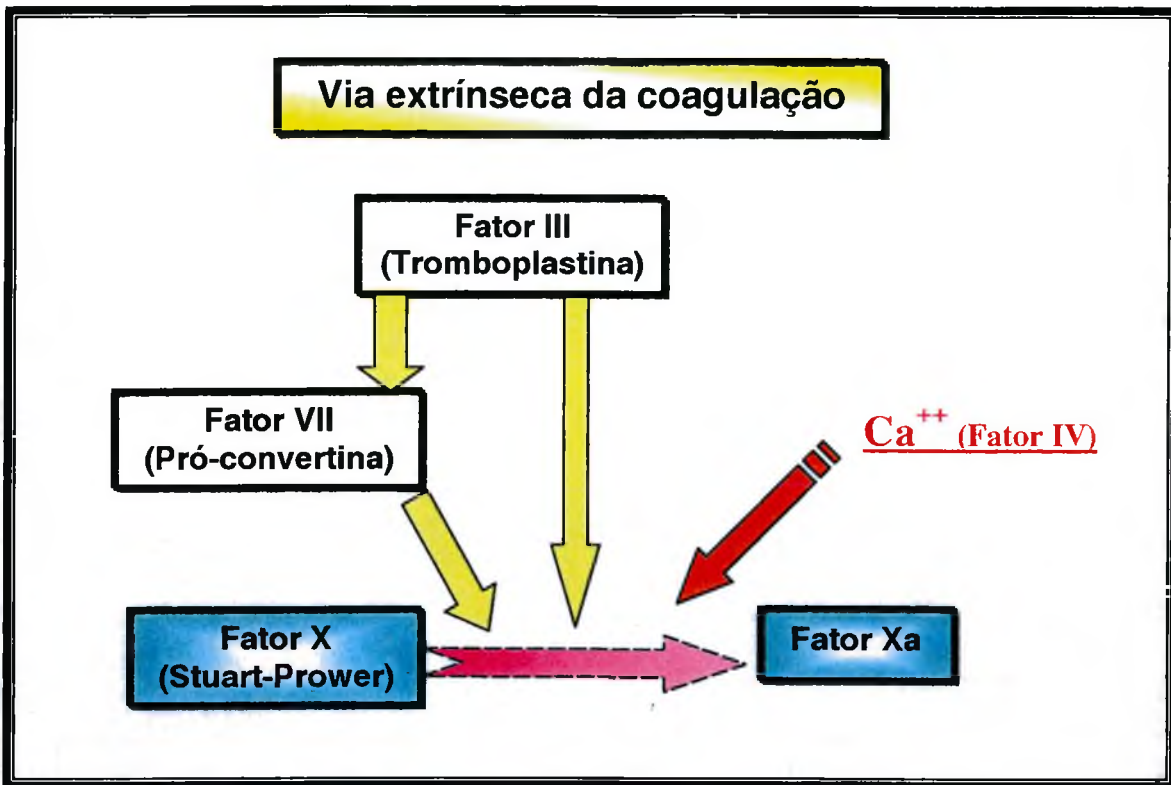


Figura 4 - Esquema da via extrínseca da coagulação  
 Fonte - Gayton e Hall (1997)

### 2.2.3.2 Via intrínseca

A via intrínseca envolve a ativação de um fator existente no sangue, o fator Hageman (fator XII), também conhecido como fator de ativação pelo contato. Este fator se ativa ao contato com qualquer superfície que não seja o endotélio vascular e, em seguida ativa o fator XI. Ambos os fatores forçam a ativação do fator IX que, uma vez ativado, converte o fator VIII (fator anti-hemofílico) à sua forma ativa, que forma um complexo com o cálcio e um fosfolípido (fator plaquetário III). Este complexo do fator VIII, cálcio e o fosfolípido, ativa o fator X, conforme está demonstrado na FIG. 5 (GUYTON; HALL, 1997).

As vias extrínseca e intrínseca de ativação da coagulação iniciam-se a partir de estímulos diferentes, mas convergem na ativação do fator X. O resultado da ativação da via extrínseca ou da via intrínseca é o mesmo, a presença do fator

X ativado. A via extrínseca é mais veloz que a intrínseca. A partir da ativação do fator X em ambas as vias, extrínseca e intrínseca, seguem a mesma via comum de estimulação, até a formação do coágulo final (FIG. 6). O fator X ativado, juntamente com o fator V (pró-acelerina), o fator IV (Cálcio) e o fosfolípido convertem o fator II (protrombina) em trombina. A trombina estimula uma série de reações, como a agregação plaquetária, a liberação de serotonina, ADP e do fator plaquetário 4. Contudo, a ação mais importante da trombina ocorre sobre o fator I (fibrinogênio). A trombina fragmenta o fibrinogênio em um monômero da fibrina e dois outros peptídeos, os fibrinopeptídeos A e B. Os monômeros da fibrina se unem para formar os filamentos de fibrina, através de um processo de polimerização. Os filamentos de fibrina aderem entre si, estimulados pelo fator XIII (fator estabilizador da fibrina), que exige a presença da trombina e do cálcio. A malha de fibrina resultante engloba plaquetas, hemácias e plasma, formando o coágulo definitivo (PERFUSION LINE, 2002).

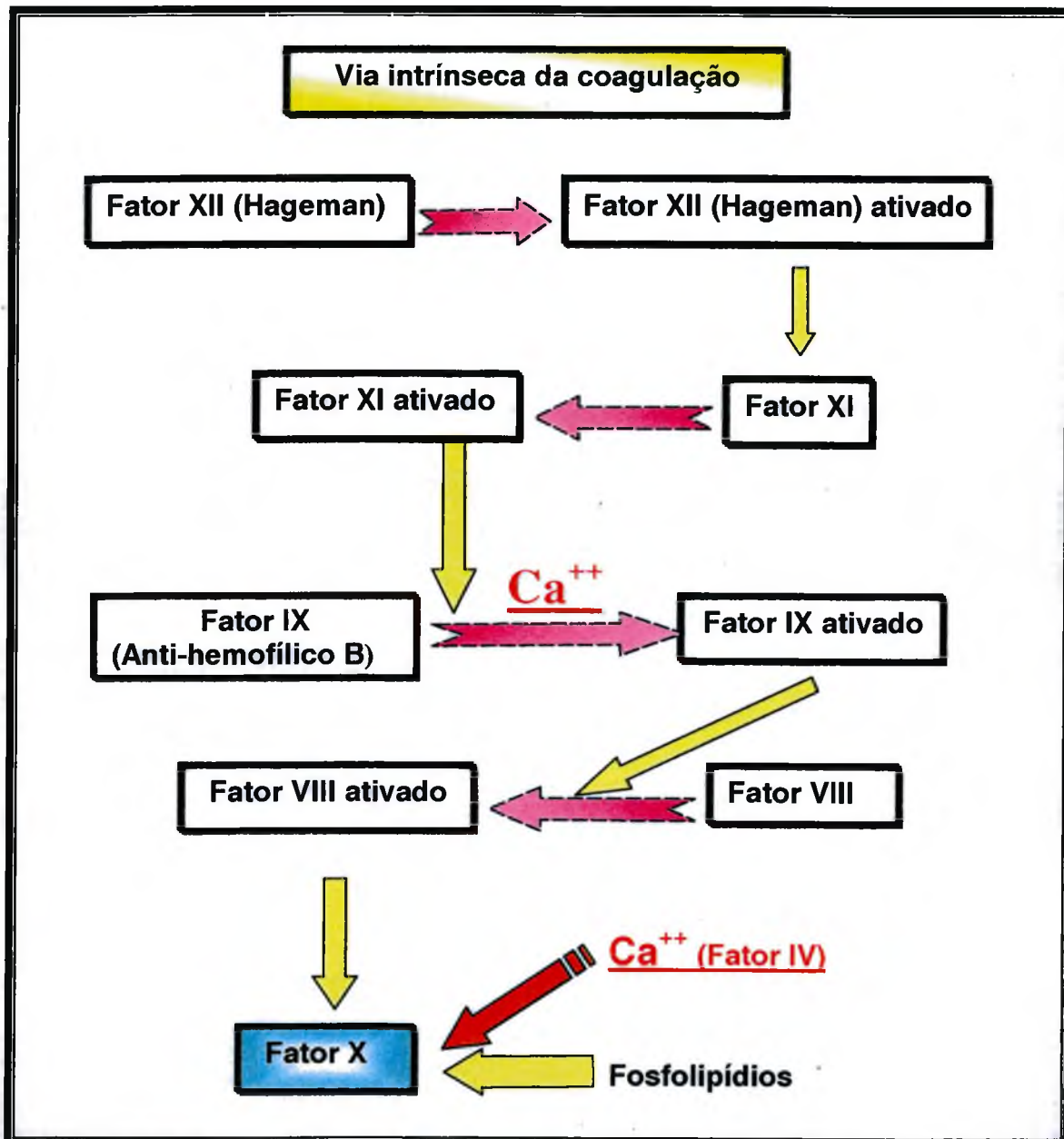


Figura 5 - Esquema da via intrínseca da coagulação.  
Fonte - Guyton e Hall (1997)



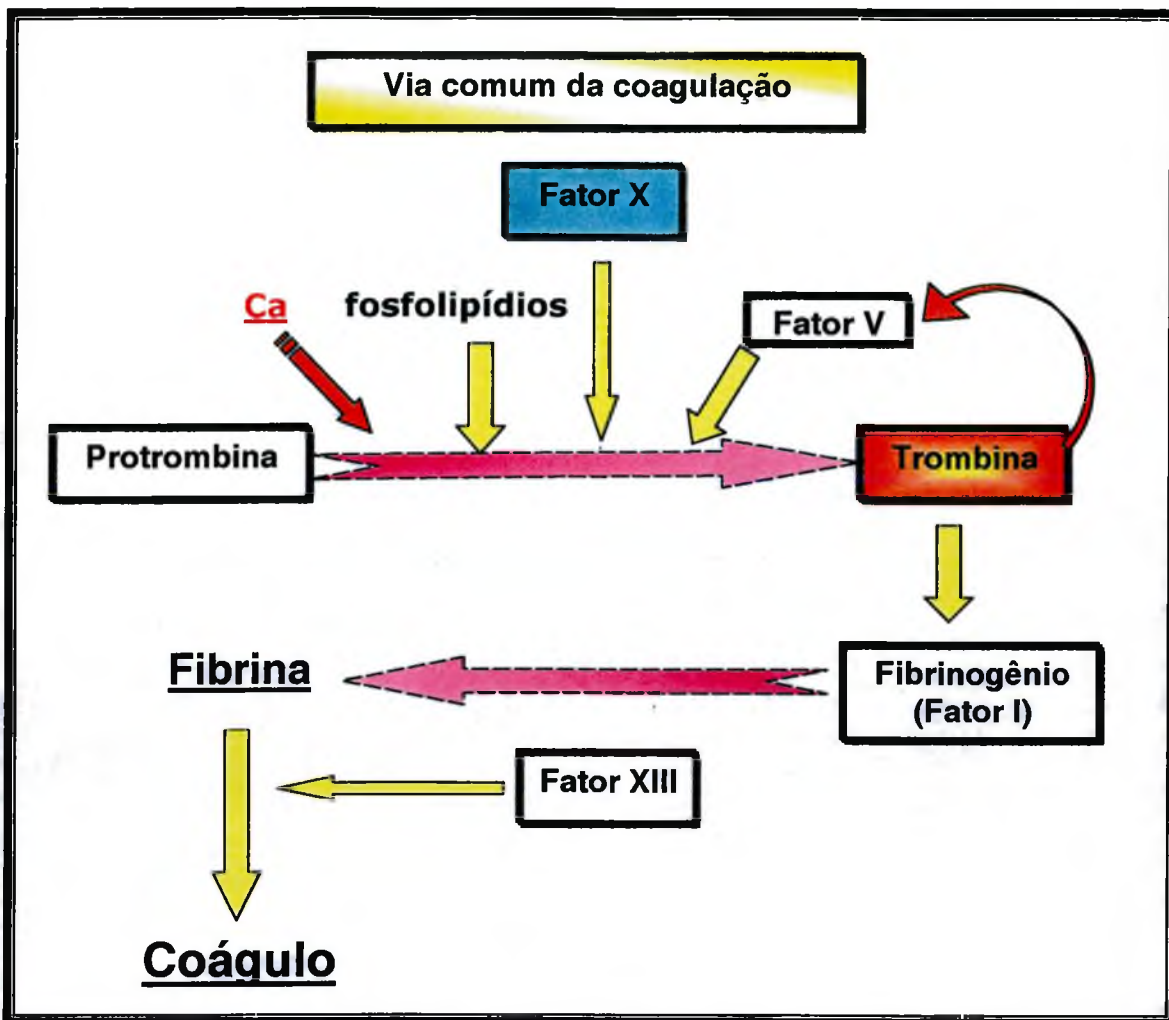


Figura 6 - Esquema da via comum da coagulação  
 Fonte - Gayton e Hall (1997)

A polimerização da fibrina é fruto da reação catalisada pelo fator XIII ativado, que se comporta como uma amidase. A fibrina polimerizada é insolúvel, arruma-se formando um retículo que aprisiona células do sangue, formando um tampão ou coágulo, cujo objetivo original seria o fechamento de uma solução de continuidade na parede do vaso. As plaquetas retidas no interior dos coágulos liberam certas substâncias pró-coagulantes. À medida que o coágulo se retrai, as bordas dos vasos sanguíneos rompidos aproximam-se, para o final da hemostasia. Uma vez formado, o coágulo pode se estender ao sangue circundante; o próprio coágulo pode iniciar um ciclo vicioso e promover mais coagulação. Uma das causas desse fenômeno é a ação

proteolítica da trombina sobre diversos fatores da coagulação, além do fibrinogênio. A trombina possui um efeito proteolítico direto sobre a protrombina, que induz a formação de mais trombina. Isto não ocorre regularmente no interior dos vasos porque o fluxo sanguíneo remove a trombina e outros pró-coagulantes, liberados durante o processo de coagulação, com grande rapidez. Pode ocorrer, contudo, com o sangue extravasado para a cavidade abdominal, o pericárdio, o mediastino ou a pleura. O sistema fibrinolítico, que dissolve os coágulos formados é incorporado ao sistema de hemostasia. A fibrinólise (dissolução do coágulo) depende do plasminogênio ou da pró-fibrinolisa, uma globulina que, quando ativada, transforma-se em plasmina. A plasmina é uma enzima que digere os filamentos de fibrina e outras substâncias como o fibrinogênio, o fator V, o fator VIII, a protrombina e o fator XII (GUYTON; HALL, 1997).

Os mecanismos intrínseco e extrínseco da coagulação do sangue, são ativados simultaneamente, após a ruptura de um vaso sanguíneo. Os fosfolipídios teciduais e o próprio tecido do local da ruptura, ativam o sistema extrínseco. O fator XII, as plaquetas e o colágeno da parede vascular ativam o mecanismo intrínseco (PERFUSION LINE, 2002).

Segundo Guyton e Hall (1997) quando coloca-se sangue em um tubo de ensaio, somente o mecanismo intrínseco desencadeia a coagulação; o vidro das paredes do tubo de ensaio ativa o fator XII e as plaquetas promovendo a formação do coágulo em cerca de 6 min. Em recipientes siliconizados geralmente este período é de 1 h ou mais. Algumas reações antígeno-anticorpo e certos tipos de medicamentos podem gerar coagulação intravascular, por ativação do mecanismo intrínseco. A principal diferença entre os dois mecanismos é que a via intrínseca é mais lenta que a extrínseca. Esta última se acelera de acordo com a quantidade de fosfolipídios liberados no tecido lesado e pelos fatores X, VIII e V presentes no sangue. O mecanismo intrínseco também pode ser bloqueado por certos inibidores da coagulação (anticoagulantes), como o warfarin. Estas drogas se caracterizam pelo efeito

depressor da formação hepática da protrombina. Após a administração do warfarin a atividade da coagulação do sangue se reduz à cerca de 40% a 50% do normal. A normalização da coagulação ocorre entre 1 e 3 dias, após a suspensão da droga. A heparina atua no sistema de coagulação, impedindo a ação da trombina sobre o fibrinogênio, mediante a formação de um complexo heparina-antitrombina III.

A presença do cálcio também é fundamental para a ativação do fator X que irá, junto com fator V, fosfolípidios e também o cálcio converter a protrombina em trombina, fornecendo naturalmente esta enzima para a continuidade das reações de formação do coágulo que culminam em transformar o fibrinogênio em uma complexa rede de fibrina (KORDICH; AVALOS; VIDAL, 1990).

Como o processo da coagulação é basicamente uma atividade enzimática, a temperatura tem importante influencia nas reações químicas envolvidas (OTTAWAY; APPS, 1986; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996).

### **2.3 Plasma rico em plaquetas: características e aplicação clínica**

A medicina vem utilizando materiais autólogos como auxiliares no processo de regeneração tecidual com muito sucesso. O baixo risco de rejeição e contaminações fazem das técnicas que utilizam materiais extraídos do mesmo indivíduo (autólogos) uma das melhores alternativas do cirurgião que almeja uma regeneração tecidual próxima da ideal. O gel de plaquetas está no grupo de materiais cada vez mais procurados pela medicina e também na odontologia, devido principalmente às suas características, é um produto atóxico, não imunorreativo (porque é obtido a partir do sangue da própria pessoa) e de baixa morbidade (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997).

O potencial indutor da regeneração óssea e suas propriedades regenerativas organizando a seqüência da cicatrização, é dada

fundamentalmente pelos fatores de crescimento contidos no gel de plaquetas. Com base nos achados histológicos, químicos e clínicos é necessário esclarecer o seu uso racional, bem como evidenciar suas vantagens e desvantagens em relação às técnicas similares.

### 2.3.1 Definição

O plasma rico em plaquetas é um material autólogo obtido através de um processo de centrifugação do sangue onde ele é separado do restante do sangue (eritrócitos e plasma pobre em plaquetas). Podemos dizer também que é uma modificação da fibrina adesiva. É preparado por coleta de sangue no período pré-operatório e é processado usando um conjunto de operações. Esta preparação caracteriza-se pelo uso de sangue autólogo, da própria pessoa, manipulado mecanicamente do qual é separada a fração de plasma rico em plaquetas (PRP) e originalmente rica em fatores de crescimento. Uma vez separada, esta fração recebe um agente coagulante para conferir ao material a consistência semelhante a gel, ideal para a sua manipulação e inserção na ferida cirúrgica ( DELWICHE et al. 1985); (HOOD; HILL; REEDER, 1993).

Na hematologia, plasma rico em plaquetas é aquele obtido a partir de uma única centrifugação do sangue total. Quando este plasma rico em plaquetas é submetido à nova centrifugação, uma concentração maior de plaquetas é obtida e passa a ser chamado de concentrado plaquetário<sup>2</sup> (Informação verbal). É este concentrado plaquetário que é normalmente utilizado em procedimentos odontológicos. Porém, o termo plasma rico em plaquetas (PRP) está tão difundido na odontologia que vamos utilizar neste trabalho a designação de PRP quando na realidade está sendo utilizado na maioria das vezes um concentrado plaquetário (o produto obtido ao final de duas centrifugações).

---

<sup>2</sup>MACHADO, A. M. B. Comunicação pessoal, 2002

### 2.3.2 Composição química

O plasma rico em plaquetas contém em sua composição química três componentes básicos: plasma, leucócitos e plaquetas. Existe no coágulo sanguíneo, normalmente, uma proporção de 95% de células vermelhas, 5% de plaquetas e menos que 1% de células brancas (GRAF. 1 e FIG. 7). O coágulo melhorado com PRP contém 4% de células vermelhas, 95% de plaquetas e 1% de células brancas (GRAF. 2 e FIG. 8)(MARX; GARG, 2002).

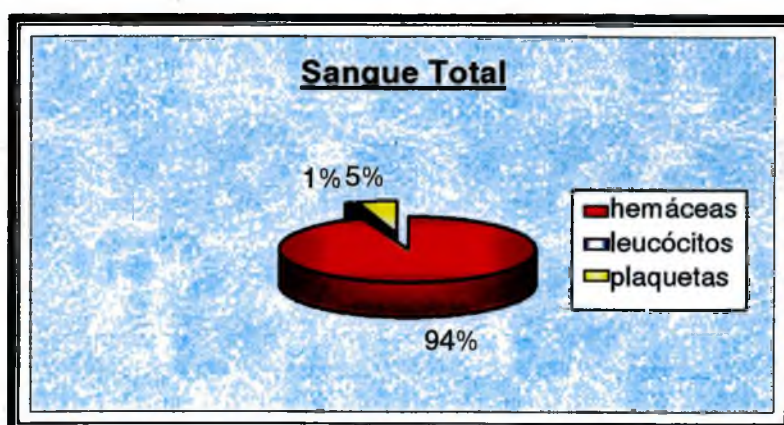


Gráfico 1. Elementos constituintes do Sangue Total.  
Fonte - Marx e Garg (2002)

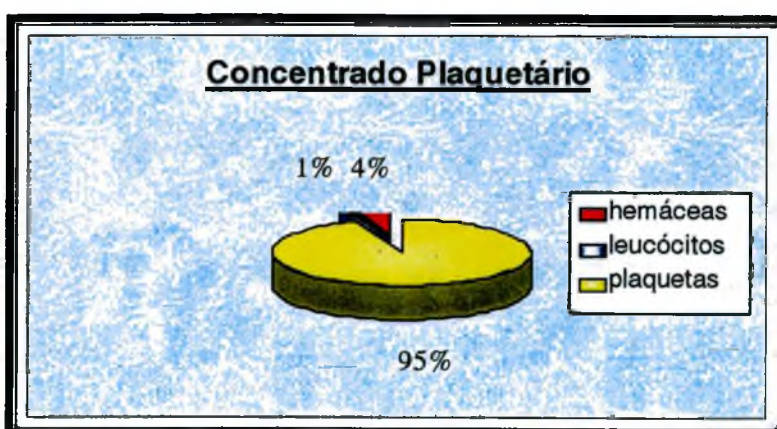


Gráfico 2. Elementos constituintes do Concentrado Plaquetário.  
Fonte - Marx e Garg (2002)

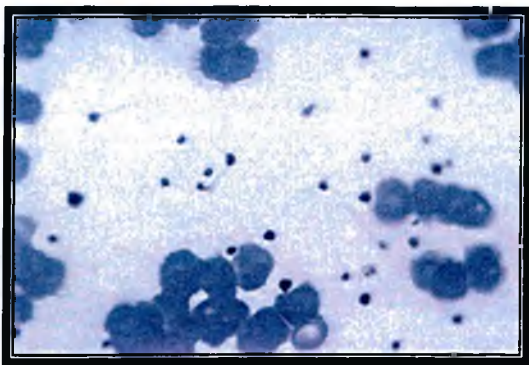


Figura 7- Contagem das plaquetas no sangue total: 225.000 plaquetas por  $\mu\text{l}$

Fonte: Marx e Garg (2002)

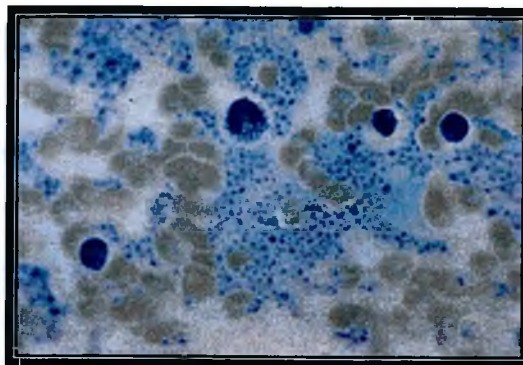


Figura 8- Contagem das plaquetas no concentrado plaquetário: 1.400.000 plaquetas por  $\mu\text{l}$ .

### 2.3.2.1 Plasma

Segundo Marx e Garg (2002) encontramos no plasma sanguíneo o soro sanguíneo e os diversos fatores de coagulação descritos na seção 2.2.2. Ele pode apresentar variações de volume e osmolaridade. Seus eletrólitos mais abundantes são sódio, cloreto e bicarbonato.

### 2.3.2.2 Leucócitos

Os leucócitos estão presentes também no plasma rico em plaquetas, o que lhe confere uma resistência natural aos processos infecciosos, melhorando o prognóstico do tratamento (SCARSO FILHO et al., 2001).

Todos os leucócitos têm seu papel bem definido no restabelecimento da homeostasia tecidual (seção 2.1.2), porém, o macrófago é de fundamental importância na manutenção destes eventos uma vez que além de fagocitarem partículas estranhas também são responsáveis pela produção de fatores de crescimento após a degradação das plaquetas. Quando estas células estão na corrente sanguínea, recebem o nome de monócitos e têm a capacidade de emitir e retrair pseudópodos, são portanto móveis e tendem a abandonar a corrente sanguínea e ingressar nos tecidos quando ocorre alguma injúria conforme as colocações que serão descritas na seção 2.3.3.1.

### 2.3.2.3 Plaquetas

As plaquetas são oriundas da porção citoplasmática dos megacariócitos medulares. (MARX; GARG, 2002). Estes, por sua vez originam-se da diferenciação de uma célula precursora através de um modo de divisão e de maturação único, a endomitose. O núcleo se multiplica sem que a célula se divida. Assim, se o número de cromossomos da célula precursora é 2N, os megacariócitos tornam-se sucessivamente 4N, 8N, 16N, 32N, 64N e, ao mesmo tempo em que o citoplasma cresce, as plaquetas vão sendo liberadas (THE PLATELET GEL NETWORK, 2002).

As plaquetas, portanto, não têm núcleo para duplicação e duram de 5 a 9 dias. (MARX; GARG, 2002).

Elas têm o aspecto de pequenos discos de  $3\mu$  de diâmetro e  $1\mu$  de espessura separados uns dos outros e distantes da parede vascular, à qual eles não aderem (FIG. 9 e FIG 10). São células secretoras, sem núcleo, então incapazes de síntese. Estas células são constituídas de: grânulos densos, grânulos mais claros ou alfa-grânulos e outras organelas. Todos esses elementos estão contidos no citoplasma envolto por uma membrana plasmática; as glicoproteínas estão na parte mais externa da membrana. A trombocitopoese é regulada por um fator presente no soro: a trombopoetina. Esse fator de crescimento hematopoético é produzido principalmente pelo fígado e pelo rim. Ele é regulado passivamente pela taxa de seu receptor (Mpl), então pela massa megacariócito-plaquetária. Outros fatores de crescimento hematopoéticos (IL3, IL6) atuam igualmente, mas quantitativamente de forma mais acessória. A destruição das plaquetas ocorre no baço e no fígado, principalmente (GUYTON; HALL, 1997).

Num indivíduo normal a concentração plasmática das plaquetas é de 150 a  $300 \times 10^3$  por milímetro cúbico de sangue. As plaquetas têm numerosas funções (haja vista o grande número de elementos constituintes) mas nem

todas estão identificadas. As principais funções estão relacionadas à hemostasia e à coagulação, mas atuam igualmente na resposta inflamatória por ativação dos fatores quimiotáticos e pela secreção de aminas vasopressoras; carregam estas aminas vasopressoras na circulação; têm função de fagocitose, podendo eliminar pequenas partículas e bactérias; participam da retração do coágulo por intermédio de uma proteína contrátil, a trombostenina; e também parecem ter um papel protetor do endotélio. Estas funções estão diretamente relacionadas com o conteúdo citoplasmático das plaquetas. Os grânulos densos contêm: serotonina, adrenalina, noradrenalina, ADP e ATP. Os alfa-grânulos contêm: fibrinogênio, o fator de Willebrand, o fator 4 (PF4) ou fator anti-heparina, fatores de crescimento, a beta-tromboglobulina e muito mais proteínas. As organelas presentes são: microtúbulos, microfilamentos, lisossomos, grânulos de glicogênio e às vezes complexo de golgi (THE PLATELET GEL NETWORK, 2002).

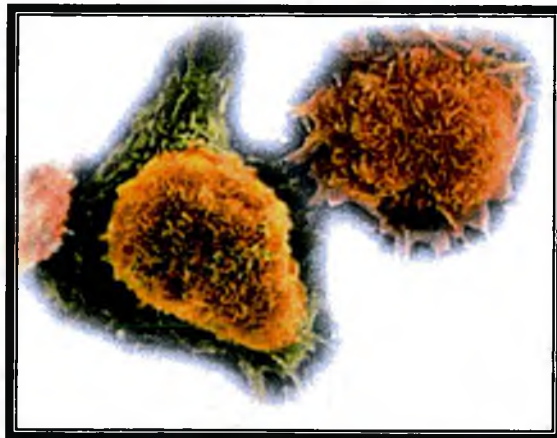
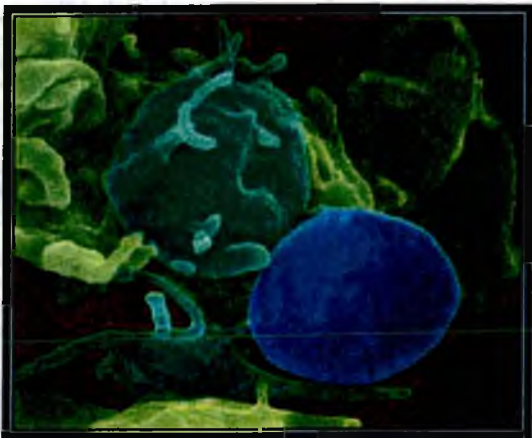


Figura 9- Plaquetas iniciando a ativação. Figura 10- Plaquetas ativada.  
Fonte- The Platelet Gel Network (2002).

### 2.3.3 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são polipeptídios de ação local, que tem sido isolados na matriz óssea, sugerindo que os mesmos sejam sintetizados pelas células ósseas ou, ao menos, nelas armazenados. Eles também são



encontrados em outros locais no organismo como nos grânulos alfa-plaquetários das plaquetas. Estes polipeptídios, entretanto, tem grande influência no metabolismo tecidual principalmente nos seus processos de reparação. O que é curioso, entretanto, é que estudos têm mostrado que alguns fatores de crescimento promovem o crescimento ósseo com maior intensidade quando agem juntos do que separadamente. É o que demonstra uma experiência utilizando-se uma combinação de IGF-I e PDGF-B aplicada em culturas de calvária de ratos. (PFEILSHIFTER et al. 1990)

O esquema de formação óssea é controlado por hormônios sistêmicos e fatores locais. Geralmente os reguladores locais de formação óssea são os fatores de crescimento que agem diretamente nos osteoblastos. Estes fatores locais podem ter influência sobre as células de origem ou diferentes células, ativando-as desta maneira em consequência dos fatores autócrinos ou parácrinos, respectivamente.

Em resumo, os fatores de crescimento que regulam a formação óssea têm algumas características comuns:

- a) eles são polipeptídios;
- b) eles exercem suas atividades por ligação para receptores;
- c) eles primeiramente têm ação local;
- d) eles são produtos naturais das células; e
- e) eles são multifuncionais, podem estimular uma ampla variedade de atividades celulares (SCHWARTZ et al. 1998).

Acredita-se que muitas situações clínicas vão ser beneficiadas com o domínio do mecanismo de ação dos fatores de crescimento. É o caso dos pacientes tabagistas. A administração de nicotina atrapalha a incorporação do enxerto artificial e deprime a cicatrização do local doador em experimentos com ratos. O aprimoramento da regeneração óssea através de fatores de crescimento pode compensar alguns impactos da adversidade da nicotina (LU; CURRIER; YASZEMSKI, 2000).

### 2.3.3.1 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é uma glicoproteína sintetizada pelos grânulos alfa-plaquetários e promovem a iniciação do ciclo celular e subseqüentemente a divisão celular. A proteína básica do PDGF é um "disulfide-linked dimer" composto por duas distintas, mas homólogas cadeias de polipeptídios, A e B. Ele é estável ao calor, a pH extremo e muitas proteinases. O PDGF existe, *in vivo*, na forma de homodimer e heterodimer, e são ambos biologicamente ativos. A forma heterodimer (PDGF-AB) é predominante nas plaquetas humanas. O PDGF interage com as células alvo através de união não-covalente em receptor de membrana que tem alta afinidade e seletividade por PDGF. Estes receptores têm sido identificados em fibroblastos, células musculares lisas, células da neuroglia e condrócitos. Os receptores de PDGF consistem de subunidades alfa e beta que estão presentes em número variado em diferentes tipos de células. As duas cadeias de PDGF dímeros ligam a molécula receptora, resultando na dimerização de subunidades de receptores. A dimerização do receptor pode ser requerida para a transmissão do sinal mitogênico. O número total de receptores e a porção de receptores alfa e beta nas células podem ser importantes na determinação e resposta dependente para diferentes isoformas. Isto pode acionar uma atuação na regulação das isoformas de PDGF. (HOSGOOD, 1993).

As plaquetas são a grande fonte de PDGF, mas macrófagos e fibroblastos também secretam PDGF. Este fator de crescimento é quimiotático para monócitos, neutrófilos e fibroblastos. Segundo Howes et al. (1988) ele é mitogênico para células mesenquimais e, de acordo com Hosgood (1993), estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos, provavelmente através de mecanismos indiretos. Os macrófagos e fibroblastos que secretam o PDGF podem ser ativados por ele, estabelecendo um feedback autócrino positivo dentro da ferida que amplia o sinal inicial dos derivados de plaqueta e dispara a liberação de fatores de crescimento e matriz protéica extracelular necessária

para a cicatrização da ferida. Além do mais, PDGF também estimula a colagenase, requerida para a remodelação do colágeno na ferida.

O PDGF é armazenado nas plaquetas e também produzido pelos macrófagos. Tem as características de um hormônio local, o qual participa no aumento do número de células mesenquimais na ferida. Em uma cicatrização padrão, num primeiro momento as plaquetas se agregam na ferida, depois elas liberam o PDGF difusamente dentro dos tecidos vizinhos que por quimiotaxia recrutam células para dentro da ferida. O alto nível de PDGF aumenta, por si só, a proliferação das células presentes no local do reparo. Este fator de crescimento tem uma grande atividade por ser mitogênico e quimiotático, podendo acelerar o crescimento mesenquimal inicial. Desta maneira o PDGF regula o número de células da ferida e a deposição de matriz. Em estudos histológicos realizados em experimentos com ratos, a análise dos resultados sugere que o PDGF realça a continuação dos eventos em vez de mudar a seqüência das reações (HOWES et al., 1988).

Através de uma pesquisa controlada, Delwiche et al. (1985) analisaram várias concentrações do PDGF obtidas através do processo de centrifugação sanguínea. O objetivo da pesquisa foi avaliar a influência do potencial eritropoiético do PDGF *in vitro* sobre células mesenquimas provenientes da medula óssea de crista ilíaca de doadores voluntários sadios. Em seus experimentos foi possível demonstrar que o PDGF exerce influência em vários tipos de células, não somente sobre as mesenquimais, mas também sobre fibroblastos, células musculares, endoteliais e progenitoras hematopoiéticas, assim como que o nível de concentração deste fator de crescimento tem influência direta sobre a redução parcial do crescimento ou a explosão do mesmo.

Utilizando-se uma matriz óssea desmineralizada como base, Howes et al. (1988) estudaram o efeito da suplementação com fatores de crescimento neste material osseointutor e, de acordo com seus achados, suplementos de PDGF

tem pequeno ou nenhum efeito na formação de cartilagem e osso em ratos jovens, indicando que o reparo pode estar maximizado. Entretanto, PDGF aumenta a cartilagem e a formação óssea em implantes colocados em ratos velhos, onde este processo foi a metade que o observado nos animais jovens. Em experimentos com ratos velhos, onde a reparação do defeito ósseo não se encontra maximizada, esta condição pode ser conseguida com a suplementação local de PDGF.

Em culturas de calvária de ratos neonatais intactos e populações de células osteoblásticas enriquecidas, o PDGF estimula a formação de células ósseas (CANALIS; MCCARTHY; CENTRELLA, 1989).

Através de um estudo com cachorros beagle jovens Lynch et al. (1991) verificaram o desempenho da combinação entre PDGF-B e IGF-I no crescimento ósseo da interface osso-implante dentário de titânio. Dentre os achados favoráveis encontra-se: o aumento da quantidade de osso em contato com o implante (em 7 dias); um aumento da neoformação óssea, preenchendo os espaços perimplantares (em 7 e 21 dias). Os autores também sugeriram que esta combinação de fatores de crescimento também deve ser útil na aceleração da cicatrização de alvéolos de extração ou aumentando a altura de rebordos atróficos. Os achados também levam a acreditar que os efeitos desta combinação (PDGF-B/IGF-I) parecem mais prolongados em defeitos ósseos grandes, tal como nos espaços medulares perimplantares. Portanto, o uso clínico desta combinação ao redor de implantes dentais de titânio deve conduzir uma acelerada e elevada osseointegração de implantes dentais, particularmente em sítios com osso de pobre densidade.

### 2.3.3.2 Fator de crescimento de transformação (TGF- $\beta$ )

O fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ) é reconhecido por receptores altamente específicos que estão presentes em quase todo tipo de

célula. A maior origem de TGF- $\beta$  durante o reparo dos tecidos moles são os grânulos alfa-plaquetários e os macrófagos. O TGF- $\beta$  está presente no fluido da ferida e é quimiotático para monócitos, macrófagos e principalmente fibroblastos, causando melhora na síntese de matriz protéica extracelular incluindo fibronectina, colágeno e glicosaminoglicanos, diminui a secreção de proteinases e aumenta a secreção de inibidores de proteinase além de regular a produção de citocinas dos macrófagos. O TGF- $\beta$  é importante na formação embrionária de cartilagem e osso, entretanto grande quantidade de TGF- $\beta$  é encontrada em osso adulto. TGF- $\beta$  é um potente indutor de colágeno tipo II e proteoglicanos, componentes da matriz cartilaginosa extracelular. TGF- $\beta$  é mitogênico para osteoblastos e os estimula a produzir matriz extracelular. O aumento dos níveis de TGF- $\beta$  tem sido encontrado no calo de fraturas cicatrizadas. (HOSGOOD, 1993).

O fator de crescimento de transformação beta é um potente supressor da proliferação e função dos linfócitos. Ele é produzido pelas células T e B e é inibidor das interleucinas e outras citocinas que estimulam a função dos linfócitos. Existe, portanto, um mecanismo de feedback autócrino mediado pelo TGF- $\beta$  que inibe a proliferação de células T que são estimuladas pela interleucinas 1 ou 2, inibe a proliferação e a produção de anticorpos nas células B, deprime a ação citolítica natural das células killer e inibe a geração de citocinas das células T e a ativação de citocinas das células killer (HOSGOOD, 1993).

*In vitro*, concentrações de 5 ng/ml demonstraram ter propriedades inibidoras para a migração de fibroblastos, porém, resultado contrário é obtido quando esta concentração é aumentada ou diminuída. (FRAY; WOOD, 1996).

O TGF- $\beta$  é uma proteína que tem sido testada como um suplemento em matriz-indutora de osso desmineralizado e em experimentos preliminares parecem não aumentarem a formação óssea. Porém, o reparo dos tecidos moles pode ser aumentado com a presença do TGF- $\beta$  (HOWES et al., 1988).

Em geral TGF- $\beta$  é um fraco agente quimiotático, mas age diretamente sobre o fibroblasto, portanto é um agente potente na estimulação da síntese de fibronectina (HOSGOOD, G. 1993).

O TGF- $\beta$  associado ao PDGF parecem ser sinérgicos, sugerindo um possível evento ativador de receptores ou responsáveis por uma melhora da expressão do receptor de membrana das células alvo. (FRAY; WOOD, 1996).

O PDGF induz a atividade dos macrófagos na secreção de TGF- $\beta$ , *in vitro* e *in vivo*. O PDGF exógeno aparece para agir em parte através do recrutamento de macrófagos e através da síntese de TGF- $\beta$  endógeno para ativar a proliferação de fibroblastos e estimular a produção de colágeno. (FRAY; WOOD, 1996).

Nem PDGF ou TGF- $\beta$  alteram a seqüência normal do reparo, mas aumentam o ritmo e a quantidade de deposição de matriz extracelular, resultando no fechamento precoce da ferida. (HOSGOOD, 1993).

#### 2.3.3.3 Fator de crescimento semelhante à insulina- I e II (IGF – I e II)

Os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e IGF-II) são polipeptídios não-glicosados. A maior fonte de fator de crescimento semelhante à insulina-I é o fígado e portanto é o tecido alvo do hormônio de crescimento que regula a produção do fator de crescimento semelhante à insulina-I por este órgão (SCHWARTZ, et al. 1998). O IGF-I e IGF-II são secretados pelos osteoblastos durante a formação óssea para aumentar a osteogênese e acelerar a deposição óssea. (MARX, 1999; HOCK; CENTRELLA; CANALIS, 1988; GIANNOBILE, 1999; SCARSO FILHO, et al., 2001). Estes fatores de crescimento possuem pequenas massas moleculares de aproximadamente 7,7 Kd para IGF-I e 7,5 Kd para o IGF-II (MARX, 1999).

Cada um deles se adere a um receptor de membrana celular IGF específico, que estimula a atividade na mitogênese de células formadoras de osso (MARX, 1999; GIANNOBILE, 1999). Deste modo, os IGFs são mitogênicos para células de linhagem osteoblásticas e estimuladores da osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados já existentes (MARX, 1999; LYNCH; COLVIN; ANTONIADES, 1989).

Esta capacidade mitogênica quando avaliada sobre as células do ligamento periodontal é 10 vezes menor que a do PDGF, pois o IGF-I só atinge o máximo de seu efeito mitogênico em concentrações maiores que 100ng/ml (MATSUDA et al., 1992).

No entanto, Jiang et al. (1999) declararam que quando o IGF é testado com matriz inorgânica de osso bovino, demonstra uma capacidade de absorção que chega a ser 10 vezes maior que a do PDGF-B. Mostrando-se importante para o anabolismo do tecido ósseo.

Diversos estudos como os de Giannobile (1999) e Mohan e Baylink (1991) sugeriam que as IGFs, quando combinadas com outros fatores de crescimento, podem aumentar a osteogênese em processos cicatriciais, apresentam-se abundantes na matriz óssea e, a sua atividade de regulação mitogênica, ou do metabolismo ósseo parece ser dose/dependente. *In vitro*, IGF- I e II apresentam atividade quimiotática equivalente, ainda que o IGF-I parece exibir maior potência.

Os IGFs exercem múltiplos efeitos sobre o metabolismo ósseo, promovem a deposição de matriz óssea (GIANNOBILE, 1999) estimulam a mitogênese das células osteoblásticas e possuem atividades de quimiotaxia para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos. (CANALIS; MCCARTHY; CENTRELLA, 1980).

O IGF-I estimula a síntese de DNA e colágeno em culturas de calvária de rato neonatal, pela estimulação de células osteoprogenitoras e células osteoblásticas diferenciadas dentro da cultura (HOCK; CENTRELLA; CANALIS, 1988)

TGF- $\beta$  combinado com IGF não altera os resultados com TGF- $\beta$  sozinho em estudos com porcos (LYNCH; COLVIN; ANTONIADES, 1989).

Conforme já mencionado anteriormente, em cachorros a combinação entre PDGF-B e IGF-I aumenta a quantidade de osso em contato com o implante (em 7 dias); aumenta a neoformação óssea, preenchendo os espaços perimplantares (em 7 e 21 dias). Também sugere que esta combinação de fatores de crescimento (PDGF-B/IGF-I) parecem mais prolongados em defeitos ósseos grandes, tal como nos espaços medulares perimplantares. Portanto, o uso clínico desta combinação ao redor de implantes dentais de titânio deve conduzir uma acelerada e elevada osseointegração de implantes dentais, particularmente em sítios com osso de pobre densidade. (LYNCH et al., 1991).

#### 2.3.4 Protocolos de obtenção do gel de plaquetas

##### 2.3.4.1 Laboratório de análises clínicas ou bancos de sangue

Diferentemente da técnica para obtenção da cola de fibrina que requer uma doação autóloga 1 a 3 semanas antes da cirurgia, no processo de obtenção do gel de plaquetas, esta coleta pode ser realizada no pré – operatório imediato. (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997).

O protocolo que tem sido usado como base pela maioria dos pesquisadores é o descrito por Marx (1999) o qual será exposto a seguir. Este protocolo utiliza uma unidade de sangue de aproximadamente 450ml proveniente diretamente do paciente para a coleta. Este material é então remetido a uma bolsa de sangue padronizada e etiquetada, contendo um anticoagulante, o citrato -



fosfato – dextrose. Esta coleta pode ser feita na sala de preparação ou na sala cirúrgica por um técnico treinado ou enfermeiro. Utilizando-se um separador celular do tipo Electromedics 500 (Metronics), consegue-se a coleta em torno de 20 a 30 min em um tempo médio de 50ml por minuto, usando uma velocidade de centrifugação de 5600 rpm, enquanto o aparelho retira o sangue, ele adiciona o citrato de fosfato-dextrose a uma proporção de 1ml de citrato para cada 5ml de sangue. Quando o sangue é centrifugado, ele é separado em seus três componentes básicos devido à densidade. Do menos denso ao mais denso, o plasma pobre em plaquetas (PPP) sai primeiro, o plasma rico em plaquetas (PRP) sai em segundo, e as células vermelhas (RBC) mais densas saem por último. O componente PPP é composto de plasma acelular; ele conta com aproximadamente 200ml do volume e pode ser retornado ao paciente. O componente RBC, essencialmente um aglomerado de células vermelhas do sangue, conta com aproximadamente 180ml do volume e pode também ser retornado ao paciente. O componente PRP é plasma com um número concentrado de plaquetas e células brancas do sangue (glóbulos brancos). Tal componente conta com aproximadamente 70ml do volume.

Tanto o PPP como o PRP são frações do plasma. Entretanto, eles contêm fibrinogênio em abundância e fatores de coagulação. A formação de fibrina, embora não seja um fator de crescimento, irá produzir a matriz natural osteocondutora necessária na regeneração óssea (MARX, 1999).

Durante o processo de centrifugação a 5400 rpm, o PPP será separado primeiro. Uma vez coletado o PPP, a velocidade de centrifugação diminui para 2400 rpm para criar uma separação precisa do PRP das células vermelhas. Experiências clínicas indicam que os primeiros 1 a 3ml da camada de RBC contém as maiores e as mais recentes plaquetas sintetizadas. Portanto, esta camada de RBCs deverá ser incluída no PRP. Isto dará uma coloração vermelha ao PRP que apresentava antes uma coloração alaranjada. A aplicação clínica do PRP para enxertos de osso esponjoso medular exige que se inicie o processo de coagulação usando-se uma mistura de 10ml de cloreto

de cálcio a 10% com 10.000 unidades de trombina bovina tópica (GENTRAC). O protocolo específico para a aplicação de PRP nesta indicação requer uma seringa individual de 10ml para cada mistura. Cada mistura proporciona, na seqüência, 6ml de PRP, 1ml da mistura de cloreto de cálcio-trombina, e 1ml de ar para servir como bolhas de mistura. A seringa é agitada por 6 a 10 s para iniciar a coagulação (MARX, 1999).

O cloreto de cálcio é usado para neutralizar o efeito anticoagulante do citrato e a trombina bovina inicia a cascata de eventos da coagulação (MARX; GARG, 2002).

O gel de PRP desenvolvido por esta manipulação é adicionado ao enxerto em várias misturas. Uma nova seringa estéril é usada a cada mistura, pois mesmo uma pequena introdução de cloreto de cálcio e trombina no recipiente com PRP irão coagular o PRP remanescente. A introdução de uma ou duas misturas de PRP no material de enxerto antes que o material de enxerto seja colocado no leito receptor distribui o PRP e, conseqüentemente, seus fatores de crescimento por todo enxerto. Misturas adicionais são colocadas em camadas na superfície do enxerto uma vez que ele esteja em posição. A formação de fibrina do processo de PRP serve como uma cola de fibrina e agrega a medula esponjosa, antes solta, o que ajuda o cirurgião a modelar o enxerto. A rede de fibrina age como um arcabouço para a osteocondução por todo o enxerto após os fatores de crescimento do interior das plaquetas iniciarem a osteogênese (MARX, 1999).

Todo este protocolo, entretanto, está passando neste momento por uma profunda mudança, visto que novos estudos estão sendo publicados com o intuito de esclarecer as mudanças qualitativas e quantitativas que ocorrem no sangue quando se incorpora a ele substâncias anticoagulantes ou coagulantes. (HANDEL et. al., 2002).

Landesberg; Roy; Glickman (2000) defenderam a substituição do citrato de fosfato-dextrose pelo uso do EDTA como agente anticoagulante, bem como a utilização de uma preparação comercial pronta, o agente coagulante ITA (Natrex Technologies Inc, Greenville, NC) para promover a coagulação de PRP.

Marx (2000) porém, argumenta que ainda hoje o anticoagulante preferível é o citrato de fosfato-dextrose porque preserva a integridade da membrana das plaquetas, o que não ocorre com o EDTA, pois o mesmo fragmenta as plaquetas. Da mesma forma, mantém a preferência pelo cloreto de cálcio e trombina como agente coagulante à preparação comercial ITA, pois, uma vez que seus defensores não divulgam a sua composição química, assim como a maneira como é obtido, não se pode considerar seguro o uso de uma substância cujo método de elaboração é mantido em segredo.

Da mesma forma existem alguns clínicos e mesmo países que são contrários ao uso da trombina bovina para iniciar o processo de coagulação. Apesar da trombina bovina ser um material amplamente testado, existe a possibilidade de se misturar uma pequena quantidade de sangue autólogo ou mesmo de osso medular autógeno particulado junto ao PRP, pois, estes produtos contem os elementos necessários para se iniciar a cascata de eventos próprios da coagulação (MARX; GARG, 2002).

De acordo com Ramesh et al. (1990) os agentes coagulantes modificam o processo de cicatrização e por estas razões influencia o seu uso cirúrgico. Em um estudo com ratos a botropase foi comparada à trombina e a fibrina. Os resultados histológicos e bioquímicos mostraram que a botropase estimula todas as fases do reparo dos tecidos enquanto que a trombina atrasa a contração da ferida, porém, a fibrina não teve uma ação discernível.

#### 2.3.4.2 Consultório odontológico

Ocorre uma certa variação na literatura quanto à quantidade de sangue a ser retirada bem como os equipamentos utilizados para se fazer à separação celular. Devido ao rápido crescimento do uso do gel de plaquetas pelos cirurgiões, surgiram no mercado equipamentos que separam pouca quantidade de sangue (45 a 60ml de sangue; 5 a 6ml de PRP por ciclo) (MARX, 2000).

Desta forma, já é possível realizar a obtenção do PRP com um processo simplificado. Este método é executado em minicentrífugas preconizadas para uso em ambiente ambulatorial ou em consultórios odontológicos (ANITUA, E. 1999; SONNLEITNER; HUEMER; SULLIVAN, 2000).

Em geral um total de 10 a 20 ml de sangue coletado é distribuído em tubos de ensaio de 5 ml, contendo solução de citrato de trissódio a 10%. Os tubos são centrifugados a 160 G por 6 min, à temperatura ambiente, resultando em três componentes básicos: células vermelhas do sangue (fundo do tubo); plasma rico plaquetas (meio do tubo) e plasma pobre em plaquetas (topo do tubo). Em seguida, faz-se a coleta do plasma, incluindo de 1 a 2 mm da porção superior das células vermelhas do sangue. O volume de cerca de 1,2 ml por tubo, é associado a 50µl de cloreto de cálcio a 10% e após 5 a 10 min o gel é formado (ANITUA, 1999).

Os resultados favoráveis com o uso do gel de plaquetas já estão se refletindo no mercado. Vários serviços de entrega de PRP estão sendo disponibilizados nas grandes cidades do país, onde o paciente dirige-se até o laboratório de análises clínicas para a coleta do sangue que, após ser centrifugado, é encaminhado ao local onde a cirurgia está sendo realizada. Também estão sendo comercializadas várias marcas de centrífugas próprias para o uso em pequenas quantidades. Conforme a marca comercial, modifica-se também um pouco, o dispositivo interno para a separação de plasma,

contudo, o princípio básico da centrifugação é sempre mantido. No anexo 3 encontram-se relacionamos alguns modelos de centrífugas.

### 2.3.5 Características dos materiais de enxerto e utilização clínica do plasma rico em plaquetas

Os enxertos são usados para fornecer uma estrutura para a regeneração óssea, reparar defeitos ósseos resultantes de trauma ou cirurgia, restaurar perda óssea resultante de doença periodontal, preencher locais de extração a fim de preservar a altura e a largura do rebordo alveolar e, aumentar e reconstruir o rebordo alveolar.

De acordo com Garg (1999) existem três diferentes processos associados com o sucesso do enxerto ósseo: a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução. A osteogênese é a formação e desenvolvimento do osso. Um enxerto osteogênico é derivado ou composto de tecido envolvido no crescimento ou reparo do osso. As células osteogênicas podem estimular a formação de osso em tecidos moles ou ativar um crescimento ósseo mais rápido em locais ósseos. A osteoindução é o ato ou processo de estimular a osteogênese. Os enxertos osteoindutores podem ser usados para aprimorar a regeneração óssea, e o osso pode até crescer ou se estender em uma área onde ele normalmente não é encontrado. A osteocondução propicia uma matriz física ou uma estrutura adequada para a deposição de novo osso. Os enxertos osteocondutores são favoráveis ao crescimento ósseo e permitem a aposição óssea a partir de osso pré-existente, mas eles não produzem formação óssea quando colocados nos tecidos moles. Para estimular o crescimento ósseo através de sua superfície, um enxerto osteocondutor requer a presença de osso já existente ou células mesenquimais diferenciadas. Assim, segundo Garg (1999) todos os materiais de enxerto ósseo possuem pelo menos um dos três modos de ação.

### 2.3.5.1 Plasma rico em plaquetas

Anitua (1999) avaliou a diferença no processo de reparação óssea após exodontia em locais selecionados para receberem implantes. Alguns locais foram tratados previamente com plasma rico em fatores de crescimento enquanto outros não receberam nenhum tratamento. Deste modo, após a extração dos dentes, o local recebeu uma preparação de plasma rico em fatores de crescimento obtido conforme o protocolo descrito na secção 2.3.3. Em alguns casos utilizou o enxerto autógeno particulado para se prevenir o colapso do retalho. Membranas não foram utilizadas em nenhum paciente para não intervir no efeito potencial benéfico do plasma rico em fatores de crescimento. A ativação do plasma rico em plaquetas nestes casos foi realizada utilizando-se uma proporção de 1,2 ml de PRP associado a 50µl de cloreto de cálcio a 10%. Segundo o autor após 5 a 10 min o gel é formado. Após 10 a 16 semanas os pacientes retornaram para a colocação dos implantes. Com uma broca trefina de 3mm foi possível obter amostras dos respectivos locais para o exame histológico. As conclusões do autor mostraram que não houve nenhum efeito negativo com o uso do plasma rico em fatores de crescimento. A epitelialização foi completa em 100% dos casos e significativamente melhor que as áreas não tratadas. A regeneração óssea obteve grande quantidade de osso maduro e com qualidade superior que nas áreas controles. O local da extração estava totalmente preenchido com osso em oito dos dez pacientes. Os dois outros pacientes que não tinham a reparação completa eram fumantes. O autor relatou que 250 pacientes já tinham sido submetidos a esta técnica e com bons resultados clínicos aparentes. Segundo o autor, a incorporação desta técnica pode servir para beneficiar muitos pacientes retirando o risco de infecções ou transmissão de doenças.

Lenharo e Mendonça (2002) demonstram a utilização do gel de plaquetas pós-exodontia de um molar superior. A centrifugação do sangue foi realizada em tubos com uma centrífuga brasileira (SIN), processado por 8 min,

seguindo o protocolo de Anitua (1999) que utiliza 1,2 ml de PRP para 50 µl de cloreto de cálcio a 10% como único agente coagulante. O alvéolo foi preenchido através de porções de gel e em seguida procederam a sutura. A abertura para a colocação dos implantes foi realizada após 4 meses. Utilizaram uma broca trefina para a coleta do osso para o exame histológico. Instalaram o implante que 60 dias após recebeu a prótese. Apesar de clinicamente o osso ter aparência normal, os autores não apresentaram o resultado do exame histológico. Neste caso específico havia ausência de antagonista ao implante o que também favorece a colocação da prótese precocemente.

#### 2.3.5.2 Plasma rico em plaquetas com enxerto ósseo autógeno

O osso autógeno é o material com a melhor perspectiva de promoção do crescimento ósseo. Suas propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas, permitem ao osso se formar mais rapidamente em condições onde se requer um aumento e reparo significativo (GARG, 1999)

É considerado o único enxerto osteogênico disponível aos profissionais clínicos. Pode ser retirado da crista ilíaca, ou locais intra-orais (sínfise mandibular, tuberosidade maxilar, ramo e exostoses). A reabsorção após o transplante tem sido considerada menor com enxertos ósseos mandibulares do que com enxertos da crista ilíaca. Os enxertos ósseos obtidos de áreas intra-orais geralmente resultam em menor morbidade. Porém, os locais doadores intra-orais provêm um volume significativamente menor que o da crista ilíaca. O local doador depende geralmente do volume e tipo de osso desejado e necessário. O osso autógeno é o que melhor preenche os requisitos de enxertos para propiciar uma estrutura para a regeneração óssea e posteriormente dentária. Porém, têm como principais desvantagens a necessidade de um segundo local cirúrgico, a morbidade resultante do paciente, e a possibilidade de não se poder obter uma quantidade suficiente de material (especialmente de locais intra-orais) (GARG, 1999)

Shanaman; Filstein; Danesh-Meyer (2001) apresentaram a utilização do gel de plaquetas juntamente com enxerto autógeno e enxerto alógeno (osso seco congelado desmineralizado - DFDBA) numa proporção de 30% de osso autógeno para 70% de alógeno. Esta mistura de enxerto foi utilizada para preencher o defeito proveniente da extração de um canino fraturado. O PRP foi obtido por aférese em um volume de 50 ml e ativado no momento da cirurgia com uma mistura de cloreto de cálcio a 10% com trombina bovina 1000 U Johnson&Johnson . A mistura do PRP com o osso para enxerto resulta em um material de consistência gelatinosa, permitindo fácil manipulação e colocação. Uma membrana de ePTFE com reforço de titânio também foi utilizada. Após 6 meses da sua colocação a membrana foi retirada permitindo a visualização de um osso clinicamente normal neoformado abaixo dela. Procederam a coleta do tecido ósseo do local enxertado com uma broca trefina de 2 mm para a realização do exame histológico. A finalização da osteotomia foi realizada a fim de possibilitar a colocação do implante. Como ainda permanecia uma pequena e estreita deiscência, nova técnica de GBR (regeneração óssea guiada) foi aplicada usando-se osso seco congelado (FDBA) recoberto por uma nova membrana. Após 4 meses realizaram o segundo estágio cirúrgico, com nova abertura e remoção da membrana. A avaliação histológica do fragmento da biópsia mostrou uma mistura de osso alveolar neoformado, tecido conjuntivo e pequenos remanescentes de DFDBA. O novo osso formado foi caracterizado pela presença de osteoblastos e osteócitos volumosos dentro de lacunas ósseas. Pequenas células inflamatórias crônicas foram freqüentemente observadas em torno das partículas de DFDBA. Os autores acreditam que o PRP não melhorou o desempenho da técnica de GBR, porém, melhorou significativamente a manipulação do material facilitando a realização da manobra.

É muito comum na implantodontia a necessidade de se realizar cirurgias de enxerto de seio maxilar. O objetivo de se fazer este tipo de intervenção não é somente preencher a cavidade sinusal e sim restabelecer uma quantidade de osso suficiente para que se possa fazer a instalação de implantes



osseointegrados. Para que isto ocorra é fundamental que além de estar com uma boa quantidade, este osso esteja também com sua fisiologia restabelecida (LENHARO; MENDONÇA, 2002).

De acordo com a Conferência do Consenso de Enxerto no Seio Maxilar (JENSEN et al., 1998) não há diferença estatisticamente significativa dos resultados entre a utilização de enxerto ósseo autógeno em bloco ou particulado. Desta forma, a combinação gel de plaquetas com osso autógeno particulado parece estar sendo a preferida da maioria dos autores. O enxerto autógeno reúne várias qualidades, principalmente o fato de conter células osteopromotoras. A associação com o gel de plaquetas confere a ele uma propriedade excepcional em termos de manipulação, inserção e estabilização do material enxertado. Além do gel de plaquetas, riquíssimo em fatores de crescimento, promover o início da cascata de reações químicas inerentes ao processo de reparação óssea. Com a utilização do gel de plaquetas há um aumento significativo do volume de material enxertado, o que faz com que não seja necessária a retirada de uma grande quantidade de osso do local doador. Em cirurgias de enxerto de seio maxilar bilateral, geralmente foi necessário recorrer-se a áreas doadoras extrabucais (crista ilíaca ou calota craniana), o que levava muitos pacientes a desistirem de tamanha intervenção. No entanto, usando-se o gel de plaquetas é comum a possibilidade de recolher-se o osso doador da própria cavidade oral (sínfise ou posterior de mandíbula). Em relação à cirurgia de enxerto de seio maxilar, os resultados da mesma Conferência de Consenso indicam que a diferença entre se colocar os implantes no mesmo momento da cirurgia de enxerto ou tardiamente também não é estatisticamente significativa. A possibilidade de se estabelecer uma boa estabilidade primária parece ser o ponto decisivo para esta questão.

Em cirurgia de enxerto de seio maxilar com enxerto autógeno é preciso cerca de 5cc de PRP por seio. Neste caso, a mistura do PRP com o osso autógeno, inicia o processo de coagulação, formando uma mistura de fácil manipulação. Da mesma forma esta mistura também pode ser utilizada com o

intuito de "expandir" a quantidade de osso disponível, chegando a ser utilizado uma quantidade de 20 a 35cc de PRP dependendo do local do enxerto. Entretanto tem sido demonstrado que um mínimo de 20% do material a ser enxertado deve ser osso autógeno. Desta maneira o PRP pode atuar junto às células osteoprogenitoras e células mesenquimais provenientes deste tecido e melhorar a formação óssea (MARX; GARG, 2002).

Grande parte dos cirurgiões que realizam a cirurgia de enxerto de seio maxilar a utilizam rotineiramente. Scarso Filho et al. (2001) mostraram através de vários casos clínicos a praticidade desta técnica em se promover a aglutinação das partículas de osso autógeno para ser levado dentro da cavidade sinusal. São mostradas também as colocações de implantes osseointegrados em locais previamente tratados com PRP. Os excelentes resultados foram obtidos não somente em cirurgias de enxerto de seio com osso autógeno particulado, como também com osso autógeno em bloco objetivando um aumento de rebordo alveolar tanto em largura como em altura.

Lenharo e Mendonça (2002), mostraram a utilização do gel de plaquetas misturado com osso autógeno particulado para enxerto de seio maxilar de dois pacientes com idade média de 54 anos. O sangue foi coletado e acondicionado em tubos contendo citrato de sódio a 3,8% (anti-coagulante) e processados em uma minicentrífuga durante 7 min a 280 rpm. Em um dos casos, três implantes osseointegráveis foram colocados simultaneamente. Utilizando um raspador de osso Mx-grafter®, rasparam a região posterior de mandíbula para se obter o osso autógeno. O osso coletado foi misturado ao PRP e o gel de plaquetas foi levado à cavidade. Os autores utilizaram para a ativação do PRP apenas cloreto de cálcio a 10%.

A técnica de utilização do PRP permite uma grande flexibilidade quanto à associação com outras técnicas. É possível, por exemplo, promover aumento do rebordo alveolar utilizando-se osso autógeno particulado e gel de plaquetas protegido também com uma membrana tipo Gore-tex®. O PRP, portanto, pode

complementar os benefícios de outras técnicas já consagradas. O caso clínico de uma paciente de 35 anos que estava com o incisivo central e lateral esquerdo condenados pode exemplificar esta possibilidade. Após a exodontia dos dentes condenados aguardou-se um período de 75 dias para nova intervenção. A área doadora para o osso autógeno foi a região posterior de mandíbula. Após o material do enxerto ter sido acomodado no local, fixou-se a membrana Gore-tex® com reforço de titânio. Esta membrana foi retirada após 5 meses da sua colocação. O início das perfurações para a colocação dos implantes foi realizado com uma broca trefina de 2,0 mm com o intuito de coletar o material e enviar para exame histológico. Com os implantes devidamente estabilizados utilizou-se transferentes de posição para confecção da prótese. Cicatrizadores foram colocados durante o período de confecção da prótese e, após 12 h da cirurgia de colocação dos implantes a paciente já recebia uma prótese provisória (LENHARO; MENDONÇA, 2002).

Em distração osteogênica o potencial em melhorar a regeneração óssea pode ser exemplificado em um trabalho de Robiony et al. (2002). Na exposição de cinco casos clínicos de severa atrofia mandibular onde o PRP foi utilizado, juntamente com uma mistura de enxerto ósseo autólogo, proveniente da crista ilíaca para preencher o espaço da distração e fornecer o arcabouço necessário para a regeneração da distração. A colocação dos implantes foi possível em todos os casos após um período de consolidação de 60 dias, mostrando que as combinações destas técnicas parecem ser muito promissoras.

#### 2.3.5.3 Plasma rico em plaquetas com enxertos alógenos

Os enxertos alógenos correspondem a tecidos provenientes de indivíduos diferentes, porém da mesma espécie. São obtidos a partir de cadáveres, pessoas com referência familiar ou indigente. Depois de processados sob esterilidade total, este material é estocado em bancos de ossos. As formas primitivas de enxertos alógenos são ossos congelados, liofilizados (secos/congelados), secos congelados desmineralizados, e irradiados. Pelo

fato dos aloenxertos não serem osteogênicos, a formação óssea leva mais tempo e resulta em um volume menor do que é encontrado com os enxertos autógenos (GARG, 1999).

O osso transplantado induz a uma resposta imune do hospedeiro. Os aloenxertos frescos são os mais antigênicos; porém, o congelamento de ambos os tipos (a seco ou não) reduz significativamente a antigenicidade. O FDBA (osso alógeno congelado seco) pode ser usado tanto na forma mineralizada quanto desmineralizada. A desmineralizada remove a fase mineral e expõe o colágeno delimitante do osso e fatores de crescimento, particularmente BMP. O FDBA pode utilizar a osteoindução e a osteocondução para formar osso. Pelo fato de ser mineralizado o FDBA endurece mais rápido que o DFDBA (osso alógeno congelado seco desmineralizado). Em experiências clínicas os enxertos de seio maxilar com FDBA parecem obter resultados mais satisfatórios em cirurgias de enxerto de seio maxilar em comparação com o DFDBA. Em tese o DFDBA pode formar osso através da osteoindução e osteocondução. Acredita-se que as BMPs e outras proteínas não colágenas na matriz são responsáveis pela osteoindução deste material. Porém, tal capacidade osteoindutiva depende da qualidade e quantidade da matriz óssea e o que se tem notado é que esta atividade de indução pode variar consideravelmente entre os bancos de tecidos, como também entre diferentes amostras do mesmo banco de osso. Portanto, o uso do DFDBA como material de enxerto tem sido questionado (GARG, 1999)

Existem várias situações onde o FDBA é mais efetivo que o DFDBA, são eles: acomodações de fenestrações; pequenos aumentos de rebordos; alvéolos de dentes recém-extraídos (como preenchimento); casos de levantamento de seio (como enxerto); reparo de deiscências e implantes falhos. O osso esponjoso irradiado também tem sido usado como um material de enxerto substituto para osso autógeno. Inicialmente, o osso foi exposto a 60.000 a 80.000 Gy de radiação. Mais recentemente, o osso trabeculado obtido da coluna vertebral é tratado com 25.000 Gy de radiação para ser usado como

material de enxerto. O uso de osso irradiado entretanto é muito controverso pois ainda existe falta de referências quanto a sua segurança e eficiência. (GARG, 1999).

Algumas das vantagens dos aloenxertos incluem uma disponibilidade imediata, eliminação da necessidade de um local doador no paciente, anestesia e tempo cirúrgicos reduzidos, menor perda de sangue e menos complicações. As desvantagens estão associadas principalmente com o uso de tecidos de outros indivíduos. A qualidade do enxerto ósseo e a subsequente saúde do receptor depende da história médica do doador. O osso de cadáver também pode sofrer rejeição, como tem ocorrido com outros tecidos ou órgãos transplantados. (GARG, A.K. 1999).

Shanaman; Filstein; Danesh-Meyer (2001) apresentaram a utilização do gel de plaquetas juntamente com enxerto autógeno e enxerto alógeno (osso seco congelado desmineralizado - DFDBA) numa proporção de 30% de osso autógeno para 70% de alógeno associado a uma membrana de ePTFE com reforço de titânio para promover a correção de defeito alveolar proveniente de lesão radicular. Estes autores relataram a aplicação de trombina bovina diretamente sobre o enxerto que estava sendo acomodado no defeito de maneira incremental. Como ainda permanecia uma pequena e estreita deiscência no momento da colocação dos implantes (6 meses depois), nova técnica de regeneração óssea guiada (GBR) foi aplicada usando-se osso seco congelado (FDBA) recoberto por uma nova membrana. Após 4 meses realizaram o segundo estágio cirúrgico, com nova abertura e remoção da membrana. A avaliação histológica do fragmento da biópsia mostrou uma mistura de osso alveolar neoformado, tecido conjuntivo e pequenos remanescentes de DFDBA. O novo osso formado foi caracterizado pela presença de osteoblastos e osteócitos volumosos dentro de lacunas ósseas. Pequenas células inflamatórias crônicas foram freqüentemente observadas em torno das partículas de DFDBA. Os autores acreditam que o PRP não melhorou o desempenho da técnica de GBR porém, melhorou

significativamente a manipulação do material facilitando a realização da manobra.

#### 2.3.5.4 Plasma rico em plaquetas com enxerto xenógeno

O enxerto xenógeno comumente utilizado é de origem bovina. Comercialmente ele apresenta-se na forma de osso inorgânico, tratado quimicamente para a remoção de seu componente orgânico. Após este material ser esterilizado, ele pode ser utilizado como um enxerto sem causar uma resposta imune ao hospedeiro. Ele pode ser usado associado à várias técnicas como correção de defeitos periodontais (CAMARGO et al., 2002), deiscências, fenestrações ao redor de implantes, pequenas osteotomias de seio maxilar, e em aumentos de rebordo alveolar grandes quando combinado com osso autógeno. Ele permite também sua utilização juntamente com barreiras de membranas.

Trata-se, portanto, de um material muito versátil e principalmente é dotado de uma técnica muito barata e de baixa morbidade para o paciente, facilitando sua aceitação. A utilização deste material juntamente com o PRP é uma excelente opção para pequenos defeitos. (CAMARGO et al., 2002).

Com o intuito de restabelecer o segmento posterior da maxila edêntula de uma paciente de 39 anos Lenharo e Mendonça (2002) demonstraram a cirurgia de enxerto de seio maxilar utilizando-se gel de plaquetas com um osso bovino inorgânico, o Bio-oss®. No caso em questão o Bio-oss® foi misturado ao PRP imediatamente após a sua ativação com cloreto de cálcio. Assim que o gel de plaquetas se formou, foi levado em seguida para a cavidade sinusal para a realização de seu preenchimento. Esta técnica mostrou ser muito simples e de baixa morbidade para o paciente.

### 2.3.5.5 Plasma rico em plaquetas com enxertos aloplásticos

Uma variedade de polímeros e cerâmicas que podem promover estabilidade estrutural imediata para a reconstrução da região que se quer reabilitar estão sendo disponibilizadas no mercado atualmente. Tais materiais permitem também o carregamento de células e fatores de crescimento diretamente para o processo de regeneração óssea (LU; CURRIER; YASZEMSKI, 2000).

Os materiais aloplásticos estão disponíveis em uma variedade de texturas, tamanhos e formas. As propriedades específicas de um aloplástico determinam qual material sintético é melhor para cada aplicação em particular. (GARG, 1999).

Vercellotti et al. (2000) demonstraram através de um caso clínico a utilização de um material aloplástico para preenchimento do espaço alveolar criado com uma cirurgia piezoelétrica. Nesta modalidade cirúrgica, através de uma frequência variável, é possível promover-se a expansão alveolar inclusive em osso tipo 1 ou 2. O autor demonstrou a utilização do PRP em uma cirurgia onde o paciente tinha apenas 3mm de largura alveolar remanescente na região dos incisivos, na maxila. O defeito criado foi preenchido com um vidro bioativo (Biogran®) e PRP ativado com Botropase® (Botropase batroxobina, A/C Ravizza Farmaceutici) totalizando 5mm de largura do rebordo. O enxerto foi recoberto com mais uma camada de gel de plaquetas para promover uma boa estabilização do material. Após 3 meses, na cirurgia de abertura, constataram a presença de osso neoformado em todo o alvéolo, assim como uma total estabilização dos implantes. Em outro caso clínico utilizando a mesma técnica foi possível a expansão do remanescente alveolar na região dos incisivos inferiores.

Shanaman; Filstein; Danesh-Meyer (2001) demonstraram a recuperação em largura e altura da região posterior de mandíbula de uma paciente de 68

anos. Após a incisão do retalho mucoperiósteo total, uma série de perfurações na cortical foram realizadas com o intuito de promover a migração de células hematopoiéticas. Logo em seguida uma membrana de ePTFE foi recortada e posicionada por lingual para fazer a proteção do enxerto obtido a partir de uma mistura de PRP com Biogran® (vidro bioativo), DFDBA e osso autógeno colhido da área retromolar numa proporção de 20:60:20. Todos os materiais foram misturados em uma cuba estéril antes da colocação no rebordo. Depois do enxerto estar no local, gotas de trombina bovina foram aplicadas no enxerto, a qual conferiu uma consistência gelatinosa e permitiu a acomodação final do material antes da cobertura deste com a membrana e sua fixação. Depois de 5 meses constataram que o aumento de 2 mm em largura foi insuficiente para a colocação dos implantes. Um procedimento adicional de GBR foi necessário para ganhar mais rebordo no sentido horizontal e facilitar a colocação dos implantes. O procedimento de GBR foi repetido usando uma mistura de FDBA e PRP em conjunto com uma barreira de PTFE. Após 6 meses de cicatrização, o local apresentava-se com um ganho em altura de 4mm aproximadamente e com a largura relativa ao rebordo inicial. O ganho de tecido ósseo permitiu a colocação de um implante de 5mm x 13mm no local do 1º molar e um implante de 5mm x 11,5 mm na posição do 2º molar. O exame histológico do fragmento obtido com o auxílio de uma broca trefina de 2mm no momento da cirurgia de colocação dos implantes, mostrou fragmentos de DFDBA residuais envolvidas por osso vital exibindo osteoblastos e osteócitos na sua parte mais coronal. Nenhuma partícula de Biogran® foi observada. Amplas áreas do fragmento foram caracterizadas como osso. Em outro caso clínico apresentado, onde foi preciso aumentar o rebordo alveolar na região posterior de mandíbula em uma paciente de 76 anos, foi obtido resultado semelhante.

O que chama a atenção nestes casos descritos por Shanaman; Filstein; Danesh-Meyer (2001) é o fato de que as cirurgias foram realizadas em pacientes idosos, onde normalmente a resposta à injúria não se realiza de maneira satisfatória. Apesar dos autores acreditarem que existem muitas



variáveis nos procedimentos e que não se pode afirmar que o PRP tenha melhorado os resultados que normalmente se consegue com técnicas de GBR, é certo que a introdução do gel de plaquetas facilita o manuseio do material de enxerto, promove hemostasia e não atrapalha o processo de regeneração dos tecidos.

### **3 PROPOSIÇÃO**

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi, portanto, verificar através do coagulômetro a obtenção da rede de fibrina, *in vitro*, durante a ativação do plasma rico em plaquetas usando somente o cloreto de cálcio a 10% como único agente direto a ser agregado ao plasma rico em plaquetas previamente aquecido a 37 °C.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

#### 4.1.2 Material de consumo

Bolsas coletoras contendo citrato-fosfato-dextrose

Cloreto de cálcio a 10% estéril

Trombina

Seringas de 10ml descartáveis estéreis

Ponteiras descartáveis para pipeta automática

Tubos de ensaio vazios

Tubos contendo EDTA

Tubos de ensaio contendo Citrato de sódio a 3,2%

Folhas de parafina

Cuvetas e bilhas metálicas próprias para o coagulômetro marca ST4 BIO

#### 4.2 Método

O método empregado seguiu as normas utilizadas pelo Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da cidade de Curitiba – Paraná para coleta de doadores de sangue e manipulação de hemocomponentes.

##### 4.2.1 Punção venosa e retirada do sangue

A técnica utilizada foi a venipuntura, realizada de maneira menos traumática possível para se evitar a ativação dos fatores extrínsecos da coagulação (FIG. 13). Esta coleta foi realizada por uma técnica treinada do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Curitiba (Biobanco)(FIG. 14) e o sangue acondicionado em uma bolsa tripla padronizada, numerada e etiquetada (FIG. 12), contendo em seu interior Dextrose anidra (2900mg), Citrato de Sódio 2H<sub>2</sub>O (2630mg), Ácido cítrico (327 mg), Adenina (27,5 mg), Fosfato de sódio monobásico H<sub>2</sub>O (222mg), Água para injetáveis q.s.p. (100 ml) – CPDA-1, obtendo-se um volume de 402 a 495 ml, mantidas em aparelho para a homogeneizar o sangue durante a coleta (FIG. 15) e, posteriormente, foram processadas em até 4 h após a coleta.

#### 4.4.4 Exames laboratoriais

A análise da coagulação do sangue inclui a história clínica do paciente, buscando episódios de hemorragias espontâneas ou produzidas por pequenos traumas. Alguns testes de laboratório são comumente usados para avaliar a hemostasia e a coagulação, nos pacientes candidatos à procedimentos cirúrgicos. Os testes mais usados são: o tempo de coagulação, tempo de sangramento, contagem de plaquetas, tempo (atividade) de protrombina e tempo parcial de tromboplastina (PERFUSION LINE, 2002)

O Biobanco tem como norma fazer uma anamnese com o paciente visando detectar possíveis razões que impeçam o paciente de ser um doador de sangue ou de hemocomponentes (ANEXO 2). Também é rotina do Biobanco a verificação da pressão sanguínea e a análise do volume globular (VG) imediatamente antes à doação. Dos 13 voluntários que se apresentaram para a coleta direcionada para pesquisa apenas nove foram liberado nestes três itens primários, e prosseguiram para a coleta da bolsa de sangue. Além da bolsa para doação, foram coletados mais dois tubos para os exames complementares. Um dos tubos continha EDTA para a realização do hemograma e, o outro continha citrato-fosfato-dextrose para possibilitar a realização do exame de tempo de tromboplastina parcial ativada.

Uma vez coletadas, as bolsas com sangue foram encaminhadas para o Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas e os tubos para os exames para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas.

As bolsas foram centrifugadas logo após a coleta, quando então o plasma rico em plaquetas foi obtido, ficou em repouso durante 1 a 2 h e então armazenado em um agitador com uma temperatura de 20 a 24°C, para evitar a agregação plaquetária e permitir as trocas gasosas. Em seguida parte do plasma pobre em plaquetas foi também encaminhado ao Laboratório do Hospital de Clínicas para que fossem realizados os testes sorológicos.

Os exames sorológicos realizados com o intuito de liberar os pacientes para possível doação foram: sífilis, Ha- Chagas, Elisa-Chagas, HBSAG, A-HIV (A), A-HBC Total, A-HCV Elisa, A-HTLV, Transaminase, Tipagem ABO, Coombs indireto, A-HIV (B). Estes exames foram executados 24 h após a coleta. Em um total de nove bolsas de sangue coletadas, apenas uma das amostras teve que ser desprezada por apresentar sorologia positiva para o anticorpo da Hepatite B (A-HBC positivo). A princípio, a presença deste anticorpo não deveria exercer influência sobre o resultado da pesquisa em questão, porém, o Biobanco não libera os hemocomponentes em hipótese alguma no caso de sorologia positiva para os testes realizados.

Também após 24 h da coleta das bolsas, os tubos contendo sangue com EDTA foram usados para a realização do hemograma dos nove pacientes, os quais acusaram que todos os voluntários apresentavam-se com a quantidade e qualidade das células sanguíneas dentro da normalidade.

Os tubos contendo citrato de sódio a 3,2% foram utilizados para a realização do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Este teste ativa os fatores de contato e dá início à cascata da coagulação, utilizando-se para isto o Caulim em prévia incubação. Neste mesmo teste são utilizados o cloreto de cálcio e fosfolipídios para analisar os demais fatores, fazendo um verdadeiro mapeamento dos fatores intrínsecos da coagulação (DACIE; LEWIS, 1995). Este exame laboratorial foi o escolhido porque através dele é possível verificar a atividade de todos os fatores envolvidos diretamente no processo da coagulação, com exceção do fator VII, que é exclusivo da via extrínseca. De acordo com os resultados obtidos, todos os oito voluntários apresentavam-se com a coagulação natural dentro dos níveis considerados normais, conforme a TAB. 2.

Pouco antes da realização dos testes com o plasma rico em plaquetas, o mesmo foi submetido a um exame para contagem do número de plaquetas existente naquele momento; 4 ml de PRP foram coletados da bolsa tripla e

colocados em um tubo contendo EDTA, o qual foi homogeneizado e analisado. De acordo com a Associação Americana de Banco de Sangue (AABB) e a Portaria de nº 1376 de novembro de 1993 do Ministério da Saúde, para que o concentrado plaquetário esteja adequado para o uso clínico é preciso se obter um valor mínimo de  $5,5 \times 10^3$  plaquetas/ml. Naturalmente, este padrão não foi realizado uma vez que a intenção foi de realizar a pesquisa com doadores clinicamente saudáveis, porém, escolhidos aleatoriamente. Os resultados desta análise estão expostos na TAB. 3.

Após a realização dos testes com o coagulômetro para a avaliação do tempo de coagulação do plasma rico em plaquetas com o cloreto de cálcio a 10%, todas as amostras (FIG. 40) foram submetidas a mais duas provas do tempo de trombina (TT) para avaliar se a amostra encontrava-se com qualidade satisfatória a fim de promover um teste confiável para a determinação do tempo de coagulação. Deste modo, também se utilizando o coagulômetro, 50µl de trombina cálcica 1,5 U foram adicionadas a 50µl do PRP das amostras utilizadas para os testes com o cloreto de cálcio a 10% (FIG. 41, 42 e 43). Conforme os resultados encontrados na TAB. 6, todas as oito amostras apresentavam-se com um nível de fibrinogênio normal no momento da realização dos testes, promovendo a formação do coágulo (FIG. 44)



Tabela 1. Resultados do Hemograma

Paciente	Hemácias*	Plaquetas**	Volume globular***
1	5.41x10 <sup>6</sup> /μl	229x10 <sup>3</sup> /μl	45.7%
2	5.50x10 <sup>6</sup> /μl	272x10 <sup>3</sup> /μl	45.0%
3	4.29x10 <sup>6</sup> /μl	393x10 <sup>3</sup> /μl	38.7%
4	5.12x10 <sup>6</sup> /μl	253x10 <sup>3</sup> /μl	44.0%
5	4.51x10 <sup>6</sup> /μl	211x10 <sup>3</sup> /μl	39.3%
6	5.29x10 <sup>6</sup> /μl	220x10 <sup>3</sup> /μl	47.5%
7	4.45x10 <sup>6</sup> /μl	274x10 <sup>3</sup> /μl	39.4%
8	5.06x10 <sup>6</sup> /μl	292x10 <sup>3</sup> /μl	44.9%
9	4.26x10 <sup>6</sup> /μl	297x10 <sup>3</sup> /μl	39.1%

\*valores normais 4.0 – 5.8x10<sup>6</sup>/μl

\*\*valores normais 140 - 400x10<sup>3</sup>/μl

\*\*\* valores normais 36.7 – 53 %

Tabela 2. Resultados do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)\*

Paciente	Tempo em segundos	Controle
1	33.5	34
2	33.4	34
3	35.7	34
4	31.4	34
5	33.6	34
6	39.3	34
7	39.2	34
8	38.7	34
9	32.1	34

\* Avalia os fatores intrínsecos da coagulação

Tabela 3. Contagem do número de plaquetas do PRP(\*)(\*\*)

Paciente	ST/peso	ST/ml	PRP/peso	Plaquetas/mm <sup>3</sup>	Plaquetas/ml
2	448g	425ml	60g	1083000	6,4x10 <sup>10</sup>
3	424g	402ml	70g	1186000	8,3x10 <sup>10</sup>
4	490g	465ml	66g	1086000	7,1x10 <sup>10</sup>
5	490g	465ml	64g	492000	2,7x10 <sup>10</sup>
6	485g	460ml	62g	750000	4,6x10 <sup>10</sup>
7	455g	432ml	68g	676000	4,5x10 <sup>10</sup>
8	500g	474ml	61g	1809000	11,0x10 <sup>10</sup>
9	500g	474ml	56g	730000	4,0x10 <sup>10</sup>

\*Obtido após 2 centrifugações do Sangue Total (ST)

\*\*Contagem realizada 48 h após a coleta do ST.

\*\*\* Valor mínimo contido em uma bolsa de CP 5,5x10<sup>10</sup> de acordo com a norma da A.A.B.B. e Portaria 1376 de nov. 1993 do MS.

Paciente 1 teve a amostra descartada pelo Biobanco

#### 4.4.5 Ativação do plasma rico em plaquetas

A ativação do plasma rico em plaquetas e os testes de coagulação com o coagulômetro foram realizadas em média 48 h depois da coleta do sangue. Apesar do plasma rico em plaquetas dever ser usado num tempo inferior a 4 h após a coleta do sangue total, quando se quer os benefícios dos fatores de crescimento, este não foi o objetivo desta pesquisa, pois se trata de um experimento, *in vitro*, onde o que será avaliado é a capacidade dos fatores intrínsecos do plasma em promover a coagulação adicionando-se apenas o cloreto de cálcio a 10% (FIG. 30). Portanto, partindo-se do princípio que os fatores da coagulação, assim como as plaquetas, permanecem viáveis por 5 dias, este período de espera, necessário até que o sangue fosse liberado pelo Biobanco, não deve interferir no tempo de coagulação e conseqüentemente nos resultados da pesquisa.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Equipamentos

Centrífuga refrigerada marca Sorwall®

Extrator para plasma

Selador de bolsas

Agitador de plaquetas

Câmara de fluxo laminar

Coagulômetro marca ST4 BIO (FIG. 11)

Pipeta automática marca eppendorf

Incubadora para banho-maria

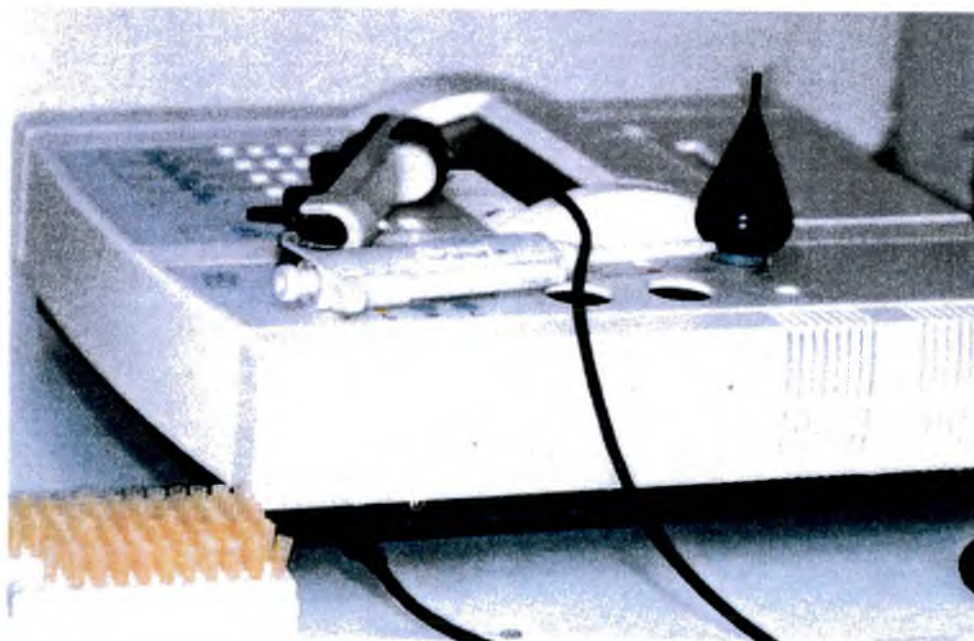


Figura 11- Coagulômetro

Em seguida também foram colhidas amostras para a realização dos exames sanguíneos (sorologia, hemograma e coagulograma) para se afastar a possibilidade de doenças sanguíneas, que impeçam a utilização do sangue pelo Banco de Sangue, bem como possíveis alterações na avaliação das pesquisas por conta de problemas de coagulação dos voluntários.



Figura 12- Bolsa tripla



Figura 13- Punção venosa



Figura 14- Retirada do Sangue



Figura 15- Hemomix

#### 4.2.2 Separação celular

A separação celular foi realizada pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas. As bolsas foram pesadas (FIG. 16) e a separação obtida através da centrifugação do sangue total (ST) em uma centrífuga refrigerada marca Sorvall Instruments Modelo RC 3 B (FIG. 17). Colocando-se a bolsa na posição adequada ao equipamento procedeu-se a primeira centrifugação do ST com uma velocidade de 2700 RPM durante 6 min e um "Brake" 6. Com esta centrifugação as hemácias que são mais pesadas ficam no fundo da bolsa e o plasma contendo as plaquetas ficam no sobrenadante.

Neste momento cada bolsa foi levada para o extrator para plasma (FIG. 18) que ao apertar a parte inferior da bolsa, empurra o plasma da parte superior para a bolsa seguinte (FIG. 19). Este procedimento só é possível após o rompimento do lacre que separa a primeira bolsa da segunda bolsa, possibilitando de maneira segura separar o plasma rico em plaquetas das hemácias.



Figura 16- Pesagem da bolsa contendo sangue total.



Figura 17- Primeira centrifugação das bolsas para a separação celular



Figura 18- Bolsa no extrator de plasma



Figura 19- Concentrado de hemácias na primeira bolsa, PRP na segunda bolsa, terceira bolsa vazia.

#### 4.2.3 Obtenção do concentrado de plaquetas

Após a obtenção do plasma rico em plaquetas este recebeu nova centrifugação a 3000 RPM durante 10 min com "Brake de 6" (FIG. 21). Neste momento o nó que separa a segunda bolsa da terceira bolsa é desatado (FIG. 20) e, novamente com o auxílio de um extrator para plasma, o plasma pobre em plaquetas (PPP) é empurrado para a terceira bolsa (FIG. 22), deixando o concentrado plaquetário contido na segunda bolsa<sup>2</sup> (FIG. 23). A comunicação entre as bolsas recebeu um selamento (FIG. 24) e o concentrado plaquetário foi pesado (FIG. 25). Após a segunda centrifugação o PRP ficou em repouso durante 1 a 2 h, quando em seguida foi armazenado em um agitador (FIG. 26 e 27) a uma temperatura estável entre 20 e 24°C para evitar a agregação plaquetária e manter a integridade das plaquetas evitando o acúmulo de gases no interior da bolsa. A utilização de bolsas triplas permite que todo o processo de centrifugação seja realizado em circuito totalmente fechado. Estas, são confeccionadas em um material que permite as trocas gasosas do interior da bolsa com o meio externo, aumentando a viabilidade dos hemocomponentes.

É importante salientar que este protocolo de obtenção do concentrado plaquetário/plasma rico em plaquetas está de acordo com o controle de qualidade do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Curitiba (Biobanco) e varia de acordo com o equipamento utilizado.



Figura 20- PRP e terceira bolsa vazia. Passagem interrompida pelo nó.



Figura 21- Segunda centrifugação

<sup>2</sup> O concentrado plaquetário (CP), como é descrito pela hematologia o produto obtido após duas centrifugações, é chamado neste trabalho de plasma rico em plaquetas (PRP) de acordo com as explicações da secção 2.3.1.



Figura 22- Retirada do PPP no extrator de plasma.



Figura 23- Plaquetas no fundo da segunda bolsa.



Figura 24- Selamento das comunicação entre as boisas



Figura 25- Pesagem do concentrado de plaquetas



Figura 26- Agitador de plaquetas



Figura 27- Gaveta do agitador contendo bolsas com plaquetas



As amostras de PRP (FIG. 28) utilizadas no experimento foram coletadas dentro de um ambiente adequadamente controlado por uma câmara de fluxo laminar.

O critério para a determinação das proporções utilizadas estão baseados nos trabalhos encontrados na literatura (ANITUA, 1999). Desta forma 1ml de plasma rico em plaquetas foi pipetado através de uma pipeta automática, cada uma das amostras devidamente numeradas foram levadas para outros tubos de ensaio também numerados. Estes tubos contendo 1ml de PRP (FIG. 29) foram levados para incubação durante 5 min. Em seguida cada amostra com 1ml de PRP foi adicionada a outro tubo contendo 40  $\mu$ l de cloreto de cálcio a 10% (FIG. 31), também previamente aquecido a 37°C. Neste momento foi acionado o cronômetro. Com o auxílio de uma folha de parafina na abertura do tubo foi possível realizar uma completa mistura (por inversão) do PRP com o cloreto de cálcio a 10% , durante 5 s. Após a mistura a amostra foi levada novamente para incubação à 37°C, até completar 4 minutos. Apenas uma das amostras teve que ter seu tempo de incubação reduzido para 2 min para que o mesmo pudesse ser medido pelo coagulômetro, visto que por várias vezes, antes de atingir 3 min de incubação a amostra já se encontrava coagulada no tubo de ensaio.



Figura 28- PRP dos voluntários colhido da segunda bolsa após a segunda centrifugação

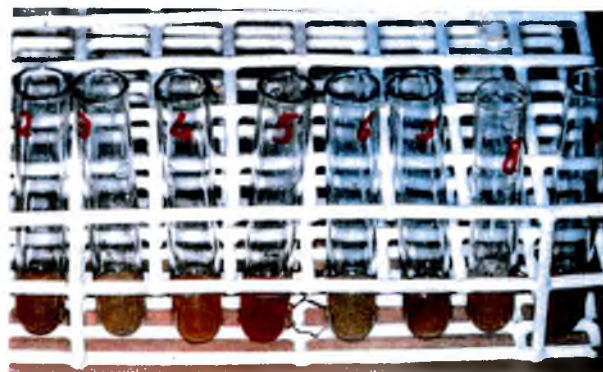


Figura 29- 1ml de PRP para o teste de coagulação



Figura 30- Cloreto de cálcio a 10%.

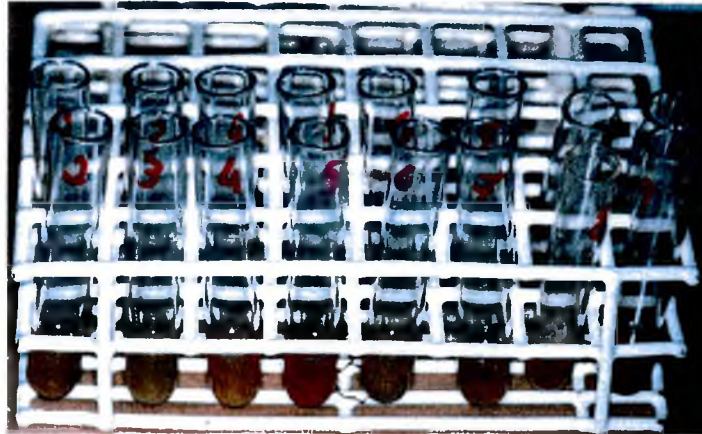


Figura 31- Tubos contendo 1ml de PRP e 40 $\mu$ l de cloreto de cálcio sendo levados para o aquecimento prévio à mistura.

#### 4.4.6 Teste com o coagulômetro

Após o período de incubação a mistura de 1ml de PRP com 40  $\mu$ l de cloreto de cálcio a 10% foi novamente pipetado e um volume de 200 $\mu$ l da mistura foi colocado em cada uma das quatro cuvetes do coagulômetro (pequenas cubas plásticas próprias para o aparelho) (FIG. 37 e 38). Esta metodologia foi desenvolvida porque nas tentativas anteriores quando 200 $\mu$ l de PRP e 8 $\mu$ l de cloreto de cálcio foram levadas diretamente ao aparelho, este não conseguia detectar a formação de rede de fibrina.

Com esta metodologia em que o PRP e o cloreto de cálcio a 10% são aquecidos em banho-maria previamente à mistura e, mantidos aquecidos por mais 4 min antes de ser levado ao coagulômetro, garantiram ao experimento 100% de determinação do tempo de coagulação de todas as amostras disponíveis.

O coagulômetro (FIG. 32 e 33) é um aparelho eletromagnético que detecta o início da formação da rede de fibrina pela inibição da movimentação da bilha metálica (FIG. 34) colocada no interior das cuvetes (FIG. 35 e 36). A

bilha metálica é uma bolinha muito pequena e leve que é atraída pela ação eletromagnética alternada do aparelho, provocando uma movimentação desta bilha. O coagulômetro possui sensores que registram o momento em que a rede de fibrina está sendo formada (FIG. 39) através da variação da amplitude de oscilação da bilha metálica. Este aparelho também é dotado de um sistema de banho-maria seco a 37°C, o que faz com que a amostra ali colocada mantenha a temperatura de 37°C (ideal para as reações enzimáticas da coagulação).

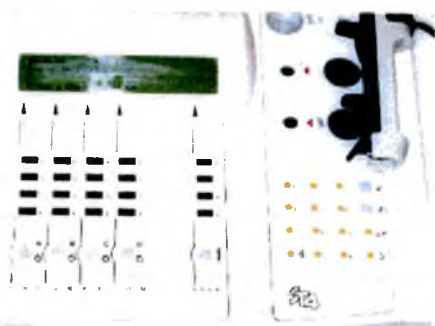


Figura 32- Coagulômetro.  
Vista superior.



Figura 33- Coagulômetro.  
Vista frontal



Figura 34- Bilha metálica.



Figura 35- Colocação da bilha metálica nas cuvetas.

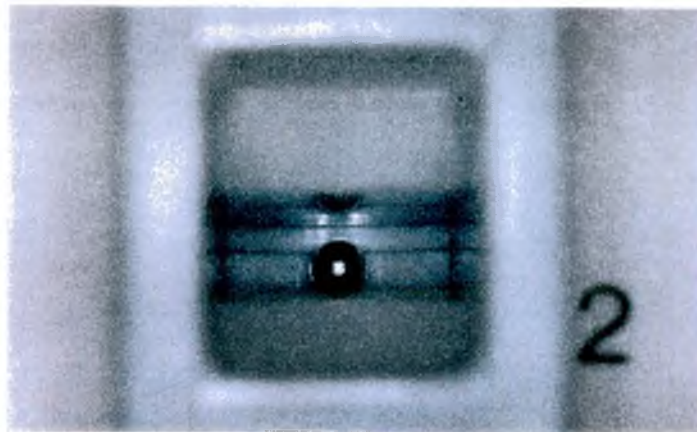


Figura 36- Bilha no interior da cuvete



Figura 37- Pipetagem da mistura de PRP+ cloreto de cálcio a 10%

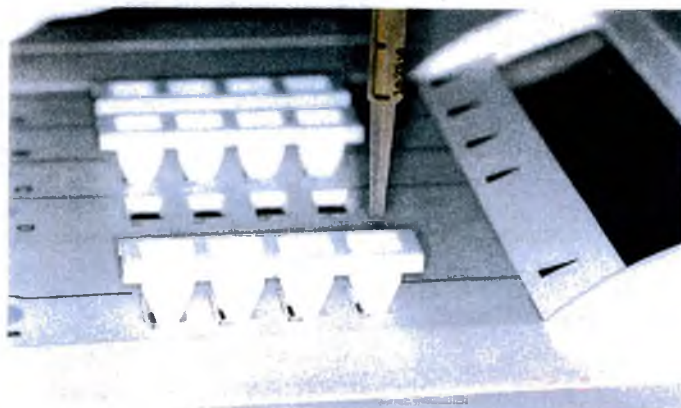


Figura 38- Colocação no coagulômetro de 200 $\mu$ l da mistura

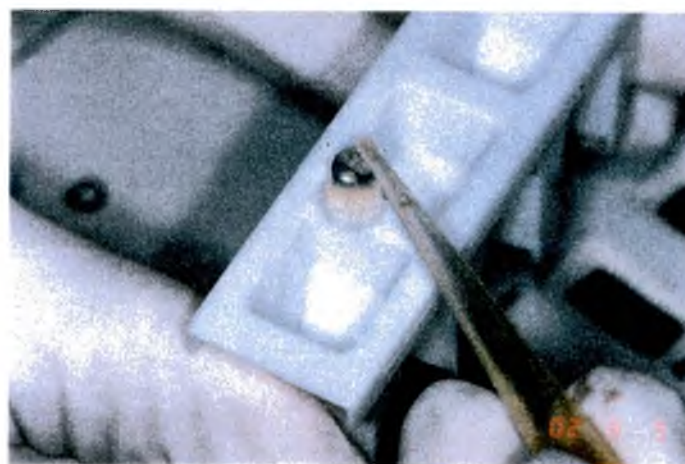


Figura 39- Formação do coágulo.

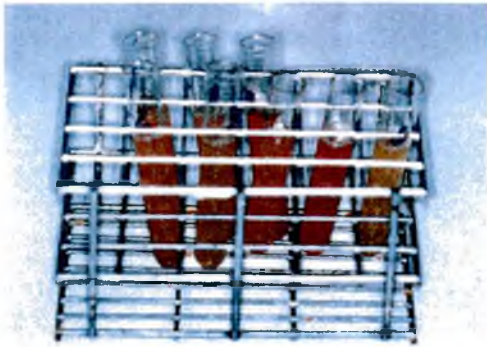


Figura 40- Amostras de PRP.

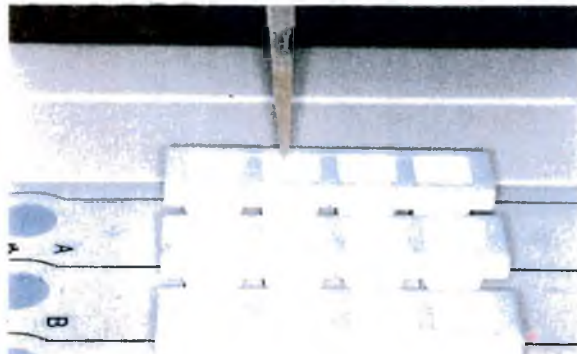


Figura 41- Colocação de 50 $\mu$ l de PRP nas cuvetes.



Figura 42- Trombina 1,5 U.

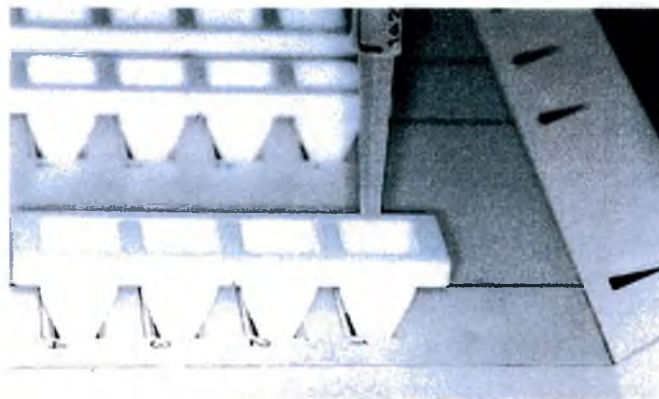


Figura 43- Colocação de 50 $\mu$ l de trombina sobre o PRP.



Figura 44: Formação do coágulo

## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

Os resultados mostram que quando uma quantidade de 1ml de PRP foi misturado por inversão a 40 $\mu$ l de cloreto de cálcio a 10% com a temperatura ideal para a atividade enzimática da coagulação (37°C) foi possível detectar a coagulação em 100% das amostras analisadas. O tempo necessário para se promover a formação do coágulo neste experimento variou entre 2,42 e 10,45 min após a mistura, conforme TAB. 4 e 5 (descrita em segundos).

Em apenas uma das amostras (paciente 3) o tempo de incubação foi de apenas 2 min e não 4 min como os demais, pois o mesmo teve uma velocidade de coagulação muito superior em relação às outras amostras. (TAB. 4 e 5).

Os testes de coagulação do paciente número 1 não foram realizados porque o material colhido, conforme a norma do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Curitiba (Biobanco) foi descartado após o exame sorológico ter detectado resultado positivo para o anticorpo do vírus da Hepatite B.

Além dos exames prévios com o sangue total o plasma rico em plaquetas também foi submetido à contagem e, um teste padrão com trombina a 1,5 U foi realizado logo após a obtenção dos tempos de coagulação da mistura PRP/cloreto de cálcio a 10% (TAB. 3).

Tabela 4. Resultados do Tempo de Coagulação  
marcada pelo coagulômetro (tempo em segundos)

PRP + Cloreto de cálcio a 10%*						
Temperatura 37°C/ 4 min de incubação após a mistura.						
Paciente	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra	4ª amostra	Tempo médio no coagulômetro	
2		147,5	165,6	165,6	164	160,6
3	**	**	**	**	**	**
4		36,3	38,3	40,5	40,9	39,0
5		108,7	128,9	141,3	143,4	130,5
6		366,7	378,1	366,7	378,1	372,4
7		288,2	351,1	288,2	351,1	319,6
8		87,2	97	95,8	103,2	95,8
9		146,5	154	145,5	146,2	148,0

\* 1ml de PRP adicionado em 40µl de cloreto de cálcio a 10%  
Paciente 1 teve a amostra descartada pelo Biobanco

\*\* amostras com somente 2 min de incubação após a mistura  
paciente 3            8,9        11,7        10,8        11,6        média 10,7



Tabela 5. Resultados do Tempo Total de Coagulação

PRP + Cloreto de cálcio a 10%* / Temperatura 37°C/ 4 min de incubação			
Paciente	Média marcada no coagulômetro (segundos)	Tempo de incubação (4 min.) +15 segundos da pipetagem	Tempo total (segundos)
2	160,6	255	415,6
3	10,7	135**	145,7
4	39,0	255	294,0
5	130,5	255	385,5
6	372,4	255	627,4
7	319,6	255	574,6
8	95,8	255	350,8
9	148,0	255	403,0
		Média	399,6

\* 1ml de PRP adicionado em 40 $\mu$ l de cloreto de cálcio a 10%

\*\* somente 2 min de incubação

Paciente 1 teve a amostra descartada pelo Biobanco

Desvio padrão 151,6 s

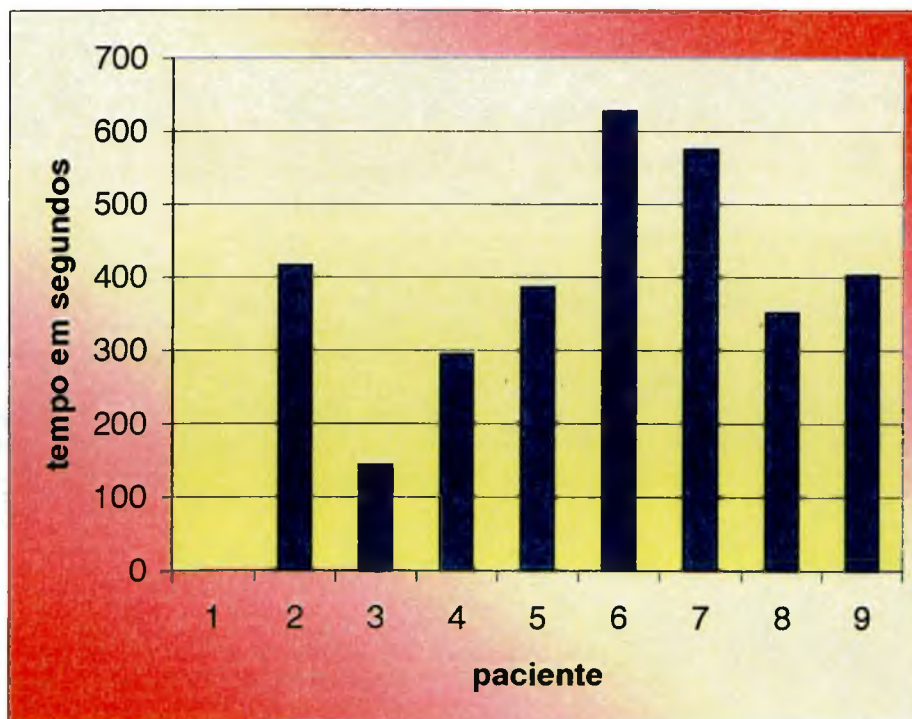


Gráfico 3- Tempo total de coagulação

Tabela 6. Resultados do Tempo de Coagulação  
(segundos)

PRP + Trombina*			
Temperatura 37°C/ sem período de incubação			
Paciente	1ª amostra	2ª amostra	Média
2	18,00	19,40	18,70
3	19,30	21,70	20,50
4	20,70	22,10	21,40
5	17,90	20,20	19,05
6	16,30	18,40	17,35
7	19,80	21,70	20,75
8	20,80	19,10	19,95
9	19,30	19,50	19,40

\*50 µl de trombina para 50 µl de PRP

Amostra controle de plasma fresco 20,45 s

Paciente 1 teve a amostra descartada pelo Biobanco

## **6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

A compreensão dos fenômenos envolvidos na resposta dos tecidos após sofrer uma injúria, abre a possibilidade de se intervir de maneira exógena utilizando-se materiais como o gel de plaquetas, com o intuito de se ter uma maior previsibilidade, bem como a maximização deste processo. (HOSGOOD, 1993; MARX; GARG, 1999). O plasma rico em plaquetas (PRP), apresenta características muito relevantes, é um produto atóxico, não imunorreativo e de baixa morbidade. Ele é obtido a partir da centrifugação do sangue do próprio paciente, portanto, é um material autógeno, eliminando o risco de infecções ou transmissão de doenças (ANITUA, 1999).

O potencial indutor da regeneração óssea e as propriedades regenerativas do PRP organizando a seqüência da cicatrização, é dada fundamentalmente pelos fatores de crescimento, principalmente PDGF, TGF- $\beta$  e IGF, os quais são liberados a partir da fragmentação (degranulação) das plaquetas. Desta maneira o PRP atua junto às células osteoprogenitoras e células mesenquimais provenientes dos tecidos adjacentes ou de enxertos ósseos autógenos e melhora a formação óssea (MARX; GARG, 1999).

Além de suas propriedades inerentes aos componentes moleculares, em certos tipos de cirurgia como as de enxerto de seio maxilar, onde é preciso uma quantidade muito grande de osso autógeno, a mistura do PRP com o osso autógeno provoca uma “expansão” da quantidade de osso disponível formando uma mistura de fácil manipulação e que seguramente ficará no local desejado. (MARX; GARG, 2002).

Portanto, a aplicação clínica do PRP exige que se inicie o processo de coagulação usando-se o cloreto de cálcio a 10% para neutralizar o efeito anticoagulante do citrato-fosfato-dextrose juntamente com mais um agente coagulante. O protocolo de Marx (1999) indica a preparação de uma mistura de

10ml de cloreto de cálcio a 10% com 10.000 unidades de trombina bovina tóxica (GENTRAC). Neste protocolo, 6ml de PRP são misturados a 1ml da mistura de cloreto de cálcio-trombina, e a 1ml de ar para servir como bolhas de mistura, em seguida a seringa é agitada por 6 a 10 s para iniciar a coagulação (MARX, 1999).

Shanaman; Filstein; Danesh-Meyer (2001) apresentaram a utilização do gel de plaquetas juntamente com enxerto autógeno e enxerto alógeno (osso seco congelado desmineralizado - DFDBA) numa proporção de 30% de osso autógeno para 70% de alógeno. O PRP foi obtido por aférese em um volume de 50 ml e ativado no momento da cirurgia com uma mistura de cloreto de cálcio a 10% com trombina bovina 1.000 U Johnson&Johnson. Segundo estes autores, o PRP não melhorou o desempenho da técnica de regeneração óssea guiada porém, melhorou significativamente a manipulação do material facilitando a realização da manobra.

É possível perceber uma variação da técnica de Marx (1999) uma vez que estes autores relataram a aplicação de trombina bovina diretamente sobre o enxerto, e conseqüentemente na ferida, durante a manobra de acomodamento do material de maneira incremental. Talvez este seja o fato principal da falta de entusiasmo destes pesquisadores quanto aos resultados obtidos com o PRP e o uso de grandes quantidades de trombina diretamente sobre o enxerto.

Vercelotti (2000) e Vercellotti; Russo; Gianotti (2002) demonstram a utilização do PRP em várias cirurgias de expansão alveolar onde o defeito criado foi preenchido com um vidro bioativo (Biogran®) e PRP ativado com Botropase® (Botropase batroxobina, A/C Ravizza Farmaceutici). Após 3 meses, na cirurgia de reabertura, constataram a presença de osso neoformado em todo o alvéolo, assim como uma total estabilização dos implantes.

Anitua (1999) em um protocolo simplificado, dispensou a utilização de bolsas de coletas e utilizando-se tubos e minicentrífugas obtém o PRP a partir

de uma pequena porção de sangue. Neste protocolo simplificado o volume de cerca de 1,2 ml por tubo, é associado somente a 50µl de cloreto de cálcio a 10% e, segundo o autor, após 5 a 10 min da mistura o gel é formado .

Todo este protocolo, entretanto, está passando neste momento por uma profunda mudança, visto que novos estudos estão sendo publicados com o intuito de esclarecer as mudanças qualitativas e quantitativas que ocorrem no sangue quando se incorpora a ele substâncias anticoagulantes ou coagulantes. (HANDEL et. al., 2002).

Landesberg; Roy; Glickman (2000) defenderam a substituição do citrato de fosfato-dextrose pelo uso do EDTA como agente anticoagulante, bem como a utilização de uma preparação comercial pronta, o agente coagulante ITA (Natrex Technologies Inc, Greenville, NC) para promover a coagulação de PRP. Marx (2000) porém, argumenta que ainda hoje o anticoagulante preferível é o citrato de fosfato-dextrose porque preserva a integridade da membrana das plaquetas, o que não ocorre com o EDTA, pois o mesmo fragmenta as plaquetas. O autor também mantém a preferência pelo cloreto de cálcio e trombina bovina como agente coagulante à preparação comercial ITA. Ressaltou que, uma vez que os defensores de tal preparação não divulgam a sua composição química e a maneira como é obtido, o uso desta, ou de qualquer outra substância cujo método de elaboração é mantido em segredo, não pode ser considerado seguro.

De acordo com Ramesh et al. (1990) os agentes coagulantes modificam o processo de cicatrização e, por estas razões influenciam o seu uso cirúrgico. Em um estudo com ratos a botropase foi comparada à trombina e a fibrina. Os resultados histológicos e bioquímicos mostraram que a botropase estimula todas as fases do reparo dos tecidos enquanto que, a trombina atrasa a contração da ferida, porém, a fibrina não teve uma ação discernível.

Estes trabalhos, assim como os de Handel et al. (2002) reforçam a necessidade de conhecermos melhor o real mecanismo de ação dos produtos anticoagulantes e coagulantes que são incorporados às técnicas cirúrgicas a fim de que possamos ter um maior controle das situações clínicas quando estes elementos são utilizados.

Da mesma forma existem clínicos e mesmo países (como alguns da comunidade europeia) que são radicalmente contrários ao uso da trombina para iniciar o processo de coagulação por tratar-se de um material de origem bovina (MARX; GARG, 2002).

Vercellotti (2000) utilizou em seus trabalhos clínicos a botropase, uma enzima obtida a partir do veneno de ofídios do gênero *Bothrops*. Ele relata bons resultados com este agente coagulante, uma vez que na Itália a trombina bovina tem sua comercialização proibida. Este produto coagulante porém, demora de 5 a 10 min para promover a coagulação do PRP (IMPLANTWEB, 2002).

Os riscos de transmissão de doenças e respostas imunorreativas inerentes ao uso de um material orgânico que não autógeno, nos leva a pensar sobre alternativas que não comprometam o uso potencial do PRP, sem contar que, os custos das cirurgias realizadas no Brasil quando se agrega à técnica materiais importados, como a trombina bovina, crescem significativamente.

Sabendo-se que o PRP é uma fração do plasma e que contém grande quantidade de fibrinogênio e fatores da coagulação, parece lógico que por si só este material possa promover a coagulação uma vez que o anticoagulante seja neutralizado. Segundo Marx e Garg (2002) existe a possibilidade de se misturar uma pequena quantidade de sangue autólogo ou mesmo de osso medular autógeno particulado junto ao PRP, pois, estes produtos contêm os elementos necessários para se iniciar a cascata de eventos próprios da coagulação.

Porém, o que se observa na prática é que não há previsibilidade quanto ao tempo necessário para se promover a coagulação do PRP quando se utiliza apenas o cloreto de cálcio a 10%, o que acaba gerando uma ansiedade extra ao cirurgião que opta por esta técnica.

Um fator que somente agora tem sido alvo da atenção dos cirurgiões é o fato de que a coagulação se dá às expensas de reações enzimáticas e que por esta razão a temperatura tem grande influência na velocidade de suas reações. (OTTAWAY; APPS, 1986; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996). Sendo assim, se a temperatura corpórea de 37°C é previamente alcançada, no momento que o cloreto de cálcio à 10% é misturado ao PRP as reações em cascata iniciam-se imediatamente e promovem a coagulação.

Partindo-se deste raciocínio esta pesquisa foi realizada e, os resultados mostram que quando se tem um aquecimento prévio do PRP, e também do cloreto de cálcio a 10% em uma temperatura de 37°C a coagulação do plasma rico em plaquetas pode ser previsível. Neste estudo foi possível se promover a coagulação de oito amostras de PRP, em quatro contra-provas cada uma e obteve-se 100% de coagulação em um tempo que variou de 2,42 e 10,45 min. (GRAF. 3).

Algumas amostras de PRP encontravam-se com a quantidade padrão de plaquetas aquém do padrão do Biobanco que é de  $5,5 \times 10^{10}$ . Em condições normais, o PRP que se encontra abaixo desta contagem de plaquetas é sistematicamente descartado para fins hemoterápicos. (TAB. 1 e 2) entretanto, pode-se observar coagulação semelhante em todas as amostras. Apesar de todas as amostras terem sido testadas quanto a presença de fatores intrínsecos que garantem a coagulação espontânea do plasma (TTPA), há que se levar em consideração o fato de que em função da rotina do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas (Biobanco) e do Laboratório de Análises Clínicas do mesmo Hospital, os testes para a mensuração do tempo de formação do coágulo com as amostras do PRP somente foram realizados 48 h



após a coleta e centrifugação do sangue dos doadores voluntários. Sabe-se que quando se trata de plaquetas, o tempo de armazenagem após a coleta do sangue exerce uma grande influencia na integridade das mesmas. Por esta razão, um teste padrão com trombina foi realizado imediatamente após a conclusão dos testes com o cloreto de cálcio a 10%. Realizando-se este teste neste momento, garantiu-se que o PRP testado estava em condições normais no que diz respeito à sua capacidade de coagulação em comparação à amostra controle de plasma fresco de vários pacientes normais.

A utilização de um coagulômetro, no entanto, não nos permite comparar a organização da rede de fibrina que ocorre com os diferentes agentes coagulantes, também não permite quantificar a porcentagem de fibrinogênio envolvido na formação desta rede de fibrina, nem tampouco as possíveis alterações na viabilidade dos fatores de crescimento com este aquecimento prévio. Sabe-se que através da análise com este aparelho, é possível obter a coagulação de maneira previsível no que diz respeito à variação de tempo e que a incorporação de trombina bovina ou de botropase não é de fundamental importância quando se quer promover a coagulação do PRP.

Ressalta-se que apesar de se obter um tempo maior para a formação da rede de fibrina com a incorporação somente do cloreto de cálcio a 10% em comparação aos dados da literatura da mistura de cloreto de cálcio a 10%+trombina bovina, este tempo pode ser administrado pelo cirurgião, sem contudo incorporar à técnica os riscos relativos ao uso de um material alógeno ou xenógeno.

## **7 CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos é lícito concluir que:

1. O cloreto de cálcio por ser um material inorgânico não incorpora à técnica de utilização do plasma rico em plaquetas os riscos inerentes ao uso de um material alógeno ou xenógeno.
2. É possível utilizar o cloreto de cálcio a 10% como único agente direto a ser agregado ao plasma rico em plaquetas com o intuito de propiciar a sua ativação em condições onde variações no tempo de coagulação não interfiram nos resultados.
3. O controle da temperatura do plasma rico em plaquetas a 37°C possibilitou a formação do coágulo em todas as amostras analisadas, conferindo à técnica mais previsibilidade.
4. Novas pesquisas como as que utilizam anticorpos monoclonados podem esclarecer de maneira mais completa a formação da rede de fibrina quando se agrega apenas o cloreto de cálcio a 10% ao plasma rico em plaquetas, assim como verificar possíveis alterações nos fatores de crescimento durante o seu aquecimento prévio.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>3</sup>

ACEUROPA LDA. Disponível em: <http://www.aceuropa.com> Acesso em: 30 de maio de 2002.

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

ANTONAIDES, H. N.; WILLIAMS, L.T. Human platelet-derived growth factor: structure and functions. **Federation Proceedings**, n. 42, p. 2630-2634, 1983.

BECKER, W. et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-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**, Chicago, v. 63, n. 11, p. 929- 940. 1992.

BERNARD, J. et al. **Hematologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. cap. 12, p. 191-205.

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

CANALIS, E.; MCCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation en vitro. **J. Cell Physiol**, New York, n.140, p. 530. 1989.

CATHERINE, S.M. What's new in transfusion medicine? **Pediatr. Clin. North Am.**, Philadelphia, n. 43, v. 3, p. 793-808. 1996.

DACIE, S. J.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. Hong Kong: Churchill Livingstone, 1995. p. 308-309.

DELWICHE, F. et al. Platelet rich in growth factor enhances in vitro erythropoieses via stimulation of mesenchymal cells. **Clin. Investig.**, Berlin, v. 1, n. 76, p. 137-42, 1985.

FRAY, T.R.; WOOD, E. J. Effect of growth factors on fibroblast migration in a simplified wound healing model. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 24, n. 2, 258s, 1996.

---

<sup>3</sup> Baseada na NBR 6023:2002 da ABNT

GARG, A. K. Grafting Materials in Repair and Restoration. In: LYNCH, S. E. et al. **Tissue Engineering, applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Carol Stream: Quintessence Books, 1999. cap. 5, p. 83-101.

GIANNOBILE, W. V. Periodontal Tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In: LYNCH, S. E. et al. **Tissue Engineering, applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Carol Stream: Quintessence Books, 1999. cap. 14, p. 231-243.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 33 e 36. p. 397-404, 421-430.

HANDEL, M. et al. Influence of acid-citrate-dextrose anticoagulant on blood quality in retransfusion systems after total knee arthroplasty. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, Berlin, v. 5, n. 122, p. 269-273, June 2002.

HARVEST TECHNOLOGIES CORPORATION. Platelet Rich Plasma Products. Disponível em: [http://www.harvesttech.com/US\\_Disposables.htm](http://www.harvesttech.com/US_Disposables.htm) Acesso em: 30 de mai. 2002.

HOCK, J.M.; CENTRELLA, M.; CANALIS, E. IGF-I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122 p. 254-260, 1988.

HOLLINGER, J. O.; BUCK, D. C.; BRUDER, S. P. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: LYNCH, S. E. et al. **Tissue Engineering, applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Carol Stream: Quintessence Books, 1999. cap. 2, p. 17-53.

HOOD, A. G.; HILL, A. G.; REEDER, G. D. Perioperative autólogos sequestration III: A new physiologic glue with wound healing properties. **Proceeding of the American Academy of vascular perfusion**. p. 14-126, 1993.

HOSGOOD, G. Wound Surgery. The role of Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor Beta. **Vet. Surg**, v.6, n.22, p. 490-495. 1993

HOWES, R.; BOWNESS, J.M.; GROTENDORST, G.R.; MARTIN, G.R.; REDDI, A.H. Platelet-Derived Growth Factor Enhances Demineralized Bone Matrix-Induced Cartilage and Bone Formation. **Calcif Tissue Int.**, New York, n. 42, p. 34-38. 1988.

IMPLANTWEB. Disponível em: <http://www.implantweb.it/tecnologia> Acesso em: 15 ago. 2002.

JENSEN, O. T. et al. Sinus Graft Consensus Conference of 1996. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 13, 1998.

JIANG, D. et al. Modification of in osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors. **J. Periodontol**, Chicago, v. 70, p. 834-839, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974. cap. 8, p. 132-152.

KEENAN, R.M. Platelet-rich plasma factor. Implant Dentistry of Washington. Disponível em: <http://www.seattle-implants.com/articles/platelet.htm> Acesso em: 23 fev. 2001.

KORDICH, L.; AVALOS, J. C. S.; VIDAL, H. O. **Manual de Hemostasia Y Trombosis**. 2 ed. Buenos Aires: Buenos Aires, 1990. p. 162-169.

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

LENHARO, A.; MENDONÇA, R. G. Plasma rico em plaquetas. In: BEZERRA, F. J. B.; LENHARO, A. **Terapia Clínica Avançada em Implantodontia**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap. 4, p. 77-104.

LU, L.; CURRIER, B.L.; YASZEMSKI, M.J. Synthetic bone substitutes. **Curr. Opin. Orthop.**, v. 11, n. 5, p. 383-390, oct. 2000.

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

LYNCH, S. E.; COLVIN, R. E.; ANTONIADES, H. N. Growth factors in wound healing. **J. Clin. Invest.**, New York, n. 84, p. 640-646. 1989.

LYNCH, S. E. et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J. Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 16, p. 545-548, 1989.

MAGINI, R. S. et al. **Cirurgias ósseas pré-implantes**. Florianópolis: Produção CDVD Multimídia, 2001. 1 CD Digital data, Sonopress.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod**. St Louis, v. 6, n. 85, p. 638-46, 1998.

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

MARX, R.E. Discussion. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 3, n. 58, p. 300-301, Mar. 2000.

MARX, R.E.; GARG. A. K. Applications of PRP in Oral and Maxillofacial Surgery. Disponível em: [http://www.plateletrich.com/frame\\_right.html](http://www.plateletrich.com/frame_right.html)  
Acesso em: 30 mai. 2002.

MATRAS, H. Fibrin Seal: The state of the art. **J. Oral Maxillofac. Surg.** Philadelphia, n. 43, p. 605, 1985.

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

MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. Bone growth factors. **Clin Orthop.**, Philadelphia, v. 263, p. 30-48, 1991.

OTTAWAY, J. H.; APPS, D. K. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1986, cap. 3, p. 25.

PFEILSHIFTER, J. et al. Stimulation on bone matrix apposition, in vitro by growth factors, a comparison between insulin-like growth factor-I, platelet-derived growth factor and transforming growth factor-B. **Endocrinology**, Baltimore, v. 127, p.69-75, 1990.

PERFUSION LINE. Centro de Estudos de Circulação Extracorpórea. Programa de Educação Continuada. Disponível em: <http://perfline.com/curso-sangue/sangue08.html> Acesso em: 29/06/2002.

RAMESH, K. V. et al. Effects of procoagulants on wound healing. **Ind. J. Exp. Biol.** New Delhi, v. 1, n. 28, p. 43-45, Jan. 1990.

RENOUARD, F.; RANGERT, B. **Fatores de Risco no Tratamento com implantes**. São Paulo, Quintessence, 2001. cap.6, p. 143-168.

ROBERT, A. B.; SPRON, M. B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). **Growth factors**, Yverdon-Les Bains, n. 8, p. 1-9, 1993.



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

SCARSO FILHO, J. et al. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO, J. C.; POLIDO, W. D. **Implantes Osseointegrados: Cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001, cap. 16, p.315-342.

SCHWARTZ, Z. et al. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 17, p. 158-172, 1998.

SHANAMAN, R.; FILSTEIN, M.; DANESH-MEYER, M. Localized Ridge Augmentation using GRB and Platelet-rich Plasma: Case Reports. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, n. 21, p. 345-355, 2001.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D.Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelets concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** Lombard, v. 15, p. 879-882, 2000.

TAYAPONGSAK, P. et al. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. **J. Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v. 2, n. 52, p. 161-166, 1994.

THE PLATELET GEL NETWORK. Anatomy of platelets. Disponível em <http://www.plateletgel.net> Acesso em 19 de junho de 2002.

VERCELLOTTI, T. Piezoelectric surgery in implantology: a case report – a new piezoelectric ridge expansion technique. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, n. 20 p. 359-365, 2000.

VERCELLOTTI, T.; RUSSO, C. GIANOTTI, S. A new piezoelectric ridge expansion technique in the arch: a case report. **Word Dentistry**. Disponível em: <http://www.worddent.com> Acesso em: 01 de jun. 2002.

VIEIRA, E. C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Biologia Celular e Biologia Molecular**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996, cap. 7, p. 112.

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. 11, n. 55, p. 1294-1299, Nov. 1997.

**ANEXOS**

## 9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_,  
 abaixo assinado, portador(a) da carteira de identidade nº \_\_\_\_\_,  
 residente na cidade de \_\_\_\_\_,  
 na rua \_\_\_\_\_,  
 nº \_\_\_\_\_, telefone \_\_\_\_\_ declaro estar  
 ciente que participarei de pesquisa científica que visa o estudo da formação do  
 coágulo quando se utiliza cloreto de cálcio com uma temperatura controlada  
 para a ativação do plasma rico em plaquetas.

Esta pesquisa tem por objetivo provar que não é necessária a utilização  
 de componentes do plasma bovino, a trombina bovina, para a ativação do gel  
 de plaquetas, uma fração do sangue utilizada em cirurgias ósseas, uma vez  
 que um componente inorgânico, o cloreto de cálcio, pode perfeitamente fazer  
 esta função.

Para que esta pesquisa possa ser realizada, parte do sangue por mim  
 doado (plasma rico em plaquetas) será utilizada em pesquisa *in vitro*, em  
 laboratório. Este material servirá basicamente para a verificação dos agentes  
 aglutinantes, não será multiplicado nem servirá como base para experiências  
 genéticas. O excedente (hemácias) será utilizado pelo Banco de Sangue do  
 Hospital de Clínicas da cidade de Curitiba- Paraná, para transfusões  
 sanguíneas conforme a necessidade.

A coleta será realizada pelo próprio Banco de Sangue do Hospital de  
 Clínicas de maneira padrão para doadores de sangue mas, além da sorologia,  
 as amostras serão examinadas também através de hemograma e  
 coagulograma para se afastar qualquer tipo de doenças sanguíneas que  
 possam alterar os resultados da pesquisa.

Estou ciente que após a realização dos testes sorológicos o meu sangue  
 somente será utilizado se forem acusados resultados negativos para a  
 transmissão de doenças. Uma vez concluído os exames sanguíneos serei  
 informado com privacidade quanto aos seus devidos resultados.

Declaro também que recebi esclarecimento sobre minhas dúvidas e que  
 entendi o propósito da pesquisa. Sendo assim, concordo com a doação do  
 sangue e se o resultado dos exames enquadrarem-se na normalidade, autorizo  
 a sua utilização para pesquisa laboratorial bem como a divulgação de seus  
 resultados junto à comunidade científica e a população em geral, preservando-  
 se meu anonimato.

Curitiba, \_\_\_\_\_ de julho de 2002.

\_\_\_\_\_  
 Pesquisadora Responsável  
 Moira Pedroso Leão  
 Telefones: (41)30291550  
 (41) 3361037  
 (41) 99947627

Rua Pe Anchieta nº 1846 sl. 1005 Curitiba - PR

## 9.2 Fichas de anamnese utilizadas pelo Biobanco



**HOSPITAL DE CLÍNICAS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Biobanco

### REQUISITOS PARA SER DOADOR DE SANGUE

- 01 - **Doenças:** o doador deve ser sadio. Se tiver alguma doença ou faz uso de medicação, você poderá ser impedido de doar. Ex.: diabetes, convulsões, câncer, doenças cardíacas, hipertensão arterial grave, doenças crônicas, etc. Em caso de dúvidas, ligue para 360-1875;
- 02 - **Medicamentos:** anticoncepcionais, vitaminas, medicações digestivas não contra-indicam a doação. Outros medicamentos, como antibióticos, corticóides, antipsicóticos sim. Na dúvida, ligue e pergunte ao Biobanco;
- 03 - **Idade:** entre 18 (dezoito) e 60 (sessenta) anos;
- 04 - **Gestação:** grávidas e até 4 (quatro) meses após o parto não podem doar;
- 05 - **Peso:** é necessário ter mais de 50kg;
- 06 - **Vacinação:** uma série de vacinas contra-indicam a doação temporariamente. Se você foi vacinado, ligue para o Biobanco e informe-se;
- 07 - **Condições Gerais:** o doador deve ter dormido bem na noite anterior, não poderá exercer atividade de risco de vida após a doação, como subir em andaimes, operar serras, etc.;
- 08 - **Álcool:** se você fez uso excessivo de bebidas alcoólicas nas últimas 12 (doze) horas, não doe;
- 09 - **Contato Sexual - Relação Sexual:** relação sexual com parceiro(a) não fixo(a) nos últimos 6 (seis) meses contra-indica a doação;
- 10 - **AIDS:** usuários de drogas, parceiros sexuais de usuários de drogas, de promíscuos sexuais e de receptores de sangue há menos de 6 (seis) meses não devem doar sangue;
- 11 - Hepatite, sífilis e malária podem contra-indicar a doação. Informe-se no Biobanco;
- 12 - Gripe e alergias podem ser motivo de inaptidão. Informe-se no Biobanco;
- 13 - **Cirurgias:** grandes cirurgias impedem de doar por 6 (seis) meses;  
Extração dentária por (três) dias;
- 14 - **Tatuagem:** inaptidão por 12 (doze) meses;
- 15 - Homens podem doar a cada 60 dias e mulheres a cada 90 dias;
- 16 - **Documentos:** por Lei Federal é obrigatória a apresentação de documento de identidade;
- 17 - Estar alimentado, porém sem ingestão de alimentos gordurosos.

#### Horário para Doação de Sangue:

Segunda a Sexta-feira: 7h - 18h00

Sábados e Feriados: 9h30 - 14h30

#### Horário para Realização de Exames

para Doação de Plaquetas:

Segunda a Sexta-feira: 8h - 11h

\* **Apresentar Carteira de Identidade**

\* **Doar em nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Registro:**

Local: Rua Agostinho de Leão Jr. 108 - Fones (41) 360-1875 ou 360-1800, R. 6417

7h - 13h - Assist. Social Sandra

13h - 19h - Assist. Social Irene



**HOSPITAL DE CLÍNICAS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BioBANCO

## TRIAGEM DO DOADOR

Doador n.º: \_\_\_\_\_

Data da última doação:    /    /

**PREENCHER EM LETRA DE FORMA**

DATA    /    /

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento:    /    /    RG.: \_\_\_\_\_ Sexo:  M  F

Nacionalidade: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_ Religião: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Filiação: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

CEP: [ ][ ][ ][ ][ ] - [ ][ ][ ][ ]    Telefone: \_\_\_\_\_

### Responda às Perguntas Assinalando Sim (S) ou Não (N)

- 1  S  N Já doou sangue alguma vez?
- 2  S  N Apresentou alguma reação?
- 3  S  N Considera-se em boa saúde?
- 4  S  N Alimentou-se hoje?
- 5  S  N Ingeriu bebida alcoólica nas últimas 12 horas?
- 6  S  N Nos últimos 07 dias teve gripe, dor de garganta, alergia, febre, ferida no corpo?
- 7  S  N Está fazendo algum tratamento ou tomando remédios?
- 8  S  N Recebeu alguma vacina (antitetânica, anti-rábica, hepatite B) ou outras?
- 9  S  N Tem ou teve doenças do sangue, coração, rim, fígado ou tireóide?
- 10  S  N Tem ou teve diabetes, lepra, tuberculose, câncer, asma, convulsão?
- 11  S  N Teve hepatite, exame positivo ou contato com hepatite nos últimos 12 meses?
- 12  S  N Teve doença de Chagas ou exame positivo para Chagas?
- 13  S  N Teve malária (maleita) ou esteve em região de malária nos últimos 6 meses?
- 14  S  N Fez extração dentária nos últimos 03 meses?
- 15  S  N Fez alguma cirurgia nos últimos 06 meses?
- 16  S  N Fez acupuntura, tatuagem, colocou brincos nos últimos 12 meses?
- 17  S  N Está amamentando, grávida ou teve aborto nos últimos 3 meses?    G = \_\_\_\_\_    A = \_\_\_\_\_
- 18  S  N Tem tosse persistente ou falta de ar?
- 19  S  N Está com perda de peso inexplicável?
- 20  S  N Está com lesões esbranquiçadas na boca e na garganta?
- 21  S  N Apresenta aumento de gânglios linfáticos?
- 22  S  N Tem diarreia persistente?
- 23  S  N É portador ou teve sífilis?
- 24  S  N Nos últimos 06 meses teve relação com mais de um(a) parceiro(a) ou novo(a) parceiro(a)?
- 25  S  N Teve relação homossexual, mesmo que uma só vez?
- 26  S  N É usuário ou já usou drogas injetáveis?
- 27  S  N Teve algum(a) parceiro(a) com hemofilia?
- 28  S  N Teve ou tem algum parceiro(a) com teste positivo de AIDS?
- 29  S  N Recebeu sangue nos últimos 10 anos?
- 30  S  N Pagou para manter relação sexual nos últimos 06 meses?

**ATENÇÃO: ENTRE A CONTAMINAÇÃO PELO VÍRUS DA AIDS E O DESENVOLVIMENTO DE TESTES POSITIVOS PODE LEVAR 06 MESES. SE VOCÊ SE ENQUADRA EM ALGUMA SITUAÇÃO DE RISCO, NÃO DOE SANGUE. VOCÊ PODE CONTAMINAR ATÉ 04 PESSOAS.**

**\*\* NAS DOAÇÕES DE SANGUE PODEM OCORRER REAÇÕES, TAIS COMO: DESMAIOS, NÁUSEAS E SUDORESE. TIRE SUAS DÚVIDAS COM OS RESPONSÁVEIS PELA TRIAGEM.**

Declaro estar ciente das reações e da minha responsabilidade no ato de doar sangue e na veracidade das respostas assinaladas.

Assinatura do Doador



### 9.3 Equipamentos de pequeno porte para obtenção do plasma rico em plaquetas

#### 9.3.1 PCCS

As informações abaixo são fornecidas pelo próprio fabricante:

Fabricante: 3i

Propriedades:

- utiliza 45 a 100ml de sangue autólogo para 4,5 a 10 ml de PRP.
- É de fácil manuseio.
- Pode ser colhido em ambiente ambulatorial ou no consultório odontológico.
- Não requer pessoal técnico especializado para operar o equipamento.



Figura 45- Sangue autólogo sendo inserido dentro do dispositivo do PCCS.

Fonte- Marx e Garg (2002).



Figura 46- Dispositivo interno.



Figura 47- PCCS.



Figura 48- Bolsa com PRP ainda com botão plaquetário.

Fonte- Marx e Garg (2002).



Figura 49- Distribuição homogênea das plaquetas no PRP.



Figura 50- PRP pronto.

### 9.3.2 Smart PreP Platelet Concentrate System

As informações e imagens que seguem abaixo são fornecidas pelo próprio fabricante:

Fabricante: Harvest

Propriedades:

- Tempo de centrifugação: 15 minutos.
- Dispensa o uso de bolsa coletora de sangue.
- Automático, de fácil manuseio.
- Acompanha kits pré-montados descartáveis para 50 ou 100cc se sangue.
- Requer 50cc de sangue para 3-9cc de PRP ou 100cc de sangue para 10-20cc de PRP.
- Alta taxa de coleta de plaquetas viáveis (70%).
- A concentração plaquetária pode ser facilmente ajustada.
- Possibilita a retirada de sangue do próprio paciente.
- Dispensa coleta prévia.
- Estabilidade do PRP em temperatura ambiente por 8 horas com este método estéril.



Figura 51- Smart PreP



Figura 52- Separação dos elementos do sangue. Botão plaquetário.

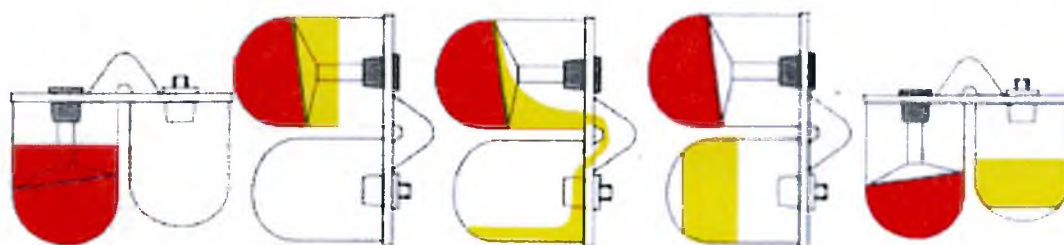


Figura 53- Sistema fechado de separação celular

Através da densidade própria do sangue, suas frações são separadas por um processo de centrifugação. Após o início da rotação o dispositivo interno assume uma posição vertical, separando o RBP do PRP e PPP. Na segunda etapa da centrifugação a velocidade de rotação diminui e o PRP e o PPP passam para o outro compartimento.





Figura 54- Materiais



Figura 55- Dispersador



Figura 56- Gel de plaquetas

Este equipamento acompanha um dispersador simultâneo das substâncias não homogêneas, possibilitando a formação rápida do gel de plaquetas. (HARVEST TECHNOLOGIES CORPORATION, 2002).

### 9.3.3 ACE

As informações e imagens abaixo são fornecidas pelo fabricante.

Fabricante: ACE

Propriedades:

- Tempo de centrifugação: 2 centrifugações de 10 minutos cada.
- Utiliza tubos de ensaio para a centrifugação.
- A coleta e separação do plasma têm que ser feita manualmente.
- Requer a utilização de seringas descartáveis para a coleta e separação do sangue.
- Possibilita a retirada de sangue do próprio paciente.
- Dispensa coleta prévia.
- O PRP deve ser utilizado imediatamente após a coleta e centrifugação.



Figura 57- Centrífuga ACE



Figura 58- Coleta do sangue em tubos



Figura 59- Colocação inclinada dos tubos.



Figura 60- Primeira centrifugação.



Figura 61- Separação celular após primeira centrifugação.



Figura 62- Transferência do PRP juntamente com a primeira camada de células vermelhas



Figura 63- Colocação do conteúdo aspirado em outro frasco.



Figura 64- Segunda centrifugação.



Figura 65- Botão plaquetário no fundo do tubo.



Figura 66- Retirada do plasma pobre em plaquetas (PPP).



Figura 67- Colocação do PPP em um recipiente estéril.



Figura 68- Retirada do plasma rico em plaquetas (PRP).  
Fonte: ACEuropa Lda (2002)



Figura 69- Separação do PPP ( amarelo) do PRP (vermelho).