

José Scarso Filho

**AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA
PROLIFERAÇÃO CELULAR – ESTUDO “IN VITRO”**

FLORIANÓPOLIS
2002

José Scarso Filho

**AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA
PROLIFERAÇÃO CELULAR – ESTUDO “IN VITRO”**

AUTOR: José Scarso Filho: aluno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, opção Doutorado em Implantodontia, com matrícula inicial em fevereiro de 2000 e término do período de obtenção dos créditos nas disciplinas em novembro de 2002.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso: Professor Titular, lotado no Departamento de Estomatologia, Disciplina de Oclusão, da Universidade Federal de Santa Catarina.

FLORIANÓPOLIS
2002

***FICHA
CATALOGRÁFICA***

S287a Scarso Filho, José

Avaliação do Plasma rico em plaquetas na proliferação celular – estudo “in vitro” / José Scarso Filho; orientador Antônio Carlos Cardoso. – Florianópolis, 2002.

75f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2002.

Inclui bibliografia

1. Plaquetas. 2. Fatores de crescimento derivado de plaquetas. 3. Implante dentário. I. Cardoso, Antônio Carlos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-089.843

Catálogo na fonte por: Vera Ingrid Hobold Sovernigo CRB-14/009

José Scarso Filho

**AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA
PROLIFERAÇÃO CELULAR – ESTUDO “IN VITRO”**

Esta Tese foi julgada para obtenção do Título de “Doutor em Odontologia”, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 04 de Dezembro de 2002.

Prof. Dr. Mauro Amaral Caldeira de Andrada
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso – Orientador _____

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini - Membro _____

Prof. Dr. José Nazareno Gil - Membro _____

Prof. Dr. Carlos Alberto Dotto - Membro _____

Prof. Dr. Waldyr Antônio Janson – Membro _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais José Scarso e Zaira da Fonseca Palma Scarso.

Meus primeiros mestres

Meu constante exemplo de vida.

Responsáveis pelos meus valores morais e princípios.

Aprendi que o desapego, a humildade, a persistência e a determinação foram fundamentais para o meu crescimento.

**Ao meu irmão e amigo Ciro.
Companheiro de todas as horas
Parceiro nas atividades de
trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Cardoso, o orientador, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso e em especial pela sua didática de ensino.

Ao Professor e Amigo Ricardo de Souza Magini, pelo crédito e oportunidade de cursar tão expressivo curso.

À bióloga Cristina Marta de Oliveira Barbieri pela fundamental contribuição nos ensinamentos de cultura celular e desenvolvimento da metodologia para PRP na Faculdade de Farmácia de Araraquara -Núcleo de Hematologia.

Aos colegas de curso José Cícero Dinato e André Luiz Zétola pelo convívio e amizade.

À Professora Dra Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho que mesmo distante sempre se mostrou presente no divino “dom” de ensinar.

À Professora Dra. Iracilda Zeppone Carlos e a funcionária Mariza Campus Polesi Placeres da Faculdade de Farmácia de Araraquara – UNESP que me auxiliaram na contagem celular deste experimento.

A Elaine Cristina da Silva que auxiliou na montagem, não medindo esforços para a melhoria deste trabalho.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Prof Mario Francisco Real Gabrielli, Prof Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, Prof Eduardo Hochuli Vieira, Prof Roberto Henrique Barbeiro e Prof Valfrido Antonio Pereira Filho por assumirem minhas atividades durante o período deste curso em que estava afastado.

Aos professores Luiz Paulo Restiffe de Carvalho, Márcia Maria Dalmolin, Carmen Terezinha Moreira Rodrigues, Nestor Urbaninho Curti, Edmilson Bersani de Oliveira, João Neudenir Arioli Filho, Paulo Y. Kano que me auxiliaram e permitiram a oportunidade de trabalhar e aprender juntos nesta etapa profissional.

À Professora Dra. Maria José Carvalho Rocha, pelos ensinamentos na pós-graduação e por sua incessante busca na excelência pelo ensino do CCS da UFSC.

Às funcionárias do CEPID Roseli Ponick, Fabyani Costa, Susan Evelin de Souza pelo apoio e auxílio durante o curso.

A funcionária Ana Maria Vieira Frandolozo, secretária da pós-graduação da Odontologia, pela presteza e eficiência.

A todos vocês, meu muito obrigado !!!

GLOSSÁRIO

- Cultura celular “in vitro” = cultivo de células em meio artificial
- Adesividade plaquetária = efeito de adesão que as plaquetas possuem que podem ser mensuradas por teste
- Agregação plaquetária = efeito de agregação que as plaquetas possuem e que podem ser mensuradas por teste
- Análise de variância = análise estatística da variação de significância entre amostras
- Azul Trypan = corante azul específico que penetra pela membrana celular de células mortas
- Câmara de Neubauer = placa de vidro que contém 50 divisões em forma de quadrado utilizado para contagem celular
- Capela fluxo laminar = câmara fechada com aspiração utilizada para manipulação de agentes contaminantes
- Centrífuga = equipamento de centrifugação
- Cintilador = equipamento de contagem celular
- Citotoxicidade = teste químico de toxicidade celular “in vitro”
- Confluência celular = efeito de toque das células em crescimento “in vitro”
- Enzima = substância que atua na quebra de componentes orgânicos
- Eritrócitos = células vermelhas do sangue
- Estufa CO₂ = equipamento que promove a manutenção da temperatura e gás carbônico constantes para o crescimento celular
- Garrafa de crescimento celular = dispositivo em forma de garrafa utilizado para cultura celular
- Geleificação = efeito de transformar substância líquida em gel
- Linhagem celular = mesma família de células
- Meio de cultura = solução contendo todos os nutrientes necessário para manutenção celular
- Micropipetas = equipamento para dosagem de solução em microlitros
- Microplacas = placas de cultura celular formada por 96 casulos de 370 microlitros
- Microscópio observação direta = equipamento para visualização de células no meio de cultura sendo que a fonte de luz é invertida.
- Plaqueamento = ato de coletar e semear células em novas garrafas de crescimento celular
- Subconfluência = efeito de recobrimento de células na garrafa em torno de 70 %
- Subcultura = número de plaqueamentos que uma linhagem celular passa durante o experimento
- Timidina tritiata = substância radioativa que participa do ciclo de mitose celular
- Unidade de sangue = bolsa de sangue com 440 a 460 mililitros
- Venipuntura = ato de coletar o sangue por meio de acesso venoso
- Viabilidade celular = é a capacidade vital das células em meio de cultura

ABREVIATURAS

³H – Timidina tritiata
 °C - Graus Celsius
 ATB-M – Antibiótico e Antimicótico
 ATV – Enzima Tripsina Versene
 cel - Célula
 cm - Centímetro
 cm² - Centímetro quadrado
 ClCa – Cloreto de cálcio
 CO₂ – Gás carbônico – Dióxido de carbono
 CPDA – Citrato, Fosfato, Dextrose, Adenina
 DME - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
 FFAR – Faculdade de Farmácia de Araraquara
 M - Mol
 mg – Miligrama
 min - Minuto
 ml - Mililitro
 mm - Milímetro
 mM - Milimol
 N – Número e células contadas
 nm – Nanômetro
 ng - Nanograma
 NIH – Linhagem celular de fibroblastos provenientes de ratos “Novergicus”
 Nnc – Número de células não coradas
 NT – Número de células totais
 NV – Número de células viáveis
 O₂ - Oxigênio
 PBSA - Phosphate Buffer Saline = Solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio
 pH - Potencial hidrogeniônico
 PRP – Plasma Rico em Plaquetas
 Q – Quantidade de quadrados contados na câmara de Neubauer
 Rpm – Rotação por minuto
 s - Segundo
 SFB - Soro Fetal Bovino
 μCi – Micro quiri
 μm - Micrômetro
 μl - Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Histórico	6
2.2 Meio de cultura	7
2.3 Definição e sinonímia	8
2.4 Composição bioquímica	9
2.4.1 Plasma	9
2.4.2 Leucócitos	9
2.4.3 Plaquetas	9
2.5 Fatores de crescimento do PRP	11
2.5.1 P.D.G.F.	11
2.5.2 TGF- β	13
2.5.3 IGF-s	15
2.6 Fatores de crescimento X reparo ósseo	17
2.6.1 Momento da instalação do enxerto	17
2.6.2 Primeira semana	18
2.6.3 Segunda a terceira semana	18
2.6.4 Quarta a sexta semana	19
2.7 Processo de obtenção	19
2.8 Técnica de aplicação clínica	20
2.9 Cronologia das pesquisas	21
3 – PROPOSIÇÃO	26
4 – MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Material	28
4.1.1 Linhagem celular	28
4.1.2 Solução antibiótico – antimicótico (ATB-M)	29
4.1.3 Meio de cultura	30
4.1.4 Enzima tripsina-versene (ATV)	30
4.1.5 Estufa de CO ₂	31
4.1.6 Capela de fluxo laminar	31
4.1.7 Centrífuga	32
4.1.8 Micropipetas	32

4.1.9 Microplacas	33
4.1.10 Coletador de células	33
4.1.11 Placa de leitura	34
4.1.12 Líquido de cintilação	34
4.1.13 Timidina tritiata	35
4.1.14 Cintilador líquido	35
4.2 Métodos	36
4.2.1 Crescimento e confluência celular	36
4.2.2 Plaqueamento	37
4.2.3 Contagem celular	39
4.2.4 Curvas de crescimento e de viabilidade celular	41
4.2.5 Obtenção do PRP	42
4.2.5.1 Coleta de sangue total	42
4.2.5.2 Primeira centrifugação	42
4.2.5.3 Coleta do PPP	42
4.2.5.4 Segunda centrifugação	43
4.2.5.5 Coleta do PRP	43
4.2.5.6 Preparo do PRP	43
4.2.6 Dosagem de proteína	46
4.2.7 Teste de citotoxicidade	49
4.2.7.1 Avaliação do teste de citotoxicidade	50
4.2.8 Preparo da placa de proliferação	51
4.2.9 Crescimento em estufa	58
4.2.10 Líquido de cintilação	58
4.2.11 Tripsina versene	58
4.2.12 Transferência para a placa de leitura	58
4.2.13 Secagem da placa	58
4.2.14 Incorporação de timidina tritiata.	59
4.2.15 Leitura da placa	59
4.2.16 Planejamento estatístico	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Análise estatística	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMO

SCARSO FILHO, J. – **Avaliação do Plasma Rico em Plaquetas na proliferação celular – estudo “in vitro”**. Florianópolis. 2002. Tese (Doutorado em Odontologia – Opção Implantodontia), Universidade Federal de Santa Catarina.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é considerado um acelerador atuando na condução do reparo tecidual. Inúmeras pesquisas clínicas comprovam o seu uso, sendo relatada várias formas de obtenção, ativação e geleificação, sem estabelecerem sua correta concentração e seus efeitos proliferativo sobre as células “in vitro”. Este trabalho avalia a ação de três tipos de PRP: o puro que encontra-se dentro da bolsa do concentrado plaquetário; o ativado que corresponde ao puro misturado com cloreto de cálcio a 10%; e o geleificado que corresponde a mistura ativada incorporada de osso particulado após a espera do tempo de geleificação. Estes tipos de PRP foram aplicados sobre a proliferação de células “in vitro” de linhagem fibroblástica NIH/3T3. Para o desenvolvimento desta metodologia foi realizado a partir de uma garrafa de cultura de células o plaqueamento promovendo células de mesma linhagem, onde foi realizado o experimento de citotoxicidade e de proliferação. Para a citotoxicidade foi realizada a dosagem de proteína de 10 bolsas de PRP para estabelecer o quantitativo de estímulo e após inúmeros testes de diluição e aplicação sobre células “in vitro” foi escolhida a concentração de 10 ng. Para a análise de proliferação as células de mesma linhagem obtidas previamente foram estimuladas com 10 ng de PRP, e o grupo controle pela ação de SFB a 2% e 5%. A proliferação foi marcada pela incorporação de timidina tritiata no intervalo de tempo de 20 horas. Concluiu-se que a proliferação celular estimulado pelo PRP na concentração de 10 ng foi significativo sendo mais expressivo o grupo de PRP ativado.

PALAVRAS - CHAVE: Plasma, Plaquetas, Fatores de crescimento derivado de plaquetas.

ABSTRACT

SCARSO FILHO, J. **Evaluation of the platelet-rich plasma in the cellular proliferation: an *in vitro* study.** 2002. Thesis (Doctorate of Dentistry), Federal University of Santa Catarina.

Platelet-rich plasma (PRP) is considered an accelerator that acts in the tissue repair. A number of clinical investigations substantiate their use, being reported several ways of obtaining, activation and gelation, without establishing their correct concentration and proliferative effects on *in vitro* cells. This study evaluates the action of three types of PRPs: the pure, that is inside the bag of the platelet concentrate; the activated, that is a mixture of the pure with 10% chloride of calcium; and the gelated, which is an activated and incorporated mixture of particulate bone, after the time of gelation. These types of PRPs were applied on the proliferation of *in vitro* cells of NIH/3T3 fibroblastic lineage. To develop this methodology, the platelet process was accomplished using a bottle of cell culture, creating cells of the same lineage, where the cytotoxic and proliferative experiment was performed. For cytotoxicity, it was accomplished the protein dosage of 10 bags of PRPs to establish the quantity of stimulus and after several dilution tests and application on *in vitro* cells was chosen the concentration of 10 ng. For proliferation analyses, the cells previously obtained of the same lineage, were stimulated with 10 ng of PRP, and the control group by the action of 2% and 5 % of SFB. The proliferation was determined by the incorporation of tritiated thymidine in the interval of 20 hours. It was concluded that cellular proliferation stimulated by PRP in the concentration of 10 ng was significant, being more expressive the group of activated PRP.

KEY WORDS: Plasma, Platelet, Derived platelet growth factor.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento terapêutico por ressecção estabelece deformidades no sistema estomatognático, de maior ou menor grau de complexidade, culminando na falência do órgão dentário ou até mesmo do esqueleto facial. Estas deformidades orofaciais podem comprometer o tratamento com implantes osseointegrados, haja visto que o tecido ósseo alveolar, a mucosa gengival e o arcabouço ósseo facial sofrem alterações morfológicas e funcionais, moduladas pela etiopatogênia de cada situação.

A busca da terapêutica restauradora para solucionar tais situações levou ao aprofundamento das pesquisas para um melhor entendimento da biologia do processo de reparo e no desenvolvimento das técnicas reconstrutivas com os enxertos ósseos. Apesar de efetivas e previsíveis elas possuem um grau de morbidade maior quando comparadas com a cirurgia para a instalação de implantes.

A partir do exposto, entende-se a razão pela procura por um material capaz de substituir o osso humano nestas situações e eliminar a necessidade de mobilizar áreas doadoras intra e extrabuciais. Vários são os substitutos ósseos estudados e aplicados em implantodontia, todos com vantagens e desvantagens a serem consideradas. O objetivo comum é promover material bioativo com a capacidade de induzir e ou conduzir a diferenciação osteoblástica levando à regeneração óssea ao local implantado.

Para almejar este tipo de reparo por indução necessita-se que o substituto utilizado seja capaz de promover a formação óssea independente do local e das estruturas celulares adjacentes. Este biomaterial, conhecido como proteína morfogenética ainda está sendo pesquisado, porém com poucos resultados reproduzíveis e confiáveis.

Atualmente, o processo de reparo por condução óssea, onde as células adjacentes ao meio participam ativamente, está sendo muito pesquisado; porém o processo é lento e sofre competição celular. Pesquisas estão sendo orientadas, na última década, para estudar a ação dos fatores de crescimento, e especificamente a sua ativação e liberação no processo de reparo.

Recentemente, relatos científicos chamam a atenção para o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), cuja estratégia terapêutica fundamenta-se na aceleração da reparação através dos efeitos dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas, que são os iniciadores universais de quase todo o processo de reparo. Ele é produto autógeno, atóxico e não imunorreativo, que tem sido empregado com aparente sucesso clínico nas áreas de cirurgias reconstrutivas oral e maxilofacial, e na implantodontia.

Estas inúmeras pesquisas clínicas comprovam o resultado qualitativo e quantitativo favorável obtido na formação óssea. Porém, somente alguns testes “in vitro” é que procuram explicar o seu mecanismo de ação e também a dose ideal para acelerar o processo de reparo, mas não são elucidativos em literatura. Uma das formas de se realizar os testes “in vitro” é através do crescimento celular em cultura, onde através de plaqueamentos pode-se manter uma mesma linhagem e com isso realizar vários testes com a mesma resposta celular.

Estes estudos quando metodizados podem ser reproduzíveis e aplicáveis com segurança para estabelecer a correta concentração dos fatores de crescimento derivado das plaquetas a ser utilizada na proliferação celular, haja visto que cada indivíduo possui uma concentração própria destas proteínas.

Essas proteínas, oriundas de pacientes, podem ser dosadas em exames de laboratório sendo possível estabelecer as diferenças de concentrações e com isso entender as variações de resposta clínica encontradas no uso do PRP. Estas concentrações de proteína dos pacientes para estudo “in vitro” devem ser diluídas porque a sensibilidade celular é muito maior em culturas de células.

Desta maneira para se testar as proteínas contidas no PRP se faz necessário realizar o teste de citotoxicidade em uma mesma linhagem celular para estabelecer a concentração a ser utilizada sobre as células e a partir desta resposta estabelecer o potencial acelerador do Plasma Rico em Plaquetas.

Este potencial acelerador sobre as células pode ser mesurado de várias formas. Uma delas é a incorporação de timidina tritiata durante o ciclo de mitose celular, marcando a quantidade de células que se proliferaram em determinado tempo.

Assim, este trabalho se propõe a estudar os efeitos das proteínas contidas no Plasma Rico em Plaquetas sobre a proliferação celular. Para tal propósito o PRP foi obtido de doadores, e após preparo metodizado será dosada a proteína e aplicada sobre cultura de células de linhagem contínua até estabelecer a concentração ideal. Esta concentração será aplicada sobre outras células desta linhagem contínua e comparadas com soro fetal para estabelecer o seu potencial de proliferação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Na década de 60, acreditava-se que o crescimento de fibroblastos 3T3 era diretamente controlado por fatores séricos. Nesta época a endocrinologia considerava os fibroblastos como células que não serviam de alvo para os hormônios clássicos porque foram falhas as tentativas de detectar a ação hormonal no controle da proliferação de mamíferos (HOLLEY e KIERNAN, 1968). Alguns anos mais tarde é que foi proposto que os fatores séricos que controlavam o crescimento das células 3T3 seriam na realidade o fator de crescimento, de natureza endócrina (ARMELIN, 1973).

O primeiro fator de crescimento descoberto foi o NGF (fator de crescimento neural), descoberto em 1954, porém apenas posteriormente isolado e caracterizado (GREENE e SHOOTER, 1980). Em 1962, COHEN, trabalhando no isolamento de NGF, descobriu e isolou o EGF (fator de crescimento epidermal). Através dos estudos da endocrinologia clássica foram descobertos ainda as somatomedinas e o fator de crescimento de insulina.

Um novo impulso foi dado ao estudo dos fatores de crescimento quando descobriu-se que as células 3T3 podiam ser estimuladas por um fator de crescimento de fibroblastos presente em extratos de hipófise bovina (ARMELIN, 1973). Este trabalho, além de mostrar que os fibroblastos poderiam servir de células alvo para fatores hormonais, forneceu ainda um bom protocolo para testes de atividade dos fatores de crescimento.

Posteriormente foi descoberto, a partir das plaquetas sanguíneas humanas, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), um fator peptídico para fibroblastos (ROSS et al, 1978).

2.2 Meio de cultura

Os experimentos com cultura de tecidos teve início no princípio do século. Nesta época o meio de cultura era extraído de fontes naturais, como linfa e coágulos de plasma. Obviamente, a composição extremamente variável desses meios impedia a realização de dois experimentos nas mesmas condições. Esta limitação, aliada à importância intrínseca de se identificar todos os componentes do meio de cultura necessários à sobrevivência e ao crescimento para cada tipo de célula, despertou o interesse precoce de se estabelecer o meio quimicamente definido. Somente na década de 50 é que se conseguiu formular o primeiro meio quimicamente definido, constituído por sais, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e fatores séricos (EAGLE, 1955).

Esse meio era incapaz de garantir por si só o crescimento celular, sendo necessário, a presença de fatores séricos. Nesta época, acreditava-se que o soro era necessário para fornecer algum tipo de nutriente. Posteriormente, descobriu-se que a função do soro no meio de cultura era fornecer fatores de crescimento e não nutrientes. Esses últimos são fornecidos pela parte quimicamente definida do meio de cultura (ARMELIN, 1975).

Inicialmente, a busca do estabelecimento de quais os componentes do soro necessários à sobrevivência e crescimento de cada tipo de célula era feita através de tentativas de análise bioquímica dos componentes ativos isolados diretamente do soro. Esse tipo de estudo foi muito difícil e não produziu resultados práticos importantes. A dificuldade foi devido principalmente à complexidade e as baixas concentrações de cada

hormônio presente no soro associado ao fato de que muito destes fatores se ligam à carregadores perdendo sua atividade quando dissociados e também ao sinergismo apresentado pelos diferentes fatores. A substituição de um enfoque analítico por um enfoque sintético permitiu a realização de progresso significativo nesta área. Assim, em 1976, HAYASHI e SATO, mostraram ser possível a manutenção de células em meio de cultura sem soro, por diversas gerações. Neste experimento a presença do soro foi necessário antes e depois da tripsinização da cultura para o repique. Posteriormente, ao se adicionar ao meio de cultura uma mistura de hormônios e certa quantidade de fibronectina tornou-se possível garantir a sobrevivência de diversos tipos de células em total ausência de soro (ORLY e SATO, 1979).

2.3 Definição e sinonímia

O Plasma Rico em Plaquetas é um produto derivado do processamento laboratorial do sangue autógeno, colhido no período pré-operatório, rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α -plaquetários (MARX e GARG, 1999).

Devido ao incremento da utilização clínica este composto aparece também com outras denominações: plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas, ou, ainda, gel de plaquetas (ANITUA, 1999; MARX et al., 1998; WHITMAN et al., 1997).

O gel de plaquetas, na verdade, é um produto derivado da mistura de Plasma Rico em Plaquetas com trombina bovina e cloreto de cálcio. A trombina na presença de cálcio quebra fibrinogênio em fibrina e ativa o fator XIII, desencadeando a formação organizada do coágulo. Esta reação em cadeia confere à mistura uma consistência adesiva e gelatinosa, facilitando o manejo cirúrgico dos enxertos (WHITMAN et al., 1997).

Assim sendo, o PRP é um produto orgânico, atóxico e não imunoreativo, que tem sido utilizado para acelerar os caminhos da cicatrização da ferida cirúrgica, a partir dos vários fatores de crescimento que contém (MARX, 1999).

2.4 Composição bioquímica

O Plasma Rico em Plaquetas apresenta na sua constituição básica três componentes: o plasma, os leucócitos e as plaquetas (MARX, 1999; MARX e GARG, 1999; WHITMAN et al., 1997).

2.4.1 Plasma

O plasma sanguíneo consiste do soro mais os diversos fatores da coagulação sanguínea (fibrinogênio, protombina, etc), devido a isso o plasma pode coagular. Ele pode apresentar variações de volume e osmolaridade, tendo no sódio, cloreto e bicarbonato os seus mais abundantes eletrólitos (GOLDENBERG, 1997).

2.4.2 Leucócitos

A presença de algumas células brancas no PRP confere a este produto uma resistência natural aos processos infecciosos e/ou alérgicos, melhorando as expectativas dos tratamentos com este recurso; uma vez que a principal função do sistema de defesa do organismo é a proteção contra organismos e substâncias estranhas.

2.4.3 Plaquetas

As plaquetas representam o componente mais importante quando o enfoque é modulação cicatricial para enxertos ósseos, devido a capacidade de liberar os fatores de crescimento (KNIGHTON et al., 1990; WHITMAN et al., 1997).

Como elementos figurados do sangue, são produzidos por fragmentação do citoplasma megacariócito, que, por sua vez, originam-se da medula óssea. Possuem a forma de discos citoplasmáticos e circulam na corrente sanguínea na concentração de 250.000/ μ l, com o volume médio de 10 μ m (OLIVEIRA, 1985)

Em indivíduos normais 2/3 das plaquetas encontram-se em circulação e um terço no baço, formando um “pool” esplênico que mantém intercâmbio contínuo com as plaquetas disponíveis na circulação (RAVEL, 1997).

As plaquetas possuem uma sobrevivência de 9,5 dias. Esta sobrevivência é determinada, principalmente, pelo envelhecimento das plaquetas na circulação. Devido a isso, a renovação plaquetária é de 35.000/dia. Apesar de seu tamanho reduzido (cerca de 3 μ m), as plaquetas desempenham uma variedade importante de funções para os processos de coagulação e de cicatrização na ferida cirúrgica. Do ponto de vista ultra-estrutural as plaquetas podem ser analisadas em: zona sol-gel (composta de vários elementos fibrosos, constituindo o sistema citoesquelético), zona das organelas (composta pelos elementos de depósito e os metabólitos) e o sistema canalicular (responsável pela comunicação com o plasma e pela rota de liberação das organelas de depósito) (OLIVEIRA, 1985).

Dentre os elementos de depósito, pode-se encontrar corpos densos e grânulos plaquetários. Com especial atenção para os grânulos α -plaquetários, responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento quando ocorre a granulação plaquetária (MARX, 1999). Estes fatores de crescimento parecem significar a chave para o entendimento e modulação dos processos cicatriciais, razão pela qual merecerão destaque no tópico a seguir.

2.5 Fatores de crescimento do PRP

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e de regeneração. Estes polipeptídios são a chave para regular diversos eventos celulares tais como: síntese de DNA, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz (ANITUA, 1999; LYNCH, 1999; GIANNOBILE, 1999).

Podemos encontrar fatores de crescimento, no osso, no cimento e em vários tecidos de cicatrização. Como exemplo podemos citar: PDGF, TGF- β s, IGF-I e II, e BMPs (RIPAMONTI e REDDI, 1994). Estas moléculas naturais são iniciadores universais de quase todos os processos cicatriciais (MARX et al., 1998).

Estudos específicos do PRP identificaram uma lista completa de fatores de crescimento, destes, pelo menos três importantes fatores de crescimento são derivados dos grânulos α -plaquetários, a saber: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β s,) e o fator de crescimento similar a insulina (IGFs), (LYNCH e BUSER, 1991; MARX et al., 1998).

2.5.1 P.D.G.F.

O PDGF foi um dos primeiros fatores de crescimento a ser identificado e o caminho para o seu isolamento começou com a observação de que fibroblastos cultivados proliferavam quando suplementados com soro, mas não quando se utilizava o plasma. Devido sua capacidade de atuar em ampla variedade de células (ósseas, fibroblastos, neurogliais, musculares, etc) é classificado dentro dos fatores de ampla especificidade (GANIO et al., 1993; LYNCH, 1999). Sendo apenas uma, do universo de 50 proteínas, que agem como fatores de crescimento.

Trata-se de uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 30kd e uma estrutura formada por duas cadeias básicas de aminoácidos – A e B. A cadeia A é formada por 121 aminoácidos e a cadeia B por 125 aminoácidos, que apresentam similaridade de até 60%. Esta proteína existe como um heterodímero de duas correntes e encontra-se dispersa pela ferida a partir da fragmentação plaquetária. Dispõe-se em pequenas quantidades, algo em torno de 0,06 ng de PDGF para um milhão de plaquetas. O que significa 6×10^{-17} g de PDGF por cada plaqueta (MARX, 1999). Apesar desta disponibilidade em pequenas proporções, ela atua como um importante mitogênico para a citodiferenciação e para a cicatrização das feridas (CHAI et al., 1998; GREEN et al., 1997).

O PDGF é o principal fator de crescimento das plaquetas, por ser o primeiro a estar presente na ferida e guiar a revascularização, a síntese de colágeno e a regeneração óssea (MATSUDA et al., 1992; WANG et al., 1994). Quando presente no sítio da ferida ele busca atingir as células alvo aderindo-se aos receptores da membrana celular e estabelecendo ligações de proteína tirosina-quinase.

A sua estrutura dimérica, com dois sítios de ligação ao receptor permite a união com receptores adjacentes para iniciar o processo de sinalização celular. Sendo que os receptores α ligam-se as cadeias A e B; enquanto os receptores β ligam-se somente as cadeias B. Talvez, por este motivo a cadeia A tenha um papel de maior importância durante as fases iniciais da cicatrização que a cadeia B. (GREEN et al., 1997). O aumento de suas concentrações nestes sítios parece acelerar os processos de cicatrização e de reparo (CHAI et al., 1998).

Este polipeptídeo é sintetizado, primariamente pelas grânulas α -plaquetárias, embora possa ser produzido e secretado por macrófagos, células endoteliais, monócitos,

fibroblastos, e matriz óssea. (LYNCH, 1999; MARX, 1999; WANG et al., 1994). De natureza catiônica possui a capacidade de permanecer estável em temperaturas menores que 100°C e possui ponto isoeletrolítico muito básico (pH = 10.2). Apesar desta estabilidade frente ao calor, a manutenção de níveis teciduais satisfatórios à regeneração e ou cicatrização, pode sofrer influência da microbiota local; a exemplo de quando exposto a concentrações de 20µg/ml de extrato de *Porphyromonas gingivalis* ocorre redução da resposta mitogênica das células do ligamento periodontal humano (MATSUDA et al., 1996).

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

Diversos estudos têm mostrado a capacidade osteogênica do PDGF, as vezes isoladamente ou em conjunto com outros fatores, tais como prostaglandinas, dexametasona, matriz colágena e/ou membranas biológica (GIANNOBILE et al., 1994; NEEL et al., 1995; PARK et al., 1995; RUTHERFORD et al. 1992; RUTHERFORD et al, 1993.).

2.5.2 T G F – β

Os fatores de crescimento de transformação betas (β) constituem uma super família de mediadores locais que regulam a proliferação e as funções da maioria das células dos vertebrados (RIPAMONTI e REDDI, 1994). Este fator de crescimento foi

assim designado, por ter sido isolado inicialmente, em tecidos modificados (sarcomas) (ANITUA, 1999).

Seus efeitos nas células são variados, dependendo do tipo de célula afetada podem: suprimir a proliferação celular, estimular a síntese da matriz extracelular, estimular a formação óssea ou atrair células por quimiotaxia. (HOLLINGER et al., 1999; MATSUDA et al., 1996). Quando atuam sobre os osteoclastos, por exemplo, inibem a reabsorção óssea (MARX, 1999; WHITMAN et al., 1997).

Os cinco membros desta família (TGF – β 1 a β 5) são proteínas com estruturas e funções semelhantes. Outras proteínas sinalizadoras extracelulares podem mostrar semelhança estrutural com os TGF- β s, tais como as ativinas e as proteínas morfogenéticas dos ossos (ROSEN and THIES, 1992). Estas proteínas, desta superfamília, ativam receptores que são serina-tionina proteinoquinas referidos como tipo I e tipo II (HARALSON, 1993; HOLLINGER et al., 1999).

As TGFs existentes e mais comuns no PRP são as TGF- β 1 e TGF- β 2, que são fatores de crescimento ligados com a cicatrização do tecido conjuntivo e a regeneração do tecido ósseo. Os TGF- β s possuem uma estrutura dimétrica formada por duas sub-unidades de 112 aminoácidos. Possuem massa molecular de aproximadamente 25kd e é formada por duas sub-unidades de 12,500 daltons. Um gene localizado ao longo da ramificação do cromossomo 19 é o responsável por sua síntese (MARX, 1999).

Este fator de crescimento tem similaridade de até 72% entre as estruturas β 1 e β 2. A estrutura β 1 é encontrada com abundância nas plaquetas, nos linfócitos e neutrófilos. O tipo β 2 é encontrado nos extratos ósseos, plaquetas e neutrófilos. Observa-se ainda um tipo β 3 que é um heterodimer formado por uma cadeia única de TGF- β 1 e β 2 (ANITUA, 1999).

As funções mais importantes do TGF β 1 e β 2 parecem ser a quimiotaxia e a mitogênese dos osteoblastos precursores estimulando a formação óssea; tanto que o TGF β 1 atinge seu potencial quimiotático máximo a partir de 0,1 ng/ml, enquanto outros fatores de crescimento só atingem o pico máximo após 10-100 ng/ml. Entretanto, seus efeitos parecem ser altamente dependentes da origem da célula óssea, da dose aplicada e do ambiente local, podendo estimular ou inibir a proliferação osteoblástica. Ainda assim, sua capacidade de estimular a quimiotaxia e a deposição da matriz óssea, tem sido ratificada (BONEWALD e MUNDY, 1990; SPORN e ROBERTS, 1992; PFEILSCHIFTER et al., 1990). Se usado para estimular a resposta óssea em torno de implantes mostra-se osseointutivo e melhora a qualidade da osseointegração uma vez que, doses de 3,0 μ g de TGF- β 1 quando aplicadas sobre implantes cerâmicos dobra o crescimento ósseo em torno dos mesmos (LIND, 1998)

2.5.3 IGF-s

São fatores de crescimento secretados pelos osteoblastos durante a formação óssea para aumentar a osteogênese e acelerar a deposição óssea (MARX, 1999; HOCK et al., 1999; CANALIS, 1980; GIANNOBILE et al, 1994). Existem dois tipos: IGF-I e IGF-II, relativamente pequenos com massas moleculares de aproximadamente 7.7 Kd e 7.5 Kd, respectivamente (MARX, 1999).

Cada um deles se adere a um receptor de membrana celular IGF específico que estimula atividade de quinase resultando na mitose de células formadoras de osso. Deste modo, os IGF-s são mitogênicos para as células de linhagem osteoblástica e estimuladores da osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados já existentes, podendo atuar de forma autócrina (RAVEL, 1997; ROSEN e THIES, 1992) ou parácrina (MARX, 1999, GIANNOBILE et al., 1994).

Esta capacidade mitogênica quando avaliada sobre as células do ligamento periodontal é 10 vezes menor que a do PDGF, pois o IGF-I só atinge o máximo de seu efeito mitogênico em concentrações maiores que 10.000 ng/ml (MATSUDA et al, 1992).

No entanto, quando testado com matriz inorgânica de osso bovino, demonstra uma capacidade de adsorção que chega a ser 10 vezes maior que a do PDGF- β , mostrando-se importante para o anabolismo do tecido ósseo (JIANG et al., 1999).

Diversos estudos sugerem que as IGF-s, quando combinadas com outros fatores de crescimento podem aumentar a osteogênese em processos cicatriciais (RIPAMONTI e REDDI, 1994).

Esta atividade de regulação mitogênica e/ou do metabolismo ósseo parece ser dose dependente (PANAGAKOS, 1993), embora as proteínas IGF-s sejam abundantes na matriz óssea (MOHAN and BAYLINK, 1991). In vitro, IGF-I e II apresentam atividade quimiotática equivalente (PANAGAKOS, 1993), ainda que o IGF-I pareça exibir maior potência (PANAGAKOS, 1993; CANALIS, 1980).

Em suma, as IGF-s exercem múltiplos efeitos sobre o metabolismo ósseo, a saber:

1. Promove a deposição de matriz óssea.
2. Estimula a mitogênese das células osteoblásticas (CANNALIS, 1980)
3. Possuem atividade quimiotática para fibroblastos, osteoblastos e células progênitoras dos osteoclastos (PANAGAKOS, 1993).

A cicatrização em áreas de enxerto ósseo ocorre dentro de um ambiente bioquímico complexo, no qual o tecido enxertado deve progredir de um tecido

transplantado para um tecido auto-sustentado. A compreensão dos efeitos bioquímicos e da influência dos fatores de crescimento neste modelo cicatricial é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de reparação óssea e dos eventuais benefícios que o PRP podem trazer incrementando este processo (MARX, 1999), assim, passaremos a descrever a relação entre os fatores de crescimento e a regeneração óssea

2.6 Fatores de crescimento X reparo ósseo

A cronologia de reparo dos enxertos ósseos pode ser, didaticamente, dividida em quatro etapas: momento da instalação do enxerto, 1ª semana, 2ª - 3ª semana e 4ª – 6ª semana (MARX, 1999).

2.6.1 Momento da instalação do enxerto

A colocação de um enxerto constituído por osteoblastos, endósteos e células resistentes circundadas por um leito tecidual vascular e celular, gera um local receptor bioquímico que é hipóxico (02 tensões – 3 a 10 mm/hg), ácido (ph 4.0 a 6.0) e rico em lactato.

Neste ambiente a regeneração óssea começa pela liberação dos fatores de crescimento no enxerto, logo após ter ocorrido a degranulação das plaquetas. Os fatores liberados são: PDGF, TGF- β s e IGFs.

O PDGF estimula a mitogênese das células do canal medular transferida junto com o enxerto e inicia a angiogênese do complexo capilar no interior do enxerto pela indução de mitose das células endoteliais.

O TGF- β , inicialmente, estimula a mitogênese dos osteoblastos e pré-osteoblastos, para aumentar o número destas células, bem como promove a diferenciação das mesmas em osteoblastos maduros e funcionais. Para sustentar a

invaginação capilar, o TGF- β influencia os osteoblastos e os fibroblastos a depositarem matriz óssea e colágena, respectivamente.

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

2.6.2 Primeira semana

Nos primeiros três dias após o enxerto, inicia-se uma intensa atividade celular, quando os capilares penetram no enxerto, devido ao processo de angiogênese. Neste período, prevalece a multiplicação e a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas do canal medular em osteoblastos, que irão secretar TGF- β e IGF na matriz óssea.

Do 5^o ao 7^o dia, através do mecanismo de quimiotaxia o PDGF (juntamente com o gradiente de oxigênio) atrai os macrófagos para a área enxertada. A partir daí os processos regenerativos serão estimulados pelos fatores de crescimento derivados dos macrófagos (FCDM). A resposta autócrina de auto-estimulação é mantida pelas células do canal medular que continuam a secretar TGF- β e IGF.

2.6.3 Segunda a terceira semana

Nesta fase, a atuação direta dos fatores de crescimento permite a manutenção do processo de reparo, principalmente mitogênese das células do canal medular e angiogênese capilar, e por volta do 14^o ao 17^o dia, pode-se ver a completa permeação capilar do enxerto. Como estes capilares respondem ao gradiente de oxigênio, logo que se difundem no enxerto, geram mecanismo cessante para prevenir uma super angiogênese.

Origina-se, então, a coalescência das ilhas osteóides individuais à superfície, gerando o processo de consolidação clínica do enxerto. Relaciona-se este momento à fase I da regeneração óssea, ou seja, tecido ósseo com trabeculado desorganizado sem sistemas harvesianos.

2.6.4 Quarta a sexta semana

Neste estágio, o enxerto está revascularizado e o reparo ósseo quase completo, os macrófagos deixam a área iniciando-se o processo de reabsorção e reposição. Ocorre a liberação de BMP e IGF, proteínas ácidos-insolúveis, que agem nas células adjacentes do canal medular e pré-osteoblastos induzindo a proliferação e diferenciação destas em osteoblastos funcionais, que irão secretar matrizes ósseas.

Este processo definirá uma arquitetura óssea madura com sistemas harversianos caracterizando o osso secundário, com endóstio e perióstio, portanto auto-sustentado. Sendo assim, através de um ciclo normal de reabsorção – remodelação, o enxerto ósseo progride de um transplante para um osso maduro e funcional.

2.7 Processo de obtenção

O PRP é obtido a partir de sangue autógeno por meio de um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial, no qual se retira sangue do doador e separa-se as substâncias desejadas (RAVEL, 1997).

A seqüência do processo é basicamente a seguinte: punção venosa, retirada do sangue e separação celular.

A punção venosa e a retirada de sangue podem ser realizadas através de 3 técnicas descritas na literatura. A primeira, que será abordado neste trabalho, é a obtenção de uma bolsa de sangue total, que corresponde a retirada em média de 440 a

460 ml (MARX, 1999; WHITMAN et al., 1997); a segunda remove o tecido sanguíneo armazenando-o em túbulos de 10 ml (ANITUA, 1999); e a terceira corresponde a técnica de aférese onde um separador celular de densidade gradiente é utilizado obtendo-se somente as células escolhidas sem coletar o sangue (LYNCH, 1999)

A separação dos elementos do sangue retirado é feita por meio da centrifugação, partindo do mais denso para o menos denso, sendo estabelecido diferentes protocolos devido as diferenças do volume coletado. Todas as técnicas buscam como produto final o PRP (ANITUA, 1999; MARX, 1999; WHITMAN et al., 1997).

2.8 Técnica de aplicação clínica

Após a obtenção do PRP, o mesmo é armazenado em recipiente específico, ou seja bolsa, mantida em temperatura ambiente a 22°C, em agitação constante, para que ocorra troca gasosa com o meio, evitando desta forma acidificação do pH. Na aplicação clínica do PRP associados com enxertos ósseos particulados é necessário a ativação do processo de coagulação. Esta ativação pode ser realizada usando o cloreto de cálcio a 10% na proporção de 1:7 com PRP (MARX, 1999). Outros autores preconizam esta ativação incorporando além do cloreto de cálcio 10% a trombina bovina tópica (10.000 unidades) (WHITMAN et al., 1997).

O processo de coagulação ativado estabelece a geleificação da mistura. O gel de plaquetas associado com enxerto ósseo previamente obtido por este processamento é introduzido no leito cirúrgico. Misturas adicionais são inseridas em camadas subseqüentes (WHITMAN et al., 1997; MARX, 1999).

2.9 Cronologia das pesquisas

A odontologia moderna encontrou nos implantes osseointegrados uma opção terapêutica de rotina. A crescente demanda ampliou as indicações e impulsionou estudos para o tratamento da maxila atrófica através dos enxertos e da preparação dos sítios para a futura instalação de implantes. A utilização de fatores de crescimento para estas finalidades, entretanto, data somente de uma década.

O estudo e a aplicação clínica dos fatores de crescimento iniciou-se em outras áreas e com a evolução das pesquisas chegou à implantodontia. Visando o melhor entendimento da transição científica e tecnológica de uma terapêutica monofatorial para a multifatorial com o PRP, segue-se uma cronologia das pesquisas que orientam o surgimento deste novo princípio de aceleração do reparo tecidual.

Experimentos em cães da raça Beagle com o PDGF e IGF-I foram desenvolvidos para estimular a regeneração periodontal e os resultados elucidaram que estes agentes de crescimento são mitogênicos e quimiotáticos para fibroblastos e osteoblastos (LYNCH et al., 1989).

Uma fórmula de reparo tecidual derivada de plaquetas autólogas contendo diversos fatores de crescimento localizados nos grânulos α -plaquetários, incluindo o PDGF, foi testada em 32 pacientes com úlceras cutâneas crônicas presentes há pelo menos oito semanas. Os pacientes foram instruídos a usar corretamente a solução em casa duas vezes ao dia retornando para as visitas de controle a cada 2 ou 3 semanas. Enquanto isso um grupo controle recebeu as mesmas instruções, mas a solução fornecida era placebo. Pode-se verificar que o tempo máximo para a total epitelização das feridas foi de 8,6 semanas no grupo teste e de 15 semanas no grupo controle, (KNIGHTON et al., 1990).

O reparo óssea em torno de 40 implantes de pressão, inseridos na mandíbula de 8 cães Beagle foi avaliado em combinação com PDGF- β /IGF-I, simultaneamente à instalação dos implantes. Os sítios dos implantes tratados com a combinação PDGF- β /IGF-I exibiram maior crescimento ósseo em torno dos implantes que nos grupos controle (gel-placebo). Esta combinação estimula a regeneração óssea em torno dos implantes de pressão (LYNCH et al., 1991).

A osseopromoção foi estudada em torno de implantes comparando o uso de membranas de e-PTFE sozinha, com DFDB ou com a combinação PDGF-bb/IGF-I. Neste estudo foram instalados 24 implantes, em cães, logo após as extrações e em alvéolos com extensa deiscência vestibular. Os resultados obtidos mostraram que os sítios tratados com membrana e-PTFE mais PDGF β /IGF-I, obtiveram altas taxas de densidade óssea e o dobro da área de crescimento ósseo em torno dos implantes, quando comparados aos sítios tratados com membrana e-PTFE sozinha ou associada ao DFDB (BECKER et al., 1992).

O protocolo para atendimento de pacientes com úlceras crônicas foi descrito, incluindo entre os procedimentos a aplicação de um polipeptídeo que atua acelerando o processo de reparo. Relataram que 78% dos pacientes inicialmente indicados para amputação, mantiveram seus membros quando seguiram o protocolo do Home Regional Would Care Center na Florida (GANIO et al., 1993).

A aplicação do PDGF associado com dexametasona e matriz colágena no tratamento de lesões periodontais produzidas, experimentalmente, em macacos foi estudada por meio de histomorfometria e após 4 semanas do debridamento das lesões e uma única aplicação da mistura, houve regeneração periodontal e crescimento ósseo alveolar vertical em áreas interdentais (RUTHERFORD et al., 1993).

A aplicação única da associação de PDGF/IGF-I “in vivo”, após terapia periodontal, foi capaz de promover regeneração dos tecidos periodontais (GIANNOBILE et al., 1994).

A utilização de um adesivo autógeno de fibrina junto com osso medular, durante procedimentos de reconstrução óssea mandibular, foi avaliado para facilitar o processo de instalação do enxerto. Este adesivo foi obtido por meio de doação autógena, em uma unidade de sangue total contendo células vermelhas do sangue, no período pré-operatório e, quando aplicado com os enxertos melhorava a cicatrização (Tayapongsak et al., 1994).

A capacidade do TGF- β 1 de estimular o crescimento ósseo em torno de implantes metálicos instalados no úmero de cães foi estudada e relataram que o mecanismo de ação do TGF- β 1, inclui a proliferação de células osteoprogenitoras e a produção de matriz óssea (SUMMER et al., 1995).

A aplicação de PDGF-b em feridas humanas crônicas e agudas resultava no aparecimento de PDGF-a em fibroblastos e, provavelmente, nas células endotéliais microvasculares do tecido de granulação, enquanto que na pele expressava receptores para PDGF-b. Sugeriu que a liberação terapêutica de PDGF-bb poderia induzir o reparo através da estimulação direta dos fibroblastos e das células endoteliais (PIERCE et al., 1995).

O uso do produto (PDGF + IGF-1) era seguro quando aplicado topicamente em lesão óssea, durante cirurgia periodontal, e uma simples aplicação era efetiva e resultava em melhora do crescimento ósseo com preenchimento dos defeitos periodontais quando comparados à prática comum (HOWELL et al., 1997).

A técnica de utilização do gel de plaquetas como uma alternativa autógena para a cola de fibrina foi descrita com fins para aplicações em cirurgia oral e maxilofacial. Apresentaram como vantagens: a segurança contra infecções e o maior suporte para a cicatrização de lesões, devido à presença de plaquetas e fatores de crescimento em sua formulação (Whitman et al., 1997).

A ação de vários fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , IGF-I, etc) sobre a cicatrização óssea foi avaliada “in vitro” e “in vivo”, sobre as células osteoblásticas, em osteotomias e na fixação de implantes ortopédicos. Concluiu que, este conceito de fixação biológica de implantes associados a fatores de crescimento é promissor para futuro uso clínico, especialmente, na melhora da cicatrização óssea (LIND, 1998).

O uso de PRP combinado com enxertos ósseos autólogos, aplicados em 44 pacientes com defeitos ósseos maiores que 5 cm na mandíbula possuíam uma regeneração óssea duas vezes mais rápida e maior densidade óssea do que enxertos ósseos autógenos realizados em outros 44 pacientes com mesmo tipo de defeito sem o uso do PRP (MARX et al., 1998).

O PRP possui uma preparação autógena que elimina a possibilidade da transmissão de doenças ou reações imunológicas, como ocorre nas preparações alógenas e xenógenas. Além do que seu uso em enxertos de maxila severamente reabsorvidos aumenta a taxa de sucesso da osseointegração (MARX e GARG, 1999).

O emprego de plasma rico em fatores de crescimento na regeneração óssea e cicatrização gengival de futuros sítios para implantes, em 20 pacientes submetidos à extração, promove condições para obtenção de mais rápida e efetiva regeneração óssea e dos tecidos moles, sendo ausentes os efeitos negativos, risco de infecção ou de transmissão de doenças por ser um material autógeno (ANITUA, 1999).

A tecnologia do PRP utiliza princípios da engenharia de tecidos e que a técnica original pode ser modificada para tratamento de lesões periodontais e defeitos peri-implantares; reduzindo de 400 para 150 ml o volume de sangue coletado e obtendo-se cerca de 15 ml de PRP (LYNCH et al., 1999).

A bioquímica dos tecidos receptores e dos enxertos são compatíveis, mas que com a adição do PRP, ocorre um estímulo na consolidação e mineralização do enxerto na metade do tempo, com 15 a 30% de ganho efetivo na densidade óssea (MARX e GARG, 2000).

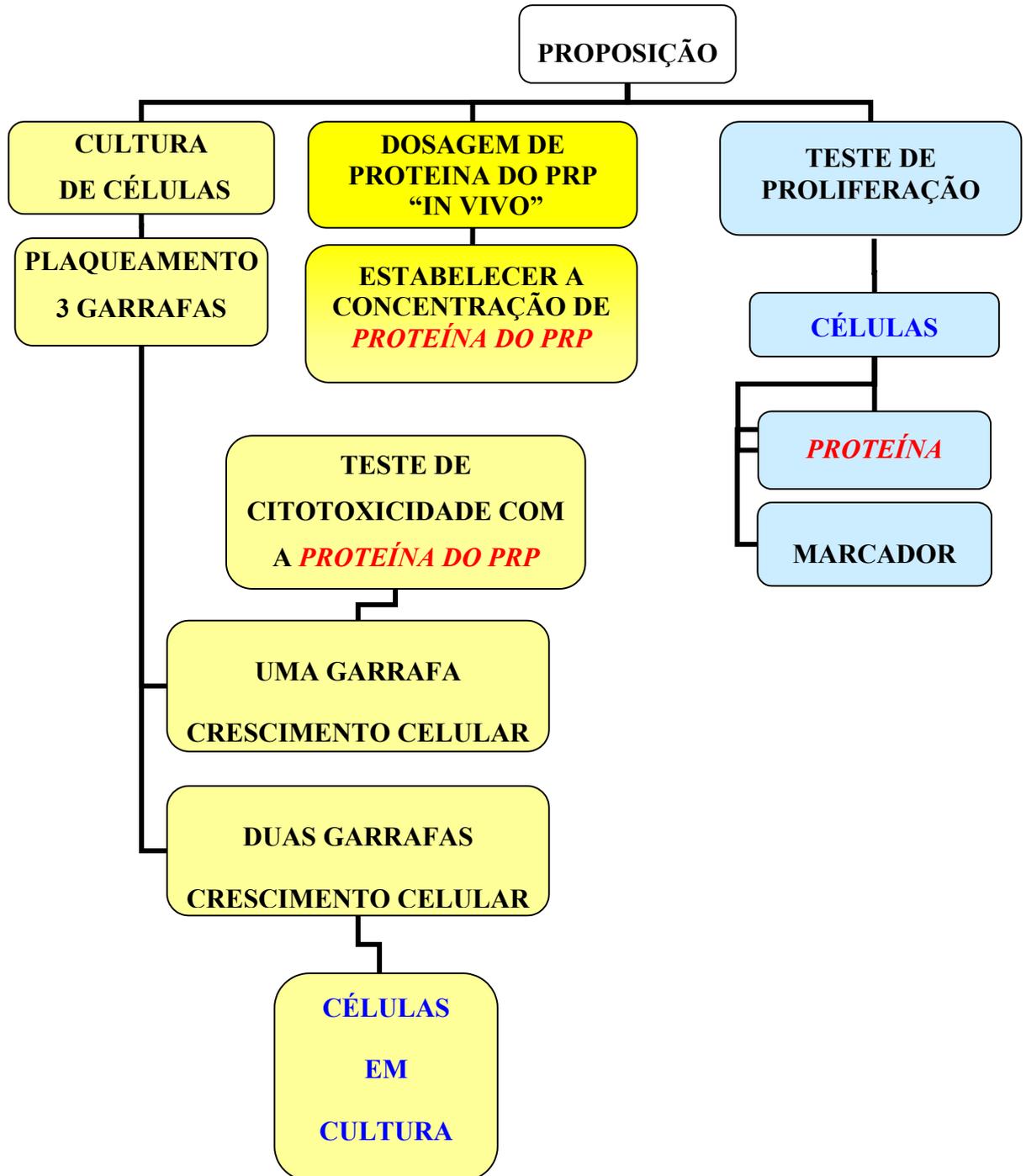
3 – PROPOSIÇÃO

A literatura deixa lacunas com relação aos efeitos do Plasma Rico em Plaquetas sobre o metabolismo celular de fibroblastos que estão diretamente ligados à reparação tecidual, assim a partir de um experimento “in vitro” este trabalho avalia o efeito do PRP na proliferação celular. Para tal propósito foi utilizado uma linhagem de células fibroblásticas de série contínua mantidas em meio de cultura, onde foi aplicado o PRP puro, ativado e geleificado, avaliando sua ação através da proliferação celular por mitose com a incorporação de timidina tritiada e quantificada em contador celular líquido.

Para tal efeito este trabalho objetiva:

- 1 através de uma linhagem celular específica NIH/3T3, promover seu crescimento e manutenção contínua.
- 2 estabelecer a correta concentração do Plasma Rico em Plaquetas a ser aplicado no crescimento celular “in vitro”.
- 3 analisar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas puro, ativado e geleificado na proliferação de fibroblastos originados dessa linhagem celular contínua e realizar uma análise comparativa dessa proliferação em relação aos tipos de PRP testados com o suplemento de soro fetal bovino a 2% e 5%, avaliados em 20 horas.

Organograma dos procedimentos empregados



4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Linhagem celular

Foram utilizadas células da linhagem NIH 3T3* de série contínua com morfologia de fibroblastos, sem patologia, proveniente de *Rattus Novergicus*, mantidas em frascos para cultura† (25 cm² de área de crescimento celular) contendo meio de Dulbecco‡ suplementado com soro fetal bovino à 10% (SFB)§ (Fig 1).

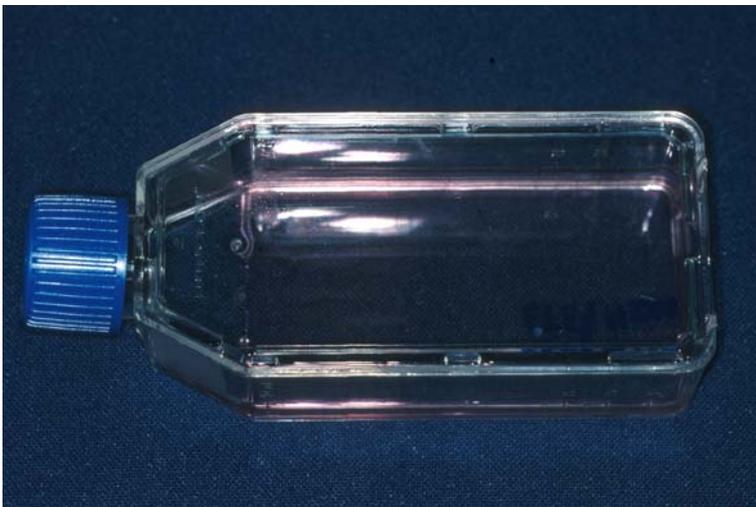


Figura 1 – Garrafa de crescimento celular

* CR06 NIH/3T3 – RJCB, Cell Bank Universidade Federal do Rio de Janeiro, R.J.,Brasil
www.bcrj.hucff.ufrj.br/home.html

† Corning Incorporated – N.Y., U.S.A.

‡ GIBCO – Invitrogen Corporation – N.Y., U.S.A.

§ Cultilab – Campinas, S.P., Brasil

4.1.2 Solução antibiótico – antimicótico (ATB-M)

Foi utilizado uma solução antibiótica e antimicótica* (Fig. 2) composta por:

TESTE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Nome produto	Solução antibiótico-antimicótico, 100x	
Numero do produto	A5955	
Aspécto	Líquido amarelo	Passou
Teste Ph	6.3 - 6.9	6.5
Esterilização	Estéril	Passou
Exame toxinas	Relato de resultados	0.5 EU/ML
Potencia Antibiótica	Penicilina: 10,000-12,000 U/ML	Penicilina: 10,800 U/ML
	Estreptomina: 10-12 MG/ML	Estreptomina: 11 MG/ML
	Anfotericina B: 25-30 UG/ML	Anfotericina B: 27 UG/ML
Teste de cultura celular	Passou	Passou
Linhagem celular		HEP2
Validade	24 meses	Fevereiro – 2004
Produzido		Março - 2002

Tabela 1 – Teste do ATB-M



Figura 2 – Solução antibiótico-antimicótico

* A5955 – SIGMA Chemical products – USA www.sigmaldrich.com/

4.1.3 Meio de cultura

O meio de cultura (Fig. 3) é o de Eagle modificado por Dulbecco (DME)*, contendo 4.500mg/L de glucose, 4mM de L-glutamina, 25 mM de tampão de HEPES e 4 mg/L de hidrocloreto de piridoxina. Este meio foi desenvolvido através da fórmula original do meio de Eagle sendo modificado sua concentração de glicose de 1000 para 4.500 propiciando um meio ótimo para cultura celular.



Figura 2 – Meio de cultura

4.1.4 Enzima tripsina-versene (ATV)

A enzima tripsina-versene[†] (ATV) composta por uma solução de tripsina 0.2% e versene a 0.02% tendo como função principal a ação de soltar as células que encontram-se aderidas na garrafa de crescimento celular. É utilizada quando pretende-se coletar as células cultivadas.

* GIBCO – CAT 12430-054 - Invitrogen Corporation – N.Y., U.S.A.

[†] Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Brasil www.ial.sp.gov.br/pesquisa.htm

4.1.5 Estufa de CO₂

Todo o crescimento celular foi realizado em estufa* de CO₂ apresentando controle absoluto da temperatura a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂, vitais para o desenvolvimento e crescimento celular (Fig. 4).



Figura 3 – Estufa de CO₂

4.1.6 Capela de fluxo laminar

Todos os procedimentos para a obtenção do crescimento e da cultura de fibroblastos foram realizados sob capela de fluxo laminar†, em condições assépticas com temperatura ambiente entre 25 a 28°C. O protocolo para utilização deve ser seguido para que não ocorra contaminação da cultura celular. Antes de utilizar a capela, deve-se ligar o sistema de exaustão por 15 minutos e em seguida ligar a luz ultravioleta por mais 15 minutos. Todo instrumental e material que será utilizado dentro da capela de fluxo laminar deve passar por antissepsia prévia com álcool 70.

* MOD 3159 - Forma Scientific, Inc., Ohio, USA

† MOD VLFS-09 – VECO, Campinas, SP, Brasil

4.1.7 Centrífuga

Todos os procedimentos de centrifugação foram realizados em centrífuga* excelsa baby II, sendo utilizado as caçapas para tubo de ensaio de 10ml (Fig. 5).



Figura 4 – Parte interna da centrífuga

4.1.8 Micropipetas

Todos os procedimentos de distribuição de solutos nas placas foram realizados com pipetador† de repetição Finnpipette (Fig. 6).



Figura 4 - Micropipetas

* MOD 206-R – Fanem, São Paulo, Brasil

† MOD H83571/4540 – Labsystems, NY, USA

4.1.9 Microplacas

Todos os procedimentos foram realizados em microplacas* estéreis de 96 casulos, em forma cilíndrica com a base reta, com altura de 10.9 mm e diâmetro superior em 6.96 mm e o inferior de 6.58 mm, apresentando o volume total de 370 μ l (Fig. 7).



Figura 5 – Microplaca de crescimento

4.1.10 Coletador de células

A coleta e a distribuição das células na placa de leitura de cintilação foi feita em coletador de células† automático de 96 pipetas com lavagem em água quente e fria e posterior aspiração. Este procedimento foi realizado 3 vezes para assegurar a correta coleta de células (Fig. 8).



Figura 8 – Coletor de células

* COD 3595 - 96 WELL CELL CULTURE CLUSTER – Costar – Corning Incorporated, NY, USA

† FILTERMATE HARVESTER, Packard BioScience Company, CT, USA

4.1.11 Placa de leitura

A placa* de leitura de cintilação utilizada foi de 96 casulos para coleta celular. Os casulos apresentam uma membrana biológica ao fundo que propicia a passagem de líquidos e retém células (Fig. 9).



Figura 9 – Placa de leitura

4.1.12 Líquido de cintilação

Para promover a cintilação favorecendo a leitura foram utilizados 25 μ l de líquido de cintilação[†] (Fig. 10).



Figura 10 —
Líquido de
cintilação

* UNIFILTER 96 GF/C – Packard Instrument company, CT, USA

† MICROSCINT 20 – Packard Instrument company, CT, USA

4.1.13 Timidina tritiata

O marcador celular utilizado foi a timidina tritiata*. A [Methyl – ³H] Thymidina apresenta 3.03 TBq/mmol e 82.0 Ci/mmol, contendo 250 µCi em 250.0 µl. (Fig. 11).



Figura 11 — Timidina tritiata

4.1.14 Cintilador líquido

Foi utilizado para mensurar a proliferação através da contagem celular pela incorporação de timidina tritiata no ciclo de mitose sendo quantificado por um cintilador líquido automático† (Fig. 12).



Figura 12 – Cintilador líquido

* TRK 758 - UK

† Top Counter NXT – Packard Instrument company, CT, USA

4.2 Métodos

4.2.1 Crescimento e confluência celular

A amostra obtida pelo banco de células veio acondicionada em recipiente térmico para transporte. Depois de desembalada a garrafa de cultura de 25 cm² foi avaliada em microscopia direta sob luz invertida para comprovar a viabilidade e a confluência celular. Como procedimento laboratorial de rotina a garrafa foi incubada durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂, para favorecer sua adesão à superfície. Após esse tempo foi adicionado 4ml de meio DME fresco, contendo 10% de SFB e 1% de solução ATB/M, doravante denominado **meio completo de cultura a 10%**. O frasco foi devidamente identificado, datado e levado à estufa de cultura com a tampa semi-aberta, para facilitar a entrada de CO₂. Foi mantido a partir daí em meio artificial e incubado sob controle de temperatura e pressão em ambiente úmido a 37°C, em fluxo de 95% de ar e 5% de CO₂.

Foram aguardadas 72 horas para a primeira observação. A monitoração do crescimento celular e a sua evolução foram feitas a cada 24 horas utilizando-se microscópio de observação direta*, para a detecção precoce de qualquer anomalia que pudesse inviabilizar o processo.

Constatado o crescimento celular, o meio completo de cultura foi renovado no máximo a cada quatro dias. Como parâmetro clínico, ao final do quarto dia este meio encontrava-se de coloração alaranjada devido à mudança do pH e a perda de nutrientes para as células, comprovando o crescimento e a viabilidade celular.

* Olympus CM2 - Japan

Para renovação do meio completo de cultura a garrafa de crescimento celular foi levada ao fluxo laminar, todo o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com 2ml de solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio (PBSA) e acrescido com 3ml do meio completo de cultura a 10%.

Quando 70% do fundo do frasco estava coberto por células visto sob microscopia direta (a isso chamamos de subconfluência) essa cultura foi subcultivada. A subcultura, ou passagem de células de um frasco para outros, geralmente implica em subdivisão de uma população celular proliferativa capaz de perpetuação através do estabelecimento de uma linhagem celular contínua. O número de passagem significa o número de vezes que uma cultura foi subcultivada. Esse procedimento denomina-se "plaqueamento".

4.2.2 Plaqueamento

Para o plaqueamento e em todas as vezes o qual se trabalhava com a garrafa de crescimento celular todas as substâncias (meio DME, PBSA, ATV) utilizadas nesses procedimentos foram previamente aquecidas em aparelho de banho-maria a 37°C por 15 minutos, antes de começar a manipulação das células.

O plaqueamento é realizado para promover um maior número de garrafas de cultura, sendo plaqueada o número de 3 unidades de cultura para o experimento, onde foi programado a utilização de uma garrafa para o teste de citotoxicidade, obtendo-se a concentração ideal ao experimento, e de duas garrafas para coleta celular para o teste de proliferação sob a ativação do PRP. A confluência das culturas celulares foi verificada em microscópio de observação direta, onde se observou que a superfície do frasco estava recoberta de uma monocamada contínua de células.

Para perpetuação dessa linhagem celular, o meio de cultura foi desprezado, a garrafa de crescimento celular foi lavada duas vezes com PBSA e levantadas de seu substrato pela ação de 5 ml da solução de tripsina/versene, durante 5 minutos a 37°C (tripsinização), sendo descartado após o uso. Separaram-se 4 ml do meio de cultura DME, inseriu-se na garrafa de cultura e agitou-se para desprender as células que estavam aderidas nas paredes. O conteúdo deste frasco foi removido, colocado em tubo de ensaio e centrifugado a 300g, 2000rpm, durante 2 minutos à temperatura ambiente em centrífuga. O sobrenadante do tubo foi descartado e as células que formavam o precipitado no fundo do tubo de ensaio foram ressuspensas com 3ml do meio completo de cultura a 10%, (Fig. 13). Em cada nova garrafa de crescimento celular foi depositado 1 ml dessa suspensão de células e acrescentado 3 ml do meio completo de cultura a 10%. Esse procedimento indicou uma nova passagem celular, sendo levadas à estufa de CO₂ para crescimento.

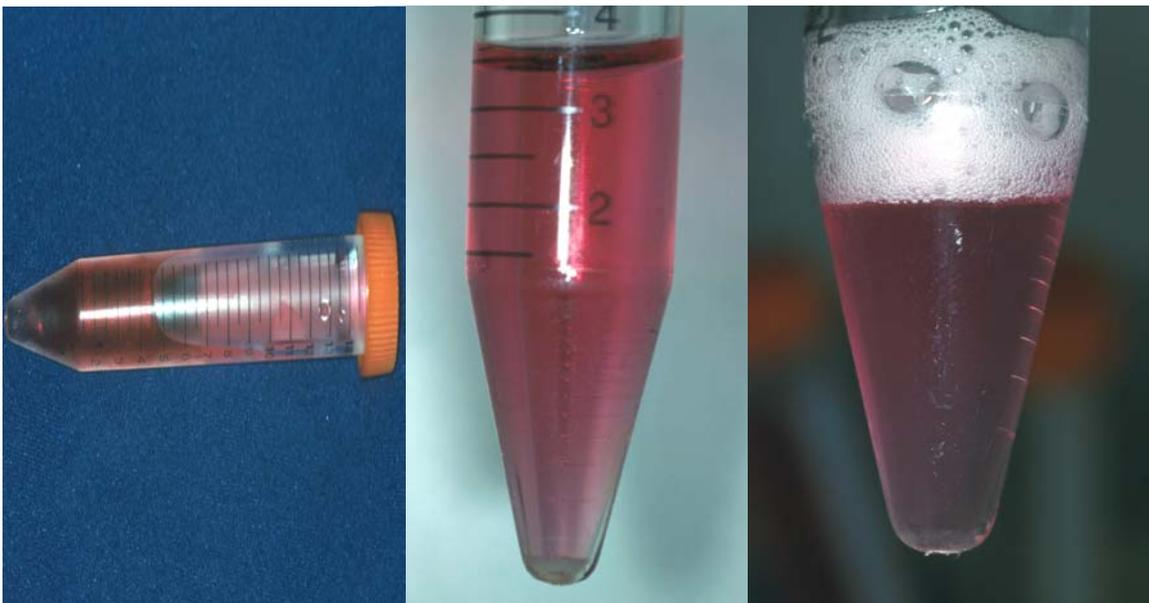


Figura 13 – Tubo de ensaio, concentrado celular após centrifugação e suspensão celular

O protocolo estabelecido acima foi seguido rigorosamente sendo trocado o meio completo de cultura a cada quatro dias e a observação da confluência celular foi realizada a cada 24 horas.

Uma das garrafas de crescimento celular, já em confluência, foi utilizada para estabelecer o teste de citotoxicidade após a obtenção do PRP. Para isso foi inicialmente realizado a contagem e a viabilidade celular, que passaremos a descrever. As outras duas garrafas de crescimento celular ficaram aguardando o resultado para posterior dar seqüência à placa de proliferação com o teste do PRP.

4.2.3 Contagem celular

Antes de começar os experimentos foi necessário fazer a determinação do número de células existentes na garrafa de crescimento celular. A finalidade era conhecer o número de células existentes para fazer a semeadura nas placas de experimento com números exatos de células, padronizando dessa forma os experimentos, da maneira mais precisa possível.

Para a determinação do número de células existentes nos frascos originais (Contagem Celular), o meio foi desprezado, as células foram lavadas duas vezes com PBSA e levantadas de seu substrato utilizando 5ml da solução de tripsina/versene por 5 minutos, sendo desprezado o sobrenadante após o uso. O meio de DME com 4 ml foi colocado dentro da garrafa e após leve agitação foi removido, colocado em tubo de ensaio e centrifugado por 2 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante dos tubos foi descartado e os precipitados foram ressuspensos em 4 ml do meio completo de cultura a 2% (DME com 1% de solução ATB/M e 2% de SFB). Desta amostra 100 µl foi dispensada em tubo de ensaio, sendo adicionado 800 µl de PBSA e 100 µl de Azul de

Trypan a 0,4%, totalizando 1 ml e uma gota dessa mistura foi colocada em cada lado da Câmara de Neubauer, (Fig. 13), que foi levada ao microscópio invertido de fase para realização da contagem do número de células. As células coradas em azul de Trypan representavam as células mortas, enquanto que as células que não estavam coradas representavam as células viáveis.

Foram contados 25 quadrados na parte superior e 25 na parte inferior, perfazendo um total de 50 quadrados contados. O cálculo de contagem foi obtido pela fórmula onde o número total de células contadas (mortas e viáveis) foi multiplicado pela diluição (nesse caso de 40, já que usamos 100 µl de uma suspensão celular de 4000 µl) e multiplicado por 10⁴ (pelo volume da gota que é 0,1 mm³ ou 10⁴ µl). Esse valor foi dividido pelo número de quadrados contados (50). A partir desta fórmula obteve-se a quantidade média de células presentes em cada frasco, através da equação 1 onde:

Equação - 1

$$NT = \frac{N \times D \times 10^4}{Q} = N^{\circ} \text{ total de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4$$

Q = N^o de quadrados da câmara de Neubauer usados para contagem

NT – Número total de células, N – Número de células contadas, D – Diluição e Q – Quantidade de quadrados contados.

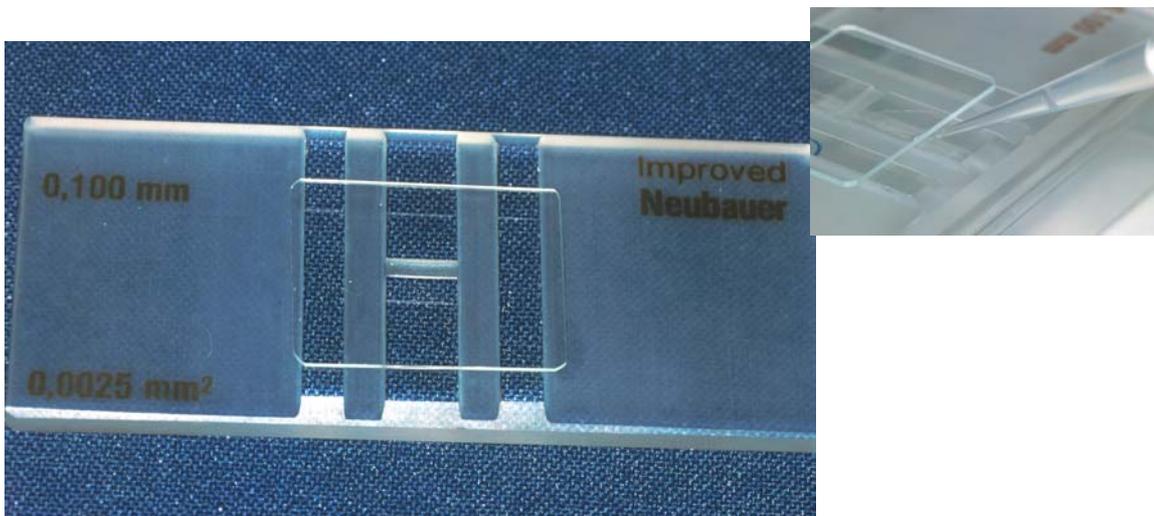


Figura 13 – Câmara de Neubauer (em detalhe o volume da gota a ser contada).

4.2.4 Curvas de crescimento e de viabilidade celular

Obtido o número total de células, foi necessário conseguir o número de células viáveis que correspondessem ao número de células não coradas pelo azul de trypan, empregando a equação 2 onde:

Equação - 2

$$NV = \frac{Nnc \times D \times 10^4}{Q} = N^{\circ} \text{ de células não coradas} \times \text{diluição} \times 10^4$$

$$Q = N^{\circ} \text{ de quadrados da câmara de Neubauer usados para contagem}$$

NV – Número de células viáveis, Nnc – Número de células não coradas, D – Diluição e Q – Quantidade de quadrados contados

Finalmente, para a viabilidade celular, segundo Freshney, 1990, realizou-se a equação 3:

Equação - 3

$$\text{VIABILIDADE CELULAR} = \frac{NV \times 100}{NT} = \frac{N^{\circ} \text{ de células viáveis} \times 100}{N^{\circ} \text{ totais de células}}$$

NV – Número de células viáveis, NT – Número total de células

Os resultados destes testes estabeleceram a viabilidade celular em $3,17 \times 10^4$

Neste ínterim, onde a viabilidade celular estava presente, foi necessário estabelecer a concentração ideal das proteínas. Para isso passaremos a descrever primeiro o protocolo de obtenção do PRP e posteriormente a sua dosagem de proteína para a realização do teste de citotoxicidade, necessário para a escolha da concentração ideal no experimento.

4.2.5 Obtenção do PRP

Para metodizar a obtenção do PRP, utilizou-se do protocolo estabelecido pelo Núcleo de Hemoterapia da Faculdade de Farmácia Bioquímica - Unesp – Campus de Araraquara.

4.2.5.1 Coleta de sangue total

Empregou-se a técnica de venipuntura com o mínimo de traumatismo para não desencadear os fatores plaquetários; facilitando adesividade, aglutinação e a aglomeração plaquetária. Uma unidade de sangue foi acondicionada a uma tripla bolsa coletora padronizada e devidamente identificada contendo anti-coagulante CPDA-1, obtendo-se um volume total de 440 à 460 ml, devendo ser processadas em um período de até 6 horas após a coleta.

4.2.5.2 Primeira centrifugação

A tripla bolsa de sangue foi posicionada na centrífuga, para promover a separação dos componentes sanguíneos por ordem de densidade, a uma velocidade de 2.200 rpm por 5 minutos a 22°C.

4.2.5.3 Coleta do PPP

Após a primeira centrifugação retira-se as bolsas do interior da máquina e extrai-se o sobrenadante diretamente para a segunda bolsa coletora, sendo separado a bolsa contendo eritrócitos das outras duas. Esta bolsa contendo eritrócitos é enviada ao banco de sangue. A bolsa tripla passa a ser dupla, onde uma das partes apresenta o plasma pobre em plaquetas e a última bolsa que até o presente momento não apresenta nada.

4.2.5.4 Segunda centrifugação

As dupla bolsa retorna para a centrífuga, onde foi submetida a nova centrifugação, na velocidade de 4,100 rpm, por 10 minutos a 22 °C.

4.2.5.5 Coleta do PRP

Retira-se a bolsa do interior da máquina e extrai-se o sobrenadante diretamente para a última bolsa coletora. Separa-se a bolsa e obtém-se o PRP e o plasma pobre em plaquetas.

4.2.5.6 Preparo do PRP

A bolsa contendo PRP é pesada para certificar se a relação peso volume está proporcional entre 60 gr para 70 ml. Esta bolsa é colocada em um agitador para homogeneização das plaquetas, ficando por 1 hora em temperatura de 20 a 22°C onde ocorrerá à desagregação espontânea das plaquetas, para finalização do PRP.

Para uma centrifugação ser considerada eficiente é necessário que o Plasma Rico em Plaquetas contenha pelo menos 70% das plaquetas do Sangue Total. A estocagem deve ser feita a 22°C, em agitação constante, para que ocorram trocas gasosas com o meio, evitando desta forma acidificação do pH. Esta troca é possível pela constituição da bolsa que é de cloreto de polivinila e di-2-etil-hexil-ftalato.

Para esta pesquisa foram selecionados pacientes que necessitavam de enxerto ósseo para viabilizar a instalação de implantes na região do seio maxilar. Um total de 10 pacientes, ou seja, 10 bolsas foram utilizadas nesta pesquisa. A obtenção do PRP seguiu o protocolo descrito acima (Tab. 2) e todos os pacientes passaram por exames para

doenças infecto-contagiosas sendo descartado qualquer paciente que estabelecesse sorologia positiva para qualquer dos exames de rotina do banco de sangue.

No momento de sua utilização clínica foi coletado 8 ml do PRP em seringa de 20 ml, sendo colocado 1 ml em tubo de microcentrífuga* devidamente identificado, recebendo a sigla I, onde doravante denominaremos de PRP puro. Seguindo o tramite clínico normal, na seringa o qual restava os 7 ml de PRP foi incorporado 1 ml de ClCa a 10%† passando a ter uma proporção de 7 para 1. Após o tempo de 1 minuto para que ocorresse a reação de quebra plaquetária foram coletados outros 1 ml desta mistura e colocados em tubo de microcentrífuga devidamente identificado, recebendo a sigla II, onde doravante denominaremos de PRP ativado. Esta mistura foi depositada sobre o tecido ósseo particulado do enxerto, coletado previamente, sendo avaliado o tempo de geleificação para cada caso.

	Tempo de preparo	Tempo de utilização (Horas)	Tempo de geleificação
Caso 1	< 6 horas	4 hora	3 minutos
Caso 2	< 6 horas	4 horas e 30 minutos	3 minutos e 45 segundos
Caso 3	< 6 horas	3 horas	2 minutos e 45 segundos
Caso 4	< 6 horas	4 horas	5 minutos e 50 segundos
Caso 5	< 6 horas	7 horas	3 minutos
Caso 6	< 6 horas	3 horas	3 minutos
Caso 7	< 6 horas	4 horas	7 minutos
Caso 8	< 6 horas	3 horas	7 minutos
Caso 9	< 6 horas	7 horas	5 minutos
Caso 10	< 6 horas	4 horas	12 minutos

Tabela 2 – Amostra de pacientes submetidos a gel de plaquetas neste experimento em relação ao tempo de preparo, utilização e geleificação

* COD 3621 – COSTAR – Corning Incorporated, NY, USA

† INDEX FARMACÊUTICA – São Paulo, Brasil

Uma pequena parte deste gel com osso particulado, que não envolvia risco ou dano ao paciente foi coletado e colocado em tubo de microcentrifuga devidamente identificado, recebendo a sigla III, onde doravante denominaremos de PRP osso-gel. Dentro do recipiente que estava o PRP osso-gel sobrou uma porção geleificada sem osso que foi coletada e colocada em tubo de microcentrifuga devidamente identificado, recebendo a sigla IV, onde doravante denominaremos de PRP gel e por fim a sobra do recipiente foi recolhido e colocado em tubo de microcentrifuga devidamente identificado, recebendo a sigla V, onde doravante denominaremos de PRP sobra (Fig. 14).



Figura 14 – Bolsa de PRP, seringa contendo PRP puro, cloreto de cálcio a 10%, forma geleificada do PRP e PRP geleificado com osso particulado e a sobra. Ao centro os microtúbulos usados para armazenamento dos tipos de PRP.

O paciente foi atendido dentro dos trâmites normais para reconstrução do seio maxilar, sendo o mesmo participante de um projeto de pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP aprovado pelo Comitê de Ética da referida Faculdade. Todos os pacientes estão cientes da pesquisa e atestaram sua participação através de formulários livre e esclarecido sobre o conteúdo desta pesquisa e da utilização de seus componentes biológicos para estimulação fibroblástica em cultura celular.

4.2.6 Dosagem de proteína

Foi utilizada a curva de referência para determinação quantitativa da proteína pelo reagente de Folin-Ciocalteu, segundo Lowry. O princípio se baseia na competição do cobre com a ligação peptídica mais a redução do reagente de Folin-Ciocalteu. Este é formado pelo sal molibdato de sódio e tungstato de sódio. Na reação o Hidróxido de cálcio (NaOH) desnatura as proteínas terciárias em primárias e nos locais onde encontra-se ligação peptídica o cobre se liga estabelecendo a cor azul. Este princípio ocorre porque a desnaturação expõe aminoácidos com anéis aromáticos hidrofóbicos, principalmente a tirosina e o triptofano, e esses anéis reduzem os sais molibdato em ácido molibidílico e o tungstato para ácido tungstílico mudando a cor amarela para o azul, proporcional à quantidade de proteína. Esta mudança de cor estabelece o fator de conversão que nesta reação é de 1.9. Assim a cada 1.9 no espectrofotômetro ao comprimento de onda de 660Å temos 1 mg de proteína total.

A quantificação proteica permitiu estabelecer a dosagem correta de proteína para cada fase do experimento. Assim realizou-se o teste de citotoxicidade para estabelecer a correta concentração proteica a ser utilizada (Tab. 3).

Esta concentração foi inicialmente diluída 1000 vezes, transformando o fator mg em µg. Além desta diluição foi necessário adequar o volume a ser testado de 200 µl, nos casulos de crescimento celular. E além disso estabelecer uma faixa de concentração a ser testada entre 5 a 20 ng de proteína por unidade de volume para o teste de citotoxicidade, onde sabe-se que na proteína total apresenta a mg por mililitro:

$$\begin{aligned} \text{Proteína total} &= a \text{ mg/ml} \\ \text{Proteína total} &= 1000a \text{ µg/ml} \\ \text{Proteína total} &= 1000 \times 1000a \text{ ng/1000µl} \end{aligned}$$

Assim aplica-se a fórmula:

$\begin{aligned} \text{Proteína total} &\rightarrow 1000\mu\text{l} \\ 5 \text{ ng} &\rightarrow b \mu\text{l} \end{aligned}$

Ou seja: $b \mu\text{l} = 1000\mu\text{l} \times 5 \text{ ng} / \text{Proteína total}$, aplica-se o primeiro fator de diluição 1000, e a equação passa a ser $b \mu\text{l} = 1000\mu\text{l} \times 5 \text{ ng} / \text{Proteína total} \times 1000$ ou $b \mu\text{l} = 5 / \text{Proteína total}$, em seguida aplica-se a diluição do teste que é de 100µl passando a ser esta fórmula em ou $b \mu\text{l} = 5 \times 100 / \text{Proteína total}$

a = dosagem de proteína
 b = volume de proteína no teste a ser aplicado para 100 µl

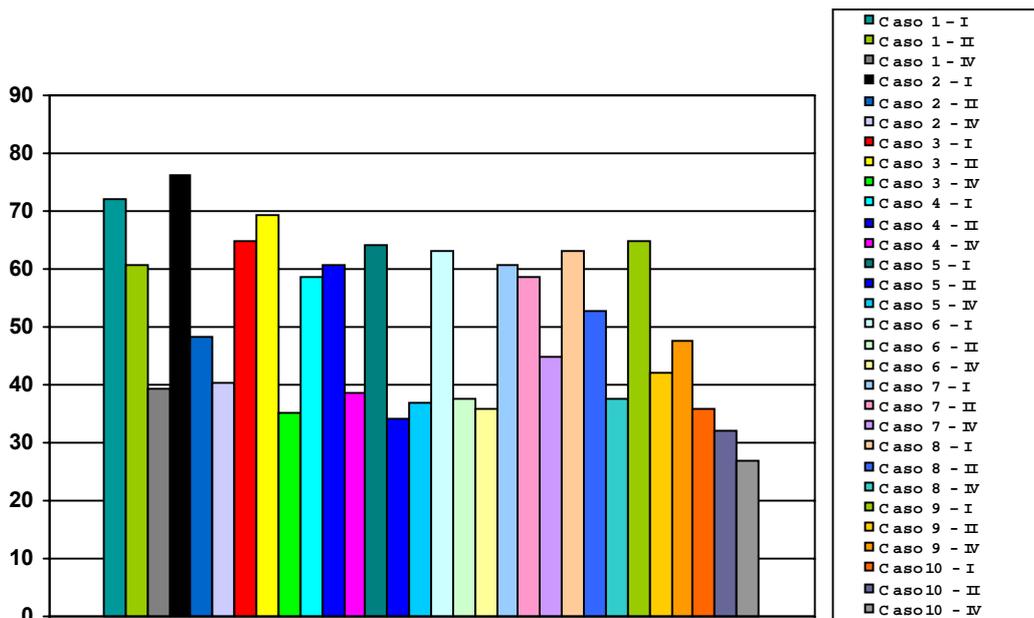


Grafico 1 – Dosagem de proteína em mg.

caso clínico	dosagem / mg	5ng	volume	volume	10 ng	volume	volume	15 ng	volume	volume	20 ng	volume	volume
Diluição	X100ul por 1000 ul	5 X 100	5 ug	solução	10 X 100	10 ug	solução	15 X 100	15 ug	solução	20 X 100	20 ug	solução
Caso 1 – I	71,9	500	6,95	93,05	1000	13,91	86,09	1500	20,86	79,14	2000	27,82	72,18
Caso 1 - II	60,55	500	8,26	91,74	1000	16,52	83,48	1500	24,77	75,23	2000	33,03	66,97
Caso 1 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 1 – IV	39,45	500	12,67	87,33	1000	25,35	74,65	1500	38,02	61,98	2000	50,70	49,30
Caso 1 – V	nao	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 2 – I	76,3	500	6,55	93,45	1000	13,11	86,89	1500	19,66	80,34	2000	26,21	73,79
Caso 2 - II	48,25	500	10,36	89,64	1000	20,73	79,27	1500	31,09	68,91	2000	41,45	58,55
Caso 2 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 2 – IV	40,35	500	12,39	87,61	1000	24,78	75,22	1500	37,17	62,83	2000	49,57	50,43
Caso 2 – V	57,9	500	8,64	91,36	1000	17,27	82,73	1500	25,91	74,09	2000	34,54	65,46
Caso 3 – I	64,9	500	7,70	92,30	1000	15,41	84,59	1500	23,11	76,89	2000	30,82	69,18
Caso 3 - II	69,3	500	7,22	92,78	1000	14,43	85,57	1500	21,65	78,35	2000	28,86	71,14
Caso 3 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 3 – IV	35,1	500	14,25	85,75	1000	28,49	71,51	1500	42,74	57,26	2000	56,98	43,02
Caso 3 – V	42,95	500	11,64	88,36	1000	23,28	76,72	1500	34,92	65,08	2000	46,57	53,43
Caso 4 – I	58,75	500	8,51	91,49	1000	17,02	82,98	1500	25,53	74,47	2000	34,04	65,96
Caso 4 - II	60,55	500	8,26	91,74	1000	16,52	83,48	1500	24,77	75,23	2000	33,03	66,97
Caso 4 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 4 – IV	38,6	500	12,95	87,05	1000	25,91	74,09	1500	38,86	61,14	2000	51,81	48,19
Caso 4 – V	41,25	500	12,12	87,88	1000	24,24	75,76	1500	36,36	63,64	2000	48,48	51,52
Caso 5 – I	64,05	500	7,81	92,19	1000	15,61	84,39	1500	23,42	76,58	2000	31,23	68,77
Caso 5 - II	34,2	500	14,62	85,38	1000	29,24	70,76	1500	43,86	56,14	2000	58,48	41,52
Caso 5 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 5 – IV	36,85	500	13,57	86,43	1000	27,14	72,86	1500	40,71	59,29	2000	54,27	45,73
Caso 5 – V	40,35	500	12,39	87,61	1000	24,78	75,22	1500	37,17	62,83	2000	49,57	50,43
Caso 6 – I	63,15	500	7,92	92,08	1000	15,84	84,16	1500	23,75	76,25	2000	31,67	68,33
Caso 6 - II	37,7	500	13,26	86,74	1000	26,53	73,47	1500	39,79	60,21	2000	53,05	46,95
Caso 6 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 6 – IV	35,95	500	13,91	86,09	1000	27,82	72,18	1500	41,72	58,28	2000	55,63	44,37
Caso 6 – V	39,45	500	12,67	87,33	1000	25,35	74,65	1500	38,02	61,98	2000	50,70	49,30
Caso 7 – I	60,55	500	8,26	91,74	1000	16,52	83,48	1500	24,77	75,23	2000	33,03	66,97
Caso 7 - II	58,75	500	8,51	91,49	1000	17,02	82,98	1500	25,53	74,47	2000	34,04	65,96
Caso 7 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 7 – IV	44,75	500	11,17	88,83	1000	22,35	77,65	1500	33,52	66,48	2000	44,69	55,31
Caso 7 – V	43,85	500	11,40	88,60	1000	22,81	77,19	1500	34,21	65,79	2000	45,61	54,39
Caso 8 – I	63,15	500	7,92	92,08	1000	15,84	84,16	1500	23,75	76,25	2000	31,67	68,33
Caso 8 - II	52,65	500	9,50	90,50	1000	18,99	81,01	1500	28,49	71,51	2000	37,99	62,01
Caso 8 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 8 – IV	37,7	500	13,26	86,74	1000	26,53	73,47	1500	39,79	60,21	2000	53,05	46,95
Caso 8 – V	28,1	500	17,79	82,21	1000	35,59	64,41	1500	53,38	46,62	2000	71,17	28,83
Caso 9 – I	64,9	500	7,70	92,30	1000	15,41	84,59	1500	23,11	76,89	2000	30,82	69,18
Caso 9 - II	42,1	500	11,88	88,12	1000	23,75	76,25	1500	35,63	64,37	2000	47,51	52,49
Caso 9 – III	osso	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 9 – IV	43,85	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso 9 – V	43,85	500	11,40	88,60	1000	22,81	77,19	1500	34,21	65,79	2000	45,61	54,39
Caso10 - I	35,79	500	13,97	86,03	1000	27,94	72,06	1500	41,91	58,09	2000	55,88	44,12
Caso10 – II	32,11	500	15,57	84,43	1000	31,14	68,86	1500	46,71	53,29	2000	62,29	37,71
Caso10 - III	OssO	500	-	-	1000	-	-	1500	-	-	2000	-	-
Caso10 - IV	27,02	500	18,50	81,50	1000	37,01	62,99	1500	55,51	44,49	2000	74,02	25,98
Caso10 – V	26,67	500	18,75	81,25	1000	37,50	62,50	1500	56,24	43,76	2000	74,99	25,01

Tabela 3 – Dosagem de proteína e cálculo de concentração de 5, 10, 15 e 20 ng para o teste de citotoxicidade.

4.2.7 Teste de citotoxicidade

O crescimento celular “in vitro” apresenta maior sensibilidade de suas células devido à disposição linear das células, aumento da superfície de contato celular, condições do meio e maior fragilidade por se tratar de cultura. Assim a concentração do PRP necessitou de uma diluição prévia antes de sua utilização direta sobre a superfície celular, formulada a diluição na ordem de 1000 vezes.

Para este cálculo foi preparado 1000 µl de solução de proteína contendo 999 µl de solução buffer e 1 µl de PRP. Este padrão seguiu-se para os grupos I, II, IV e V, ou seja, PRP puro, PRP ativado, PRP gel e PRP sobra. O grupo III por apresentar tecido ósseo particulado foi necessário descalcificar e foi excluído da pesquisa. O volume de proteína a ser testado na ordem de 5, 10, 15 e 20 ng foi completado para 100µl do meio de cultura completo a 2% (1% ATB/M, 2% SFB e 97% de DME). Tab 4.

	5 ng	5 ng	5 ng	10 ng	10 ng	10 ng	15 ng	15 ng	15 ng	20 ng	20 ng	20 ng
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	caso 7- I											
	8.26	8.26	8.26	16.52	16.52	16.52	24.77	24.77	24.77	33.03	33.03	33.03
B	caso 7- II											
	8.51	8.51	8.51	17.02	17.02	17.02	25.53	25.53	25.53	34.04	34.04	34.04
C	caso 7- IV											
	11.17	11.17	11.17	22.35	22.35	22.35	33.52	33.52	33.52	44.69	44.69	89.39
D	Caso 7- V											
	11.40	11.40	11.40	22.81	22.81	22.81	34.21	34.21	34.21	45.61	45.61	45.61
	88.60	88.60	88.60	77.19	77.19	77.19	65.79	65.79	65.79	54.39	54.39	54.39

Tabela 4 – Base de cálculo para o teste de citotoxicidade do caso 7.

Devemos voltar a lembrar que na contagem celular, a suspensão celular de 4.0ml foi utilizada 0.1ml para realização da viabilidade celular. O restante da solução foi utilizado para dar seguimento ao teste de citotoxicidade. A suspensão restante (3,9 ml) é preparada para o experimento.

Para cálculo de volume foi realizado a soma dos itens em azul que representam a suspensão celular que aparecem nesta tabela 3.619.68 μl e o complemento de proteína que representam o vermelho na ordem de 1.180.32 μl totalizando 4.800,00, o que apresentou 48 casulos com 100 μl . Para cálculo de suspensão celular foi aproximado o volume total celular para 3.700.00 μl , onde 1% ou 37 μl foi incorporado de ATB/M, 2% ou 74 μl foi incorporado de SFB e o restante 97% ou 3.589.00 μl foi incorporado de meio DME.

Os resultados deste teste de citotoxicidade foram avaliados e através de microscopia direta foi escolhido a melhor concentração e avaliado os grupos. Com relação aos grupos o índice de crescimento celular no grupo V ou seja PRP sobre não foram expressivos. Assim foram avaliados somente os grupos I, II e IV e a concentração escolhida para esta avaliação foi de 10 ng.

4.2.7.1 Avaliação do teste de citotoxicidade

Cada amostra foi fotografada para análise descritiva da morfologia celular. Os grupos tiveram uma variação de concentração de 5ng, 10 ng , 15ng e 20ng.

Os resultados obtidos confirmam a hipótese da viabilidade do PRP no crescimento celular, em concentração de 10 ng, comprovados nos dados a seguir. Para o grupo de 5 ng a morfologia celular foi predominante na forma achatada, com pouca confluência celular (Fig. 15, 16, 17). No grupo de 10 ng, a morfologia apresentou-se na combinação de células achatadas e arredondadas, com pouca confluência celular (Fig. 18, 19, 20). No grupos de 15ng houve pouca confluência celular com células arredondadas e predominância de células achatadas, sendo constatado no interior das células vacúolos expressivos, (Fig. 21, 22, 23). No grupo de 20 ng houve predominância

de células achatadas com muitos vacúolos no interior celular e quase nada de confluência celular, (Fig. 24, 25, 26). O controle realizado com soro fetal bovino a 2% evidenciou poucas células de predominância arredondadas (Fig. 27), a 5 % encontrou-se células arredondadas e achatadas em subconfluência celular (Fig. 28). Todos os exames foram feitos em microscópio de luz invertida (Fig. 29).

4.2.8 Preparo da placa de proliferação

Foi montado uma placa de proliferação utilizando-se da concentração de 10 ng.

Os cálculos desta estão na tabela 4.

Caso clínico diluicao 1X1000X200ul	Dosagem de proteína em mg por 1000 ul	Concentração de 10 ng 10 X 200	Volume de PRP 10 ug	Volume da solução
Caso 1 – I	71,9	2000	27,82	172,18
Caso 1 – II	60,55	2000	33,03	166,97
Caso 1 - IV	39,45	2000	50,70	149,30
Caso 2 – I	76,3	2000	26,21	173,79
Caso 2 – II	48,25	2000	41,45	158,55
Caso 2 - IV	40,35	2000	49,57	150,43
Caso 3 – I	64,9	2000	30,82	169,18
Caso 3 – II	69,3	2000	28,86	171,14
Caso 3 - IV	35,1	2000	56,98	143,02
Caso 4 – I	58,75	2000	34,04	165,96
Caso 4 – II	60,55	2000	33,03	166,97
Caso 4 - IV	38,6	2000	51,81	148,19
Caso 5 – I	64,05	2000	31,23	168,77
Caso 5 – II	34,2	2000	58,48	141,52
Caso 5 - IV	36,85	2000	54,27	145,73
Caso 6 – I	63,15	2000	31,67	168,33
Caso 6 – II	37,7	2000	53,05	146,95
Caso 6 - IV	35,95	2000	55,63	144,37
Caso 7 – I	60,55	2000	33,03	166,97
Caso 7 – II	58,75	2000	34,04	165,96
Caso 7 - IV	44,75	2000	44,69	155,31
Caso 8 – I	63,15	2000	31,67	168,33
Caso 8 – II	52,65	2000	37,99	162,01
Caso 8 - IV	37,7	2000	53,05	146,95
Caso 9 – I	64,9	2000	30,82	169,18
Caso 9 – II	42,1	2000	47,51	152,49
Caso 9 - IV	43,85	2000	47,61	152,39
Caso10 – I	35,79	2000	55,88	144,12
Caso10 - II	32,11	2000	62,29	137,71
Caso10 - IV	27,02	2000	74,02	125,98

Tabela 5 – Cálculo de proteína e volume celular para a placa de proliferação.

Teste com 05ng de PRP

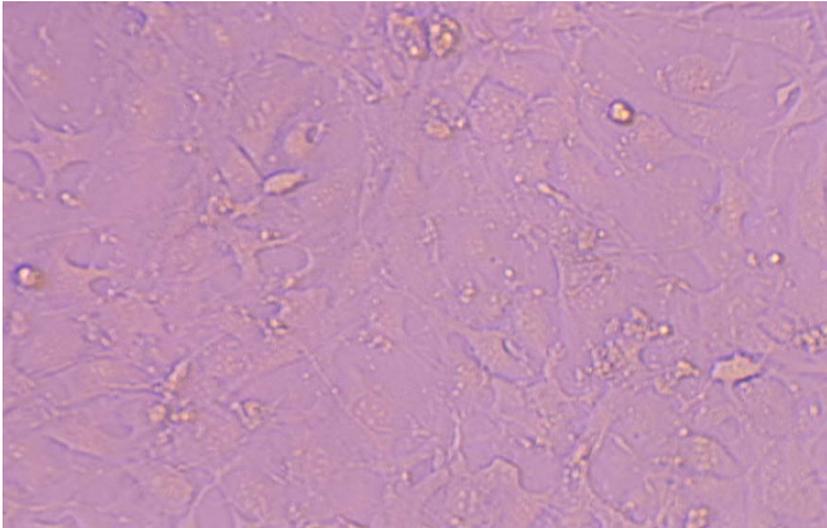


Figura 15 - Suspensão celular em meio de cultura completo com 05ng de PRP puro

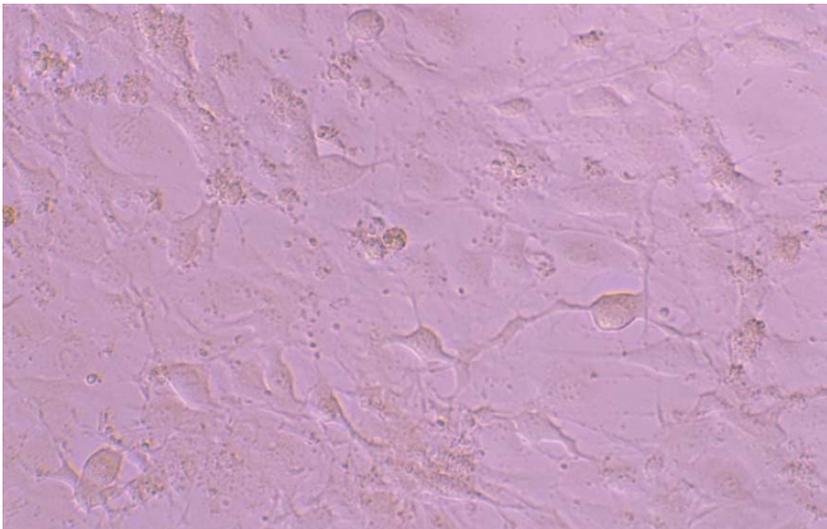


Figura 16 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 05ng de PRP ativado

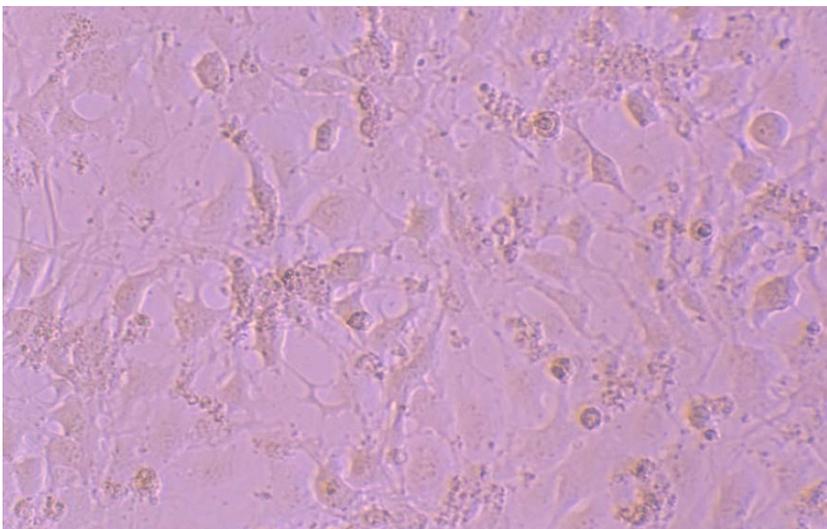


Figura 17 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 05ng de PRP gel

Teste com 10ng de PRP

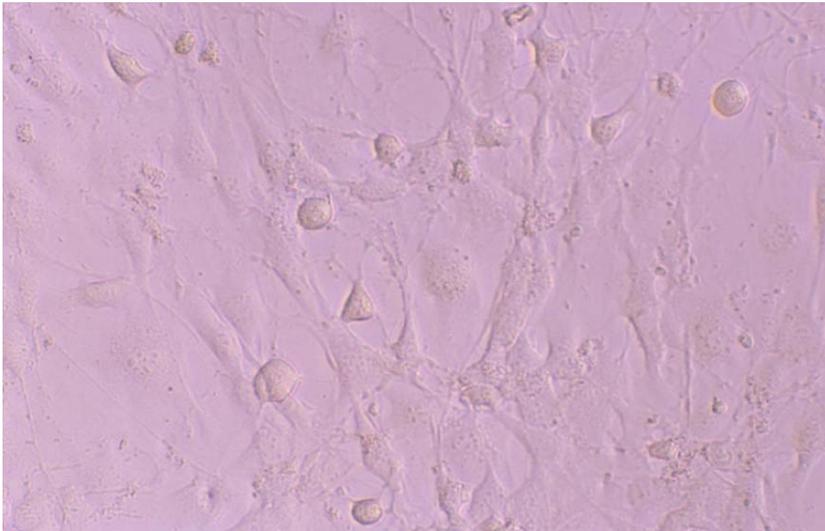


Figura 18 - Suspensão celular em meio de cultura completo com 10ng de PRP puro

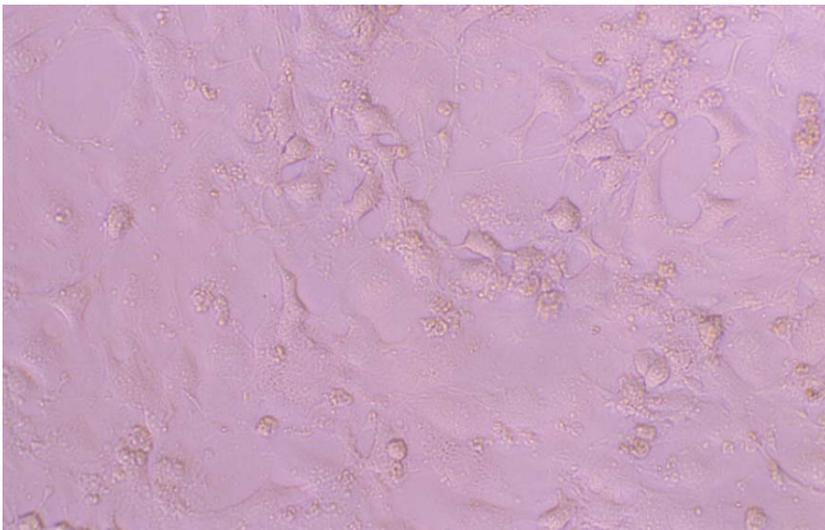


Figura 19 - Suspensão celular em meio de cultura completo com 10ng de PRP ativado



Figura 20 - Suspensão celular em meio de cultura completo com 10ng de PRP gel

Teste com 15ng de PRP

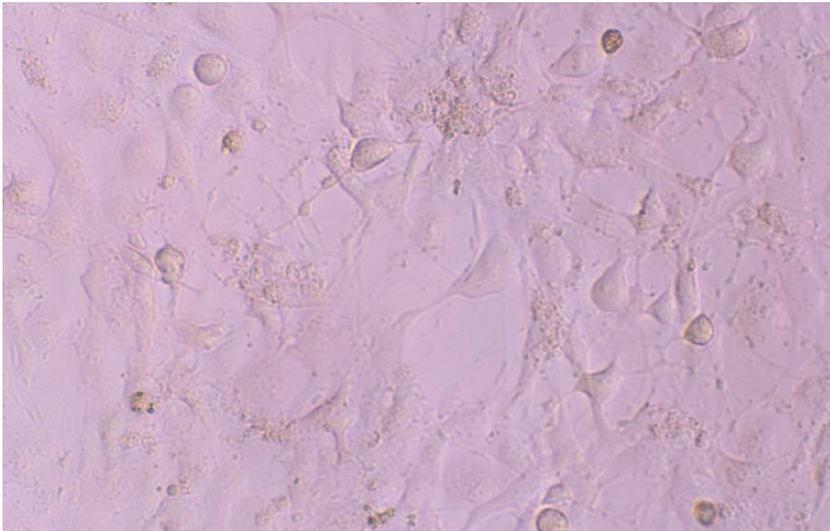


Figura 21 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 15ng de PRP puro

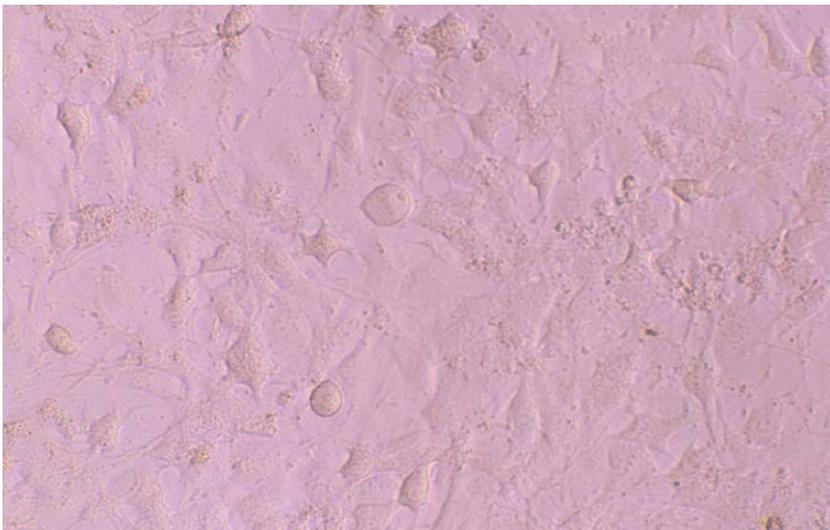


Figura 22 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 15ng de PRP ativado

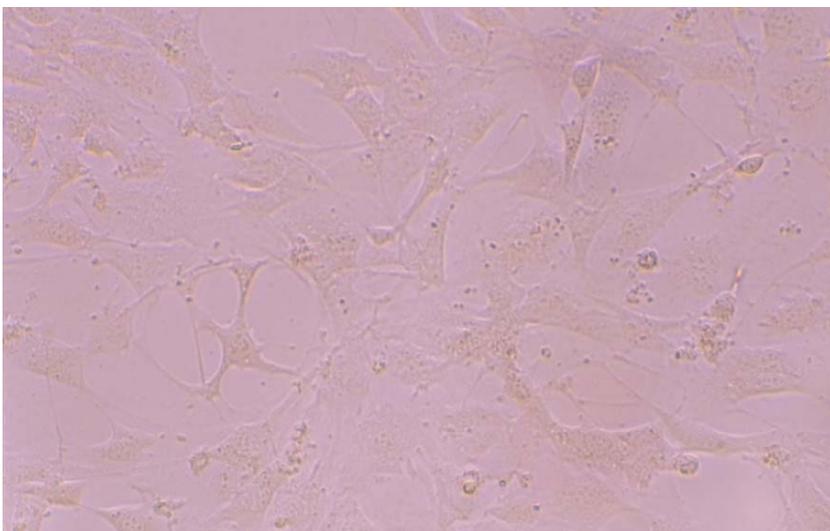


Figura 23 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 15ng de PRP gel

Teste com 20ng de PRP

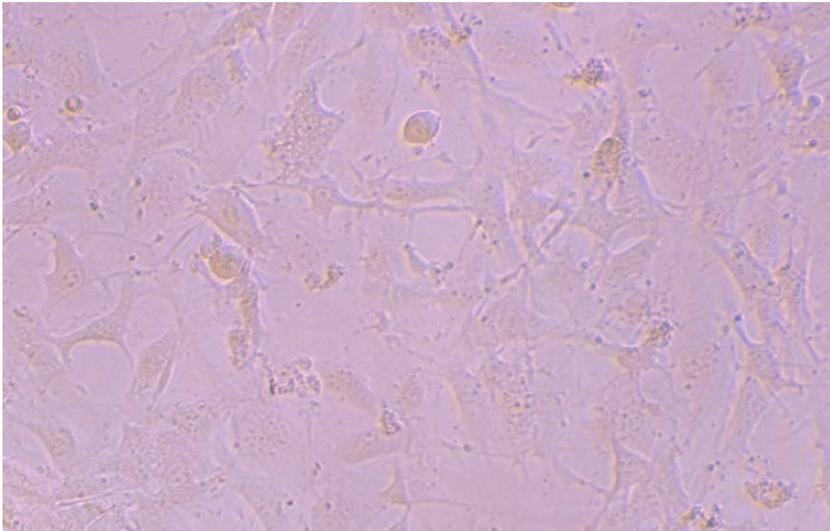


Figura 24 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 20ng de PRP puro

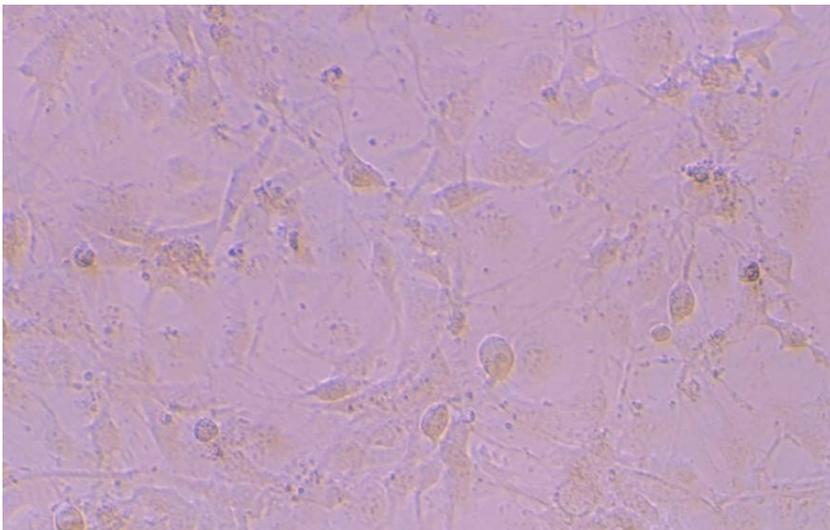


Figura 25 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 20ng de PRP ativado



Figura 26 – Suspensão celular em meio de cultura completo com 20ng de PRP gel

Teste com SFB

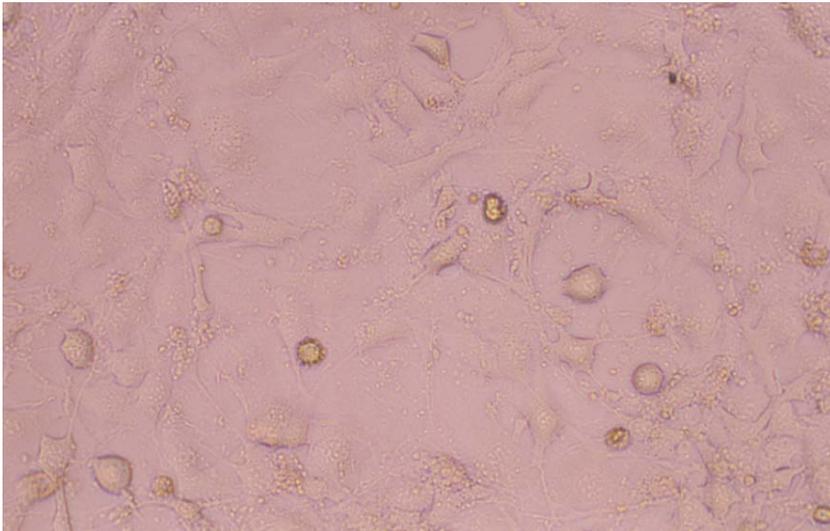


Figura 27 – Suspensão celular em meio de cultura com 2% SFB

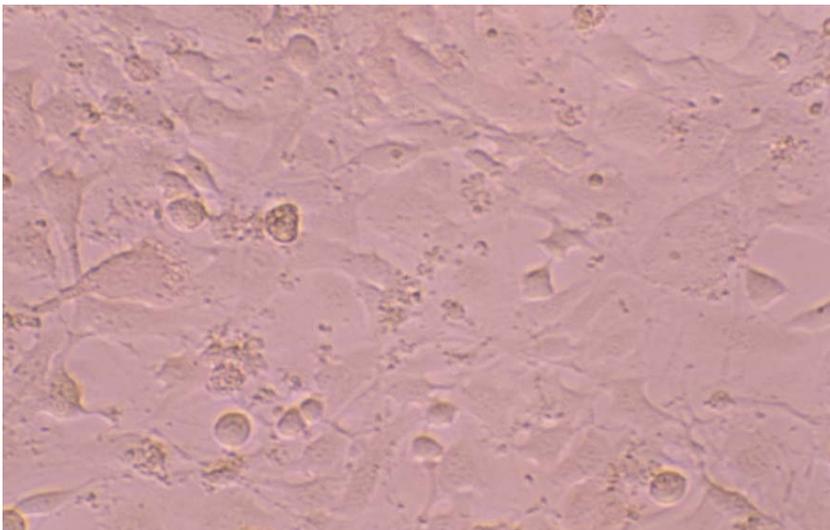


Figura 28 - Suspensão celular em meio de cultura com 5% de SFB



Figura 29 – Microscópio de luz invertida

Todos os casos foram montados em placa estéril de 96 casulos de maneira a poder estabelecer todo o grupo experimental de PRP nesta placa. A distribuição e montagem da placa de proliferação para o grupo testado de PRP foi realizada seguindo a mesma concentração da placa de citotoxicidade, sendo a diagramação mostrada abaixo, na tabela 6:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Caso 1 - I	caso 1 - I	caso 1 - I	caso 1 - II	caso 1 - II	caso 1 - II	caso 1 - IV	caso 1 - IV	caso 1 - IV	Caso 7 - I	caso 7 - I	caso 7 - I
	27.82	27.82	27.82	33.03	33.03	33.03	50.70	50.70	50.70	33.03	33.03	33.03
B	Caso 2 - I	caso 2 - I	caso 2 - I	caso 2 - II	caso 2 - II	caso 2 - II	caso 2 - IV	caso 2 - IV	caso 2 - IV	Caso 7 - II	caso 7 - II	caso 7 - II
	26.21	26.21	26.21	41.45	41.45	41.45	49.57	49.57	49.57	34.04	34.04	34.04
C	Caso 3 - I	caso 3 - I	caso 3 - I	caso 3 - II	caso 3 - II	caso 3 - II	caso 3 - IV	caso 3 - IV	caso 3 - IV	caso 7 - IV	caso 7 - IV	caso 7 - IV
	30.82	30.82	30.82	28.86	28.86	28.86	56.98	56.98	56.98	44.69	44.69	44.69
D	Caso 4 - I	caso 4 - I	caso 4 - I	caso 4 - II	caso 4 - II	caso 4 - II	caso 4 - IV	caso 4 - IV	caso 4 - IV	Caso 10 - I	caso 10 - I	caso 10 - I
	34.04	34.04	34.04	33.03	33.03	33.03	51.81	51.81	51.81	55.88	55.88	55.88
E	Caso 5 - I	caso 5 - I	caso 5 - I	caso 5 - II	caso 5 - II	caso 5 - II	caso 5 - IV	caso 5 - IV	caso 5 - IV	caso 10 - II	caso 10 - II	caso 10 - II
	31.23	31.23	31.23	58.48	58.48	58.48	54.27	54.27	54.27	62.29	62.29	62.29
F	Caso 6 - I	caso 6 - I	caso 6 - I	caso 6 - II	caso 6 - II	caso 6 - II	caso 6 - IV	caso 6 - IV	caso 6 - IV	Caso 10 - IV	caso 10 - IV	caso 10 - IV
	31.67	31.67	31.67	53.05	53.05	53.05	55.63	55.63	55.63	74.02	74.02	74.02
G	Caso 8 - I	caso 8 - I	caso 8 - I	caso 8 - II	caso 8 - II	caso 8 - II	caso 8 - IV	caso 8 - IV	caso 8 - IV	susp. cel.	susp. cel.	susp. cel.
	31.67	31.67	31.67	37.99	37.99	37.99	53.05	53.05	53.05	200 ul	200 ul	200 ul
H	Caso 9 - I	caso 9 - I	caso 9 - I	Caso 9 - II	caso 9 - II	caso 9 - II	caso 9 - IV	caso 9 - IV	caso 9 - IV	Timidina	timidina	Timidina
	30.82	30.82	30.82	47.51	47.51	47.51	47.61	47.61	47.61			

Tabela 6 – Distribuição da suspensão celular e da proteína na placa de proliferação.

4.2.9 Crescimento em estufa

Após a montagem da placa de 96 furos foi inserida em estufa de CO₂ e mantida por 18 horas.

4.2.10 Líquido de cintilação

Após este período, cada casulo recebeu 40µl de líquido de cintilação.

4.2.11 Tripsina versene

Em seguida aplica-se ATV na proporção de 20 µl em cada casulo, e espera-se por 3 minutos.

4.2.12 Transferência para a placa de leitura

Com auxílio de um coletor com 96 pontas, posiciona-se a placa de proliferação na porção inferior, em contato com as 96 pipetas e na parte superior a placa de leitura de cintilação. O aparelho faz a lavagem com água quente e aspiração 3 vezes, seguida da lavagem com água fria e aspiração 3 vezes. Após esta etapa todas as células da placa de proliferação foram transferidas para a placa de leitura de cintilação.

4.2.13 Secagem da placa

Após este tempo a placa de cintilação é deixada de lado por 8 horas, para secagem e completar seu ciclo.

4.2.14 Incorporação de timidina tritiata.

A timidina tritiata é inserida após certificar que a placa encontra-se bem seca. O volume de 24µl de timidina é colocada em cada casulo. As placas são vedadas com adesivo especial.

4.2.15 Leitura da placa

É inserido dentro do aparelho de contagem celular líquido. Onde obtém-se os dados de proliferação celular.

4.2.16 Planejamento estatístico

O estudo da hipótese de que os grupos: caso I; caso II; caso IV; susp celular; timidina tritiata; SFB 2% e SFB 5%, exercem seus efeitos sobre a proliferação celular foi realizado a partir do modelo estatístico de análise de variância paramétrico a um critério fixo no nível de significância de 0,05. A regra de decisão para se testar a hipótese definida acima foi estabelecida a partir de $p = P(F > F_0)$ — probabilidade de que a estatística F seja maior do que seu valor observado(F_0) nos dados amostrados — do modo que se segue: se p foi maior do que 0,05, o valor de F_0 foi não significativo e a hipótese sob teste foi não rejeitada e, em caso contrário, o valor de F_0 foi significativo e a hipótese sob teste foi rejeitada.

Se a hipótese de igualdade foi rejeitada, efetuou-se o teste adicional de Tukey para se detectar a diferença significativa entre os grupos, com o qual pôde-se estabelecer uma ordem classificatória crescente.

5 RESULTADOS

Os resultados do teste de proliferação estão na tabela 7 abaixo:

caso 1 – I	3137	6489	6057
caso 1 – II	3906	6883	7567
caso 1 – IV	6887	6310	6659
caso 2 – I	6311	9356	9304
caso 2 – II	10669	10313	10873
caso 2 – IV	5674	8454	7704
caso 3 – I	7516	10467	12350
caso 3 – II	10332	13331	13559
caso 3 – IV	13239	11676	14335
caso 4 – I	6193	11491	13401
caso 4 – II	13578	15631	14179
caso 4 – IV	9451	3243	4614
caso 5 – I	6706	12247	11593
caso 5 – II	8733	9607	8858
caso 5 – IV	10984	9559	10435
caso 6 – I	7509	9359	14340
caso 6 – II	10224	14025	11678
caso 6 – IV	12305	10996	11605
caso 7 – I	8039	6840	6006
caso 7 – II	11418	12202	7729
caso 7 – IV	13996	11298	10513
caso 8 – I	6516	9613	11185
caso 8 – II	14339	11974	11265
caso 8 – IV	9884	11407	12195
caso 9 – I	161625	166332	161765
caso 9 – II	6168	8819	6535
caso 9 – IV	7335	8087	7159
caso 10 – I	11492	9662	6780
caso 10 – II	2220	9285	7323
caso 10 – IV	6058	7874	4517
Susp celular	12562	9428	6714
Timidina	477	243	90
SFB 2%	4144	8892	11839
SFB 5%	17625	19968	15798

Tabela 7 – Resultados da proliferação celular

5.1 Análise estatística

A aplicação do modelo estatístico aos dados obtidos experimentalmente originou a tabela 8. Note-se que a aplicação do modelo aos dados foi possível porque o teste de Levene, que coloca à prova a hipótese de igualdade de variâncias entre os grupos, forneceu um valor para a estatística $F_0 = 1,295$ que foi não significativa porque $p = 0,267$ com 6 graus contra 92 graus de liberdade.

Fonte de Variação	G.L.	Q. M.	F ₀	p <
Grupo	6	81517597,913	9,412 s	0,001
Residual	92	8661131,888		

Tabela 8 – Resultados da análise de variância.

s = valor significativa.

Na tabela 9, notou-se que o valor $F_0 = 9,412$ foi não significativa porque $p < 0,001$. Pode-se, então, afirmar-se que a hipótese de igualdade entre os efeitos desencadeados pelos grupos sobre a proliferação celular foi rejeitada. Na tabela 2 esses efeitos foram dados em termos de proliferação celular média, aonde se observou que o grupo Timidina apresentou a menor proliferação celular média, seguida dos grupos SFB 2%, caso IV, caso I, caso II, que apresentaram-se em mesmo grupo de resultado porém com médias estatisticamente diferentes entre si de proliferação celular, vindo a seguir o grupo SFB 5% que apresentou a maior proliferação celular média.

Grupo	Freq.	Média	D. Padrão	Class.
Caso I	27	8887,37	2747,90	B
Caso II	30	10107,43	3185,86	B
Caso IV	30	9148,43	2936,49	B
Timidina tritiata	3	270,00	194,91	A
SFB 2%	3	8291,67	3882,47	B
SFB 5%	3	17797,00	2090,31	C

Tabela 9 - Freqüências, médias, desvios padrão e classificação para a proliferação celular.

6 DISCUSSÃO

A capacidade osteoindutiva e catalizante dos adesivos de fibrina impulsionaram à descoberta de seus mecanismos de ação (WHITMAN et al., 1997; MARX, 1999). A multiplicidade de funções e a busca da melhor técnica de aplicação clínica, provocaram uma rápida transição conceitual: adesivos de fibrina (ANITUA, 1999), cola de fibrina (TAYAPONGSAK et al., 1994), gel de plaquetas (WHITMAN et al., 1997) e, mais recentemente, PRP (ANITUA, 1999).

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

O PRP é um produto de origem 100% orgânica e autógena (Whitman et al., 1997) e esta é uma das razões pelas quais ele vem sendo utilizado nos processos de reconstrução óssea (ANITUA, 1999; MARX, 1999). Posto que, a reconstrução óssea feita com biomateriais aloplásticos ou xenógenos, possui comportamentos biológicos distintos podendo levar à formação de tecido ósseo ou não no local enxertado devido ao mecanismo de reparação e aceitação orgânico-celular destes compostos (BUSER et al., 1995).

Outro aspecto relevante, é que por ser fruto de uma preparação autógena realizada momentos antes do procedimento cirúrgico, o uso PRP reduz o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas, quando comparada a outros produtos. Existe relato de transmissão de vírus HIV através do uso de cola de fibrina em cirurgia

oral, pois este produto, disponibilizado comercialmente, é derivado de crioprecipitado de doador ao acaso ou homólogo (WHITMAN et al., 1997).

Nos casos em que a cola de fibrina deriva de doação homóloga, exige-se colheita prévia de no mínimo 3 dias antes da cirurgia (WHITMAN et al., 1997) ou de 1 a 3 semanas antes (TAYAPONGSAK et al., 1994), expondo o paciente ao risco de uma reação potencial à transfusão ou a complicação devido à doença infecciosa, bem como requer avançada coordenação por parte do cirurgião responsável (WHITMAN et al., 1997).

A característica técnica de colheita e aplicação rápida do PRP, serve para reduzir os riscos de uma pré-doação (WHITMAN et al., 1997). Assim como, preserva a função máxima das plaquetas (RAVEL, 1997) e as atividades dos fatores de crescimento derivados dos grânulos α -plaquetários (MARX, 1999; ANITUA, 1999).

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

Preservar a função máxima das plaquetas parece ser de grande importância bioquímica, pois a vantagem da utilização do PRP é a aceleração da regeneração óssea pelo aumento da quantidade de todos os fatores de crescimento presentes nas plaquetas humanas (MARX, 1999).

A bio-tecnologia do PRP permite a concentração de grande número de plaquetas (com seus fatores de crescimento) em pequenos volumes de plasma (ANITUA, 1999; MARX, 1999, LYNCH, 1999). Contagens mecânicas de plaquetas no sangue periférico de 44 pacientes apontaram uma média de valor de 232,000; enquanto que no PRP foi de

785,000, significando um aumento de 338%. Quando estas plaquetas foram contabilizadas em esfregaços de sangue o PRP demonstrou um aumento de 900% sobre o número inicial contado no mesmo esfregaço (MARX, 1999).

Tem-se teorizado que esta quantidade acentuada de fatores de crescimento do PRP inicia a atividade das células ósseas indiferenciadas de forma mais completa do que ocorreria, naturalmente, no enxerto e na área de coagulação (MARX e GARG, 1999). Ou seja, a regeneração óssea iniciada pelo PRP leva a um aumento ou melhoria do caminho natural da regeneração óssea.

Assim como, que a regeneração óssea mais rápida e com qualidade final elevada deve-se ao fator de que as células do canal do enxerto ósseo e os osteoblastos, quando testados com anticorpo monoclonais para receptores de PDGF, TGF-b1, TGF-b2 e IGF, demonstraram resultados positivos. Enquanto que, as células contendo receptores PDGF e TGF-b estavam agrupadas nas regiões perivasculares e as células que continham receptores IGF foram encontradas nos osteoblastos endósseos (MARX, 1999).

Em função disto, os estudos e experiências com PRP, adicionados ao enxerto tem apresentado prematura consolidação e mineralização do enxerto na metade do tempo, com 15 a 30% de ganho efetivo na necessidade de osso trabecular (MARX e GARG, 1999).

O organismo humano acredita nos fatores de crescimento para promover o rápido aumento do número de células mesenquimais indiferenciadas no sítio cicatricial durante o tempo de reparo e cicatrização. Pois a proporção de células mesenquimais para células estruturais da medula é de aproximadamente 1:100,000 quando é adolescente; 1:250,000 quando na idade de 35 e 1:400, 000 na idade de 80 (MARX, 1999).

Assim sendo, se a vantagem do PRP é a aceleração da regeneração óssea pelo aumento da quantidade de todos os fatores de crescimento presentes nas plaquetas humanas, a desvantagem deve ser o curto período de vida plaquetária no enxerto. Pois, todas as plaquetas fragmentam-se em torno de 3 a 5 dias e a atividade dos seus fatores se extinguem por volta de 7 a 10 dias (MARX, 1999).

Apesar do curto período de vida das plaquetas, provou-se que o PRP é capaz de promover uma regeneração óssea mais rápida e qualitativamente melhor; quando analisado histologicamente enxertos ósseos beneficiados com PRP, demonstrou em períodos de 4 a 6 meses formação de sistemas harvesianos maduros e maior formação de osso lamelar fase – II do que em enxertos não beneficiados.

Diante desta constatação, a aplicação do PRP em conjunto com procedimentos de enxertos ósseos tem sido ampliada e discutida, com aparente sucesso. Nos enxertos de seio maxilar, com ou sem instalação imediata de implantes, o PRP mostra um papel importante, devido ao complexo ambiente bioquímico que se estabelece nesta situação clínica.

Quando um enxerto cortico-medular particulado é instalado para preenchimento de um seio maxilar, ele é instalado dentro de um espaço morto, preenchido por sangue coagulado. Este espaço é hipóxico (5 a 10 mmHg) e acidófilo (pH de 4 a 6), contendo plaquetas, leucócitos, eritrócitos e uma complexa rede de fibrina (MARX, 1999; WHITMAN et al., 1997).

A intenção deste procedimento não é somente preencher a cavidade sinusal, mas criar adequada quantidade de osso viável subjacente à crista óssea reabsorvida, para a obtenção de um tratamento reabilitador previsível. E para que isto ocorra, a qualidade e

quantidade óssea regenerada tornam-se de fundamental importância, principalmente quando há brevidade para a instalação dos implantes.

Neste ambiente de baixa oxigenação e relativa acidez, as células mesenquimais indiferenciadas, que apresentam-se em pequeno número, necessitam se multiplicar rapidamente ladeadas pela angiogênese capilar. No intuito de restabelecer um tecido normóxico (P_{O_2} de 45 a 55 mmHg) e com pH fisiológico (7,42), sob pena de todo o processo regenerativo ser prejudicado, caso isto não ocorra o mais rapidamente possível (MARX, 1999).

A finalidade da aplicação do PRP nestas situações é, exatamente, acelerar o processo cicatricial através dos fatores de crescimento, que estimulam a sucessão de eventos celulares necessários. Ou seja, a concentração de todos os fatores de crescimento do PRP, principalmente PDGF, TGF- β e IGF, otimizam as atividades celulares de mitogênese, angiogênese e quimiotaxia (ANITUA, 1999) favorecendo a ocorrência do processo de regeneração.

Desta forma, pode-se perceber que a pluralidade das ações celulares do PRP habilita o seu uso em diversas situações clínicas, tais como: enxerto no seio, enxerto para crescimento de altura ou largura (particulado ou em bloco) do rebordo alveolar, fenestrações e deiscências, dentre outras.(WHITMAN et al., 1997).

Certamente, o valor clínico real do PRP é o seu poder de formação óssea mais rápido, o que permite uma função antecipada e uma colocação de implantes mais breve, quando necessário. Além disto, a quantidade de osso regenerado em enxerto beneficiado com PRP é bem maior em medida; especialmente, naqueles indivíduos com regeneração óssea mais pobre: idosos, osteoporóticos, diabéticos e irradiados (MARX e GARG, 1999).

Este conceito de aceleração da cicatrização óssea pela adição acentuada de bioquímicos do PRP deve-se ao entendimento de que a concentração das plaquetas, em pequenos volumes de plasma, possibilita a liberação sucessiva de fatores de crescimento no ferimento estimulando a osseocondução através do enxerto (MARX, 1999).

O princípio da concentração de todos os fatores de crescimento, principalmente PDGF, TGF- β s e IGF, a partir do seqüestro de plaquetas, confere ao PRP uma habilidade plural para acelerar eventos cicatriciais tais como: mitogênese, angiogênese e quimiotaxia. Este espectro amplificado suporta a estratégia de ação deste produto, que é otimizar os caminhos naturais da cicatrização através dos fatores de crescimento nele contidos.

Desta forma, esta nova modalidade de engenharia tecidual oferece aos cirurgiões a capacidade de modular processos regenerativos ósseos. Possibilitando uma osteogênese mais rápida e de melhor qualidade, que se repercute clinicamente em uma função antecipada e na instalação mais breve dos implantes.

Esta rapidez de formação esta diretamente ligada a capacidade proliferativa do PRP. Neste experimento as células foram mantidas através da suplementação com soro fetal bovino em meio de cultura. O meio é uma solução composta de aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais, algumas vezes são suplementados por glicose e outros suplementos orgânicos (PAUL, 1975). A qualidade do meio é de extrema importância, já que ele irá manter as células em condições nutricionais semelhantes àquelas que tinham quando estavam no organismo. Em cultura de fibroblastos, para que a divisão celular se realize em condições ótimas, é necessário que o meio de cultura esteja em condições ideais de nutrição, isto é, o meio ideal para essas células é aquele que contenha de 5 a 10% de SFB, caso contrário essas células entrarão em estresse, e

terão seu crescimento alterado de alguma forma, segundo Freshney. Por isso trabalhamos com meio DME contendo 5% de SFB para o estabelecimento dessa linhagem, sendo nosso parâmetro ideal de crescimento celular.

Este crescimento é controlado visualmente pela confluência celular. A confluência modula a atividade mitótica das células. As células em cultura sofrem um fenômeno que se conhece por inibição de contato, pois quando uma célula contata ao seu redor com outras células e forma-se uma monocamada, inibe-se o processo mitótico (ALBERTS et al., 1989).

Assim, este experimento limitou-se ao período de 20 horas de estimulação para estabelecer a proliferação em um ciclo de mitose celular. A partir de um quantitativo de viabilidade celular pode-se aplicar o PRP em suas três formulações sendo evidenciado a ação mais expressiva do PRP ativado sobre os outros tipos. O PRP somente perdeu por ativação em relação ao SFB a 5%, situação considerada ideal de crescimento e desenvolvimento celular *in vitro*.

Em suma, o PRP é um composto totalmente orgânico, atóxico, não imunoreativo e desprovido de morbidade elevada. Necessitando, ainda, ter sua tecnologia de processamento bioquímico aperfeiçoado e seus mecanismos de ação melhor esclarecidos para alcançar aplicabilidade clínica rotineira.

7 CONCLUSÃO

1 - É possível promover o crescimento e manutenção estável da linhagem NIH/3T3.

2 - A concentração do Plasma Rico em Plaquetas determinada e aplicada no crescimento celular proposta é de 10 ng para obtenção de crescimento celular “in vitro”.

3 - O efeito na proliferação de fibroblastos foi significativo para o Plasma Rico em Plaquetas puro, ativado e geleificado; sendo que o grupo do PRP ativado com cloreto de cálcio a 10% obteve maior significância.

4 - A aplicação do PRP deve seguir um protocolo extremamente rigoroso desde a fase laboratorial até sua utilização clínica.

5 - A dosagem, concentração e aplicação do PRP sobre crescimento celular “in vitro” não apresentam dados comparativos em literatura, incentivando investigações futuras.

6 - O estado da arte do PRP será idealizado quando a metodização laboratorial estabelecer parâmetros clínicos rígidos para a promoção e aceleração da reparação tecidual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D.
Molecular biology of the cell. New York: Plenum Press, 1989. p.123-156.
- ANITUA E. - Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.14, n.4, p.529-535, 1999.
- ARMELIN H.A. – Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell grown. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.70, p.2702-2706, 1973.
- ARMELIN H.A. – Hormones and regulation of cell division: mammalian cell cultures as an experimental approach. In: Biochemical Actions of Hormones, Ed. G. Litwack, vol. III: p.1-21 Academic Press Inc. New York.
- BECKER W., LYNCH S.E., LECKHOLM U., BECKER B.E., CAFFESSE R., DONATH K. and SANCHEZ R. - 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.*, v.63, n.11, p.929-940, 1992.
- BOYNE P., MARX R.E., NEVINS M., TRIPLETT G., LAZARO E., LILLY L.C., ALDER M., NUMMIKOSKI P. - A feasibility study evaluating rh BMP-2 / Absorbable collagen Sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, v.17, n.1 p.11-25, 1997.
- BONEWALD L. F., MUNDY G. R. - Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin. Orthop.*, n.250, p.261-276, 1990
- BUSER D., RUSKIN J., HIGGINBOTTOM F, HARDWICK R, DAHLIN C, SCHENK R. – Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.10, n.6, p.666-681, 1995.
- CANALIS E. - Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J. Clin. Invest.*, v.66, p.709-719, 1980.
- CHAI Y., BRINGAS P. JR, MOGHAREI A., SHULER C. F., SLAVKIN H.C. - PDGF-A and PDGFR- α regulate tooth formation via autocrine mechanism during mandibular morphogenesis in vitro. *Dev. Dyn.*, v.213, p.500-511, 1998.
- CHO M.I., LIN W.L., GENCO R.J. - Platelet-derived growth factor – modulated guided tissue regenerative therapy. *J. Periodontol.*, v.66, n.6, p.522-530, 1995.
- EAGLE H. – Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. v.122, p.43-46, 1965.

- GAMAL A.Y., MAILHOT J.M., GARNICK J.J., NEWHOUSE R. and SHARAWY M.M. - Human periodontal ligament fibroblast response to PDGF–BB and IGF–1 application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J. Clin. Periodontol.*, v.25, p.404-412, 1998.
- GANIO C., TENEWITZ F.E., WILSON R.C., MOYLES B.G. - The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet-derived growth factors. *J. Foot Ankle Surg.*, v.32, n.3, p.263-267, 1993.
- GARG, A.K. - Grafting materials in repair and restoration. *Tissue Engineering*. Illinois: Quintessence Books, 1999, p.83-101.
- GIANNOBILE W.V., RYAN S., SHIH M.S., SU D.L., KAPLAN P.L. and CHAN T.C.K. – Recombinant human osteogenic protein–1 (OP 1) stimulates periodontal wound healing in Class III furcation defects. *J. Periodontol.*, v.69, p.129-137, 1998.
- GREENE L.A., SCHOOTER E.M. – The nerve growth factor: biochemistry, síntesis and mechanism of action. *Ann. Rev. Neurosci.* v.3, p.353-402, 1980.
- GIANNOBILE W.V., FINKELMAN R.D., LYNCH S.E. – Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J. Periodontol.*, v.65, n.12, p.1158-1168, 1994.
- GIANNOBILE W. - Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. *Tissue Engineering*. Illinois: Quintessence Books, 1999, p.231-243.
- GREEN R.J., USUI M.L., HART C.E., AMMONS W.F. and NARAYANAN A.S. - Immunolocalization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF – α and β receptors in human gingival wounds. *J. Periodontal Res.*, v.32, p.209-214, 1997.
- GOLDENBERG S. - Descomplicando a Fisiologia. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, p.61-65.
- HAASE H.R., CLARKSON R.W., WATERS M.J, BARTOLD P.M. – Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, v.174, p.353-361, 1998.
- HARALSON M.A. - Extracellular matriz and growth factors: An integrated interplay controlling tissue repair and progression to disease. *Lab. Invest.*, v.69, n.4, p.369-372, 1993.
- HOCK J.M., CENTRLLA M., CANALIS E. – Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matriz formation and cell replication. *Endocrinol.*, v.122, n.1, p.254-60, 1988. Apud TUNES U.R., RAPP G.E., Atualização em Periodontia e Implantodontia, São Paulo: Artes Médicas, 1999, p. 311-312.

- HOLLEY R.W., KIERNAN J.A. – Contact inhibition of cell division in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.60, p.300-304, 1968.
- HOLLINGER J.O., BUCK D.C., BURDER S.P. – Biology of bone healing: Its impact on clinical therapy. *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial surgery and periodontics*. Illinois: Quintessence Books, 1999, p.17-53.
- HOWELL T.H., FIORELLINI J.P., PAQUETTE D.W., OFFENBACHER S., GIANNOBILE W.V., LYNCH S.E. - A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor - BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J. Periodontol.*, v.68, n.12, p.1186-1193, 1997.
- HU J.C., ZHANG C., SLAVKIN H.C. - The role of platelet-derived growth factor in the development of mouse molars. *Int. J. Dev. Biol.*, v.39, p.939-945, 1995.
- JENSEN O.T. - *The Sinus Bone Graft*, Colorado: Quintessence Books, 1999, p.183-189.
- JIANG D, DZIAK R., LYNCH S.E., STEPHAN E.B. – Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors. *J. Periodontol.*, v.70, n.8, p.834-839, 1999.
- KNIGHTON D.R., CIRESI K., FIEGEL V.D., SCHUNOTH S., BUTLER E., CERRA F. - Stimulation of repair in chronic non healing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg. Gynecol. Obstet.*, v.170, p.56-60, 1990.
- KNIGHTON D.R., OREDSON S., BANDA M. - Regulation repair hypoxic control of macrophage mediated angiogenesis. Apud HUNT T.K., HAPPENSTALL R.B., PENNES E. Soft and hard tissue repair. New York: *Paper Press*, 1984, p.41-49.
- LIND M. - Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomyelitis and implants fixation. *Acta Orthop. Scand.*, v.69(283), p.2-37, 1998.
- LIND M., OVERGARD S., SOBALLE K., NGUYEN T., ONGPEPATTANAKUL B., BUNGER C. – Transforming growth factor - β 1 enhances bone healing to unloaded tricalcium phosphate coated implants: An experimental study in dogs. *J. Bone Joint Surg.*, v.14, p.343-350, 1996.
- LYNCH S.E. - Introduction. *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Illinois: Quintessence Books, cap 1, p.1-23, 1999.
- LYNCH S.E., BUSER D., HERNANDEZ R.A., WEBER H.P., STICH H., FOX C.H., WILLIAMS R.C. - Effects of the platelet-derived growth factor / Insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a Pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.*, v.62, n. 11, p.710-716, 1991 a.

- LYNCH S.E., DE CASTILLA E.R., WILLIAMS R.C. – The effects of short-term application of a combination platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J. Periodontol.*, v.62, p.458-467, 1991 b.
- LYNCH S.E., WILLIAMS R.C., POLSON A.M., HOWELL T.H., REDDY M.S., ZAPPA U.E., ANTONIADES H.N. – A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, v.16, p.545-548, 1989.
- MARX R.E. - Platelet-rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Illinois: Quintessence Books, 1999, p.71-82.
- MARX R.E., CARLSON E.R., EICHSTAEDT R.M., SCHIMMELE S.R., STRAUSS J.E., GEOGERFF K. - Platelet-rich plasma : growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.85, n.6, p.638-646, 1998.
- MARX R.E., GARG A.K. - Bone Graft physiology with use of platelet – rich plasma and hiperbaric oxygen. *The Sinus Bone Graft*. Colorado: Quintessence Books, 1999, p.183-189.
- MARX R.E., GARG A.K. - A estrutura óssea, o metabolismo e a fisiologia: Seu impacto na implantodontia dentária. *Implant Dent.*, v.7, n.5, p.267-276, 1998.
- MATSUDA N., LIN W.L., KUMAR N.M., CHO M.I., GENCO R.J. – Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J. Periodontol.*, v. 63, n.6, p.515-525,1992.
- MATSUDA N., TAKEMURA A., TANIGUCHI S., AMANO A., SHIZUKUISHI S. – Porphyromonas gingivalis reduces mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to platelet-derived growth factor in vitro. *J. Periodontol.*, v.67, n.12, p.1335-1341, 1996.
- MCCARTHY T.L., CENTRELLA M., CANALIS E. - Parathyroid hormone enhances the transcript and polypeptide levels of insulin-like growth factor I in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinol.*, v.124, n.3, p.1247-1253, 1989
- MERAW S.J., REEVE C.M. LOHSE C.M., SIOUSSAT T.M. – Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J. Periodontol.*, v.71, n.1, p.8-13, 2000.
- MOCHIZUKI H., HAKEDA Y, WAKATSUKI N - Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinol.*, v.131, n.3, p.1075-1080, 1992. Apud Position Paper – The potencial role of growth and differentiation factors in Periodontal regeneration. *J. Periodontol.*, v.67, p.545-553, 1996.

- MOHAN S., BAYLINK D.J. - Bone growth factors. *Clin. Orthop.*, n.263, p.30-48, 1991.
- NELL A., RIEGLER B., ULM C., MATEJKA M., SINZINGER H. – Stimulation der Plattchenmitogen-induzierten prostaglandin I₂ synthese in periodontalen Gewebe von cyclosporin. A behandelten Patienten. *Wien. Klin. Wochenschr.*, v.107, n.9, p.278-282, 1995.
- OLIVEIRA H.P.- Hematologia Clínica. 3. ed., Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1985, p.467-485.
- ORLY J., SATO G. – Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell*. v.17, p.295-305, 1979
- PANAGAKOS F.S. – Insulin-like growth factors-I and -II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. *Biochimic*, v.75, p.991-994, 1993.
- PARK J.B., MATSUURA M., HAN K.Y., NORDERYD O., LIN W.L.,GENCO R.J., CHO M.I. – Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J. Periodontol.*, v.66, n.6, p.462-477, 1995.
- PAUL, J. - Behaviour of cells in culture. In: PAUL, J. Cell and tissue culture. Great Britain: Churchill Livingstone, 1975. p.20-30.
- PFEILSCHIFTER J., OECHSNER M., NAUMANN A., GRONWALD R.G.K., MINNE H.W., ZIEGLER R - Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: A comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor β . *Endocrinol.*, v.127, n.1, p.69-75, 1990.
- PIERCE et all, 1995 apud OLIVEIRA M.D.B. - Tratamento radicular com PDGF-BB uma análise comparativa com o tratamento mecânico e condicionamento ácido em fragmentos dentários implantados no subcutâneo de ratos. (Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru), 1998.
- RAVEL R. - Laboratório Clínico: Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.109-129.
- RIPAMONTI U., REDDI A.H. - – Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J. Periodontal Res.*, v.29, p.225-235, 1994.
- ROSEN V., THIES R.S. – The BMP proteins in bone formation and repair. *Tig March* v.8, n.3, 1992.
- ROSS R., GLOMSET J., KARIYA B., RAINES E. – Role of platelet factors in the growth of cells in culture. *Natl. Cancer Inst. Nonogr.* v.48, p.103-108, 1978.

- RUDKIN G.H., MILLER T.A. - Growth factors in surgery. *Growth Factors*, v.97, n.2, p.183-189, 1996.
- RUTHERFORD R.B., NIEKRASH C.E., KENNEDY J.E., CHARETTE M.F. – Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J. Periodontal Res.*, v. 27, p.285-290, 1992.
- RUTHERFORD R.B., RYAN M.E., KENNEDY J.E., TUCKER M.M., CHARETTE M.F.– Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J. Clin. Periodontol.*, v.20, n.7, p.537-544, 1993.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. Statistical Methods. Iowa State: University Press. 1967
- SOORY M., VIRDI H. - Implications of minocycline, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta on inflammatory repair potential in the periodontium. *J. Periodontol.*, v.70, n.10, p.1136-1143, 1999.
- SPORN, M.B., ROBERTS A.B. - Transforming growth factor β : Recent progress and new challenges. *J. Cell. Biol.*, v.119, n.5, p.1017-1021, 1992.
- STRAYHORN C.L., GARRET J.S., DUNN R.L., BENEDICT J.J., SOMERNAN M.J. – Growth factors regulate expression of osteoblast associated genes. *J. Periodontol.*, v. 70, p.1345-1354, 1999.
- SUMNER D.R., TURNER T.M., PURCHIO A.F., GOMBOTZ W.R., WASHINGTON R.M., GALANTE J.O. - Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor - β . *J. Bone Joint Surg.*, v.77-A, n.8, p.1135-1147, 1995
- TAYAPONGSAK P., O'BRIEN D.A., MONTEIRO C.B., ARCEO-DIAZ L.Y. - Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.52, p.161-165, 1994.
- TIPTON D.A., DABBOUS M.K. - Autocrine transforming growth factor β stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J. Periodontol.*, v.69, p.609-619, 1998.
- WANG H.L., PAPPERT T.D., CASTELLI W.A., CHIEGO D.J. JR, SHYR Y., SMITH B.A. – The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: An autoradiographic study on dogs. *J. Periodontol.*, v.65, n.5, p.429-436, 1994.
- WHITMAN D.H., BERRY R.L., GREEN D.M. – Platelet Gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.55, p.1294-1299, 1997.