

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS: UMA ANÁLISE QUANTITATIVA E
QUALITATIVA DE DOIS PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO**

ADRIANA PARISOTTO MACEDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS: UMA ANÁLISE QUANTITATIVA E
QUALITATIVA DE DOIS PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Odontologia – área
de concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof^o. Dr. José Nazareno Gil.

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2004.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por iluminar esta caminhada e tantas outras percorridas;
- A meu marido Sandré pelo seu companheirismo, cumplicidade e amor;
- A minha pequena Isadora que compartilhou deste momento de uma maneira única e incondicional;
- Aos meus pais pelo voto de confiança em meus atos que possibilitaram mais este momento de conquista;
- Aos meus irmãos pelo afeto e orgulho demonstrado que tanto contribuíram na minha formação;
- A minha sobrinha Luana, cujo entusiasmo com a Odontologia me envaidece;
- Ao meu orientador Professor José Nazareno Gil, o qual dedico o mais profundo respeito e admiração por ser sempre o mentor e encorajador de muitas etapas profissionais obtidas;
- Ao Professor Antônio Carlos Cardoso pelos constantes questionamentos;
- Ao Professor Ricardo Magini pelo entusiasmo diante de novos conhecimentos;
- Ao Professor Alberto Fedeli Jr. pela amizade e companheirismo;
- A todos os professores que auxiliaram no meu crescimento pessoal e profissional; em especial aos professores Ana Paula Borba e Celso Espada pelo incondicional apoio a esta pesquisa tornando possível alcançar os objetivos propostos;
- A minha amiga Dircilene pela disponibilidade; amizade e constante apoio.

RESUMO

A reparação óssea é freqüentemente necessária para possibilitar a colocação de implantes em uma posição ideal de estética e função. As técnicas cirúrgicas de reconstrução têm como objetivo uma melhora na qualidade e quantidade óssea para que o rebordo retorne as funções de suporte, tal como antes da perda do dente natural. Recentes relatos da literatura apontam o plasma rico em plaquetas e sua viabilidade biológica para uma atuação perfeita sobre o reparo. Neste trabalho, vinte e cinco pacientes foram selecionados, e o sangue coletado foi submetido a dois protocolos de obtenção do plasma rico em plaquetas (uma e duas centrifugações). Este plasma foi avaliado de forma quantitativa (contagem plaquetária manual, através de Câmara de Neubauer) e qualitativa (função plaquetária de agregação, através da utilização do agregômetro). Os resultados obtidos demonstraram que o processo duplo de centrifugação determina uma maior concentração de plaquetas no plasma, mas ocorre uma diminuição na função de agregação plaquetária. Novas pesquisas serão necessárias para melhor avaliação da degranulação plaquetária e a conseqüente ação dos seus respectivos fatores de crescimento.

Palavras-chave: plasma rico em plaquetas, gel de plaquetas, concentrado de plaquetas, enxertos ósseos, reparo ósseo.

ABSTRACT

The bone regeneration is frequently necessary to facilitate the placement of implants in an ideal position of aesthetics and function. The surgical techniques of reconstruction have as objective an improvement in the quality and bone amount so that the edge comes back to its support functions, just as before the loss of the natural tooth. Recent reports of the literature aim the platelet-rich plasma and its biological viability for a perfect performance on the repair. In this work, twenty-five patients were selected, and the collected blood was submitted to two protocols of obtaining of the platelet-rich plasma (one and two centrifugalizations). This plasma was evaluated in a quantitative way (manual platelets count, through Camera of Newbauer) and qualitative (platelet function aggregation, through the use of the aggregometer). The obtained results demonstrated that the double process of centrifugalization determines a larger platelets concentration in the plasma, but it occur a decrease in the platelet aggregation function. New researches will be necessary for better evaluation of the one of platelet granulation and the consequent action of its respective growth factors.

Word-keys: platelet-rich plasma, platelet gel, platelet concentrated, bone grafts, bone repair.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. PLAQUETAS	14
2.2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS	23
2.3. OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	26
2.4. CONTAGEM PLAQUETÁRIA	30
2.5. AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	31
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. MATERIAIS	37
4.1.1. Equipamentos:	37
4.1.2. Materiais de consumo:.....	38
5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÕES	57
9. REFERÊNCIAS.....	58
10. APÊNDICE.....	62

LISTA DE GRÁFICO

GRÁFICO 1 - AÇÃO DE FATORES EXÓGENOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.	33
GRÁFICO 2 - VARIAÇÃO PERCENTUAL DO GRUPO I COM SANGUE PERIFÉRICO, BASEADO NA CONTAGEM DO NÚMERO DE PLAQUETAS.	44
GRÁFICO 3 - VARIAÇÃO PERCENTUAL DO GRUPO II COM SANGUE PERIFÉRICO, BASEADO NA CONTAGEM DO NÚMERO DE PLAQUETAS.	45
GRÁFICO 4 - VARIAÇÃO PERCENTUAL DO GRUPO I (UMA CENTRIFUGAÇÃO) VERSUS GRUPO II (DUAS CENTRIFUGAÇÕES), BASEADO NA CONTAGEM DO NÚMERO DE PLAQUETAS.	47
GRÁFICO 5 - VARIAÇÃO PERCENTUAL DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA ENTRE OS GRUPOS I-A E I-B.	48
GRÁFICO 6 - VARIAÇÃO PERCENTUAL DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA ENTRE OS GRUPOS II-A E II-B.	49
GRÁFICO 7- VARIAÇÃO PERCENTUAL DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA ENTRE OS GRUPOS I E II.	50

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DO GRUPO I COM SANGUE PERIFÉRICO, BASEADO NA CONTAGEM DO NÚMERO DE PLAQUETAS.	43
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DO GRUPO II COM SANGUE PERIFÉRICO, BASEADO NA CONTAGEM DO NÚMERO DE PLAQUETAS.	45
TABELA 4 - COMPARAÇÃO DO GRUPO I (UMA CENTRIFUGAÇÃO) VERSUS GRUPO II (DUAS CENTRIFUGAÇÕES), BASEADO NA CONTAGEM DO NÚMERO DE PLAQUETAS.....	46
TABELA 5 - PERCENTUAL DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NOS GRUPOS I-A (0,3 UM DE ADP) E I-B (6,3 UM DE ADP) E VARIAÇÃO PERCENTUAL ENTRE OS GRUPOS.....	48
TABELA 6 - PERCENTUAL DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NOS GRUPOS II-A (0,3 UM DE ADP) E II-B (6,3 UM DE ADP) E VARIAÇÃO PERCENTUAL ENTRE OS GRUPOS.	49
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DE CONTAGEM E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NOS GRUPOS IB (6,3 UM DE ADP) E II B(6,3 UM DE ADP)	50

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 - O PROCESSO DE CENTRIFUGAÇÃO DETERMINA A SEPARAÇÃO DOS ELEMENTOS DO SANGUE DE ACORDO COM O SEU GRADIENTE DE DENSIDADE.....	14
FIGURA 2 - ULTRA-ESTRUTURA PLAQUETÁRIA.....	18
FIGURA 3 - A EXPOSIÇÃO DAS PLAQUETAS RESULTA EM ATIVAÇÃO E DEGRANULAÇÃO. .	20
FIGURA 4 - A ADIÇÃO DO AGONISTA PLAQUETÁRIO DETERMINA A AGREGAÇÃO QUE PODE SER MEDIDA NO AGREGÔMETRO ATRAVÉS DA PASSAGEM DE LUZ. DE ACORDO COM A ILUSTRAÇÃO GRÁFICA QUANTO MAIOR A AGREGAÇÃO, MAIOR A PASSAGEM DE LUZ.....	31
FIGURA 5 - DISPOSITIVO DE CONTAGEM MANUAL.....	37
FIGURA 6 - CÂMARA DE NEWBAUER.....	37
FIGURA 7 – AGREGÔMETRO.....	38
FIGURA 8 - PIPETAS EPPENDORF (PARA SEPARAÇÃO DO PLASMA).....	38
FIGURA 9 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA.	42

1. INTRODUÇÃO

A expectativa da ciência é a previsibilidade, principalmente quando se trata de procedimentos regenerativos. As técnicas reconstrutoras buscam solucionar ou muitas vezes minimizar as seqüelas estéticas e funcionais determinadas pelas perdas ósseas e dentárias, visando menor morbidade e um material com propriedades ideais para substituição do osso humano.

Com a evolução da Implantodontia, várias técnicas têm sido desenvolvidas para alcançar condições ideais de posicionamento e estética, e assegurar a osseointegração dos implantes. Portanto, a presença de um volume ósseo suficiente é um pré-requisito fundamental no planejamento com implantes osseointegrados.

A literatura tem salientado as propriedades regenerativas do plasma rico em plaquetas (PRP), que pode ser considerado um agente catalisador no processo de reparo. O processamento do plasma rico em plaquetas envolve o seqüestro e concentração de plaquetas com seus fatores de crescimento, que são considerados os iniciadores universais de quase todo o processo de cicatrização. O plasma rico em plaquetas trata-se de um princípio terapêutico inovador que, através de uma fonte autógena de fatores de crescimento, acelera as já existentes etapas do reparo da ferida cirúrgica.

O Plasma Rico em Plaquetas, uma modificação da cola de fibrina, obtido do sangue autógeno e contendo seus fatores de crescimento tem sido amplamente utilizado nos procedimentos de reconstrução para Implantodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial. Estes fatores de crescimento, como citado anteriormente, formam um grupo de polipeptídeos que têm uma ação importante nas diversas etapas do reparo tecidual atuando como agentes reguladores e estimuladores dos processos celulares de mitogênese, quimiotaxia, diferenciação e metabolismo. As ações destes fatores são bastante complexas porque podem determinar diferentes efeitos sobre um mesmo tecido. Por exemplo, o fator de crescimento de transformação β (TGF β) estimula o crescimento in vitro de certos fibroblastos quando na presença de Fator de crescimento derivado de plaquetas(PDGF) mas inibe este crescimento se houver Fator de crescimento epidérmico (EGF). Portanto, o plasma rico em plaquetas tem sua utilização embasada cientificamente, pois possibilita a modulação dos processos regenerativos, determinando uma osteogênese mais rápida e de melhor qualidade.

O plasma rico em plaquetas é uma preparação obtida através de sequestração e concentração de plaquetas por centrifugação de gradiente de densidade. Esta separação celular

(centrifugação) visa obter um plasma com a maior concentração de plaquetas quando comparada com a contagem basal do sangue periférico. Existem vários protocolos de obtenção sugeridos na literatura para encontrar a concentração plaquetária ideal e maior liberação dos fatores de crescimento, que são os responsáveis imediatos pelo processo cicatricial. Portanto, o estabelecimento de um protocolo baseado em uma análise quantitativa e qualitativa das plaquetas torna-se indispensável para alcançar o sucesso clínico deste procedimento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor entendimento da evolução e estágio atual do plasma rico em plaquetas, a revisão estará subdividida nos seguintes tópicos:

- 2.1. Plaquetas
- 2.2. Plasma rico em plaquetas
- 2.3. Obtenção do plasma rico em plaquetas
- 2.4. Contagem plaquetária
- 2.5. Agregação plaquetária

2.1. Plaquetas

O sangue é um tecido conjuntivo que circula pelo sistema cardiovascular e desempenha importantes funções que mantêm a integridade funcional do organismo, entre as quais podemos citar:

- transporte de nutrientes e oxigênio para as células;
- remoção do dióxido de carbono e resíduos metabólicos;
- combate à infecção através dos elementos celulares e humorais;
- termorregulador.

O tecido hematológico é formado pelo conjunto de sangue periférico e medula óssea. O sangue periférico é constituído por elementos figurados e plasma. Os eritrócitos, leucócitos e plaquetas correspondem aos elementos celulares, enquanto que o plasma corresponde ao líquido intercelular que confere ao sangue suas propriedades líquidas. O volume relativo de células e plasma é de aproximadamente 45% e 55% respectivamente. Este valor é obtido por centrifugação, medindo-se o volume celular e plasmático em 100ml de sangue total (figura 1). Na parte superior da camada celular promovida pela centrifugação existe outra camada mais delgada chamada de creme ou papa leucocitária (*buffy coat*), sendo constituída por leucócitos e plaquetas (JUNQUEIRA , CARNEIRO, 1999).

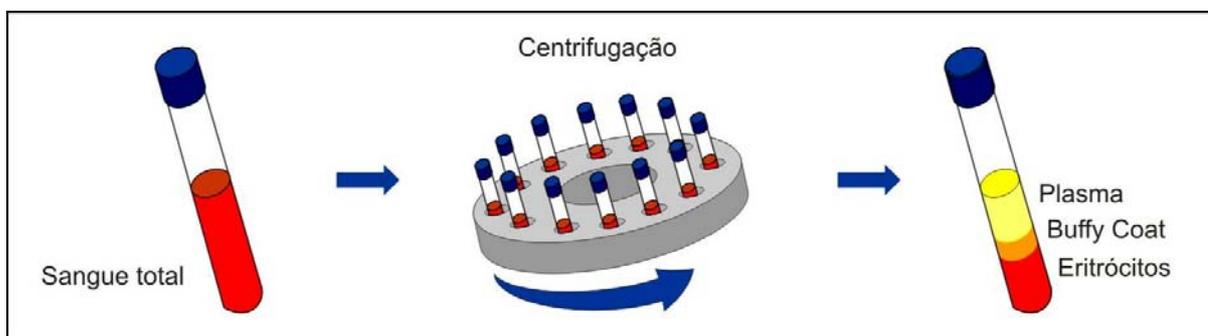


Figura 1 - O processo de centrifugação determina a separação dos elementos do sangue de acordo com o seu gradiente de densidade.

Os eritrócitos, leucócitos e plaquetas têm sua origem, após nascimento, na medula óssea, mas na fase adulta, apenas os ossos esponjosos compreendem o órgão hematopoético. A celularidade da medula óssea diminui com a idade, em torno dos 65 anos diminui 30% e progressivamente até 50% devido ao aumento de gordura (VERRASTRO, LORENZI e WENDEL NETO, 1996).

O plasma é principalmente constituído por água que serve de solvente para proteínas, gases (oxigênio, dióxido de carbono, nitrogênio), eletrólitos, nutrientes (glicose, lipídios, aminoácidos) materiais residuais e substâncias reguladoras (hormônios, enzimas). As proteínas são as maiores substâncias dissolvidas e estão subdivididas em: fibrinogênio, globulinas e albuminas. O fibrinogênio é produzido no fígado e atua no processo de coagulação sanguínea. As albuminas também produzidas no fígado são as menores proteínas e responsáveis pela pressão osmótica exercida sobre a parede vascular. As globulinas correspondem às imunoglobulinas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

As plaquetas podem ser concentradas e capturadas por protocolos de centrifugação, assim obtemos o denominado Plasma Rico em Plaquetas (PRP), que tem sido amplamente utilizado na Odontologia. Vários autores têm salientado as propriedades regenerativas do plasma rico em plaquetas (PRP), que pode ser considerado um agente catalisador no processo de reparo. Desta forma, torna-se interessante conhecer alguns detalhes da estrutura e função plaquetária.

A descoberta das plaquetas como uma classe de corpúsculos do sangue foi descrita por Bizzozzero (1882). Em 1888, Eberh e Schimmelbusch descreveram sobre a importância das plaquetas no processo de início da hemostasia e formação do coágulo. Além disso, Aschoff (1925) relatou sobre a interação das plaquetas com todos os elementos do sangue.

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos, anucleados, derivados de células da medula óssea denominadas de megacariócitos. Na formação das plaquetas, minúsculas porções do citoplasma separam-se das regiões periféricas dos megacariócitos através de grandes canais de demarcação plaquetária. A membrana que reveste estes canais surge por invaginação da membrana celular e apresentam continuidade com o espaço extracelular. O contínuo desenvolvimento e a fusão das membranas de demarcação plaquetária produz a separação completa dos fragmentos citoplasmáticos para formar as plaquetas. Um megacariócito pode originar duas a três mil plaquetas. Ao final o megacariócito se encontrará desnudo à espera da apoptose pelas células reticulo-endoteliais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

As plaquetas são os menores componentes corpusculares do sangue humano (diâmetro 2 a 4 μm) e seu número fisiológico no organismo varia de 150.000 a 300.000/ mm^3 de sangue. Elas abrigam um citoplasma com uma complexa rede de organelas e substâncias que possibilitam a execução de inúmeras funções. Além disso, possui uma membrana de superfície trilamelar, sendo duas camadas de proteínas e uma camada de lipídios. Esta membrana tem uma invaginação citoplasmática formando um sistema canalicular aberto que propicia uma ampla superfície que contém a maior parte da atividade do fator plaquetário 3 e possui receptores que reagem com a trombina (RAPAPORT, 1978; HOFFBRAND e PETTIT, 2001). Os receptores da membrana servem para ativação e interação interplaquetária. Entre os receptores podemos citar:

- GPIb/IX - adesão das plaquetas ao colágeno e camada subendotelial.
- COL- receptor para o fator de vonWillebrand.
- GPIa - interage na adesão quando na ligação ao COL.
- GPIIb/IIIa - serve como local de ligação de moléculas adesivas como, por exemplo, o fibrinogênio.

Esta ultra-estrutura plaquetária exhibe um sistema microtubular submembranoso que mantém a morfologia da plaqueta e forma um cito-esqueleto que estabiliza a célula, permitindo circular como um disco achatado (Figura 2). Os microfilamentos distribuídos ao longo do citoplasma (incluindo proteínas musculares) estão envolvidos nas alterações de contração e secreção das plaquetas, bem como na retração do coágulo. Uma das maiores proteínas plaquetárias é a actina. Muitas respostas plaquetárias requerem força gerada pela contratibilidade destas proteínas. Estas respostas incluem secreção, mudança de forma, agregação e retração do coágulo. As plaquetas também possuem inúmeras organelas, incluindo alfa grânulos, que contém uma variedade de proteínas (RAPAPORT, 1978; HOFFBRAND e PETTIT, 2001; WHITE e JENNINGS, 1996):

- corpos densos, que contém cálcio, adenina nucleotídeos e serotonina;
- lisossomos(hidrolases);
- peroxissomos(catalases);
- Mitocôndrias e um sistema tubular denso (cálcio, prostaglandinas e tromboxano).

Acredita-se que o sistema tubular denso atua também como bomba sequestradora de cálcio, fornecendo baixos níveis de cálcio citoplasmático nas plaquetas em repouso. O cálcio estabiliza a coagulação e tem grande importância no metabolismo das plaquetas, tais como: facilitar a ligação com o fibrinogênio (fase da agregação), estimular a formação de

pseudópodos (retração plaquetária) e centralizar os grânulos plaquetários, facilitando a fixação dos pseudópodos e agregação.

As plaquetas exibem ainda grânulos densos e alfa. O grânulo alfa contém coagulantes e proteínas adesivas tais como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, fator V e também são responsáveis pela produção e liberação de fatores de crescimento como o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Dependendo da força do estímulo, o conteúdo dos grânulos alfa, dos grânulos de núcleo denso ou mesmo dos grânulos lisossomiais podem ser liberados. Durante o processo de ativação, ocorrem alterações no complexo de glicoproteínas IIb/IIIa, resultando na formação de receptores capazes de ligar diversas proteínas plasmáticas, mais notavelmente o fibrinogênio na presença de cálcio, as plaquetas apresentam um espessamento em direção umas as outras, resultando na agregação plaquetária.

Portanto a ultra-estrutura plaquetária pode distinguir três zonas importantes (VERRASTRO & LORENZI & WENDEL NETO, 1996):

- **Zona periférica:** região que recebe e transmite os estímulos para as funções de aderência e agregação. A membrana da plaqueta é trilamelar, formada por proteínas (laterais) e lipídios (central). Abaixo da membrana, se localiza uma camada (submembrana) com microtúbulos e ou filamentos que constituem o esqueleto plaquetário. Estes microfilamentos são responsáveis pela forma discóide da plaqueta e pela formação dos pseudópodos.

- **Zona Gel:** também denominada de hialoplasma e contém material amorfo, fibroso e em vários estados de polimerização. Contém o sistema contrátil, responsável pela mudança da forma, extrusão dos pseudópodos e secreção da plaqueta.

- **Zona das organelas:** representada pelos grânulos, corpos densos, mitocôndrias, sistema tubular denso e partículas de glicogênio dispersos no citoplasma. As mitocôndrias apresentam estrutura simples e são responsáveis em grande parte pelo metabolismo energético das plaquetas durante sua ativação.

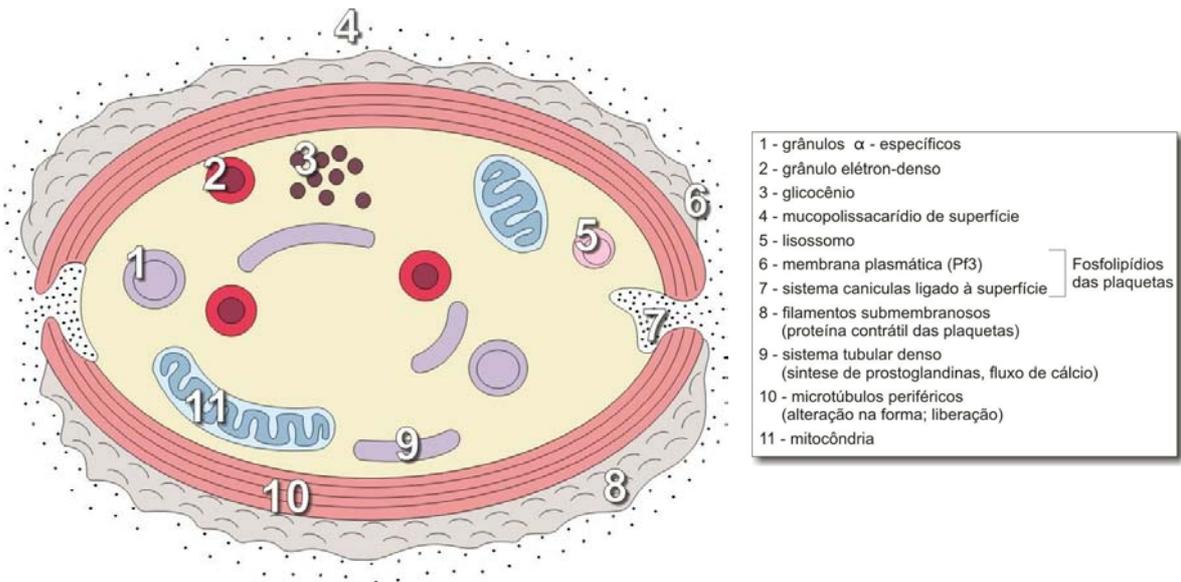


Figura 2 - Ultra-estrutura plaquetária.

Fonte: HOFFBRAND & PETTIT, 2001.

A plaqueta permanece no interior do sistema vascular e não é encontrada nos fluidos extracelulares. Oitenta por cento das plaquetas estão sempre circulando e 20% estão concentradas no baço. Elas se movem livremente entre estes dois compartimentos. Se o baço aumenta de modo expressivo, a distribuição das plaquetas sofre um desvio e até 80% delas podem estar concentradas no baço. Por razões desconhecidas, a medula óssea não aumenta a produção o suficiente para compensar este desvio, resultando em uma moderada trombocitopenia (RAPAPORT, 1978).

A medula óssea não contém uma reserva de plaquetas. Se por qualquer razão, a maior parte das plaquetas circulantes é destruída ou perdida (por exemplo, depois de hemorragia maciça cuja reposição foi feita com sangue armazenado, que não contém plaquetas viáveis), a trombocitopenia resultante persiste por alguns dias antes que sejam produzidas plaquetas suficientes para corrigi-las (VERRASTRO, LORENZI e WENDEL NETO, 1996).

As plaquetas morrem de senescência e apresentam um *turnover* fisiológico de aproximadamente dez dias, sendo retiradas da circulação pelo sistema fagocitário (mononuclear) principalmente do baço (RAPAPORT, 1978).

As plaquetas são elementos importantes na hemostasia, principalmente na fase inicial, graças às funções de aderência do colágeno e agregação entre si para formar o tampão hemostático no local da lesão vascular.

As plaquetas participam ativamente no processo de reparo das feridas, sendo as primeiras células presentes no local do trauma (ANDREASEN e ANDREASEN, 2001). Além

do papel hemostático, as plaquetas exercem um efeito sobre a iniciação de toda resposta vascular e atração, ativação dos neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e das células endoteliais.

Os eventos que ocorrem no reparo podem ser classicamente divididos em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação.

A capacidade das plaquetas em aderir às superfícies teciduais expostas, bem como entre si, é fundamental para a função hemostática nos eventos cicatriciais. A adesão e ativação das plaquetas ocorrem quando elas entram em contato com o colágeno e as microfibrilas da matriz subendotelial liberando localmente fatores, tais como a trombina, ADP, fibrinogênio, fibronectina, tromboplastina e fator VIII Von Willebrand. Além da agregação e ativação plaquetária, a cascata da coagulação é iniciada. O desafio da coagulação é a conversão do fibrinogênio em fibrina, que criará uma rede para captura de frações do plasma e elementos formados. Este coágulo de fibrina é formado intra e extravascular dando suporte ao tampão plaquetário inicial. A ativação da cascata da coagulação ocorre pela exposição do endotélio vascular e presença de fatores teciduais. A trombina é gerada, a qual ativa as plaquetas e catalisa a geração e formação de fibrina a partir do fibrinogênio. A formação de fibrina é considerada a chave para estabilização do trombo plaquetário e sua resistência de permanência.

O caminho da coagulação extrínseca é iniciado pela tromboplastina tecidual e fator VII, ao passo que a coagulação intrínseca depende da exposição das plaquetas ao colágeno endotelial e ativação dos fatores XII, precalicreína e cinogênio. Portanto as plaquetas iniciam o processo hemostático, passando de um estado inerte para originar um processo de várias etapas, tais como (ANDREASEN e ANDREASEN, 2001; ANITUA, 2000; FITZGERALD, 2001):

- **Adesão:** as plaquetas se aderem especificamente ao endotélio que se torna exposto após ruptura do vaso e interage com o fator de Von Willebrand e com as fibras colágenas do interior da parede do vaso sanguíneo.

- **Ativação:** as plaquetas passam de forma discóide para esférica emitindo pseudópodos que permitem contato interplaquetário. Após a ativação ocorre uma alteração nas glicoproteínas da membrana plaquetária que favorecem a tendência de união entre as plaquetas.

- **Agregação:** após formação do trombo plaquetário, as plaquetas unidas dependem da ativação de receptores que aderem ao fibrinogênio e iniciam a degranulação (Figura 3).

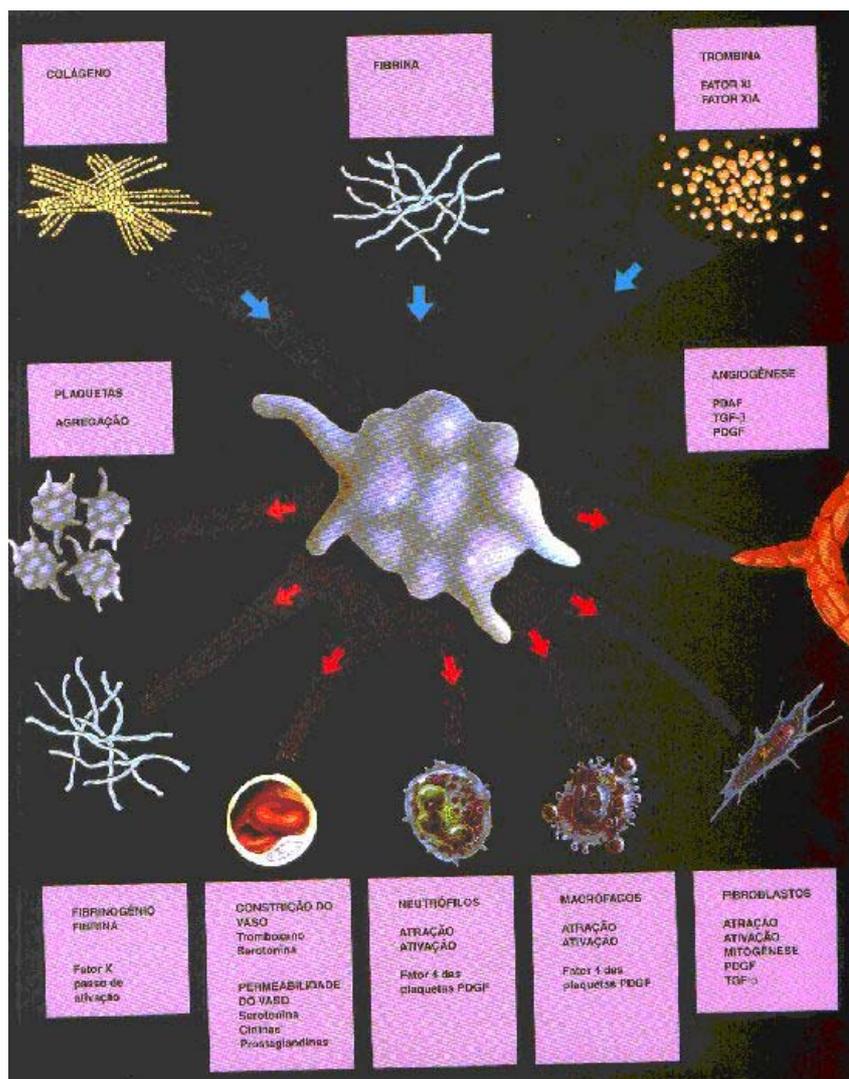


Figura 3 - A exposição das plaquetas resulta em ativação e degranulação.

Fonte: ANDREASEN e ANDREASEN, 2001.

A ação combinada de substâncias liberadas pelas plaquetas, da coagulação sanguínea e da degradação tecidual resulta em hemostasia, início da resposta vascular e liberação de sinais para a migração, proliferação e ativação celular. Estes eventos são em grande parte controlados e dirigidos pelos fatores de crescimento específicos e quimiotáticos, levando à proliferação e migração de células ativas no processo de cicatrização. Estes mediadores são produzidos por diferentes tipos celulares e são coletivamente classificados como citocinas, visto que modulam as respostas inflamatória e imunológica.

Entre os fatores de crescimento liberados pela degranulação plaquetária e existentes no plasma rico em plaquetas podemos citar (ANDREASEN e ANDREASEN, 2001; ANITUA, 2000; MARX, 1999):

- Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

- Fator de crescimento de transformação β (TGF β).
- Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF).
- Fator de crescimento epidérmico (EGF).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) está envolvido em quase todo o reparo pelo duplo papel de reservatório de fator de crescimento e fator de hemostasia, sendo liberado de plaquetas ativadas pela trombina ou colágeno. Possui um efeito mediador regulando a migração, proliferação e síntese de matriz de uma variedade de células. Trata-se de uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 30kd. Embora seja o principal fator de crescimento nas plaquetas, também é sintetizado e secretado por macrófagos e células endoteliais. Existem aproximadamente 1200 moléculas de PDGF por cada plaqueta, evidenciando o grande potencial para um melhor reparo e regeneração óssea quando a quantidade de plaquetas é aumentada pelo plasma rico em plaquetas. O PDGF é o primeiro fator de crescimento na ferida e guia a revascularização, síntese de colágeno e regeneração óssea, atuando nos mecanismos de mitose, angiogênese e ativação de macrófagos para debridamento e fonte para outros fatores de crescimento atuarem (ANDREASEN e ANDREASEN, 2001; MARX, 1999).

O fator de crescimento de transformação β (TGF β) pode ser sintetizado pelas plaquetas, macrófagos, osteoblastos, fibroblastos e alguns outros tipos celulares. Este fator é subdividido em TGF β 1 e TGF β 2 e estão relacionados com o reparo do tecido conjuntivo e regeneração óssea. As funções mais importantes do TGF são a quimiotaxia e mitogênese dos osteoblastos, estimulando a deposição de colágeno para formação óssea. Além disso, inibe a formação de osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea (ANDREASEN e ANDREASEN, 2001; MARX, 1999).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) é encontrado nas formas de IGF1 e IGF2. São fatores secretados pelos osteoblastos e sua presença nas plaquetas age como precursoras de osteoblastos. São proteínas relativamente pequenas, com massas moleculares de aproximadamente 7,5 kd (MARX, 1999).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é produzido pelas plaquetas, glândulas salivares e duodenais, além de também ser encontrado na urina. Este fator tem um efeito proliferativo celular nos fibroblastos periosteais e células endoteliais (ANDREASEN e ANDREASEN, 2001).

Com este sucinto reconhecimento da estrutura e das funções plaquetárias, bem como seu envolvimento no processo de reparo das feridas, pretendemos reforçar o intuito deste

trabalho em demonstrar a viabilidade plaquetária tanto em termos quantitativos como qualitativos quando no preparo e obtenção do plasma rico em plaquetas.

2.2. Plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas apresenta na sua constituição básica três componentes: plasma, leucócitos e plaquetas. O plasma é formado pelo soro sanguíneo mais os diversos fatores de coagulação. Os leucócitos são as células que conferem a resistência natural ao plasma rico em plaquetas. As plaquetas representam o componente mais importante devido à liberação dos fatores de crescimento (MARX, 1999; WHITMAN, BERRY e GREEN, 1997). Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e regeneração. Estas moléculas são consideradas as iniciadoras universais de quase todos os processos de reparo (MARX, 1999). Os fatores de crescimento, embora liberados conjuntamente pelos grânulos alfa plaquetários, apresentam épocas definidas de atuação. Inicialmente o PDGF atua na angiogênese e na diferenciação celular inicial. O TGF-B aprimora a diferenciação celular e conjuntamente estimula a maturação celular. O IGF-I termina a maturação e programa a consolidação da cicatrização através de estímulo de outras células (MARX, 1998).

O processamento do plasma rico em plaquetas (PRP) permite a concentração de grande número de plaquetas com seus fatores de crescimento, em mínimo volume de plasma. As plaquetometrias realizadas no PRP comparadas com contagens feitas no sangue periférico de quarenta e quatro pacientes apontaram concentrações de valores de aproximadamente três vezes superiores. Quando estas plaquetas foram contabilizadas em esfregaços de sangue, o PRP demonstrou aumento de 900% sobre o número inicial de contagem basal de plaquetas (MARX, 1999).

Um outro aspecto altamente favorável do PRP, diz respeito ao fato de ser uma preparação autógena que é realizada antes do procedimento cirúrgico e, portanto reduz o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas quando comparada com outros produtos (WHITMAN, BERRY e GREEN, 1997).

Os resultados da associação do PRP com enxertos ósseos têm demonstrado uma consolidação mais rápida e uma mineralização do enxerto em 50% do tempo requerido, além de um aumento de 15 a 30% na densidade do osso trabecular (MARX, 1999).

MARX (1999), relatou a eficiência dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas que ocorrem desde o início da cirurgia. Portanto o efeito destes fatores incide no nível de neoformação óssea desde o primeiro estágio determinando aceleração no reparo e produzindo um tecido ósseo de maior densidade.

ANITUA (1999) através de um estudo clínico em vinte pacientes submetidos à extração dentária prévia a colocação de implantes, verificou que nos alvéolos tratados com PRP e enxerto apresentaram maior espessura óssea vestibulo-lingual e melhor epitelização que o grupo controle sem PRP, em um período de 16 semanas. Além disso, o autor relatou o uso de PRP em outros 250 pacientes com evidência de sucesso clínico.

MARX e GARG (1999) sugerem o uso do PRP nos casos que apresentam menores chances de sucesso nos enxertos ósseos e osseointegração, como, por exemplo, o edentulismo total (maxila severamente reabsorvidas), pacientes com osteoporose e casos de doença dentária com subsequente alteração nos tecidos adjacentes.

CARLSON (2000) enfatiza as perspectivas da utilização do PRP com enxertos autógenos como um grande avanço do século XXI, vislumbrando um futuro da eliminação de áreas doadoras de enxertia utilizando-se das proteínas osseomorfogênicas.

Um estudo retrospectivo das publicações sobre PRP na Odontologia foi desenvolvido por CARLSON e ROACH (2002) sendo constatado que o uso do PRP foi benéfico para o reparo tecidual envolvido.

Da mesma forma PACIFICI, CASELLA e MAGGIORE (2002) revisaram técnicas de obtenção do PRP e sugeriram um novo protocolo, concluindo que o PRP é uma fonte autógena atóxica, não imunogênica de fatores de crescimento, e capaz de acelerar o processo normal do reparo ósseo.

GIL et al (2002) relatam os efeitos benéficos de reconstrução em fendas alveolares com enxerto ósseo autógeno associado ao PRP. Os autores enfatizam as vantagens de cicatrização mais rápida da mucosa e do enxerto, além de possibilitar o uso de área doadora com menor volume de enxerto que pode ser compensado com a adição do PRP.

Estudos experimentais em animais (ZECHNER, 2003), com análises histológicas e histomorfométricas concluíram que a aplicação do PRP acelera a atividade de regeneração óssea em sítios de implantes durante fases precoces do reparo.

SANCHEZ , SHERIDAN e KUPP (2003) também consideram uma evidência científica o uso do PRP em combinação com enxertos ósseos nas cirurgias reconstrutivas, constatando a opinião unânime de aceleração e melhora da qualidade do osso regenerado.

A associação do PRP com produtos xenógenos comprovou ser eficaz em aplicação clínica em 21 pacientes com defeitos periodontais (LEKOVIC, 2002), também confirmado por estudos clínicos anteriores (KASSOLIS , ROSEN e REYNOLDS, 2000) .

Além deste, outro estudo clínico em levantamento do seio maxilar com implante imediato em maxilas severamente reabsorvidas, utilizando-se de produtos xenógenos e PRP, também obtiveram um sucesso de 92,9% no reparo (RODRIGUEZ, 2003).

WOJTOWICK et al (2003) observando os efeitos da associação do PRP com material xenógeno sugerem que mecanismos genéticos influenciam a organização do padrão trabecular do tecido ósseo regenerado, provavelmente sob a influência de fatores de crescimento contidos no PRP.

SHANAMAN, FILSTEIN e DANESH-MEYER (2001), questionam a possibilidade de osteoindução do PRP e afirmam através de estudo clínico que a associação do PRP com enxertos xenógenos não influenciou na quantidade e qualidade do osso neoformado quando comparado com técnicas de regeneração tecidual guiada.

Outros autores (VENTURELLI, 1999; DANESH-MEYER, FILSTEIN e SHANAMAN, 2001; FROUM et al, 2002; PHILIPPART, 20003; WILTFANG, 2003; WOJTOWICZ, 2003 , também sugerem que a associação do PRP com materiais aloplásticos não seja tão eficaz quando comparados aos enxertos autógenos.

OKLUND (1986) também comprovou em estudos experimentais que o reparo ósseo é mais lento em enxertos xenógenos. Além disso, MARX (1998) observou a formação óssea completa em fendas alveolares em um período de seis meses quando utilizou como material de enxerto o osso xenógeno Nos casos em que utilizou material aloplástico ocorreu uma formação óssea de apenas de 30% no mesmo período.

2.3. Obtenção do plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas é obtido a partir da coleta de sangue, por meio de um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial.

O volume sanguíneo necessário depende do protocolo utilizado. Na literatura, podemos encontrar protocolos que utilizam 450 a 500ml de sangue na preparação do plasma rico em plaquetas. Estes protocolos são realizados em bancos de sangue ou ambientes cirúrgicos hospitalares, utilizando-se de bolsas coletoras e centrífugas de maior porte e complexidade. Estas bolsas coletoras apresentam três compartimentos, que são preenchidos de acordo com as etapas realizadas (WHITMAM, BERRY e GREEN, 1997; MARX, 1998; ROSENBERG e TOROSIAN, 2000).

Quando a preparação do plasma rico em plaquetas é realizada em ambiente ambulatorial, pode-se utilizar um volume sanguíneo que varia de 10 a 80ml. O material é coletado em tubos de ensaio e são centrifugados em dispositivos menos sofisticados e de fácil manuseio. Vários autores têm sugerido a simplificação de obtenção do plasma rico em plaquetas (ANITUA, 1999; SONNLEITNER, HUEMER e SULLIVAN, 2000; LANDSBERG, ROY e GLICKMAN, 2000).

A seqüência do processo de obtenção está basicamente dividida em três etapas:

1ª Etapa: Punção venosa e coleta do sangue.

2ª Etapa: Separação celular (centrifugação).

3ª Etapa: Preparo do plasma.

1ª Etapa: Punção venosa e coleta do sangue.

- Locais de acesso:

A localização adequada e verificação da condição do acesso venoso são um fator decisivo para o êxito do procedimento e evitar desconforto desnecessário ao paciente. A seleção do acesso deve sempre dar preferência para veias localizadas em membros superiores. As veias de extremidades inferiores devem ser evitadas pelo risco de flebite em veias varicosas e possibilidade de embolia pulmonar. Em pacientes idosos convém salientar a fragilidade nos tecidos de sustentação que pode determinar o extravasamento sanguíneo com conseqüente formação de hematomas, principalmente na região do dorso da mão (ANITUA, 2000).

A palpação da veia é o método de eleição para localização e diferenciação de uma pulsação arterial, tornando também possível a verificação da condição do acesso venoso.

Os acessos venosos devem ser selecionados, dando-se preferência aos vasos de maior calibre e facilidade de acesso, sendo estes na seguinte ordem:

- veias superficiais de grande calibre da fossa antecubital, como por exemplo às veias medianas, basilica e cefálica;
- veias do dorso da mão e antebraço.

O material de coleta deve ser preparado e colocado próximo ao paciente, na seqüência do procedimento. É de fundamental importância tranquilizar o paciente, pois a ansiedade e o temor podem desencadear um reflexo vagal com conseqüente síncope e ativação do sistema nervoso simpático produzindo vasoconstrição. Este colapso periférico é totalmente indesejável tornando-se um fator complicador para a punção venosa (ANITUA, 2000).

É importante que durante a punção venosa ocorra mínimo traumatismo nos tecidos e que seja evitada a contaminação do sangue com tromboplastina tissular que pode ativar a coagulação.

A escolha do protocolo ditará a preferência para o acesso venoso e também o volume sanguíneo necessário para obtenção do plasma rico em plaquetas.

Outro fator fundamental está relacionado com o anticoagulante, sendo normalmente sugerido o citrato de sódio. O citrato de sódio capta os íons de cálcio do sangue e os neutraliza formando um composto denominado quelato que impede a formação do coágulo. Além disso, o citrato de sódio não altera os receptores de membrana das plaquetas e conseqüentemente o processo de quelação pode ser revertido através da adição do cloreto de cálcio para formação do gel de plaquetas (ANITUA, 2000).

Uma consideração importantíssima é a utilização imediata do plasma, quando este é obtido ambulatorialmente. Para fins de ativação dos fatores de crescimento, o ideal é que a utilização do plasma seja o mais rápido possível (SCARSO FILHO, 2000).

2ª Etapa: Separação celular (centrifugação).

A centrífuga é um dispositivo giratório que tem o objetivo de acelerar o processo de decantação de fluidos ou sólidos dentro de outro fluido. O aparelho funciona executando um movimento circular que exerce uma aceleração controlada sobre o objeto. Essa aceleração denomina-se aceleração centrípeta. A aceleração centrípeta recebe esta denominação, pois aponta sempre para o centro do sistema. O valor da aceleração varia de acordo com o raio da centrífuga e a velocidade do movimento. Como o raio da centrífuga é fixo, muda-se o valor da aceleração alterando-se a velocidade do movimento, que por sua vez é medida em metros por segundo (velocidade escalar ou tangencial) ou radianos por segundo (velocidade angular). A

velocidade do movimento determina a frequência (numero de voltas por unidade de tempo) que é medida em Hertz (rotações por segundo), ou RPM (rotações por minuto).

A unidade de medida da aceleração é metros por segundo ao quadrado, mas pode-se usar como referência a aceleração da gravidade da Terra, que equivale aproximadamente a 9.8 metros por segundo ao quadrado. Em um movimento circular, por exemplo, onde se tem uma aceleração centrípeta de 19.6 metros por segundo ao quadrado, pode se dizer que equivale a duas gravidades ou 2 “G”.

A frequência da centrifugação é determinada de acordo com o raio da centrífuga e utilizando aceleração de 160 a 250G, baseado nas indicações da literatura. Para calcular a frequência utilizar-se-á da seguinte fórmula matemática:

$$Ac = \frac{(2\pi RF)^2}{R} \quad Ac = \text{aceleração centrípeta} \quad \pi = 3,1415$$

R = raio da centrífuga

$$Ac * R = (2\pi RF)^2 \quad F = \text{frequência}$$

$$\frac{\sqrt{Ac * R}}{2\pi R} = F$$

Após o cálculo da frequência para cada tipo de centrífuga e aceleração desejada, o tempo de centrifugação é determinado por contagem plaquetária ideal.

Outro método de calcular a frequência do movimento é através da utilização de tabelas, onde o raio, força G determinam o valor ideal de rotação (LEMOS e ROSSI JÚNIOR, 2003).

A força centrífuga empregada na preparação do plasma rico em plaquetas é muito crítica, portanto as centrífugas devem ser calibradas cuidadosamente observando todas as variáveis que podem afetar sua calibração.

O número de centrifugações (uma ou duas) dependerá do protocolo a ser utilizado. Alguns autores sugerem protocolo com apenas uma centrifugação (ANITUA, 1999; VENTURELLI, 1999; BEZERRA e LENHARO, 2002), enquanto outras referências indicam protocolo de dupla centrifugação (MARX, 1998; ROSENBERG e TOROSIAN, 2000; SONNLEITNER, HUEMER e SULLIVAN, 2000; LANDSBERG , ROY e GLICKMAN, 2000; GIL et al, 2002).

3ª Etapa: Preparo do plasma.

Após a separação celular é então realizada a preparação do plasma que basicamente descarta a porção vermelha do sangue e utiliza o plasma rico em plaquetas.

Em bancos de sangue a coleta é realizada em bolsas que apresentam três compartimentos. O primeiro compartimento é preenchido pelo sangue total retirado do paciente, sendo que o segundo e o terceiro são preenchidos após dois processos de centrifugação. Na primeira centrifugação ocorre a separação do plasma pobre em plaquetas, dos eritrócitos e da crosta do coágulo (plaquetas e leucócitos). Com o segundo processo de centrifugação podemos obter o plasma rico em plaquetas (SCARSO FILHO, 2000).

Em processo ambulatorial o volume sanguíneo coletado em tubos de ensaio é submetido ao processo de separação celular e obtemos duas camadas celulares:

- Camada superior: plasma rico em plaquetas (coloração amarelada).
- Camada inferior: eritrócitos (coloração vermelha).

Em seguida procede-se a pipetagem do plasma rico em plaquetas e descarta-se a porção inferior que contém as hemácias. Quando se utiliza o protocolo de centrifugação dupla, o plasma rico em plaquetas pipetado volta à centrífuga e teremos uma nova separação celular: o plasma pobre em plaquetas e o concentrado de plaquetas. O concentrado de plaquetas está localizado na porção inferior do tubo e corresponde a aproximadamente 20% do volume, sendo que 80% do sobrenadante é considerado plasma pobre em plaquetas.

2.4. Contagem plaquetária

A contagem plaquetária é consideravelmente mais difícil do que a contagem de leucócitos ou eritrócitos. Esta dificuldade é esperada em vista do pequeno tamanho dessas células, de sua aderência a superfícies estranhas e do fato de agregar-se quando ativadas.

Em geral, as técnicas modernas de contagem plaquetária podem ser divididas em três grupos (BITHELL, 1998):

- **Métodos diretos ou hemocítômetros:** pode ser utilizado microscópio de contraste de fase e diluição em oxalato de amônio, o que facilita a contagem manual e diferenciação das plaquetas.
- **Métodos semiautomatizados:** as plaquetas são contadas por um contador eletrônico de partículas.
- **Métodos totalmente automatizados:** vários aparelhos estão atualmente disponíveis comercialmente (exemplo *Hemalog Technicon*), onde as plaquetas são contadas em contador óptico de partículas o qual emprega o princípio da microscopia de campo escuro invertido. A precisão da contagem plaquetária desse instrumento é igual ou mesmo maior do que aquela obtida através de métodos semiautomatizados.

Através da contagem plaquetária é possível avaliar a eficiência do protocolo de obtenção do plasma rico em plaqueta, que de acordo com a literatura (MARX, 1999) deve ser de três a cinco vezes maior que a contagem inicial.

De acordo com GASPERINI (2003), através de estudo experimental em trinta pacientes determina uma maior contagem plaquetária com centrifugação dupla, obtendo um concentrado de plaquetas aproximadamente cinco vezes maior quando comparado com a contagem inicial do sangue periférico.

2.5. Agregação plaquetária

A agregação plaquetária tem sido o método de escolha para a avaliação da função plaquetária desde 1970. A agregação plaquetária pode ser estimada qualitativamente por técnicas tanto microscópicas como macroscópicas e é geralmente avaliada em suspensões de plasma rico em plaquetas enriquecidas com citrato. Esta função plaquetária é mais comumente avaliada com um equipamento denominado agregômetro, o qual permite a medição de alterações na densidade ótica de uma suspensão plaquetária sob condições de temperatura constante e agitação contínua. A maioria dos instrumentos mede uma combinação de dispersão e absorção de luz, ou seja, simplesmente mede o aumento na transmissão de luz através de uma suspensão de plaquetas após adição de agonistas plaquetários exógenos (FITZGERALD, 2001; BITHELL, 1998), de acordo com a figura 4. São vistas alterações na forma de discóide para esferóide, como uma diminuição na transmitância da luz, enquanto a formação subsequente dos grumos de plaquetas permite que mais luz passe através da suspensão para o fotodetector e é registrada como um aumento na transmitância da luz.

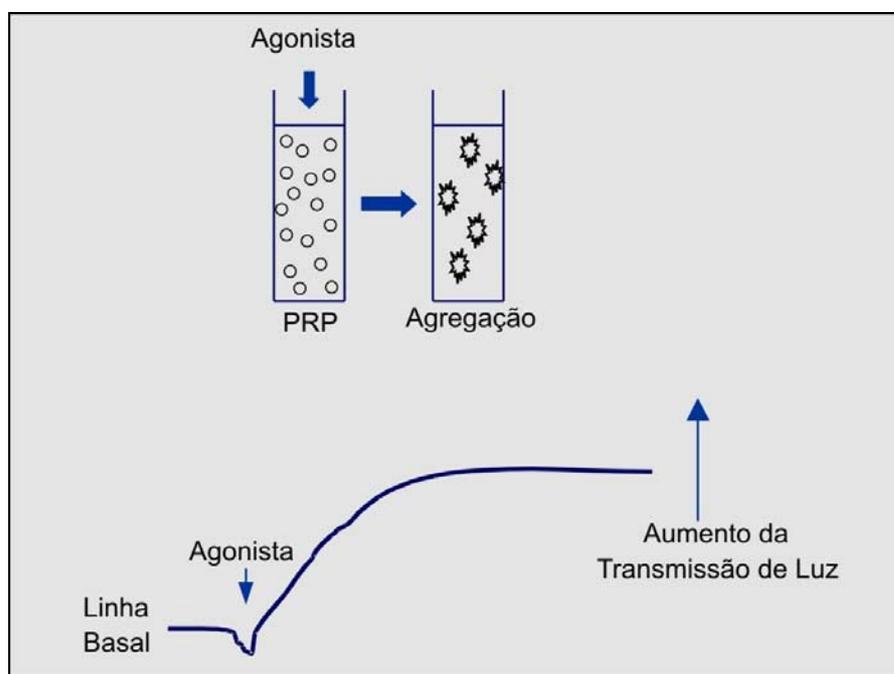


Figura 4 - A adição do agonista plaquetário determina a agregação que pode ser medida no agregômetro através da passagem de luz. De acordo com a ilustração gráfica quanto maior a agregação, maior a passagem de luz.

Fonte: WHITE e JENNINGS, 1996.

A mobilização do ácido araquidônico dos fosfolípidios da membrana e seu metabolismo através da via ciclo-oxigenase serve para formar o mais potente pro-agregante: tromboxane A₂. A resposta de agregação plaquetária requer a síntese de tromboxane A₂, a qual requer a enzima ciclo-oxigenase. Os produtos de degradação de fibrina podem inibir a agregação plaquetária pelo bloqueio dos receptores de fibrinogênio.

A inibição das funções plaquetárias pode ocorrer em consequência de distúrbios sistêmicos da coagulação ou através de terapêutica medicamentosa de outras patologias. As plaquetas são os componentes principais de trombos arteriais, uma inibição farmacológica efetiva da agregação plaquetária é o objetivo primário da terapia antitrombótica. Nos últimos anos, várias tentativas têm sido desenvolvidas para obtenção de antagonistas do receptor GPIIb-IIIa que poderia ser utilizado no tratamento de síndromes agudas coronárias. Estes antagonistas teriam uma maior efetividade que a inibição determinada por medicamentos à base de ácido acetil salicílico .

Os medicamentos a base de ácido acetilsalisílico e antiinflamatórios não esteroidais (AINES) inibem o caminho da ciclo-oxigenase. Enquanto os derivados do ácido acetilsalisílico inibem a função plaquetária por todo o período de vida plaquetário, os AINES são inibidores reversíveis e a resposta plaquetária retorna cerca de três dias após a suspensão da medicação. Os efeitos destes medicamentos atuam em uma fase primária da agregação plaquetária onde os fatores exógenos podem interferir. A agregação secundária é sempre iniciada por processo endógeno de liberação de cálcio intracelular, ADP e outros fatores que determinam a agregação final (gráfico 1). A prescrição de vários outros medicamentos podem interferir na função plaquetária. Os antibióticos que apresentam o anel β lactâmico, tais como as penicilinas e as cefalosporinas podem afetar a agregação plaquetária. O mecanismo de ação ocorre por um alteração na membrana da plaqueta com consequente bloqueio da interação receptor-agonista ou através de efeito inibitório sobre o influxo de cálcio.

Os anestésicos também têm demonstrado efeito sobre a resposta de agregação das plaquetas. Os anestésicos como a lidocaína têm um efeito direto sobre a membrana plaquetária. De acordo com relatos na literatura, os pacientes submetidos à anestesia geral não somente tem um tempo de sangramento aumentado, mas também apresentam uma redução na resposta de agregação plaquetária (WHITE e JENNINGS, 1996).

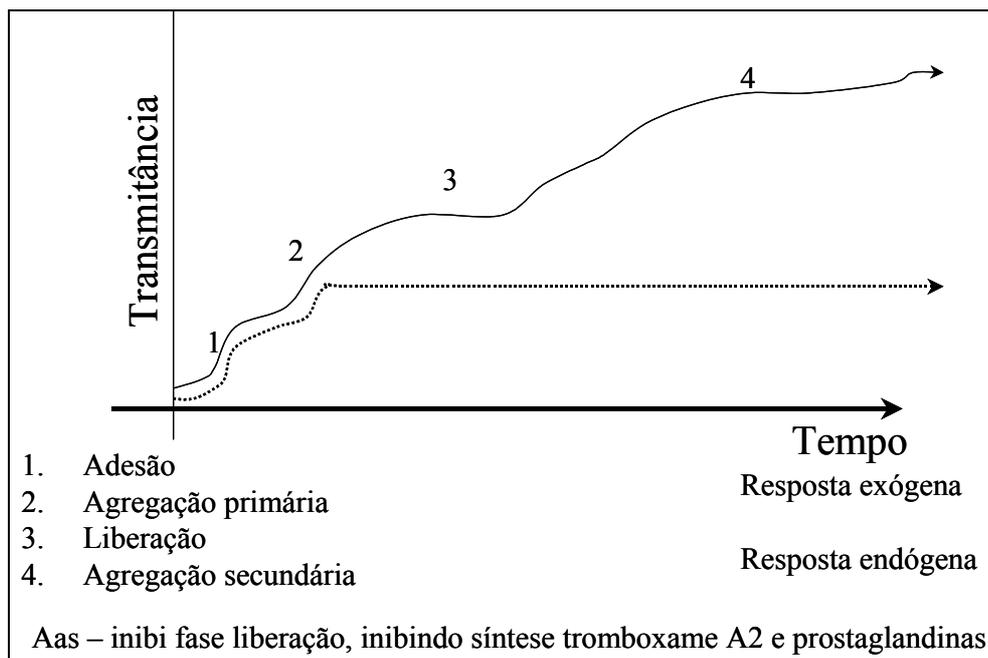


Gráfico 1 - Ação de fatores exógenos sobre a agregação plaquetária.

Na avaliação laboratorial da agregação plaquetária, bem como em outros procedimentos de laboratório, é essencial o controle de variáveis que poderão afetar os resultados. Segundo WHITE e JENNINGS (1996), entre estas variáveis podemos citar:

a) Anticoagulantes:

- **Citratos:** ambos 0,1 e 0,129 mol/L de citrato de sódio no padrão de 9 partes de sangue e 1 parte de anticoagulante são tradicionalmente utilizados para testes de agregação plaquetária.

- **Heparina:** também pode ser utilizada, mas em muitos pacientes a contagem de plaquetas do PRP será significativamente menor quando comparada ao citrato. Além disso, uma pequena porcentagem da população apresenta agregação espontânea na presença da heparina. A heparina não é um anticoagulante de escolha para o teste de agregação.

- **Ácido etilodiaminotetraacético dipotássico ou dissódico (EDTA):** não é indicado para testes de agregação devido não determinar níveis de cálcio suficientes para que a agregação possa ocorrer.

b) PH:

Os testes de agregação devem ser realizados em pH de 7,2-7,4. Em pH muito baixo, as respostas das plaquetas são diminuídas até o ponto de total inibição de agregação em pH de 6,5. Ao contrário, em pH de 8,1 ou mais alto, pode determinar agregação espontânea.

c) Temperatura:

A agregação plaquetária deve ocorrer em 37° C para mimetizar a situação *in vivo*. Alguns estudos têm demonstrado que a exposição das plaquetas a baixas temperaturas pode determinar agregação espontânea durante os testes. Portanto a armazenagem incorreta das plaquetas pode levar a erros nos valores das respostas de agregação.

d) Tubos de ensaio:

As preparações de plaquetas deveriam sempre ser realizadas em tubos plásticos ou em tubos de vidro com interior siliconizado. Os tubos somente com vidro podem determinar ativação plaquetária.

e) Contagem de plaquetas:

O PRP (plasma rico em plaquetas) deve ser ajustado para uma contagem constante de plaquetas utilizando para diluição o PPP (plasma pobre em plaquetas) ou solução salina. Geralmente, os estudos de agregação plaquetária utilizam um padrão de 250 a 300.000 plaquetas/mm³ em solução de PRP.

f) Eritrócitos:

A presença de células vermelhas no PRP pode determinar uma baixa porcentagem de agregação por inibir a habilidade do agregômetro na medição.

g) Agonistas plaquetários:

Todos os agonistas plaquetários têm um efeito final similar que é indução a agregação. Estes agonistas determinam um aumento do cálcio intracelular e ativação da proteína quinase C, ou seja, ocorre uma ativação na superfície do receptor GPIIb/IIIa. Todos estes mecanismos levam a uma mudança de forma e expressam uma alta afinidade da plaqueta ao fibrinogênio (FITZGERALD, 2001).

Entre os agonistas plaquetários que determinam agregação, podemos citar (WHITE e JENNINGS, 1996):

- **Adenosina Difosfato (ADP):**

A adição de ADP nas plaquetas causa mudança na forma, exposição do fibrinogênio e agregação plaquetária. O ADP induz um aumento do nível de cálcio livre citoplasmático através de liberação de cálcio intracelular bem como por influxo. O ADP inibe o estímulo sobre a enzima adenilciclase e também causa reorganização do cito-esqueleto das plaquetas. Tem sido sugerido que o ADP pode ativar as plaquetas através de uma proteína G identificada como G₁₂. Também existem evidências que sugerem dois receptores de ADP nas plaquetas: um responsável pela agregação que está associado à proteína G e outro responsável pelo influxo de cálcio e mudança de forma na plaqueta.

- **Epinefrina:**

A Epinefrina é único entre os agonistas plaquetários porque determina agregação plaquetária e degranulação, mas não determina mudança na forma da plaqueta. As respostas das plaquetas a epinefrina são altamente variáveis.

- **Colágeno:**

O colágeno é uma proteína insolúvel que induz ativação, adesão, degranulação e agregação plaquetária. A agregação das plaquetas induzida por baixas doses de colágeno é altamente dependente da reação de degranulação e é muito sensível a inibição por aspirina.

- **Trombina:**

A trombina é considerada o mais potente agonista plaquetário. A trombina ativa agregação plaquetária em concentrações muito mais baixas que as necessárias para produzir o efeito de coagulação. O receptor da trombina é uma proteína integral de 425 aminoácidos que expande a membrana em sete vezes. Existe uma grande região extracelular amino-terminal que submete a trombina à clivagem.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar a quantidade e agregação plaquetária através de dois diferentes protocolos ambulatoriais de obtenção do plasma rico em plaquetas.

3.2. Objetivos específicos

- Aplicar dois métodos de centrifugação para obter o plasma rico em plaquetas.
- Comparar a quantidade de plaquetas obtidas pelos dois protocolos testados.
- Analisar a agregação plaquetária dos dois protocolos testados através do agregômetro.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia desta pesquisa foi aprovada pelo CEPESH (Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos) com o projeto nº 177/03.

4.1. Materiais

4.1.1. Equipamentos:

- Centrífuga Fanem Baby I.
- Dispositivo de contagem plaquetária manual (Câmara de Newbauer).

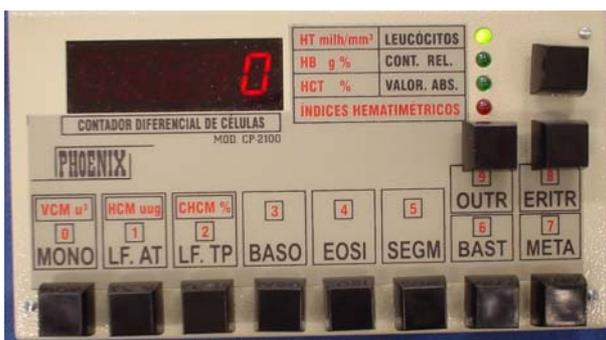


Figura 5 - Dispositivo de contagem manual.



Figura 6 - Câmara de Newbauer.



Figura 7 – Agregômetro.



Figura 8 - Pipetas Eppendorf (para separação do plasma).

4.1.2. Materiais de consumo:

- Álcool 70;
- Rolo de algodão;
- Garrotes de borracha;
- Scalp *vacuntainer*;
- Tubos de ensaio *vacuntainer* estéreis (vidro interior siliconizado) de 05 ml, contendo como anticoagulante citrato de sódio (0,5ml);
- tubos de ensaio estéreis *vacuntainer* de 05 ml, contendo como anticoagulante EDTA;
- Tubos de ensaio plásticos de 15ml;
- Etiquetas;

- Ponteiras descartáveis para pipeta;
- ADP.

Esta amostra selecionou de forma aleatória vinte e cinco indivíduos, doadores voluntários (estudantes e funcionários) da UFSC. Os indivíduos selecionados foram submetidos a anamnese e apresentavam bom estado de saúde geral, além de não estar fazendo uso de nenhum tipo de medicamento.

Estes indivíduos foram orientados para coleta do sangue, de forma a não ingerir nenhum medicamento por dez dias antes da data prevista da coleta e manter jejum por quatro horas prévias a punção venosa.

De acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, os voluntários assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice 1) permitindo a coleta do volume sanguíneo, realização dos protocolos de centrifugação para análise das plaquetas e posterior inutilização deste material em locais adequados de coleta e destino final do lixo hospitalar da UFSC.

Os indivíduos foram divididos em grupamentos de cinco para realização de todo o processo, a fim de minimizar os desvios estatísticos (tabela 1). O tratamento estatístico utilizado foi o Teste T.

De cada voluntário foi coletado aproximadamente 35 ml de sangue total, para realização de contagem plaquetária e preparação do plasma rico em plaquetas. O sangue foi coletado em 6 tubos de vidro (interior siliconizado) com volume de 5 ml, sendo que 0,5 ml corresponde ao volume do anticoagulante: citrato de sódio. Para contagem de plaquetas no sangue total foi coletado um tubo adicional contendo EDTA como anticoagulante.

GRUPO 1	5 INDIVÍDUOS	7 TUBOS	1 TUBO EDTA 3 TUBOS CITRATO COM UMA CENTRIFUGAÇÃO (GRUPO I) 3 TUBOS CITRATO COM DUAS CENTRIFUGAÇÕES (GRUPO II)
GRUPO 2	5 INDIVÍDUOS	7 TUBOS	1 TUBO EDTA 3 TUBOS CITRATO COM UMA CENTRIFUGAÇÃO (GRUPO I) 3 TUBOS CITRATO COM DUAS CENTRIFUGAÇÕES (GRUPO II)
GRUPO 3	5 INDIVÍDUOS	7 TUBOS	1 TUBO EDTA 3 TUBOS CITRATO COM UMA CENTRIFUGAÇÃO (GRUPO I) 3 TUBOS CITRATO COM DUAS CENTRIFUGAÇÕES (GRUPO II)
GRUPO 4	5 INDIVÍDUOS	7 TUBOS	1 TUBO EDTA 3 TUBOS CITRATO COM UMA CENTRIFUGAÇÃO (GRUPO I) 3 TUBOS CITRATO COM DUAS CENTRIFUGAÇÕES (GRUPO II)
GRUPO 5	5 INDIVÍDUOS	7 TUBOS	1 TUBO EDTA 3 TUBOS CITRATO COM UMA CENTRIFUGAÇÃO (GRUPO I) 3 TUBOS CITRATO COM DUAS CENTRIFUGAÇÕES (GRUPO II)

Tabela 1 - Delineamento experimental.

O processo completo de preparação para cada grupo foi dividido nas seguintes etapas:

1. Identificação dos tubos com os nomes dos voluntários e grupos de pesquisa (GRUPO I e II).

2. Cada indivíduo foi submetido a uma coleta de aproximadamente 35 ml de sangue total em sete tubos de 05 ml. O acesso venoso preferencial foi à fossa antecubital com opção das veias mediana ou basílica. Como segunda opção, deixamos o acesso venoso do dorso da mão. Todas as punções venosas foram realizadas por um único operador e realizadas de maneira menos traumática possível para evitar a ativação precoce das plaquetas.

3. Um tubo contendo EDTA foi utilizado para contagem plaquetária do sangue total em dispositivo manual (Câmara de *Newbauer*).

4. Os 03 tubos de cada paciente contendo citrato, foram submetidos a uma centrifugação com uma frequência previamente calculada e estabelecida de 1200 rpm por dez minutos (Protocolo do Núcleo de Cirurgia e Traumatologia do Hospital Universitário da UFSC). O dispositivo utilizado foi à centrífuga Fanem baby I.

5. Após a primeira centrifugação que determina uma separação celular em duas camadas distintas, procedeu-se a pipetagem do plasma rico em plaquetas e permanecendo no tubo somente a camada das células vermelhas do sangue que foi desprezado em recipiente apropriado e recebendo destino final no lixo hospitalar da UFSC.

6. O conteúdo pipetado do plasma rico em plaquetas dos três tubos foi acondicionado em outro tubo de ensaio de plástico e seco (sem anticoagulante) e receberam a identificação do grupo de experimento (GRUPO I).

7. Foi realizada a remoção de uma alíquota de 10 microlitros do plasma obtido no GRUPO I e realização de contagem de plaquetas em dispositivo manual (Câmara de *Newbauer*).

8. Foi realizada a remoção de uma alíquota de 200microlitros do plasma do GRUPO I, em seguida procedeu-se à diluição com solução salina até a concentração de aproximadamente 250.000 plaquetas e dividiu-se em duas alíquotas acrescentando 0,3 e 6,3 microlitros de ADP (GRUPO I-A e I-B). As amostras foram então submetidas à prova de agregação plaquetária no agregômetro.

9. Os outros três tubos restantes (contendo citrato) de cada indivíduo foram identificados (GRUPO II) e submetidos a uma centrifugação estabelecida de 1200 rpm por dez minutos (Protocolo do Núcleo de Cirurgia e Traumatologia do Hospital Universitário da UFSC). O dispositivo utilizado foi a centrífuga Fanem baby I.

10. O conteúdo pipetado do plasma rico em plaquetas dos três tubos foi acondicionado em outro tubo de ensaio de plástico e seco (sem anticoagulante) e submetido a um segundo processo de centrifugação em uma frequência de 1200 rpm por dez minutos (Protocolo do Núcleo de Cirurgia e Traumatologia do Hospital Universitário da UFSC).

11. O conteúdo de PPP (plasma pobre em plaquetas) resultante do processo da segunda centrifugação foi pipetado em aproximadamente 80% do seu volume, permanecendo no tubo o concentrado de plaquetas e uma pequena alíquota de PPP (20%) que foi utilizado para realizar a resuspensão destas plaquetas e então permitir a contagem.

12. Foi realizada a remoção de uma alíquota de 10 microlitros do plasma obtido no GRUPO II e determinado à contagem plaquetária em dispositivo manual (Câmara de Newbauer).

13. Foi realizada a remoção de uma alíquota de 200 microlitros do plasma do GRUPO II, em seguida procedeu-se à diluição com solução salina até a concentração de aproximadamente 250.000 plaquetas e dividiu-se em duas alíquotas acrescentando 0,3 e 6,3 microlitros de ADP (GRUPO II-A e II-B). As amostras foram então submetidas à prova de agregação plaquetária no agregômetro.

Os grupos analisados e divididos foram comparados da seguinte forma:

- Contagem plaquetária do GRUPO I (plasma obtido com uma única centrifugação) versus contagem plaquetária do sangue basal.
- Contagem plaquetária do GRUPO II (plasma obtido com duas centrifugações) versus contagem plaquetária do sangue basal.
- Contagem plaquetária do GRUPO I (plasma obtido com uma única centrifugação) versus contagem plaquetária do GRUPO II (plasma obtido com duas centrifugações).
- Avaliação da agregação plaquetária do GRUPO I-A versus GRUPO I-B.
- Avaliação da agregação plaquetária do GRUPO II-A versus GRUPO II-B.

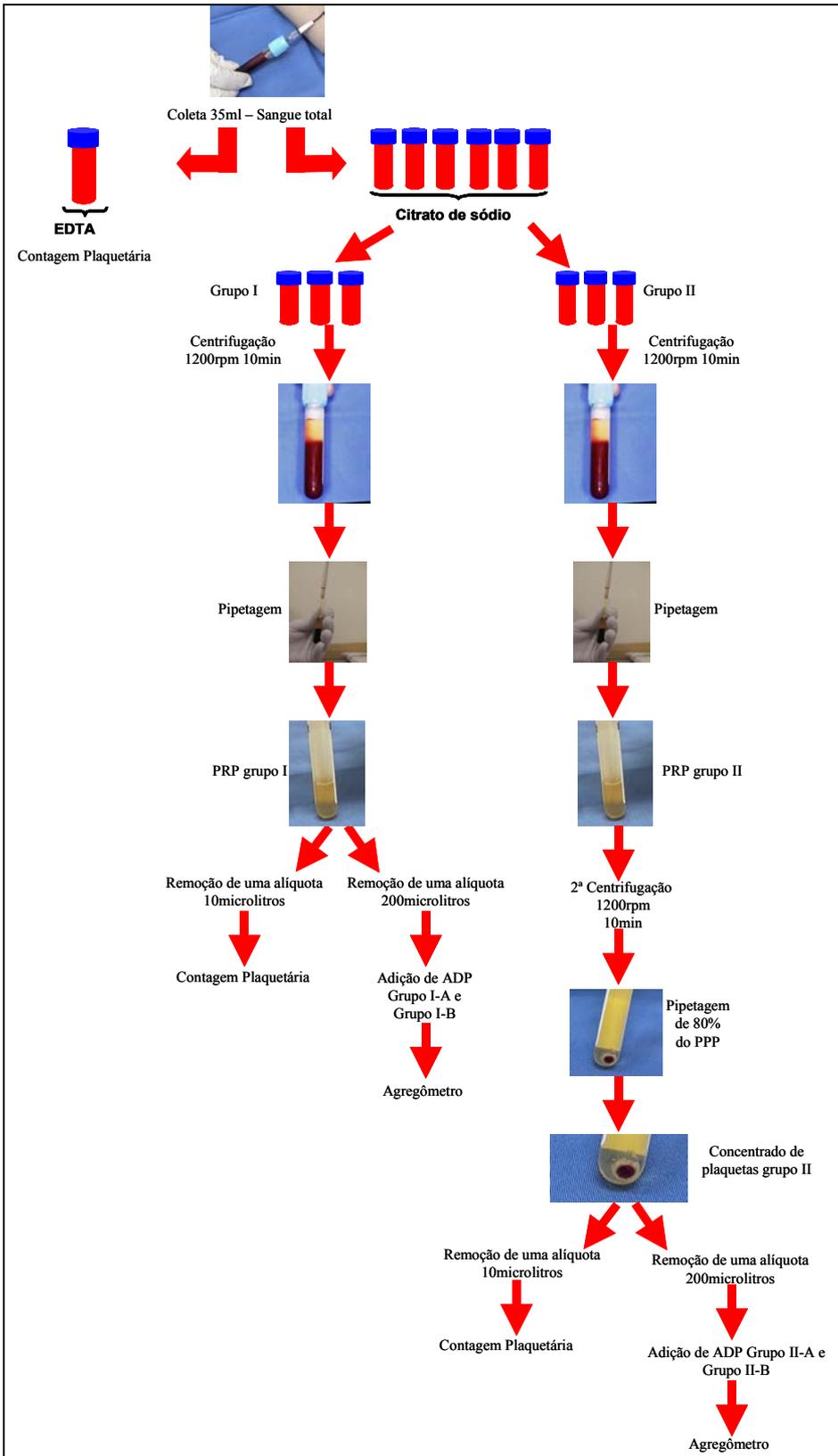


Figura 9 - Ilustração esquemática da metodologia.

5. RESULTADOS

Dos vinte e cinco voluntários selecionados aleatoriamente, quatorze indivíduos eram do sexo masculino e onze indivíduos eram do sexo feminino. A faixa etária variou de vinte a quarenta um anos, com uma média de 29 anos.

A contagem plaquetária do GRUPO I (protocolo de uma centrifugação) observou-se um aumento médio de 143% quando comparado com a contagem basal do sangue periférico (Tabela 2). Os testes estatísticos foram calculados com 8% de nível de significância.

Amostra	Basal	1º Centrifugação	%
1	180000	447000	148%
2	210000	521000	148%
3	196000	552000	182%
4	252000	752000	198%
5	275000	885000	222%
6	195000	403000	107%
7	248000	539000	117%
8	289400	598700	107%
9	159500	398000	150%
10	265000	702000	165%
11	169400	493120	191%
12	218900	495300	126%
13	267000	587000	120%
14	243800	586000	140%
15	198400	485800	145%
16	268900	639000	138%
17	290000	702000	142%
18	295900	798000	170%
19	237000	602400	154%
20	210500	456000	117%
21	204300	402000	97%
22	170300	395000	132%
23	195600	406000	108%
24	284000	604000	113%
25	243000	589000	142%

Tabela 2 - Comparação do Grupo I com sangue periférico, baseado na contagem do número de plaquetas.

No gráfico 2 podemos observar que a variação percentual da contagem basal e a primeira centrifugação está entre os limites 97 e 222%.

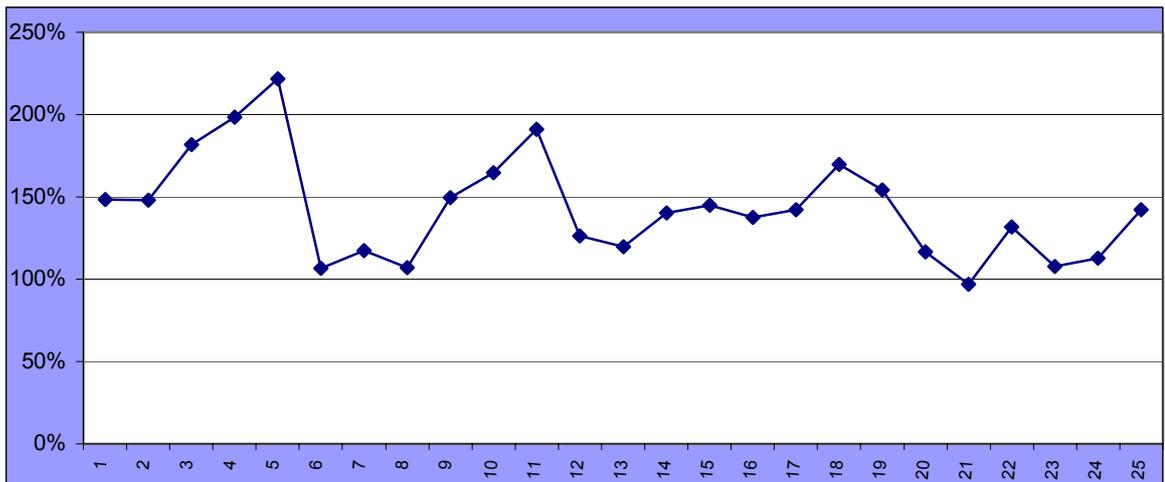


Gráfico 2 - Variação percentual do Grupo I com sangue periférico, baseado na contagem do número de plaquetas.

Na contagem plaquetária do GRUPO II (protocolo de duas centrifugações) houve uma média de aumento de 327% quando comparada com a contagem de plaquetas do sangue basal (tabela 3). Com uma variação entre 208% e 369% nos indivíduos 15 e 17 (dois extremos) respectivamente, conforme gráfico número três.

Amostra	Basal	2º	%
1	180000	696000	287%
2	210000	880000	319%
3	196000	812000	314%
4	252000	1081000	329%
5	275000	1213000	341%
6	195000	639000	228%
7	248000	940000	279%
8	289400	1030050	256%
9	159500	737000	362%
10	265000	1105000	317%
11	169400	639000	277%
12	218900	790000	261%
13	267000	956000	258%
14	243800	926000	280%
15	198400	612040	208%
16	268900	1040600	287%
17	290000	1360050	369%
18	295900	1297000	338%
19	237000	940000	297%
20	210500	890400	323%
21	204300	680500	233%
22	170300	639500	276%
23	195600	680500	248%
24	284000	954000	236%
25	243000	1037000	327%

Tabela 3 - Comparação do Grupo II com sangue periférico, baseado na contagem do número de plaquetas.

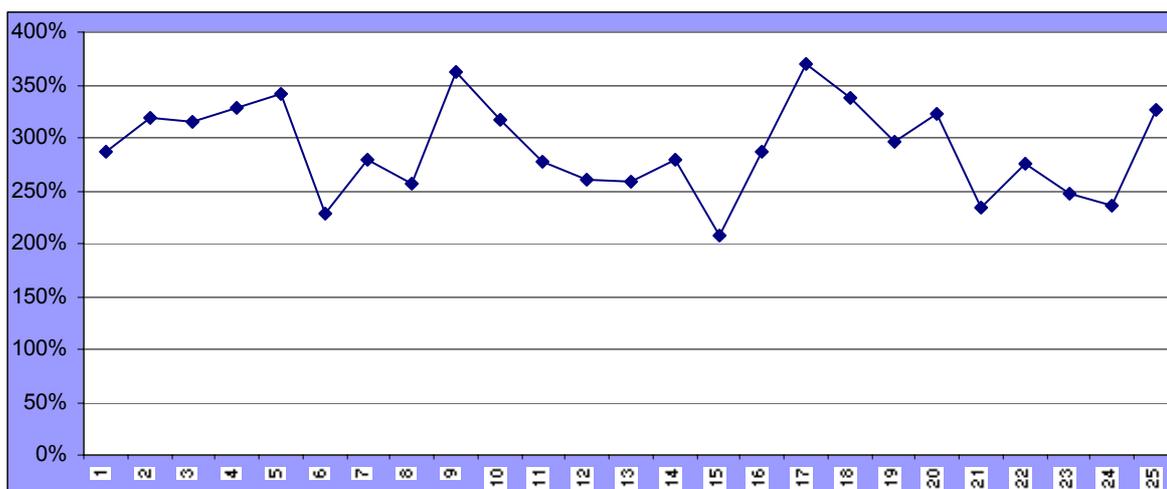


Gráfico 3 - Variação percentual do Grupo II com sangue periférico, baseado na contagem do número de plaquetas.

Na comparação quantitativa do número de plaquetas no plasma do GRUPO I versus GRUPO II, pudemos observar que no GRUPO II obtivemos um concentrado de plaquetas 76% maior (Tabela 4). No gráfico 4 podemos observar que a variação percentual do número de plaquetas entre a primeira e segunda centrifugação é bastante sensível determinando extremos entre 26% e 95%.

Amostra	1º	2º	%
1	447000	696000	56%
2	521000	880000	69%
3	552000	812000	47%
4	752000	1081000	44%
5	885000	1213000	37%
6	403000	639000	59%
7	539000	940000	74%
8	598700	1030050	72%
9	398000	737000	85%
10	702000	1105000	57%
11	493120	639000	30%
12	495300	790000	59%
13	587000	956000	63%
14	586000	926000	58%
15	485800	612040	26%
16	639000	1040600	63%
17	702000	1360050	94%
18	798000	1297000	63%
19	602400	940000	56%
20	456000	890400	95%
21	402000	680500	69%
22	395000	639500	62%
23	406000	680500	68%
24	604000	954000	58%
25	589000	1037000	76%

Tabela 4 - Comparação do Grupo I (uma centrifugação) versus GRUPO II (duas centrifugações), baseado na contagem do número de plaquetas.

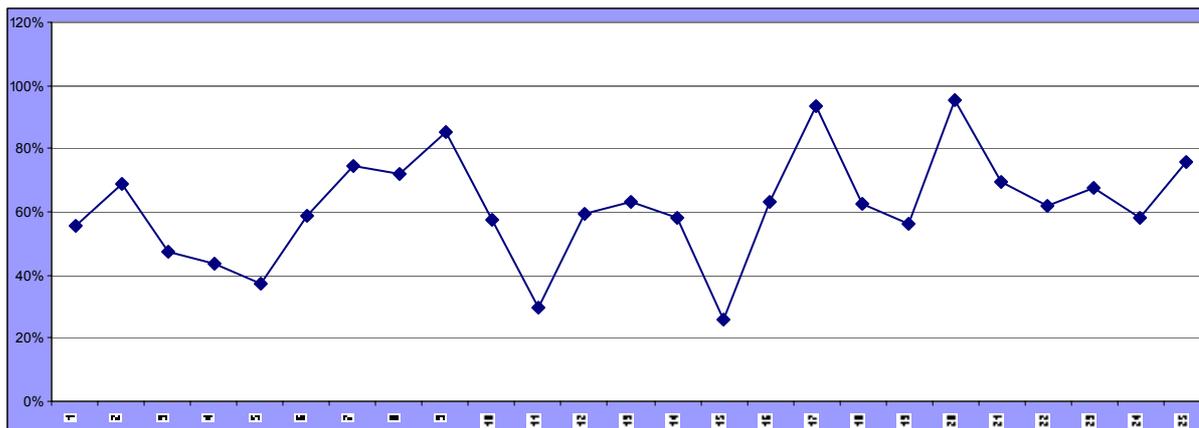


Gráfico 4 - Variação percentual do Grupo I (uma centrifugação) versus GRUPO II (duas centrifugações), baseado na contagem do número de plaquetas.

Nos GRUPO I-A (0,3 uM de ADP) e I-B (6,3 uM de ADP) a função plaquetária manteve-se estável com uma porcentagem de aproximadamente 96% de agregação em todos os indivíduos (Tabela 5).

Amostra	Grupo I A 0,3uM	Grupo I B 6,3uM	%
1	69%	71%	3%
2	100%	100%	0%
3	94%	96%	2%
4	100%	100%	0%
5	95%	98%	3%
6	90%	93%	3%
7	91%	94%	3%
8	99%	100%	1%
9	97%	98%	1%
10	97%	100%	3%
11	81%	85%	5%
12	85%	87%	2%
13	97%	100%	3%
14	94%	100%	6%
15	92%	98%	7%
16	87%	89%	2%
17	100%	100%	0%
18	96%	96%	0%
19	91%	92%	1%
20	90%	93%	3%
21	96%	99%	3%
22	97%	100%	3%
23	96%	100%	4%
24	96%	97%	1%
25	96%	98%	2%
Média	93%	95%	2%

Tabela 5 - Percentual da agregação plaquetária nos Grupos I-A (0,3 uM de ADP) e I-B (6,3 uM de ADP) e variação percentual entre os grupos.

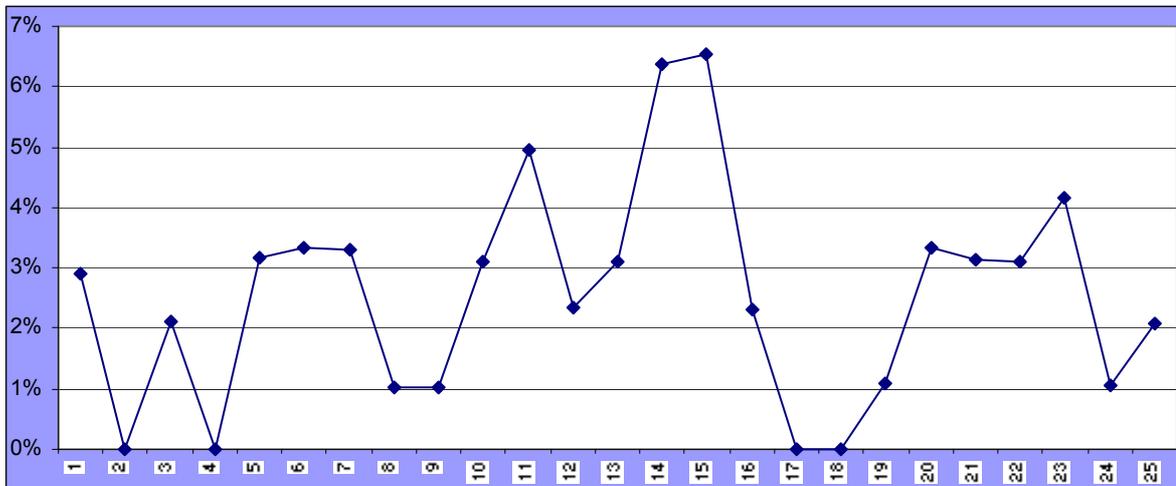


Gráfico 5 - Variação percentual da agregação plaquetária entre os Grupos I-A e I-B.

Com relação à agregação plaquetária houve uma diminuição da função quando o plasma foi submetido a duas centrifugações (GRUPO II), tanto em concentração de 0,3 microlitros (II-A) quanto com uma concentração maior de 6,3 microlitros (II-B) de ADP (Tabela 6).

Amostra	Grupo II A 0,3uM	Grupo II B 6,3uM	%
1	57%	58%	2%
2	45%	45%	0%
3	55%	56%	2%
4	50%	52%	4%
5	45%	46%	2%
6	58%	59%	2%
7	57%	59%	4%
8	60%	62%	3%
9	54%	56%	4%
10	52%	58%	12%
11	48%	49%	2%
12	54%	56%	4%
13	57%	59%	4%
14	53%	59%	11%
15	60%	63%	5%
16	57%	60%	5%
17	43%	49%	14%
18	50%	59%	18%
19	62%	63%	2%
20	48%	49%	2%
21	42%	49%	17%
22	55%	59%	7%
23	53%	59%	11%
24	58%	59%	2%
25	50%	51%	2%
Média	53%	56%	6%

Tabela 6 - Percentual da agregação plaquetária nos Grupos II-A (0,3 uM de ADP) e II-B (6,3 uM de ADP) e variação percentual entre os grupos.

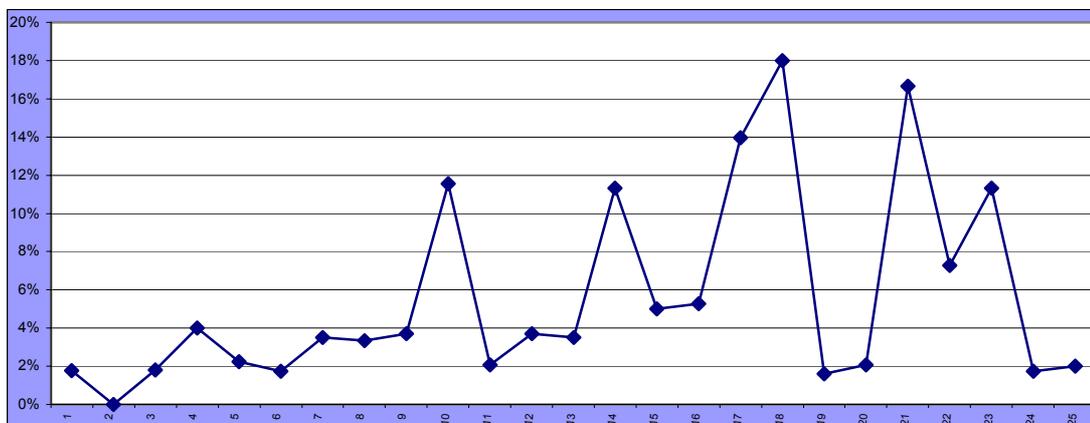


Gráfico 6 - Variação percentual da agregação plaquetária entre os Grupos II-A e II-B.

Os resultados mostram que o plasma submetido a um processo de centrifugação (GRUPO I) apresenta um menor número de plaquetas quando comparado com o GRUPO II, mas observamos que a função de agregação plaquetária se mantém praticamente inalterada. Enquanto que no GRUPO II podemos observar que apesar de se obter um maior número de plaquetas, estas apresentavam uma diminuição considerável da agregação (Gráfico 7 e tabela 7).

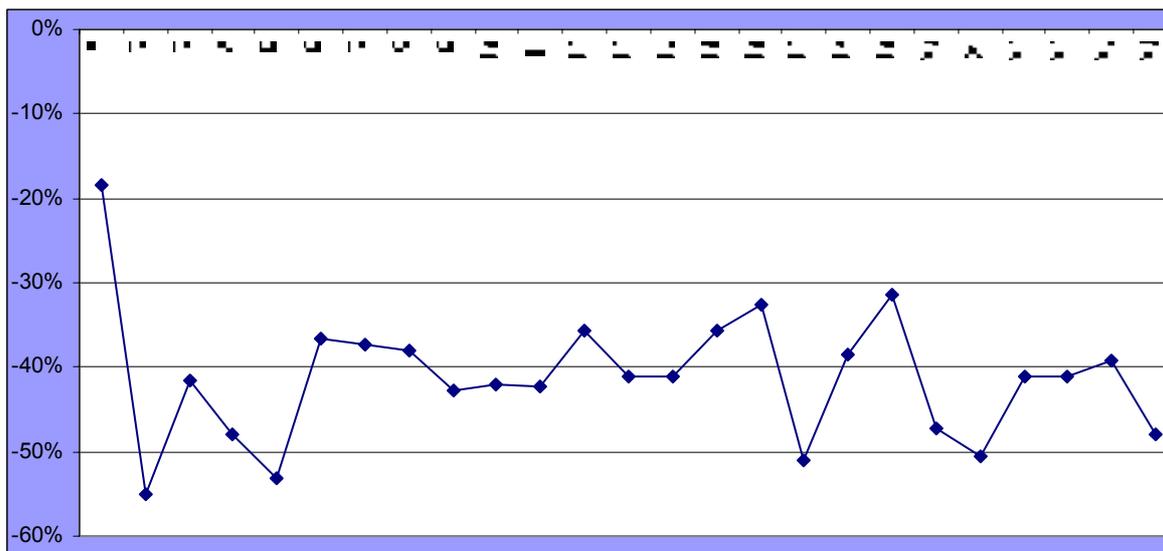


Gráfico 7- Variação percentual da agregação plaquetária entre os Grupos I e II.

	concentração	centrifugação	contagem Plaquetária	Agregação
1.1	6,3uM	1º	447000	71%
1.2	6,3uM	2º	696000	58%
1.3		Basal	180000	
2.1	6,3uM	1º	521000	100%
2.2	6,3uM	2º	880000	45%
2.3		Basal	210000	
3.1	6,3uM	1º	552000	96%
3.2	6,3uM	2º	812000	56%
3.3		Basal	196000	
4.1	6,3uM	1º	752000	100%
4.2	6,3uM	2º	1081000	52%
4.3		Basal	252000	
5.1	6,3uM	1º	885000	98%
5.2	6,3uM	2º	1213000	46%
5.3		Basal	275000	

Tabela 7 – Comparação de contagem e agregação plaquetária nos Grupos IB (6,3 uM de ADP) e II B(6,3 uM de ADP) .

6. DISCUSSÃO

A utilização do plasma rico em plaquetas é um processo que determina uma aceleração e aumento quantitativo da cicatrização óssea pela adição acentuada de fatores de crescimento que estimulam a osteocondução através do enxerto. O plasma rico em plaquetas representa indubitavelmente um dos grandes avanços na cirurgia reconstrutora, oferecendo um acesso aos fatores de crescimento com uma tecnologia simples e acessível.

Vários procedimentos têm sido pesquisados e empregados para a reconstrução do tecido ósseo perdido. O enxerto ósseo é o segundo tecido mais comumente transplantado nos organismos, à exceção apenas do tecido sanguíneo (PROLO e RODRIGO, 1985).

Os enxertos ósseos continuam sendo o material mais utilizado para correção de defeitos esqueléticos adquiridos ou congênitos. A sua previsibilidade pode ser explicada pelo fornecimento de células com capacidade de neoformação óssea, fatores de crescimento e um arcabouço imunologicamente idêntico ao leito receptor.

O processo dos enxertos ósseos depende de algumas variáveis que determinam o padrão de sucesso do procedimento cirúrgico. Entre estas variáveis podemos citar: características da área doadora, técnica cirúrgica, condições da área receptora, imobilização do enxerto e mecanismo de reparo.

A escolha da área doadora normalmente está baseada na obtenção do volume ósseo necessário e menor morbidade. Vários relatos na literatura sugerem que a origem embrionária e o processo de ossificação da área doadora do enxerto ósseo são importantes para a previsibilidade do procedimento. No entanto, outros estudos experimentais têm demonstrado que a origem embriológica isoladamente analisada não é um fator decisivo para o sucesso dos enxertos ósseos. O fator decisivo está baseado na relação entre osso cortical e esponjoso. Um enxerto ósseo mais corticalizado e com esponjosa mais densa, sofre uma menor reabsorção independente da área doadora ser intramembranosa ou endocondral (GORDH e ALBERIUS, 1999).

A área receptora deve ser previamente analisada em relação à anatomia do osso remanescente, presença de eventuais patologias, bem como a vascularização também determinada pela quantidade e qualidade do tecido de revestimento.

A integração do enxerto na área receptora depende da perfeita estabilização e imobilização favorecendo um contato íntimo com osso remanescente e a conseqüente proliferação vascular e celular. A revitalização do enxerto e o sucesso da incorporação dependem de uma perfeita adaptação e uma ampla superfície de contato com o leito vascular do local receptor.

O reparo depende muito da qualidade e quantidade de células viáveis, principalmente relacionadas com a angiogênese e osteogênese. As células do canal medular do enxerto, que são as principais células de regeneração óssea, existem em número reduzido. A proporção de células mesenquimais para células estruturais da medula é de aproximadamente 1 para 100.000 em adolescentes, 1 para cada 250.000 na faixa etária dos 35 anos e 1: 400.000 aos 80 anos (MARX, 1999).

Após anos de pesquisas da fisiologia óssea e procura de um substituto ideal do osso humano ou de um material que possa melhorar o reparo tecidual, as plaquetas surgem como um precursor de reparo e hemostasia que agrega fatores de crescimento que são os iniciadores de todo o processo. As comprovações clínicas e laboratoriais dos efeitos benéficos das plaquetas sobre o reparo, principalmente nos enxertos ósseos, determinaram a ampliação de pesquisas e a expectativa de um futuro promissor na cirurgia reconstrutiva maxilofacial e Implantodontia.

Os fatores de crescimento presentes no plasma rico em plaquetas são mediadores que podem aumentar o número destas células e promover maior eficiência no processo de reparo. Outro benefício adicional do PRP é a habilidade de formar um gel biológico que pode conter o enxerto, estabilizar o coágulo e funcionar como adesivo.

O tempo de atividade de uma plaqueta no reparo é de aproximadamente cinco dias, inicialmente pelo aumento e ativação de osteoblastos seguindo-se por quimiotaxia e ativação dos macrófagos.

Estudos experimentais em animais (ISOGAI et al, 1999) comprovaram a eficiência da cola de fibrina como veículo de crescimento celular determinando crescimento ósseo em tecidos heterotópicos. O rumo das pesquisas em engenharia tecidual acalenta a expectativa de um futuro próximo, onde teremos banco de células e fatores de crescimento isolados como recursos disponíveis para os procedimentos de reconstrução dos tecidos.

A técnica simplificada para obtenção do plasma rico em plaquetas determinou uma ampla utilização do plasma por meio acessível e simples. O plasma rico em plaquetas preparado ambulatorialmente representa um procedimento com várias vantagens técnicas, entre as quais podemos citar:

- Procedimento minimamente invasivo.
- Coleta do volume sanguíneo no pré-operatório imediato.
- Utilização do plasma rico em plaquetas fresco, sem armazenamento.
- Imunologicamente seguro (fonte autógena).

- Custo acessível.
- Utilização de equipamentos simples e transportáveis, permitindo sua utilização em ambiente ambulatorial e hospitalar.
- Facilidade de manipulação do enxerto, devido à formação do gel.
- Diminui a quantidade de material de enxerto.

A recente tecnologia permite o uso do PRP com pequenos volumes de sangue, minimizando a necessidade de reinfusão de células vermelhas e riscos associados. Contudo há pouca informação sobre a quantidade ideal de plaquetas para um melhor reparo ósseo (KASSOLIS et al, 2000).

Qualquer protocolo de obtenção do PRP deve concentrar plaquetas no seu nível máximo para que corresponda aos resultados clínicos referidos na literatura. Mas além de uma alta concentração plaquetária com grande liberação de fatores de crescimento, é muito importante que seja mantida a integridade da plaqueta. Os fatores de crescimento devem ser liberados de plaquetas viáveis, uma vez que no ato de exocitose granular, a plaqueta completa a estrutura terciária das proteínas do fator de crescimento. As plaquetas fragmentadas podem degranular grandes quantidade de fatores de crescimento, mas com efetividade diminuída (MARX, 2000). Alguns autores (LANDSBERG, ROY e GLICKMAN, 2000) referem teste de quantificação dos níveis de PDGF e TGF β , mas no entanto o método não permite avaliar a atividade biológica dos fatores que pode estar alterada pelo método de obtenção do plasma rico em plaquetas.

A escolha do anticoagulante (citrato de sódio) que preserva a membrana plaquetária, bem como a calibragem da centrífuga com uma força G, frequência e tempo ajustados são muitos importantes na manutenção da viabilidade da plaqueta. A força G excessiva pode fragmentar as plaquetas e ser um fator determinante na não eficiência do PRP. A coleta do sangue de forma atraumática e os tubos de acondicionamento que devem ser plásticos ou siliconizados também são fatores determinantes para manter a estrutura da plaqueta e não provocar uma adesão ou agregação precoce.

Apesar da literatura (WHITE e JENNINGS, 1996) sugerir a coleta do sangue preferencialmente com seringa e agulha, ainda não está claro o efeito dos equipamentos a vácuo nos trabalhos com medição da função plaquetária. Até que possa ser comprovado que os equipamentos a vácuo não aumentam a ativação das plaquetas ou afetam a farmacodinâmica das medições, recomenda-se a utilização dos mesmos pela facilidade de manuseio e agilidade no processo de obtenção do plasma rico em plaquetas.

De acordo com este experimento, o número de plaquetas do sangue periférico comparado com a contagem final obtida no plasma com uma ou duas centrifugações, apresenta um comportamento não linear. Apesar de todos os indivíduos apresentarem um aumento significativo das plaquetas, os resultados são variáveis. Este achado vai de encontro com citações da literatura, onde a possibilidade de influência do número de plaquetas pré-operatórias ainda não está esclarecida (WEIBRICH , KLEIS e HAFNER,2002).Na primeira centrifugação observamos um aumento das plaquetas em aproximadamente uma vez e meia. É importante salientar que todos os indivíduos apresentavam um número superior a 150.000 plaquetas, com um extremo máximo de contagem de 295.900 plaquetas no sangue basal. Para minimizar os erros de contagem, em cinco indivíduos aleatórios, foi realizada uma segunda contagem para conferência dos números obtidos.

Outros resultados obtidos neste estudo experimental determinam que uma segunda centrifugação aumenta o número de plaquetas em aproximadamente três vezes quando comparado com a contagem inicial do sangue periférico. No entanto, apesar de um maior número de plaquetas, estas apresentavam uma alteração significativa na função de agregação plaquetária. Nos grupos IA e IB a função de agregação plaquetária manteve-se praticamente sem alterações, alcançando percentuais de mais de 90% tanto em maior quanto menor concentração de agonista plaquetário. Nos grupos IIA e IIB, obtivemos um percentual máximo de agregação de 63%, com uma média de 53% e 56% nas concentrações de 0,3 e 6,3 uM de ADP. Uma maior concentração de agonista plaquetário não conseguiu induzir a uma maior agregação e confirma possível dano na estrutura plaquetária durante o processo de obtenção do plasma.

Esta menor efetividade na agregação pode comprometer a degranulação com seus respectivos fatores de crescimento e conseqüentemente os resultados esperados com o uso do PRP.Mas existem outras variáveis que não nos permitem concluir de forma incisiva sobre a função plaquetária. Um primeiro fator a ser considerado é a dificuldade de análise da efetividade biológica dos fatores de crescimento, além da necessidade de estudos clínicos comprobatórios sobre a eficiência do plasma rico em plaquetas com diferentes concentrações plaquetárias.

A quantidade de PDGF necessária para encontrar os efeitos biológicos ainda permanece obscura. Novas pesquisas são necessárias para obter a concentração ideal dos fatores de crescimento e para caracterizar outros fatores fisioquímicos que podem estar presentes no PRP e poderão explicar melhor o efeito benéfico na cicatrização de feridas e formação óssea (ANITUA, 1999; WEIBRICH , KLEIS e HAFNER, 2002).

As variações na concentração de PDGF podem influenciar o reparo ósseo. MARDEN et al (1993) demonstraram em um estudo experimental animal que o PDGF em certas concentrações pode interagir com proteínas osteomorfogéticas e resultar em inibição do reparo ósseo. A complexa interação bioquímica que pode ocorrer entre diferentes fatores de crescimento contidos no PRP e o hospedeiro durante as fases do reparo ainda não está claramente compreendida e requer estudos futuros.

Com tecnologia e preparação facilitadas, o plasma rico em plaquetas constitui-se em uma alternativa viável que através da ação dos fatores de crescimento justifica o seu uso nas cirurgias de reconstrução óssea.

O fator questionável relacionado à utilização do PRP, diz respeito à dificuldade em determinar um número de plaquetas e conseqüentemente uma concentração ideal de seus respectivos fatores de crescimento. A literatura apresenta escassos estudos clínicos em humanos cuja metodologia e acompanhamentos apresentam-se geralmente não adequados. Novas pesquisas com números e controle bem delineados ainda se tornam necessárias para comprovar a eficácia em termos quantitativos e qualitativos do PRP. Além da dificuldade na definição numérica das plaquetas, existe carência de comprovação qualitativa dos fatores de crescimento. Alguns estudos conseguiram rastrear e quantificar os fatores, mas a efetividade biológica ainda não foi avaliada.

Este estudo demonstrou que a agregação, uma das funções plaquetárias, foi alterada quando no preparo do PRP. Considerando o resultado desta pesquisa, onde uma segunda centrifugação determina uma menor agregação, retornamos a três questionamentos:

- A degranulação dos grânulos alfa estaria também afetada pela menor agregação?
- E se a degranulação não foi efetivamente afetada, estes fatores ainda estariam biologicamente viáveis?
- Qual a concentração ideal plaquetas e de dos fatores de crescimento, para obtermos o melhor sucesso clínico desta técnica?

Portanto, para restringirmos problemas que podem afetar o produto final deste plasma sugerimos que:

- Os protocolos de obtenção do PRP devem estar baseados no conhecimento dos equipamentos de separação celular e de todas as variáveis (ex: anticoagulantes, tubos e método de coleta) que podem interferir na quantidade e qualidade das plaquetas do plasma que vai ser obtido pelo processo.

- Novas pesquisas envolvendo acompanhamentos clínicos tornam-se necessárias para efetivar a eficácia do PRP.

7. CONCLUSÕES

Através deste experimento pode-se verificar que o processo de dupla centrifugação para obtenção do concentrado em plaquetas determina um substancial aumento no número de plaquetas quando comparado com o processo de apenas uma centrifugação. Na contagem plaquetária no GRUPO II (protocolo de duas centrifugações) houve um aumento de 327% quando comparada com a contagem de plaquetas do sangue basal. Na comparação quantitativa do número de plaquetas no plasma do GRUPO I versus GRUPO II, podemos observar que no GRUPO II obtivemos um concentrado de plaquetas 76% maior.

No entanto, os GRUPOS I-A e I-B a função plaquetária manteve-se estável com uma porcentagem de aproximadamente 96% de agregação em todos os indivíduos. Enquanto que a agregação plaquetária nos GRUPOS II-A e II-B houve uma diminuição significativa da função obtendo-se uma agregação média que variou de 53 a 56%.

Os resultados obtidos demonstraram que o processo duplo de centrifugação determina uma maior concentração de plaquetas no plasma, mas ocorre uma diminuição na função de agregação plaquetária.

Novas pesquisas serão necessárias para melhor avaliação da degranulação plaquetária e a conseqüente ação dos seus respectivos fatores de crescimento.

9. REFERÊNCIAS

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

ANITUA, E; ORTIZ, I. A. **Un nuevo enfoque en la regeneracion osea.** Vitoria, Spain: Puesta Al Dia Publicaciones, 2000.

BEZERRA, F. J. B.; LENHARO, A. Plasma rico em plaquetas. In: LENHARO, A; MENDONÇA, R. G. **Terapia clínica avançada em implantodontia.** São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 77-104.

BITHELL, T. C. Abordagem diagnóstica das desordens do sangramento. In: BITHELL, T. C. et al. **Hematologia clínica.** São Paulo: Manole, 1998. c.48, p.1427-1453.

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

CARLSON, N. E. ROACH JR, R. B. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. **J.Am.Dent.Assoc.** v. 10, n. 133, p. 1383-1386, 2002.

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

FITZGERALD, D. J. Vascular biology of thrombosis-the role of platelet-vessel wall adhesion. **Official Journal of the American Academy of Neurology.** v. 57. n. 2, p. 1-4, sep.2001.

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

GASPERINI, G. Análise quantitativa do protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas do núcleo de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial do HU-UFSC. 2003. Monografia (Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do HU-UFSC) Universidade Federal de Santa Catarina.

GIL, J. N. et al. Emprego de plasma rico em plaquetas na reconstrução de fendas alveolares - apresentação de caso clínico. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia.** v. 9. n. 35. Curitiba, jul/set 2002. p. 197-201.

GORDH, M.; ALBERIUS, P. Some basics factors essential to autogenic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. **Scand. J. Plasti.Reconstr. Hand. Surg.** v. 33. p. 129-146, 1999.

GOTTRUP, F.; ANDREASEN, J. O. Cicatrização da lesão após trauma. In: ANDREASEN, J. O ANDREASEN, F. M. **Texto e Atlas colorido de traumatismo dental.** São Paulo: Artmed, 2001. c.1. p. 13-76.

HOFFBRAND, V.; PETTIT, J. E. Distúrbios vasculares e plaquetários de sangramento. In: **Hematologia clínica**. São Paulo: Manole, 2001. c.15. p. 267-278. Disponível em: <<http://www.dentalnet.com.br/fisiologiaprpp.htm>>. Acesso em: 09 set. 2003.

ISOGAI, N. et al. Experimental use of fibrine glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. **Plast. Reconstr. Surgery**. v. 105. p. 953-963, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sangue. In: JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9. ed., 1999. c. 9, p. 181-198.

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

LANDSBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. **J. Maxillofacial Surg**. v. 58, p. 297-301, 2000.

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

LEMOES, J. J.; ROSSI JÚNIOR, R. **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos - proposta de um protocolo de obtenção simplificado**. Disponível em: <<http://www.odontologia.com.br>>. Acesso em: 10 dez. 2003.

LORENZI, T. F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia, Hemoterapia**: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Atheneu, 1996. c.1. p. 3-8.

MARDEN, L. et al. Platelet-derived growth factors inhibit bone regeneration induced by osteogenin, an bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. **J. Clin Investig**. n. 92. p. 2897-2905, 1993.

MARX, R. E. Discussion- Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. In: LANDSBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. **J. Maxillofacial Surg**. v. 58. p. 297-301, 2000.

MARX, R. E. Platelet concentrate: a strategy for accelerating and improving bone regeneration. In: DAVIES, J. E. **Bone engineering**. Toronto, Canada: Rainbow, 1999. c. 41. p. 447-453.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: LYNCH, S.E. et al. **Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Illinois: Quintessence Books, 1999. c. 4. p. 71-82.

MARX, R. E. et al. 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.; GARG, A. K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. In: JENSEN, O. T. **The sinus bone graft**. Chicago: Quintessence, 1999. p. 183-189.

OKLUND, S. A. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts and allografts in canine skull defects. **Clin. Orthop.** n. 205. p. 269-291, 1986.

PACIFICI, L.; CASELLA, F.; MAGGIORE, C. platelet rich plasma (PRP): potentialities and techniques of extraction. **MINERVA Stomatol.** v. 51. n. 7-8. p. 341-350, 2002.

PHILIPPART, P. et al. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft: a 5-year survey. **Int. J. Oral and Maxillofacial Surg.** v. 3. n. 18. p. 411-416, May-Jun 2003.

PROLO, D. J.; RODRIGO, J. J. Contemporary bone graft physiology and surgery. **Clin. Orthop. Res.** n. 200. p. 322-342, nov. 1985.

RAPAPORT, S. Plaquetas e púrpuras plaquetopênicas. In: **Introdução à hematologia**. São Paulo, SP: Harper & Row do Brasil, 1978. c. 25. p. 278-292.

RODRIGUEZ, A. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implant. **J. Oral and Maxillofacial Surg.** v. 2. n. 61. p. 157-163, 2003.

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

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

SHANAMAN, R. et al. Localized ridge augmentation using GRB and platelet-rich plasma: case report. **Int. J. of Periodontics and Restorative Dentistry.** v. 21. n. 4. p. 345-355, 2001.

SONNLEITER, D. et al. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intra-oral bone grafting techniques: a technical note. **Int. J. Oral and Maxillofacial Implants.** v. 15. n. 6. p. 879-882, 2000.

VENTURELLI, A. Regeneración ósea: plasma rico en plaquetas. **Rev. Assoc. Odontol. Argent.** v. 87. n. 6. p. 459-467, dec. 1999.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F. O sangue e sua formação. In: VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia, Hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. São Paulo: Atheneu, 1996. c. 1, p. 3-8.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K.; HAFNER, G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP Kit versus PCCS PRP system. **Int. J. Oral and Maxillofacial Implants.** v. 17. n. 2. p. 184-190, 2002.

WHITE, M. M.; JENNINGS, L. K. Basic introduction to platelets. In: Platelet protocols. San Diego, CA. **Academic Press**, 1996. c. 1. p. 3-26.

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 Maxillofacial Surg.** v. 55. p. 1294-1299, 1997.

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

WOJTOWICZ, A. et al. Fourier and fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bovine bone. **Int. J. Oral and Maxillofacial Surg.** v. 1. n. 32. p. 84-86, 2003.

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

10. APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Adriana Parisotto Macedo (mestranda em Odontologia-Implantodontia), sob a orientação do Professor Dr. José Nazareno Gil, estamos desenvolvendo a pesquisa PLASMA RICO EM PLAQUETAS: UMA ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE DOIS PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO com o objetivo de comparar dois métodos de obtenção do plasma rico em plaquetas. Este estudo é necessário porque o plasma possui propriedades que favorecem o reparo ósseo e diminui a quantidade necessária de retirada de enxerto ósseo.

A participação como voluntário desta pesquisa restringe-se apenas à doação de 35ml de sangue. Os voluntários serão submetidos à punção venosa para a coleta sanguínea. Este procedimento pode trazer os seguintes riscos e desconfortos:

- moderado desconforto momentâneo;
- transfixação do vaso sanguíneo ou não obtenção do acesso venoso determinando a formação de equimoses ou hematomas;
- na coleta o paciente poderá sentir mal estar, tontura, que estarão relacionados com o estado psicológico e reflexo vagal.

Mas esperamos que traga os benefícios esperados, tais como:

- melhor reparo ósseo;
- aceleração da cicatrização;
- menor morbidade nas cirurgias de enxertos ósseos bucais, devido a presença do plasma rico em plaquetas a quantidade de osso requerida será menor.

Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone 47 9967-3223. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais e todo material coletado só será utilizado neste trabalho.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Eu, _____ fui esclarecido sobre a
pesquisa PLASMA RICO EM PLAQUETAS: UMA ANÁLISE QUANTITATIVA E
QUALITATIVA DE DOIS PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO e concordo que meus dados
sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, de _____ de 2004.

Assinatura: _____ RG: _____