



1290004736

TCE/UNICAMP  
Es65u  
FOP

ROGÉRIO TERRA DO ESPÍRITO SANTO

**USOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DOS FATORES DE  
CRESCIMENTO**

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

2004

ROGÉRIO TERRA DO ESPÍRITO SANTO

**USOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DOS FATORES DE  
CRESCIMENTO**

Monografia apresentada à  
Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba da Universidade  
Estadual de Campinas como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Especialista em  
Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio  
Zaffalon Casati

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

2004

306

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
BIBLIOTECA**

Unidade FOP/UNICAMP	
N. Chamada	Es65u
Vol.	Ex.
Tombo BC/	

Unidade - FOP/UNICAMP

TCE/UNICAMP

Es65u Ed.

Vol. Ex.

Tombo 4736

C  D

Proc 26P-134/2000

Preço R\$31,00

Data 13/04/2000

Registro 767610

#### Ficha Catalográfica

Es65u	<p>Espírito Santo, Rogério Terra do.          Usos do plasma rico em plaqueta e dos fatores de crescimento. /          Rogério Terra do Espírito Santo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.          87f. : il.</p> <p>Orientador : Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati.          Monografia (Especialização) – Universidade Estadual de          Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Bioengenharia tecidual 2. Plasma autólogo de          fatores de crescimento. 3. Mediadores biológicos. I.          Casati, Márcio Zaffalon. II. Universidade Estadual de          Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.          III. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

*Dedico este trabalho ao meu pai (in memoriam) e à minha mãe. Primeiro pelo constante apoio e incentivo desde o início de meus estudos; segundo porque sempre acreditaram em mim.*

## *Agradecimentos*

*Primeiramente, a Deus porque é o doador e mantenedor de nossas vidas. Ele sempre me dá força e sabedoria para que eu possa superar todos os obstáculos.*

*Ao meu pai Azarias (in memoriam) que, com certeza, se emocionaria por ver seu filho concluir com muita luta mais uma etapa da vida profissional.*

*À minha mãe Cida, a mãezinha querida, pela preocupação e carinho dispensado em todos os momentos. O que hoje sou é também mérito dela que dedicou tempo integral em prol de sua família. Te amo mãe!*

*Ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum pela experiência e o conhecimento dado a todos nós.*

*Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum pela coordenação e transmissão da ciência periodontal.*

*Ao Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati pela forma gentil e atenciosa em orientar-me para a realização desta monografia.*

*Ao Edwil, Jorge e Vinícius por estarem sempre presentes e dispostos a transmitir a vivência da clínica de um modo prático e funcional.*

*Ao Dr. Nildemar Mendes Filho, diretor do serviço de odontologia do CECOM – UNICAMP, pois sem o seu apoio jamais poderia realizar este sonho. Valeu pela amizade e as "horas".*

*À Verônica, minha parceira de clínica. Fomos realmente uma "dupla dinâmica", mesmo sendo formada por acaso. Nos sentimos tão bem que vou sentir sua falta durante a realização de minhas cirurgias!!!*

*À Patrícia Furtado pela gentileza em disponibilizar-me valiosas referências bibliográficas.*

*Às amigas do periopira, que, com certeza, vão ficar na história.*

*E, finalmente, mas sem menos mérito, a todas as pessoas que me auxiliaram direta ou indiretamente nestes dois anos. Valeu!*

Os cientistas tentaram entender a felicidade. Pesquisaram-na, fizeram estatísticas, mas ela os confundiu, falando-lhes: "A lógica numérica jamais compreenderá a lógica da emoção!" Perturbados, descobriram que o mundo da emoção é indecifrável pelo mundo das idéias. Por isso, os cientistas que viveram uma vida exclusivamente lógica e rígida foram infelizes.

Augusto Cury

## SUMÁRIO

0 – Introdução.....	11
1 – Sangue.....	14
1.1 – Micro-ambiente medular ou estroma medular.....	15
1.1.1 – Unidades celulares.....	15
1.1.2 – Matriz extracelular.....	15
1.2 – Plaquetas ou trombócitos.....	16
1.2.1 – Concentração plaquetária no sangue.....	17
1.2.2 – Atividade plaquetária.....	17
2 – Sobre os fatores de crescimento.....	18
2.1 – Principais fatores de crescimento.....	20
2.1.1 – VEGF.....	20
2.1.2 – FGF.....	20
2.1.3 – TGF- $\beta$ .....	22
2.1.4 – BMPs.....	23
2.1.4.1 – Resposta imune à BMP.....	25
2.1.4.2 – BMP purificada x recombinante.....	26
2.1.4.3 – Aplicações clínicas odontológicas da BMP.....	27
2.1.5 – PDGF.....	28
2.1.5.1 – Aplicação clínica do PDGF.....	29
2.1.6 – EGF.....	30
2.1.7 – IGFs.....	31
2.1.8 – CGF.....	33
2.2 – Associação dos fatores de crescimento.....	37
2.2.1 – Estudos em animais.....	38
2.2.2 – Estudos <i>in vitro</i> .....	40
2.2.3 – Estudos em humanos.....	41
3 – Plasma rico em plaquetas (PRP).....	44
3.1 – Preparo do PRP: métodos de obtenção.....	50
3.2 – Protocolos de obtenção do PRP.....	51

3.2.1 – Protocolo convencional.....	51
3.2.2 – Protocolo simplificado baseado em Anitua.....	52
3.2.3 – Protocolo simplificado de Sonnleitner.....	53
3.2.4 – Protocolo de Landesberg.....	53
3.2.5 – Protocolo de Rosenberg e Torosian.....	54
3.2.6 – Protocolo de Anitua.....	54
3.2.7 – Protocolo de Marx.....	55
3.3 – Aplicações clínicas do PRP.....	57
4 – Carreadores.....	57
5 – Engenharia Tecidual.....	60
6 – Discussão.....	63
7 – Considerações finais.....	68
8 – Referências bibliográficas.....	69

## RESUMO

O objetivo deste trabalho é abordar o uso, na área odontológica, do plasma rico em plaquetas (PRP) e dos fatores de crescimento (FC), ambos considerados, na atualidade, a mais alta biotecnologia. Para realizar tal trabalho, primeiramente, fizemos uma pesquisa bibliográfica e selecionamos alguns estudos considerados importantes sobre o tema, tanto no Brasil (PONTUAL e MAGINI, 2004, ANDRIOLO, 2002), quanto no exterior (ANITUA, 2000; MARX, 2001, dentre outros). Em seguida, iniciamos a escrita do texto na seguinte ordem: a) descrevemos os componentes sanguíneos, pois é a partir do sangue que obtemos o PRP; b) elencamos os principais FC – VEGF, FGF, TGF- $\beta$ , BMP, PDGF, EGF, IGF, CGF, dentre outros; c) relacionamos os principais estudos com FC em animais, *in vitro* e em humanos; d) descrevemos os métodos e protocolos de obtenção do PRP; e) mostramos as aplicações clínicas do PRP; f) explicamos as características e funções dos carreadores e a engenharia tecidual; g) discutimos o PRP e os FC. Finalmente, constatamos que, embora esteja evidente os benefícios do PRP, sobretudo por ser um método natural, ainda há a necessidade de muitas pesquisas, uma vez que há diversos questionamentos sobre seu uso, conforme destacamos nas considerações finais.

## ABSTRACT

The aim of this study is to approach the use of platelet-rich plasma (PRP) and growth factors (FC), both considered, nowadays, the highest biotechnology in odontological clinic. In order to accomplish such objective, we first reviewed the literature and selected some important studies about the subject, both national (PONTUAL e MAGINI, 2004; ANDRIOLO, 2002) and international (ANITUA, 2000; MARX, 2001). Second, we started writing the text in the following order: a) we described blood components since blood is the most important liquid of the human body and contains plasma; b) we comented the main FC – VEGF, FGF, TGF- $\beta$ , BMP, PDGF, EGF, IGF, CGF, etc; c) we reported some studies with FC in animals, *in vitro* and in humans; d) we described methods and PRP protocols; e) we demonstrated clinic applications of PRP; f) we explained blood components and their role, delivery systems and tissue engeneering; g) we discussed PRP and FC use. Finally, we noticed that, although the benefits of PRP are evident, mainly because is a natural method, there is still the need for many researches, once there are many questions on its use, as we described in the final remarks.

## Introdução

O interesse pelo tema abordado neste trabalho surgiu a partir de nosso envolvimento no curso de especialização em periodontia. Embora trabalhemos por mais de dez anos na área odontológica, o conhecimento adquirido durante o curso despertou-nos para o enorme interesse dado às diversas maneiras de possibilidades de reparo dos defeitos periodontais, tais como: a) terapia convencional - raspagem e alisamento radicular, b) regeneração tecidual guiada - membranas, c) matérias de preenchimento - (osso ou substâncias bioativas) e, d) biologia molecular. Dentre essas possibilidades a que mais nos interessa aqui é a biologia molecular, pois esta inclui os fatores de crescimento (FC) que estão em voga neste novo século. Prova disso é a vasta gama de pesquisas que vem sendo desenvolvidas em todas as áreas da ciência médica com o intuito de acelerar e aumentar a reparação tecidual.

A primeira definição de FC tomamos de CHAGAS et al. (2004:149) para quem os FC são *mediadores biológicos naturais que regulam eventos celulares cruciais na reparação tecidual, tais como síntese de DNA e matriz, quimiotaxia e diferenciação celular*. Outra definição ainda mais completa é a que apresenta FILHO et al. (2004:52) com base nas pesquisas realizadas por ANITUA (1999), dentre outras. Para estes pesquisadores os FC são definidos

*como um grupo de polipetídeos que estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular e morfogênese de tecidos e órgãos da embriogênese até a vida adulta. Estes podem agir e atuar como agentes mitogênicos, melhorando a proliferação de certos tipos de células, ou serem morfogênicos, alterando, assim o fenótipo celular.*

Assim, eles atuam como reguladores e desreguladores das atividades celular, das enzimas, dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos indutores de expressão genética, entre outras atividades. Eles também aumentam, de forma rápida, o número de células tronco e a promoção de sua atividade durante a agressão aos tecidos.

Os principais FC são:

- 1) VEGF – FC do endotélio vascular;
- 2) HIF – fator indutor da hipóxia<sup>1</sup>;
- 3) FGF – FC fibroblástico;
- 4) TGF- $\beta$  - FC de transformação  $\beta$  ( $\beta$ 1 a  $\beta$ 5 e BMP);
- 5) Angiopoetinas – Ang1 e Ang2 são conhecidas<sup>2</sup>;
- 6) PDGF – FC derivados da plaqueta (PDGF, TGF $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 e outros);
- 7) EGF – FC epidermal;
- 8) IGF – FC similar à insulina (IGF1 e IGF2);
- 9) CGF – FC do cimento, semelhante ao IGF1.

Quando há uma injúria periodontal, são liberados os seguintes mediadores biológicos naturais:

- a) do osso: PDGF, TGF- $\beta$ , EGF I e II, BMP;
- b) das plaquetas: PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, PD-ECGF;
- c) do plasma: IGF I-II;
- d) dos macrófagos: PDGF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ ;

---

<sup>1</sup> É uma proteína indutora da colonização de monócitos. Melhora a eficácia na produção de VEGF (Santos e Santos, 2004:32).

<sup>2</sup> São FC recentemente descritos. Eles apresentam-se sob quatro formas, porém somente as formas Ang1 e Ang2 são conhecidas (Santos e Santos, 2004:33).

e) do cimento: PDGF, CGF, TGF- $\beta$ , EGF I e II.

Por outro lado, se ocorre uma injúria tecidual<sup>3</sup>, são liberados os seguintes mediadores biológicos:

a) das plaquetas: PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, PD-EGGF;

b) do plasma: IGF – I e II;

c) dos macrófagos: PDGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ .

Uma fonte rica em FC que tem sido objeto de grande interesse para as pesquisas atuais é o plasma rico em plaquetas (PRP). Como o próprio nome explica, é um concentrado autólogo de plaquetas que possui um grande reservatório de FC como já descrevemos acima.

---

<sup>3</sup> Essa descrição dos FC - injúria periodontal e tecidual – foi fornecida por Patrícia Furtado Gonçalves em comunicação pessoal na Faculdade de Odontologia de Piracicaba sobre FC – 24/05/2004.

O objetivo desta seção é comentar sobre os fatores de crescimento, sobretudo o PRP, nossa ênfase neste trabalho. Porém, cremos ser pertinente explicar, primeiro, sobre o sangue e seus componentes, pois este importante líquido do corpo humano é que fornece o componente fundamental: o plasma.

## 1 - O Sangue

*Tomai, este é o meu sangue  
que é derramado por vós.  
Tomai em memória de mim.*

Esta metáfora bíblica é, sem dúvida, bastante conhecida pelos cristãos e evidencia, de forma ainda mais clara, a enorme importância de um dos principais componentes do corpo humano: o sangue. É por meio deste que nutrientes tais como sais minerais, proteínas, etc são levados para os tecidos do nosso corpo. São os nutrientes deste tipo que nos fornece energia para as diversas atividades que exercemos em nossas vidas diárias.

Para explicarmos sobre este líquido vital para o ser humano, tomaremos, primeiramente, a pesquisa de SANTOS e SANTOS (2004), dentre outras. Para estes pesquisadores *o sangue é um tecido biológico que a qualquer momento pode tornar-se gel e a seguir sólido*. Apesar de parecer simplificar a transformação do sangue em gel com a expressão *a qualquer momento*, veremos, mais adiante, que, para a obtenção do plasma, é necessário um processo de centrifugação. Pelo fato de se apresentar na forma líquida, o sangue não possui uma forma definida. Quanto a sua constituição, há uma fase líquida (o plasma) e uma sólida composta por três séries celulares, a saber:

1. Eritrócitos ou glóbulos vermelhos;

2. Leucócitos ou glóbulos brancos;

3. Plaquetas ou trombócitos.

Todas as células do sangue periférico (fase sólida) navegam no plasma e migram para os tecidos para exercer suas funções. Elas são produzidas em todos os ossos, ou seja, na medula óssea vermelha.

### **1.1 - Micro-ambiente medular ou estroma medular**

Ele é formado basicamente formado pelos seguintes elementos:

#### **1.1.1 - Unidades Celulares**

São células-tronco ou *stem cell* que são mitoticamente pluripotentes e geram células de linhagens distintas. Na primeira diferenciação aparecem as Unidades Formadoras de colônias que têm receptores específicos para os fatores de crescimento/diferenciação e, dependendo do tipo de fator estimulador/diferenciador, darão origem às diferentes linhagens celulares sangüíneas, a saber:

#### **1.1.2 – Matriz extracelular**

Ela abriga várias substâncias, geralmente macromoléculas, produzidas por células estromais que promovem duas funções fundamentais:

- permitir que as moléculas de adesão ou receptores de membrana das células tronco provenientes da circulação periférica se fixem no estroma medular;
- promover a atuação e contato dos fatores de crescimento/diferenciação hemopoiéticos sobre os receptores de membrana.

A matriz extracelular possui as seguintes moléculas de adesão:

1. Fibronectina;
2. Colágeno;
3. Hemonectina;
4. Ácido hialurônico;
5. Laménina;
6. Glicosaminoglicanas.

## **1.2 - Plaquetas ou trombócitos**

Segundo LENHARO et al. (2004), as plaquetas são o resultado da fragmentação do citoplasma do megacariócito (célula produzida na medula óssea a partir da célula-tronco parenquimatosa). O amadurecimento do megacarioblasto origina o megacariócito (100  $\mu\text{m}$  de diâmetro). O citoplasma megacariócito amadurece e fragmenta. Cada fragmento corresponde a uma plaqueta. O megacariócito pode dar origem a até mil plaquetas (2 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro e espessura menor que 1  $\mu\text{m}$ ), com vida média de cerca de 10 dias.

As plaquetas obtêm energia do glicogênio abundante em seu citoplasma. Elas são anucleadas e têm citoplasma complexo cujas organelas são indispensáveis as suas funções. Estas organelas estão ligadas aos mecanismos de atividade trombotinâmica da coagulação, a saber:

- emissão de pseudópodes;
- adesividade interplaquetária;
- retração plaquetária;

- coágulo.

A plaqueta exibe ainda dois tipos de grânulos:  $\alpha$  e  $\beta$ . Os grânulos  $\alpha$  são responsáveis pela produção e liberação de PDGF. Estes grânulos contêm o fator plaquetário IV que participa dos fenômenos de coagulação do sangue e contêm ainda  $\beta$  tromboglobulina, fiminogênio e fatores de crescimento.

### **1.2.1 - Concentração plaquetária no sangue**

Há uma concentração, em média, de 150.000 a 300.000 plaquetas por  $\text{cm}^3$  de sangue. Quando esta concentração for superior a 350.000/ $\text{cm}^3$  ocorrerá uma alteração denominada trombocitose, podendo ter a incidência de trombos no exterior dos vasos. Por outro lado, quando o nível de concentração for inferior a 150.000/ $\text{cm}^3$  produzirá trombocitopenia, ocorrendo assim hemorragias. No que se refere às plaquetas envelhecidas, lesadas ou não-funcionantes é interessante observar que estas são removidas da circulação pelo baço, uma vez que perdem a função de ser os componentes básicos iniciais no processo de hemostasia, ou seja, a coagulação do sangue.

### **1.2.2 - Atividade Plaquetária**

Em condições normais o endotélio apresenta cargas elétricas negativas similares às das plaquetas, o que pode gerar um processo de repulsão entre essas duas estruturas. Quando esse equilíbrio entre o endotélio e as plaquetas cessa, por exemplo, pelo rompimento do vaso sangüíneo, ocorrerá a precipitação das plaquetas a fim de interromper a perda de sangue.

As plaquetas possuem capacidade de: adesão, ativação e agregação.

- Adesão → aderência no subendotélio vascular;
- Ativação → alteração da forma discoide para esférica com pseudópodes, o que possibilita maior contato entre elas;
- Agregação → resultado do acúmulo das plaquetas formando grumos e dando origem ao futuro coágulo.

As condições acima explicitadas também produzirão a degranulação, ou seja, a liberação do conteúdo dos grânulos  $\alpha$  (Fatores de crescimento). A seguir outras plaquetas reúnem-se às primeiras e formam um emaranhado que também aprisiona hemácias e leucócitos. É o primeiro elemento da hemostasia do organismo.

Segundo SLATER et al. (1995), durante o processo de granulação muitas proteínas são liberadas e dentre elas os fatores de crescimento, sendo destes os mais conhecidos: PDGF, VEGF, FGF, TGFB, EGF, IGF e BMP. Já para o pesquisador ANITUA et al. (2000), caso as plaquetas sejam empregadas como fontes exógenas de fatores de crescimento, passará a existir um reforço das concentrações já existentes, formando um estímulo adicional para as atividades celulares, potencializando o reparo local.

## **2 – Sobre os FC**

Como já elencamos os principais FC na introdução, apresentaremos, neste momento, uma cronologia das principais pesquisas realizadas a respeito dos FC para, em seguida, descrevermos e explicarmos cada FC separadamente. A

cronologia descrita abaixo foi tomada de LENHARO e MENDONÇA (2004).

Vejamos os principais pesquisadores:

- 1) LYNCH e colab. (1989): PDGF + IGF-I na regeneração periodontal de cães;
- 2) KNIGHTON (1990): plaquetas autólogas na cura de úlceras crônicas;
- 3) LYNCH et al. (1991): PDGF-b + IGF-I em torno de implantes com cães;
- 4) BECKER et al. (1992): membrana ePTFE + PDGF-bb/IGF-I em implantes com cães. 1- altas taxas de densidade óssea; 2 – dobro de crescimento ósseo.
- 5) GANIO et al. (1993): cura de úlceras crônicas com solução de Procuren;
- 6) RUTHERFORD et al. (1993): PDGF + dexametasona na regeneração periodontal em macacos;
- 7) GIANNOBILE et al. (1994): confirmaram in vivo os resultados de RUTHERFORD;
- 8) TAYAPONGSAK et al. (1994): adesivo de fibrina + osso medular;
- 9) SMITH, SUMMER, HOWELL et al. (1995 a 1997): PDGF, TGF-bs e IGF-s;
- 10) WHITMAN et al. (1997): gel de plaquetas;
- 11) LIND (1998): implantes + vários FC na melhora da cicatrização óssea;
- 12) MARX et al. (1998): enxertos ósseos autógenos resulta em regeneração duas vezes mais rápida e densidade óssea maior enxertos autólogos;
- 13) MARX e ANITUA (1999): técnica ambulatorial de extração do PRP;
- 14) MARX e GARG (2000): PRP estimula a consolidação e mineralização do enxerto na metade do tempo com 15 a 30% de ganho na densidade óssea.

## **2.1 – Principais FC**

### **2.1.1 – VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular**

Ele é produzido sobre três formas, a saber:

- a) VEGF 165 - grande poder vanulogênico e já está sendo experimentado clinicamente em doenças isquêmicas (ISWER, J. M. 1996, apud PONTUAL e MAGINI, 2004);
- b) VEGF- A 189 - ligado a heparina;
- c) VEGF- A 206 - ligado a heparina.

Quanto as suas funções, podemos destacar:

- 1) proliferação e migração das células endoteliais;
- 2) adaptação das integrinas aos receptores de VEGF;
- 3) promoção da diapedese através das células endoteliais;
- 4) produção de proteínas degradadoras da matriz extracelular;
- 5) facilitação dos processos migratórios.

### **2.1.2 – FGF - Fator de crescimento fibroblástico**

Seu peso molecular é entre 16 e 18 KDA. São identificados dezenove tipos de FGF, no entanto, só o FGF ácido (aFGF) e FGF básico (bFGF) são mais abundantes e estudados. Eles circulam ligados à heparina e são abundantemente liberados durante a injúria tecidual das cirurgias e traumatismos. São conhecidos quatro receptores para o FGF: FGF-R 1,2,3,4 (PARTANEN, J. et al.1992). Dentre as suas funções destacam-se:

- 1) potente fator mitogênico para endotélio, condrócitos, fibroblastos e músculo liso (ISWER, J. M.1996);
- 2) atua sobre a hematopoiese;
- 3) potente agente quimiotaxiador;
- 4) Ambas as formas de FGF estimulam a síntese de DNA e replicação de células *in vitro*, mas eles diminuem a atividade de fosfatase alcalina e não têm nenhum efeito estimulador direto em osteoblastos maduros. Ambos são estimulantes potentes de angiogênese, o que é importante para a invasão vascular do enxerto (LYNCH: 1991).

Os estudos de SCHLIEPHAKE et al. (1995) com FGF foram feitos em 4 *minipigs* da seguinte maneira: osso bovino poroso colocado subperiostealmente em ambos os lados da mandíbula. Em um lado associado a FGF. Verificou-se que ambos os lados foram preenchidos com osso.

Em 2002, TAKAYAMA et al. realizou pesquisas com FGF-2 no epitélio gengival e o seu efeito nas respostas proliferativas pelas células da gengiva epitelial (GE). Para tal estudo, foram isoladas GE humanas do epitélio gengival saudável e, o mRNA do FGF-2 e os receptores de FGF (FGFRs) foram examinados transcrição reversa em reação de cadeia de polimerase (RT-PCR). A distribuição do FGF-2 nos tecidos gengivais foi detectada pela análise imunohistológica usando o anticorpo monoclonal para o FGF-2 humano recombinante o qual foi recentemente designado como BF-2. Após, as respostas proliferativas das GE para o FGF-2 foram investigadas por método de mensuração. Os resultados mostraram que o uso de RT-PCR revelou que as células GE expressaram FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4 mRNA. Em seguida, análises *in vitro* revelaram

que FGF-2 aumentam as respostas proliferativas das células humanas GE. Além disso, o FGF-2 é ancorado nos espaços intercelulares do gengival por meio do heparansulfato e pode regular o crescimento e citodiferenciação das células GE através dos receptores específicos da célula-tipo.

### 2.1.3 – TGF $\beta$

Os fatores de crescimento de transformação  $\beta$  são uma super família de mediadores locais que regulam a proliferação e as funções da maioria das células dos vertebrados. Os membros dessa família (TGF $\beta$ 1 a  $\beta$ 5) são proteínas com estruturas e funções semelhantes. Outras proteínas sinalizadoras extracelulares podem mostrar semelhança estrutural com os TGF $\beta$ 5, tais como as ativinas e proteínas morfogenéticas dos ossos (MERAW et al, LEE, ROSEN, SPORN, TIPTON, apud BEZERRA, 2002).

As proteínas dessa família ativam a serina-tironina, proteinoquinases e receptores referidos como tipo I e II (HARALSON, HOLLINGUER, apud BEZERRA, 2002). As TGF $\beta$ 5 mais comuns no PRP são as TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2. Elas são fatores de crescimento e estão ligadas à cicatrização do tecido conjuntivo e regeneração do tecido ósseo (MARX). A estrutura  $\beta$  1 é encontrada com abundância nas plaquetas, nos linfócitos e neutrófilos, o tipo  $\beta$ 2 nos extratos ósseos, plaquetas e neutrófilos (ANITUA). Além desses tipos, observa-se ainda um tipo  $\beta$ 3 que é um heterodimer formado por uma cadeia de TGF $\beta$ 1 e  $\beta$ 2.

Dentre as funções do TGF, destacam-se, como as mais importantes a quimiotaxia e a mitogênese dos osteoblastos precursores, estimulando a formação

óssea. Prova disso é o fato de TGF $\beta$ 1 atingir o seu potencial quimiotático máximo a partir de 0,1ng/ml, enquanto outros FC só atingem o pico máximo após - 100ng/ml. Ainda assim, sua capacidade de estimular a quimiotaxia e a deposição da matriz óssea tem sido ratificada (BONEWALD e MUNDY, SPORN, apud BEZERRA, 2002).

#### **2.1.4 – BMPS**

As proteínas ósseas morfogenéticas são uma glicoproteína de baixa massa molecular cuja estrutura primária é de 40 a 50 % similar ao FC de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Sugere-se que as BMPS são membros da superfamília dos TGF $\beta$  (WOZNEY, 1994), identificadas por URIST (1972). Os TGF $\beta$ s são encontrados na matriz óssea em quantidades superiores às BMPs e são classificados como citocinas ao invés de morfogêneses. São identificadas mais 15 BMPs c / capacidade de induzir a formação óssea ectópica, diferentes das TGF $\beta$ . O trabalho de Marshal Urist em (1965) mostrou a capacidade osteoindutora da matriz orgânica de osso desmineralizado e liofilizado de coelho ao implantá-la no músculo e observar a formação de osso nesta região – neoformação óssea ectópica. As BMPs induzem a diferenciação de células-tronco e células mesenquimais indiferenciadas em células osteogênicas formadoras de osso. Essas proteínas são moléculas diméricas com as duas cadeias polipeptídicas mantidas e unidas através de uma simples ligação dissulfeto (AKAMATSU T. e MATSUDA, 1999, apud GRANJEIRO, 2004). Existem vários tipos de BMPs, até agora foram encontrados vinte e dois tipos.

A BMP1 não é incluída por se tratar de uma enzima, a proteinase, procolágeno envolvido no processamento proteolítico do colágeno maduro. Não é capaz de induzir formação óssea, além de causar efeito sinérgico se associada com outras BMPs. Quanto as BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6 e BMP-7 (OP-1: proteína osteogênica) são as que possuem capacidade osteoindutora e fazem parte da superfamília das TGF- $\beta$  (URIST et al. 1985, apud GRANJEIRO, 2004). A BMP-7 foi clonada na década de 1990 e estimula a proliferação celular, síntese de colágeno e diferenciação de osteoblastos.

Já a BMP3, conhecida como osteogenina, tem efeito inibidor da osteogênese. Por ser a mais abundante das BMPs no osso desmineralizado com uma abundância em torno de (65%), provavelmente, a BMP3 desempenha papel essencial como moduladora da atividade osteogênica de BMPs *in vivo*. Isso impõe a necessidade de determinar o conteúdo de BMP3 quando BMPs exógenas são utilizadas para acelerar a reparação óssea. O potencial osteogênico de BMPs será aumentado pela inibição da ativação de antagonistas. Por outro lado, a BMP3 poderá ser utilizada na terapia de patologias caracterizadas pela hipermineralização óssea, conforme explica GRANJEIRO et al., 2004. Finalmente, a BMP-8 (OP-2 Proteína Osteogênica 2) é encontrada durante a embriogênese.

De acordo com REDDI, (1996) as BMPs são moléculas pleiotrópicas que são envolvidas na quimiotaxia, mitose e diferenciação de células mesenquimais no tecido ósseo. Depois da quimiotaxia de monócitos e células mesenquimais a diferenciação celular acontece. As células mesenquimais proliferam e se diferenciam em condrócitos que, em seguida, hipertrofiam-se. Eles sofrem morte

celular e são então substituídos por osso. O ambiente criado com a presença das BMPs determina o tipo de tecido produzido. Em um local heterotópico, o BMP-3 ou BM-7 produzem cartilagem. No periodonto, eles produzem cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Em áreas craniofaciais eles produzem o osso intramembranoso.

As células-alvo para BMP atuar são:

- células mesenquimais: diferenciação em osteoblastos;
- osteoblastos: rápida diferenciação;
- condroblastos: induzem diferenciação via endocondral;
- mioblastos: inibe a miogênese e diferenciação;
- fibroblastos: induz a atividade da fosfatase alcalina;
- neuronais: apresentam receptores para BMPs.

#### **2.1.4.1 – Resposta imune à BMP**

Não são completamente conhecidos ou bem definidos a resposta imune frente às BMPs. Parece que a aplicação de BMP e proteínas não colagênicas alogênicas promove uma resposta imune moderada a qual será maior quando com a BMP xenogênica. Estudos demonstraram que não houve produção de anti rh BMP após a implantação em defeitos de mandíbula em cães (TORIUMID, M. et al. 1991). No entanto, há necessidade de mais estudos para melhor entender sobre a resposta imune à BMP.

#### 2.1.4.2 – BMP Purificada x Recombinante

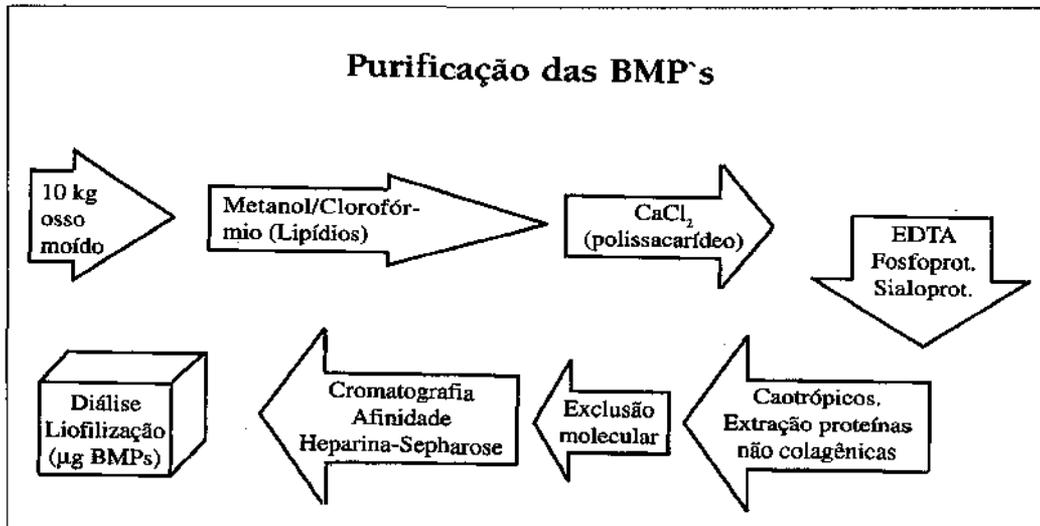
As BMPs podem ser purificadas a partir de ossos de diferentes animais, uma vez que demonstram extensa homologia estrutural e funcional. A purificação apresenta baixíssimo rendimento (1kg de osso → µg de BMP)<sup>4</sup>. Atualmente foi possível clonar BMPs em grande quantidade (JEPSEN et al. 1997, apud GRANJEIRO, 2004). Contudo, a capacidade osteoindutora de BMPs recombinantes (rh BMP) é menor em relação àquelas purificadas.

Em suas pesquisas, BESSHO et al. (1996), apud GRANJEIRO (2004), verificaram, por meio do conteúdo de  $CA^{+2}$ , que o aspecto radiográfico e a maturação do tecido ósseo ectópico formados no músculo de ratos são significativamente maiores, cerca de 10 vezes, quando se utiliza a BMP bovina purificada (purificada x recombinante). As hipóteses para tal afirmação são baseadas nos seguintes fundamentos:

- a) diferenças na seqüência de aminoácidos (BESSHO, K.,1996);
- b) necessidade de diversas BMPs recombinantes em grande quantidade para que seja possível o reparo;
- c) analisar o tipo de carreador utilizado.

---

<sup>4</sup> Ver figura abaixo retirada de Granjeiro et al. 2004:109.



#### 2.1.4.3 – Aplicações Clínicas Odontológicas da BMP

As especialidades clínicas abaixo demonstram o extenso uso da BMP:

- levantamento do seio maxilar (MARGOLIN et al: 1998 e TERHEYDEN, 1999);
- aumento de crista óssea para colocação de implantes (BARBOZA, 2000);
- defeitos intra-ossos de três paredes (em cães) (CHOI, S. H. et al. 2002);
- furca III com uso de rh BMP-7 (GIANOBILLE et al. 1998);
- furca II - observaram ganho de ligamento periodontal clinicamente após seis meses de tratamento cirúrgico (CAMARGO, 2002);
- capeamento pulpar - induz formação de barreira mineralizada em polpa, ou seja, diferenciação de células da polpa em odontoblastos (NAKASHIMA, 1994). JEPSEN et al. (1997) verificaram formação de barreira dentinária maior que o tratado com Ca (OH)<sub>2</sub>.

### 2.1.5 – PDGF

É um dos primeiros FC a ser identificado. Na ferida (liberado dos grânulos  $\alpha$  plaquetário) ele guia a revascularização, a síntese de colágeno e a regeneração óssea, conforme nos explicam (MATSUDA et al. 1992). Também atua em grande número de células (fibroblastos, células musculares e neurogliais, células ósseas, etc). Dessa forma, é classificado como de ampla especificidade (CANALIS, LYNCH, 1989). ANITUA denomina o PDGF como sendo uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 30kd e estrutura formada por duas cadeias básicas de aminoácidos A e B. Essa estrutura dimérica, com dois sítios de ligação do receptor, permite a união com receptores adjacentes para iniciar o processo de sinalização celular. Os receptores alfa ligam-se às cadeias A e B, enquanto que os receptores  $\beta$  ligam-se somente às cadeias B. Talvez, por isso, a cadeia A tenha papel mais importante nas fases iniciais da cicatrização. Apresenta três isoformas: PDGFAA, PDGFBB, PDGFAB.

O PDGF dispõe-se em pequenas quantidades, algo em torno de 0,06 mg de DDGF/ um milhão de plaquetas, mas atua como importante mitogênico para a citodiferenciação e cicatrização das feridas (CHAI, GREEN, RUTHERFORD, apud BEZERRA, 2002). Embora estável com calor, este FC pode sofrer influência da microbiota local. Segundo MATSUDA (op. cit) em concentrações de 20  $\mu$ g/ml de *Porphiromonas gingivalis* (Pg) ocorre redução da resposta mitogênica das células do ligamento periodontal. Nos fibroblastos deste ligamento é onde promove o aumento da proliferação e da capacidade de aderência dos mesmos (MATSUDA,

GAMAL, HAASE, apud BEZERRA, 2002). Nos osteoblastos há o estímulo para a ação mitogênica e de quimiotaxia (JIANG, LIND, apud BEZERRA, 2002).

Ademais, o PDGF pode estimular a produção de várias moléculas da matriz extracelular como fibronectina, colágeno, colagenase, proteoglicanos e ácido hialurônico. Estes elementos são importantes nos estágios posteriores à cicatrização de lesões (BAUER, CLARK, apud BEZERRA, 2002).

Para que o PDGF atue na regeneração é necessário:

- 1) Estar presente no local da lesão;
- 2) As células na área de regeneração expressem receptores de PDGF.

#### **2.1.5.1 – Aplicação clínica do PDGF**

Os estudos de ROBSON et al. (1992) observaram redução em tamanho de úlceras tratadas com PDGF-BB recombinante humano após 28 dias de aplicação. As lesões tratadas com PDGF mostraram um aumento da granulação e tecidual, rica em fibroblastos e glicosaminoglicanas. Elevou-se também o nível de repitelização e neovascularização: assim o PDGF não altera a seqüência normal do reparo, mas aumenta a eficiência do processo. PIAZUELO et al. (2000) observaram o aumento da proliferação de fibroblastos induzido pelo PDGF BB. Nas pesquisas realizadas por (COHEN, EMBIL) o PDGF BB foi encontrado aumentando a regeneração em pacientes com diminuição da capacidade de regeneração, tais como os diabéticos.

Diante disso, podemos concluir que o uso do PDGF na periodontia e implantodontia pode ser um novo aliado para a regeneração tecidual. No entanto, ainda são necessários mais estudos para melhor avaliarmos sua eficácia ou

possíveis riscos, pois como afirma OKUDA et al. (2003), *as concentrações de PDGF e TGF- $\beta$  ainda não foram especificamente determinadas e os efeitos biológicos do PRP nos níveis celular e molecular ainda não foram determinados.*

#### **2.1.6 – EGF**

Esse FC é encontrado em maior abundância nas glândulas salivares e na urina. Também tem sido isolado no cérebro, na medula espinhal e no líquido amniótico. Suas funções são: estimulação da síntese de DNA, crescimento celular em vários tipos de células, incluindo as de origens epitelial, endotelial e mesodérmica. Ainda estimula a produção de prostaglandina e reabsorção óssea em culturas de células ósseas da calvária de ratos neonatais.

Segundo o estudo de MATSUDA et al. (1992) esse FC gerou resposta mitogênica moderada em fibroblastos do ligamento periodontal. Já no estudo de CHO et al. 1994, esse FC não mostrou significativo potencial mitogênico e quimiotático em fibroblastos do ligamento periodontal.

A pesquisa de CHAO et al., apud SAYGIN et al. (2000), investigou o papel do EGF na diferenciação de cementoblastos. Os pesquisadores demonstraram que durante a diferenciação dos cementoblastos um nível muito baixo de ligação do EGF presente nas células mesenquimais do próprio folículo dental, precementoblastos e cementoblastos indicaram um efeito limitado do EGF na diferenciação cementoblástica. Entretanto, preosteoblastos, precondroblastos, células periféricas do folículo e fibroblastos maduros do ligamento periodontal exibiram o EGF de ligação *in vivo*. Concluíram, então, que a interação entre EGF e

EGF de ligação não está envolvida diretamente nas atividades do cementoblastos, mas outros estudos indicaram que o EGF associado a outras células é importante para o desenvolvimento do dente e do periodonto.

### 2.1.7 – IGFs

É um FC secretado pelos osteoblastos durante a formação óssea para aumentar a osteogênese e acelerar a disposição óssea (CANALIS, HOCK, HOWEL, GIANNOBILE, apud BEZERRA, 2002).

Conforme nos explica SOARES et al. (2004), em 1976, RINDERKNECHI e HUMBLE, propuseram este nome - IGF – em razão da similaridade estrutural dessas substâncias com a cadeia insulínica e as suas propriedades biológicas de aumento da síntese de DNA, RNA e proteínas e aumento de taxa de crescimento de fibroblastos *in vitro*. De acordo com CLEMMONS (1989), apud BEZERRA (2002), a estrutura do IGF é muito semelhante à da proinsulina, mas com diferenças funcionais.

Os níveis de insulina, por exemplo, variam bastante devido à ingestão de carboidratos e estimulam o transporte e os processos metabólicos da glicose, enquanto o IGF apresenta níveis mais estáveis no sangue, uma vez que circula ligado às proteínas carreadoras e estimula a replicação celular. A insulina e o IGF têm receptores celulares de superfície estruturalmente distintos.

Existem dois tipos: IGF I e IGF II. Eles são relativamente pequenos, com massas moleculares de aproximadamente 7,7 para o primeiro e 7,5 para o segundo, respectivamente (MARX). Tanto IGF-I e IGF-II estimulam a síntese de colágeno. O primeiro em uma concentração de 10nM; já o segundo em 30nM,

conforme explicam MCCARTHY et al. (1989), apud FILHO et al. (2004). Além da ação do IGF-I sobre osteoblastos foram constatados efeitos desse FC sobre os osteoclastos, havendo reabsorção de forma direta e indireta (MOCHIZUKI et al. (1992), apud FILHO et al. 2004).

Os IGFs são mitogênicos para as células de linhagem osteoblástica e estimuladores da osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados já existentes, podendo atuar de forma autócrina ou parácrina (MOCHIZUKI et al. (1992), apud BEZERRA, 2002. Esta capacidade mitogênica quando avaliada sobre as células do ligamento periodontal é dez vezes menor que a do PDGF, pois o IGF I só atinge o máximo de seu efeito mitogênico em concentrações maiores que 10.000 ng/ml (MATSUDA). De acordo com JIANG (1999), apud BEZERRA, (2002), o IGF tem capacidade de absorção dez vezes maior que o PDGF $\beta$  mostrando-se importante para anabolismo ósseo. Diversos estudos sugerem que IGFs quando combinados com outros FC podem aumentar a osteogênese em processos cicatriciais (GIANNOBILE).

As pesquisas realizadas – KAAKS et al. (2000); MA J. et al. (1999); RENEHAN et al. (2000), apud SOARES et al. (2004) – demonstraram que o IGF, juntamente com o hormônio de crescimento humano (h GH), exerce papel fundamental no crescimento das crianças devido as suas funções proliferativas e de síntese. Mas, pelo fato de encontrar-se em altas concentrações sorológicas da infância até a adolescência, alguns estudos, no entanto, demonstram que quando IGF-I é encontrado em concentrações sorológicas elevadas na idade adulta, isso

pode fazer com que haja um aumento do risco de ocorrência de câncer de mama, de próstata e, principalmente, do câncer colorretal.

No ligamento periodontal o IGF tem as seguintes ações, a saber: a) ação quimiotática sobre as células; b) ação sobre a mitogênese e, c) síntese de proteínas *in vitro* (MATSUDA et al. 1992). Quando associado ao PDGF-BB, o IGF aumenta ainda mais os efeitos sobre proliferação dos fibroblastos do ligamento periodontal. Há também pesquisas que descrevem a presença de receptores de superfície para IGF-I na superfície de células do ligamento periodontal de ratos (BLOM, S. et al. 1992).

No primeiro estudo sobre a ação de FCs sobre cementoblastos foram analisados os efeitos de três FCs (IGF-I, PDGF-BB e TGF-B) *in vitro* e *in vivo* (reimplante das células após o tratamento com os FCs). Os resultados demonstraram que os FCs influenciaram a proliferação e o perfil de expressão genética fenotípica do potencial de biomineralização dos cementoblastos (SAYGIN, N.E. et al. 2000).

#### **2.1.8 – CGF**

Segundo SAYGIN et al. (2000) o cimento tem uma composição bioquímica semelhante ao osso. Em sua composição orgânica estão presentes os FC, tais como: BMP, PDGF, FGF, TGFh, PTH e IGF-I. Estes FC desempenham um importante papel na diferenciação, migração, proliferação e mineralização celular. As moléculas presentes exclusivamente no cimento são: a) CGF – FC do cimento - que é semelhante ao IGF-I e tem como função síntese de matriz orgânica e atuam como quimiotáticos para cementoblastos; b) CAP – proteína de

adesão do cimento – que promove a adesão das células produtoras de matriz mineralizada. As tabelas<sup>5</sup> abaixo mostram algumas importantes moléculas identificadas no cimento e sua ação.

<b>Moléculas</b>	<b>Atividade biológica</b>
<b>IGF-I</b>	Proliferação, diferenciação, síntese de matriz
<b>FGF</b>	Proliferação, diferenciação, síntese de matriz, angiogênese
<b>PDGF</b>	Proliferação, diferenciação, síntese de matriz
<b>TGF-β</b>	Síntese de matriz, angiogênese, quimiotaxia
<b>BMPs</b>	Síntese de matriz, diferenciação, formação óssea
<b>EGF</b>	Proliferação, diferenciação
<b>CGF</b>	Proliferação, diferenciação

<b>Componentes da matriz</b>	<b>Atividade biológica</b>
<b>Colágenos</b>	Adesão celular, diferenciação, regula proliferação
<b>BSP</b>	Adesão celular, diferenciação, mineralização
<b>OPN</b>	Adesão celular, regula diferenciação e sobrevivência
<b>Fibronectina</b>	Adesão celular, diferenciação, regula proliferação
<b>Osteonectina</b>	Regula angiogênese, diferenciação e proliferação
<b>CAP</b>	Adesão celular, diferenciação

BSP – bone sialoprotein  
 OPN – osteopontin  
 CAP – cementum attachment protein

Em 1998, a proteína de adesão do cimento (CAP) era ainda pouco conhecida, mas revelava-se mais eficiente para a adesão de células ósseas alveolares (ABC) e células do ligamento periodontal (PLC) que os fibroblastos gengivais (GF). Isso motivou BAR-KANA et al. (1998) a realizar um estudo para determinar a capacidade das células humanas derivadas do periodonto de ligar e liberar CAP e também de relacionar essas propriedades com sua capacidade de

<sup>5</sup> Tabelas elaboradas por GRZESIK e NARAYANAN (2004)

liberar fosfatase alcalina (AIP) e formar tecido mineralizado (MTF). ABC, PLC e GF foram testados e, células estromais da medula óssea (SBMC) e células derivadas do cementoma (CC) serviram como controle. Através da histoquimiometria e imunoquimiometria, foi observada a maior expressão de CAP na CC, seguida pela PLC e ABC em ordem decrescente, enquanto que SBMC e GF não expressaram CAP. SBMC manifestou a maior capacidade de ligação de CAP seguida de CC, ABC, PLC e GF. As manifestações de MTF e AIP foram consideráveis em SBMC, seguida pela ABC, PLC e CC. Concluindo, os resultados gerais indicaram que a secreção e adesão do CAP não estão relacionadas. Quanto à manifestação do CAP, esta é restrita as células do periodonto com um potencial de formação de tecidos mineralizados.

PITARU et al. (2002) pesquisaram a relação entre BMP2 e CAP. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da BMP2 na manifestação de CAP e de progenitores clonados do ligamento periodontal (PL). O efeito da BMP2 na manifestação de CAP na diferenciação de progenitores clonados de fibroblastos (Fb) e formação de tecido mineralizado (MTF) foi testado pela fosfatase alcalina e pela imunoquimiometria para determinar a capacidade de ligação desses clones no CAP. Os clones não tratados de fibroblastos foram negativos em todos os testes e revelaram baixa capacidade de ligação para o CAP. Os clones não tratados de MTF foram positivos em todos os testes e revelaram alta capacidade de ligação para o CAP. A BMP2 aumentou o potencial de ligação do CAP tanto dos clones de Fb quanto dos MTF; induziu a manifestação de CAP nos clones de Fb e aumentou a manifestação de CAP nos clones de MTF. Pela primeira vez, os resultados indicaram que a BMP2 pode recrutar progenitores para os cementoblastos e

regular a diferenciação destes pela indução e aumento da manifestação de CAP por meio de um regulador celular de linhagem específica. Além disso, os resultados sugeriram que as linhagens de MTF e Fb podem originar, mais rapidamente, de uma célula progenitora comum.

Recentemente, ZHAO et al. (2004) realizaram um estudo para avaliar a habilidade dos cementoblastos e das células do folículo dental em promover a regeneração periodontal. O método utilizado em 12 ratos foi desnudar a face vestibular da raiz distal do molar de seu ligamento periodontal, cimento e dentina superficial através de uma janela óssea criada bilateralmente. Os defeitos tratados foram divididos em três grupos: a) somente carreador – esponjas de polímeros; b) carreador mais células foliculares; c) carreador mais cementoblastos. No primeiro caso, após três semanas de realização da cirurgia, os defeitos histológicos indicaram partículas de esponjas de polímeros, tecido fibroso e novo osso disperso e formado na área de defeito. No segundo caso, houve uma aparência similar, mas com uma menor formação óssea. No terceiro caso, por outro lado, notaram tecidos mineralizados no lugar da cicatrização com extensão em relação à superfície da raiz, no ligamento periodontal e lateralmente além da face vestibular que envolve o osso. Enfim, o estudo piloto demonstrou que os cementoblastos têm uma considerável habilidade para induzir a mineralização nas feridas periodontais quando utilizadas as esponjas de polímeros como carreadores. Já as células implantadas no folículo dental parecem inibir a cicatrização periodontal. Os resultados confirmaram que os comportamentos seletivos de diferentes células tipos *in vivo* podem auxiliar o papel dos

cementoblastos como uma ferramenta para melhor entender a regeneração periodontal e a cementogênese.

## 2.2 – Associação dos FC

Conforme nos explica HAYASHI (2004) a associação dos FC demonstra sinergismo quando aplicados em defeitos periodontais. Isso pode promover ganhos na regeneração periodontal. No primeiro quadro<sup>6</sup> a seguir podemos perceber o efeito dos FC nas células do ligamento periodontal; no segundo pode-se notar o efeito dos FC nas células osteoblásticas.

Efeito nas células do ligamento periodontal

FC	Proliferação	Produção de matriz	Quimiotaxia
<b>BMPs</b>	0	?	?
<b>βFGF</b>	+++	?	+++
<b>EGF</b>	+	+	0
<b>IGF-I</b>	+	+	++
<b>PDGF-BB</b>	+++	++	++
<b>TGFβ</b>	++	++	+

Legenda:

- inibitório

0 sem efeito

? efeito desconhecido

+ estímulo leve

++ estímulo moderado

+++ estímulo grande

<sup>6</sup> Quadros elaborados por SAYGIN et al. 2000.

### Efeito da atividade osteoblástica

FC	Proliferação	Prod. de matriz	Quimiotaxia	Diferenciação
BMPs	+	++	++	+++
$\beta$ FGF	+++	+/-	0	-
EGF	+	0	0	?
IGF-I	+	++	++	+
PDGF-BB	+++	+/-	++	-
TGF $\beta$	++/-	++	++	+/-

Dois destes fatores de crescimento, o PDGF e IGF, têm sido usados em associação de estudos que visam a regeneração periodontal, pois apresentam melhores resultados em termos de aumento de tecido conjuntivo, conteúdo e maturação do colágeno, espessura e diferenciação epitelial normais, além de ausência de reação inflamatória exorbitante.

#### 2.2.1 – Estudo em animais

Para testar tal hipótese, LYNCH et al. (1989) realizaram um estudo em três cães com defeitos periodontais naturais, nos quais, após a elevação de um retalho total e debridamento, cinco pré-molares receberam 75  $\mu$ m de gel inerte com 1  $\mu$ m de PDGF e IGFI (teste). Outros sete pré-molares receberam 75  $\mu$ m do gel sem os fatores (controle). Os resultados demonstraram que, no grupo controle, havia epitélio periodontal longo e, no grupo teste, novo osso e novo cimento.

Em outra pesquisa, LYNCH et al. (1989) fizeram estudos em treze cães utilizando o PDGF-B/IGFI em gel metil-celulose (teste) ou apenas o gel (controle). Após duas semanas, a porcentagem de formação de novo aparato de inserção (osso-ligamento periodontal-cimento funcionais) foi de 1,5 % e 30,9 % para os

grupos controle e teste, respectivamente. Em cinco semanas de 6,9 % e 40,6 %, respectivamente.

RUTHERFORD et al. (1993) estudaram a aplicação do PDGF associado à dexametasona e matriz colágena no tratamento de lesões periodontais produzidas experimentalmente em primatas por meio de histomorfometria. Após 4 semanas do debridamento das lesões e uma única aplicação da mistura, constatou uma regeneração periodontal e crescimento ósseo alveolar vertical em áreas interdentais.

KIM et al. (2002) compararam, em cães a eficácia da associação PRP mais osso desmineralizado no reparo de defeitos ósseos criados em implantes ósseo-integrados instalados na crista ilíaca. Concluíram que a associação promoveu maior formação óssea.

GIANNOBILE et al. (1996) estudaram a utilização de PDGF-BB e IGF-I separadamente ou em associação em defeitos periodontais de macacos. Para o PDGF- BB todos os parâmetros foram maiores que no controle, mas apenas a porcentagem de nova inserção alcançou diferença estatisticamente significativa em doze semanas. O IGF-I apresentou apenas mudanças modestas em todos os parâmetros. Quanto à associação PDGF-BB/IGFI, todos os parâmetros deste grupo tiveram aumentos estatisticamente significantes em relação ao controle, após quatro semanas. Em doze semanas, no grupo PDGF-BB + IGF-I, todos os parâmetros avaliados foram superiores em relação ao controle.

Entretanto, diferenças estatisticamente significantes entre o grupo teste e controle ocorreram apenas na porcentagem de nova inserção (180 %) e na porcentagem de preenchimento ósseo (193 %).

### 2.2.2 – Estudos *in vitro*

No que se refere a estudos *in vitro*, NISHIMURA & TERRANOVA, em 1996, apud HAYASHI (2004), avaliaram a resposta quimiotática sobre fibroblastos do ligamento periodontal e tecido conjuntivo após a aplicação de PDGF IGF e o fator específico de crescimento químico tático isolado de células do ligamento periodontal humano. Os pesquisadores concluíram que todos os fatores são capazes de promover quimiotaxia, mas só o fator quimiotático específico do ligamento periodontal foi capaz de fazer migrar as células advindas do ligamento e não do tecido conjuntivo.

GIANNOBILE et al. (1997) avaliaram a utilização de IGFI associado a outros FC (TGF BI, o bFGF e o PDGF-BB), aplicados em cultura de células ósseas bovinas. Os resultados demonstraram que o PDGF-BB, assim como o IGFI, aumentou a síntese de colágeno, sendo IGF-I mais efetivo que PDGF. A combinação entre os dois fatores foi a que mais estimulou a síntese protéica, entretanto, para os autores, este efeito pode ter sido devido ao aumento do número de células, o que aumentaria a síntese geral.

STRAYHOR et al. (1999) estudaram a aplicação de um extrato bovino contendo somente BMPs ou em combinação com o PDGF ou IGF ou a associação PDGF / IGF, sobre células osteoprogenitoras. Os grupos controle foram um meio de cultura com soro fetal bovino (FBS 2 % - controle negativo), outro com FBS 2 % mais ácido ascórbico e glicerofosfato (controle veículo) e um último contendo FBS 10 % mais ácido ascórbico e glicerofosfato (controle positivo). As doses testadas para o PDGF, IGFI e extrato bovino foram de 1,0 ou 20ng/ml cada. Quando comparado ao controle negativo, o PDGF aumentou o número de células em

doses de 10 e 20 ng/ml. O IGF-I não apresentou diferenças significantes e o extrato bovino em doses de 10 e 20ng/ml diminuiu o número de células. O PDGF bloqueou a expressão gênica do IGF, mas não a do extrato bovino.

PFEILSCHIFTER, J. et al. (1990) concluíram que a oposição de matriz óssea foi maior quando combinaram três fatores de crescimento simultaneamente ao meio de cultura (IGF-I, PDGF, IGF- $\beta$ ), sugerindo que estes fatores podem potencializar um ao outro quanto ao estímulo e à formação óssea.

SANT'ANA, (2001) concluiu que a associação dos FCs obteve melhores resultados quanto à adesão dos fibroblastos do ligamento periodontal às superfícies radiculares *in vitro*, enquanto o TGF- $\beta$ 1, seguido pela combinação dos três FCs (PDGF-BB, IGF-I e TGF- $\beta$ 1), apresentou melhores índices de proliferação dos fibroblastos em cultura após cinco dias.

### 2.2.3 – Estudos em humanos

Quanto aos estudos em humanos HOWELL et al. (1997) realizaram estudo em trinta e oito pacientes com defeitos ósseos bilaterais (furca II ou angular) e testaram a segurança do uso de FC recombinantes humanos (rh). Os grupos foram divididos da seguinte forma:

Grupo Teste 1: rh PDGF-B e rh IGF-I 50  $\mu$ g/ml + gel de metilcelulose;

Grupo Teste 2: rh PDGF- B e rh IGF1 150  $\mu$ /ml + gel de metilcelulose;

Controle 1: gel de metilcelulose;

Controle 2: cirurgia periodontal convencional (RAR).

Os resultados, após seis meses, demonstraram que não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com a menor dose dos fatores de crescimento e os grupos controle. Porém, após nove meses, encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo teste e o controle nos seguintes aspectos:

- 1) Altura óssea: ganho de 0,75mm para grupo de controle e 2,08mm para o grupo teste;
- 2) Preenchimento ósseo: 18,5 % para grupo controle e 42,3 % para grupo teste;
- 3) Tecidos moles: Ambos apresentaram ganho de nível clínico de inserção, porém sem diferenças estatisticamente significantes entre si;
- 4) Avaliação da saúde do paciente: não foram detectados anticorpos para os FC e sem alteração local ou sistêmica.

Ainda sobre o sinergismo entre as duas substâncias (PDGF/IGF) ainda não está totalmente esclarecido. Segundo os estudos *in vitro*, aparentemente, o PDGF estaria mais relacionado ao estímulo da proliferação e o IGF ao aumento da síntese de matriz (GIANNOBILE et al. 1997 e STRAYHORN et al. 1999). Também seriam importantes o efeito quimiotático de ambos em relação aos fibroblastos (NISHIMURA e TERRANOVA, 1996, apud HAYASHI, 2004) e o aumento da adesão de fibroblastos à raiz (GAMAL et al. 1998). Agindo sobre o cementoblastos, o PDGF parece estimular a proliferação, enquanto que o IGF teve efeitos positivos sobre a formação de matriz mineral e mineralização sendo que o

PDGF inibiu tais eventos, conforme demonstraram SOMMERMAN et al. (1999) e SAYGIN et al. (2000).

No que se refere à utilização da associação PDGF/IGF, esta apresenta potencial para promover regeneração periodontal, porém, em humanos não está claro se estes estudos são clinicamente significantes. Isso demonstra que novos estudos devem ser realizados sobre esta associação para que possamos ter conclusões mais consistentes a seu respeito.

O recente estudo de OKUDA et al. (2003) demonstrou que o PRP possui uma boa concentração de PDGF e TGF- $\beta$ . Para tal estudo obtiveram PRP de vinte sujeitos saudáveis. Isolado o plasma, por meio de centrifugação, este foi avaliado nos níveis de PDGF-AB e TGF- $\beta$ 1. Os efeitos biológicos do PRP foram avaliados nas células osteoblásticas, epiteliais, fibroblásticas e do ligamento periodontal. Os resultados mostraram que a concentração de plaquetas foi de  $70.9 \times 10^4$  células por  $\mu$ l; os níveis de PDGF-AB e TGF- $\beta$ 1 foram de 182.0 ng/ml (440.6%) e 140.9 ng/ml (346.6%). Quanto ao PRP, este estimulou a síntese osteoblástica do DNA e a divisão celular. Constataram, ainda, um estímulo da síntese do DNA nos fibroblastos gengivais e nas células do ligamento periodontal. Finalmente, os dados demonstraram que tanto o PDGF-AB quanto o TGF- $\beta$ 1 foram altamente concentrados nas preparações de PRP.

### 3 – Plasma rico em plaquetas – PRP

A terminologia usada é a seguinte: plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas e gel de plaquetas.

De acordo com RYAN (2001), apud ANDRIOLO (2002), o sangue humano de um indivíduo adulto normal contém, por mm<sup>3</sup>, aproximadamente, de 4,1 a 5,1 milhões de eritrócitos, 4,4 a 11,3 mil leucócitos e de 172 a 450 mil plaquetas. Na fase líquida, denominada plasma, estão dissolvidas as proteínas circulantes, os lípidos, sais minerais, proteínas, nutrientes e produtos do metabolismo orgânico.

O PRP é definido como sendo um líquido formado por água e proteínas, tais como: albumina, globulina, fibrinogênio e protrombina (ver a proporção no quadro abaixo). As duas últimas, juntamente com as plaquetas, são importantes na coagulação. É um produto derivado do processamento laboratorial do sangue autógeno, coletado no período pré-operatório e rico em FC originários dos grânulos  $\alpha$ -plaquetários.

No que diz respeito à distribuição das proteínas do plasma temos o seguinte:

Água	91g %
Proteínas totais	0,7g%
Albumina	4,5g %
Globulinas	2,5g %
Fibrogênio	0,3g %

Quanto às vantagens de utilização do PRP, podemos citar:

- a) acelera o crescimento e a maturação óssea;
- b) aumenta a estabilização do enxerto – barreira mecânica;
- c) promove a adesão tecidual na ferida;
- d) promove a cicatrização tecidual da ferida;
- e) potencializa a hemostasia;
- f) facilidade de obtenção e fabricação, pois não necessita de banco de sangue;
- g) baixo custo e seguro;
- h) baixo grau de desconforto para o paciente;
- i) quimiotaxia;
- j) estimulação da mitogênese;
- k) diferenciação celular.
- l) modelagem do enxerto;
- m) presença de FC.

A respeito das indicações do PRP na odontologia, elas abrangem várias áreas, como: implantes dentais, defeitos periodontais, enxertos ósseos em bloco e particulados, selamento de perfuração da membrana do seio, levantamento do seio maxilar, laterização do nervo alveolar inferior, comunicação buco-nasal, hemostasia de sítios de doadores de enxertos, substituto de enxertos ósseos, regeneração de alvéolos após extração, regeneração após apicetomia e regeneração ao redor de implantes.

Na medicina é um potente agente na cicatrização tecidual, podendo ser usado na cirurgia cardíaca e plástica, neurocirurgia, feridas crônicas, ortopedia e

traumatologia. Além dessas áreas há ainda o uso na oftalmologia, urologia, dentre outras.

Segundo HEATON et al. (1997), apud ANDRIOLO (2002), o sangue a ser centrifugado, para a obtenção do plasma, pode ser fracionado em seus componentes celulares principais. Os eritrócitos se localizam na porção mais inferior do tubo e logo acima se forma uma camada intermediária onde se localizam os leucócitos e plaquetas maiores. O terço superior do plasma é pobre em elementos celulares, mas na região imediatamente acima dos leucócitos, forma-se uma nuvem onde se concentram as plaquetas integras e muitas das proteínas plasmáticas.

MARX (1999) fez estudos comparando plaquetometrias realizadas no PRP com contagens feitas no sangue periférico de 44 pacientes. Os resultados da pesquisa apontaram uma concentração 3 vezes superiores em média. Quando as plaquetas foram contabilizadas em esfregaços de sangue, o PRP demonstrou um aumento de 900% sobre o número inicial contado no mesmo esfregaço.

Segundo MARX et al. (1999), acreditam que essa acentuada concentração plaquetária seja capaz de ampliar a ação dos fatores de crescimento liberados dos grânulos  $\alpha$  das plaquetas. Isso ocorre no momento de fragmentação dessas células para que se possa iniciar a atividade das células ósseas indiferenciadas de forma mais completa do que normalmente ocorreria no enxerto e na área de coagulação. O reparo ósseo que já ocorria naturalmente passará, com o PRP, a ter um acréscimo qualitativo e quantitativo em tempo menor. O PRP, adicionado ao enxerto, tem apresentado prematura consolidação e

mineralização do enxerto na metade do tempo, com 15 a 30 % de ganho efetivo na necessidade de osso trabecular.

Segundo ROSENBERG e TOROSIAN (2000 apud ANDRIOLO, 2002), a concentração de plaquetas pode chegar até 338 % que a encontrada no sangue total. Este material regenerado, rico em proteínas, pode ser combinado com um material de enxerto ósseo apropriado e, assim, possibilita a formação óssea ótima no sítio de enxerto.

Para LYNCH et al (1989), os fatores de crescimento promovem um rápido aumento de número de células indiferenciadas no sítio cicatricial durante o tempo de reparo ou regeneração, pois a proporção de células mesenquimais para células estruturais da medula é de aproximadamente:

1: 100.000 no adolescente;

1: 250.000 na idade de 35 anos;

1: 400.000 na idade de 80 anos.

Assim sendo, a vantagem na aplicação clínica do PRP é a aceleração do reparo ósseo pelo aumento da quantidade de todos os fatores de crescimento presentes nas plaquetas humanas (ver quadro a seguir)<sup>7</sup>. De acordo com MARX (2004) o ideal é a obtenção de pelo menos 4 vezes a concentração basal de plaquetas, ou seja, em torno de 1.000.000 de plaquetas.

---

<sup>7</sup> Retirado de um panfleto informativo sobre Fator de Crescimento Autólogo produzido pela UNICELL biotecnologia e HARVEST.

Volume Sangue (ml)	Volume de FC autólogo (ml)	Aumento acima da linha basal	Fatores de crescimento			
			PDGF-AB	TGF- $\beta$ I	VEGF	EGF
20	3	4.4x	4.4x	4.4x	4.4x	4.4x
60	7	6.6x	6.6x	6.6x	6.6x	6.6x
120	10	4.3x	4.3x	4.3x	4.3x	4.3x

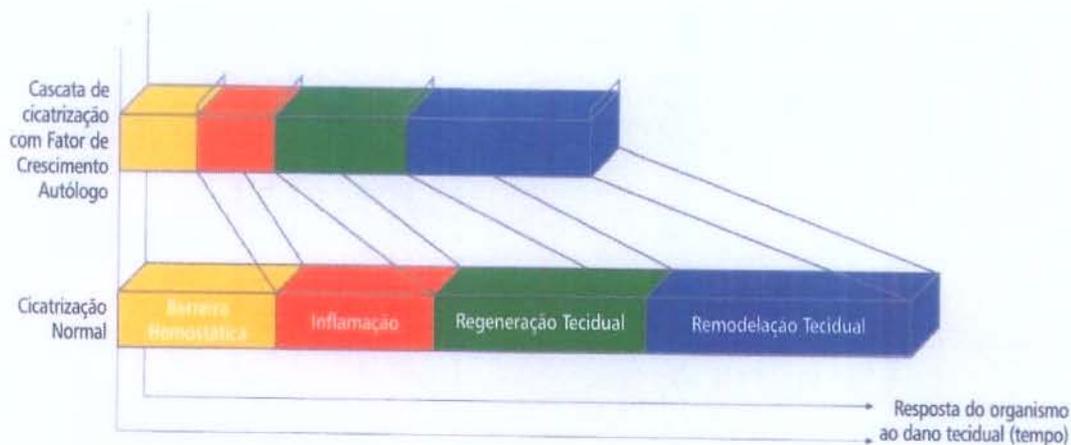
Outra vantagem do uso do PRP se deve ao fato de sua preparação autógena, quer dizer, é 100 % orgânica e realizada em momentos antes do procedimento cirúrgico. Além disso, seu uso reduz o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas (HIV, hepatite, etc) se comparado a outros produtos, segundo WHITMAN, D. H. et al (1977).

Nas pesquisas realizadas por MARX e GARG (1999) foram analisados enxertos ósseos associados com PRP. Os resultados demonstraram, em períodos de 4 a 6 meses, formação de sistemas harwesianos maduros e maior formação de osso lamelar fase II do que em enxertos não beneficiados.

REDDI, A H. (1997) afirmou que a aplicação do PRP com enxertos ósseos, e substitutos desses enxertos, tem sido ampliada e discutida com aparente sucesso. Nos enxertos de seio maxilar, com ou sem instalação imediata de implantes, o PRP tem um papel importante, devido ao complexo ambiente químico que se estabelece nesta situação clínica.

Uma das principais finalidades da aplicação do PRP é acelerar o processo reparativo através dos fatores de crescimento que estimulam a sucessão de eventos celulares necessários (ver gráfico a seguir)<sup>8</sup>.

<sup>8</sup> Retirado do panfleto informativo sobre Fator de Crescimento Autólogo produzido pela UNICELL biotecnologia e HARVEST.



Os FC (PDGF, TGF- $\beta$  e IGF) otimizam as atividades celulares da mitogênese, angiogênese e quimiotaxia, favorecendo a ocorrência do processo de regeneração, conforme nos explica ANITUA (1999).

Em estudos realizados por MARX et al. (1998), apud FILHO et al. (2004), verificou-se uma neoformação óssea duas vezes mais rápida e maior densidade óssea do que enxertos ósseos autógenos realizados em outros 44 pacientes com o mesmo tipo de defeito sem o uso do PRP.

KIM et al (2002), apud FILHO et al. (2004), em estudos realizados com cães, compararam a eficácia da associação PRP mais osso desmineralizado com o osso desmineralizado no reparo de defeitos ósseos criados em implantes ósseo-integrados instalados na crista ilíaca. Os pesquisadores concluíram que a associação com PRP promoveu mais formação óssea.

No entanto, apesar da larga utilização dos FC, eles possuem uma limitação. Segundo RIPAMONTI et al. (1996) e GIANNOBILE et al. (1996) eles têm uma meia vida extremamente curta, pode haver perda do FC devido à

solubilidade do carreador; alteração do processo normal de reparo devido à presença do carreador. Além disso, interfere no mecanismo de ação natural de outros fatores de crescimento.

### **3.1 – Preparo PRP: Métodos de Obtenção**

A partir de 1999, a reprodução dos resultados alcançados por MARX foi iniciada em vários centros de pesquisa. Sua maior limitação estava na metodologia de coleta, na relação custo-benefício e na complexidade. Em função disso, começou a busca por um protocolo simplificado e de aplicação ambulatorial.

Em 1999, LYNCH et al. acrescentaram que a tecnologia do PRP utiliza-se de princípios da engenharia de tecidos e que a técnica original deveria ser modificada para tratamento de lesões periodontais e defeitos perimplantares, pois, reduzindo-se de 400 para 150 ml o volume de sangue coletado, obtém-se área de 15 ml de PRP.

Já para SONNLEITNER et al. (2000), a preparação do PRP por plasmaferese é o processo pelo qual as plaquetas são retiradas do paciente e os componentes restantes do sangue são devolvidos para o corpo. Esta técnica produz um PRP com concentração plaquetária 300 % maior que os níveis sangüíneos normais. No entanto, o alto custo da plasmaferese e a necessidade do uso de equipamentos especializados tornam seu uso restrito em consultórios odontológicos, sendo realizado apenas em grandes clínicas ou hospitais. Desse modo, optar pela centrifugação, tem a vantagem de ser mais simples, além de um custo mais baixo.

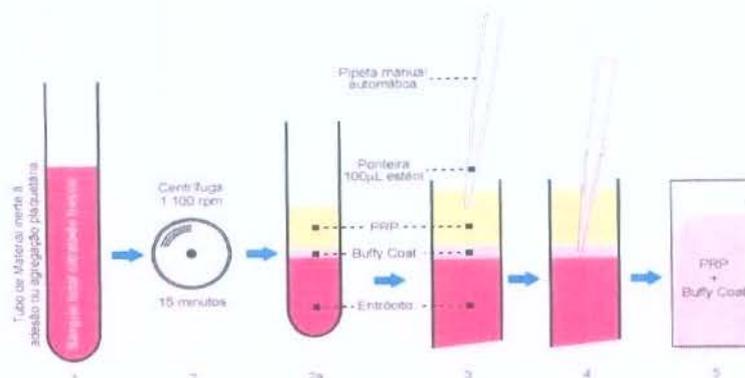
Segundo MARX et al. (1998), a preparação do PRP por centrifugação do sangue total anticoagulado, sob condições controladas, é simples e de baixo custo, permitindo a separação de plasma com elevado número de plaquetas.

### 3.2 – Protocolos de Obtenção do PRP

A seqüência do processo de obtenção (ver figura a seguir de PONTUAL e MAGINI, 2004:30) está basicamente dividida em duas etapas:

1ª. etapa: punção venosa e coleta do sangue;

2ª. etapa: separação celular (centrifuga) e preparo do plasma.



Demonstrativo gráfico da obtenção do gel de plaquetas.

Para descrevermos os protocolos de obtenção do PRP, tomamos como referência a pesquisa realizada por ANDRIOLO (2002: 55-59) e LEMOS et al. (2004).

#### 3.2.1 – Protocolo convencional

Com o auxílio de um separador celular por gradiente de densidade é colhido de 400 a 450 ml de sangue. Este é, em seguida, centrifugado a uma velocidade de 5.600 rpm (50 ml/min), conforme nos explica MARX et al. (1998). A

centrífuga separa cada camada de sangue, numa proporção da menos densa para a mais densa, isto é, a camada de plasma pobre em plaquetas (PPP) que é a primeira (topo) camada (aproximadamente 200ml); a outra camada, localizada na porção central (cerca de 70 ml), é composta de plasma rico em plaquetas (PRP); a última camada contém eritrócitos no nível mais inferior (cerca de 180 ml). O PRP é coletado e centrifugado a uma velocidade mais baixa (2.400 rpm) para que haja uma separação mais exata do PRP e dos eritrócitos. Quanto às plaquetas mais jovens, que são as de maior atividade e maiores, elas se encontram misturadas ao primeiro milímetro da camada superior dos eritrócitos. Por essa razão, elas podem ser incluídas no PRP. Já o PPP e os eritrócitos vão retornar ao paciente por meio de um acesso venoso periférico. Enfim, os pesquisadores realizaram a contagem de plaquetas e constaram que no plasma original a média foi de 232 mil por  $\text{mm}^3$  e, no PRP, de 785 mil por  $\text{mm}^3$ . Isso confirma a concentração média que é por volta de 338%.

### **3.2.2 – Protocolo simplificado baseado em ANITUA (1999)**

Neste protocolo coleta-se o sangue e, em seguida, o acondiciona em tubos de ensaio (5 ml) e, em cada um destes tubos, coloca-se 0,5 ml de citrato de sódio 10%, ou seja, anticoagulante. O volume total é de aproximadamente 10 a 20 ml. Após, a mistura é levada a uma mini-centrífuga a 160 G durante 6 minutos. Em seguida, coleta-se o PRP que inclui de 1 a 2 mm da porção superior das células vermelhas, totalizando um volume de 1, 2 ml por tubo. Finalmente, adiciona-se 5,0 ml de cloreto de cálcio a 10%. Depois de 15 a 20 minutos, o gel de plaquetas já está formado.

### **3.2.3 – Protocolo simplificado SONNLEITNER et al (2000)**

Neste protocolo são feitas duas centrifugações. Após a primeira, realizada a uma velocidade de 1200 rpm (160 G / 20 minutos), pipeta-se o plasma e submete-se a uma segunda centrifugação a uma velocidade de 2000 rpm (400 G / 15 minutos). Terminada esta centrifugação, pode verificar-se uma concentração – em forma de “botão” – de plaquetas (0,5 ml por tubo) na parte inferior de onde o PRP é removido. Ele se concentra na parte superior do tubo e apresenta-se cor amarelada. Vale ressaltar que na zona de transição, na fase vermelha, a proporção de linfócitos é alta. Isto é interessante porque os linfócitos também liberam fatores de crescimento e, por esta razão, poderiam ser usados na mistura.

### **3.2.4 – Protocolo de LANDESBURG et al (2000)**

Para este protocolo são coletados 5,0 ml de sangue em um tubo contendo 0,5 ml de citrato de sódio. A centrifugação é realizada a 200 G / 10 min. Todo o volume do plasma é transferido para outro tubo (15 ml) para ser submetido a uma nova centrifugação a 200 G / 10 min. Para a obtenção do gel, cada milímetro do PRP é adicionada a 0,167 ml de uma solução que contém 5 ml de cloreto de cálcio a 10% e 5 mil unidades de trombina bovina. Esta mistura é geleificada a 37° C em banho-maria. A cada milímetro é adicionado 0,06 ml de uma solução de cálcio a 10% e a 0,5 ml do agente geleificante ITA; então, a mistura é deixada também à temperatura de 37° C.

### **3.2.5 – Protocolo de ROSENBERG & TOROSIAN (2000)**

Estes pesquisadores sugerem, para a obtenção do PRP, a plasmaferese que é realizada no dia da cirurgia. Utiliza-se da flebotomia para coletar por volta de 450 ml de sangue, sendo que a veia é mantida com salina normal. Após, o sangue é centrifugado a uma velocidade de 5.600 rpm, e o fracionamento a uma velocidade de 50 ml/min para que haja a liberação das plaquetas. Isso é feito por meio da redução da velocidade da centrifuga para 2.400 rpm. Desse modo, obtém-se de 30 a 40 ml de PRP e o PPP é reinfundido no paciente. A duração deste processo pode variar de 30 a 45 minutos.

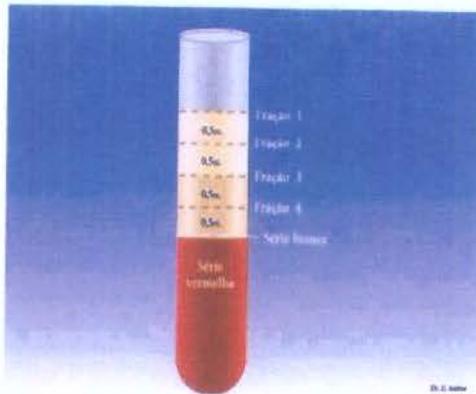
### **3.2.6 – Protocolo de ANITUA (2003)**

ANITUA (2003), apud MACEDO et al. (2004), realizou extração do sangue minutos antes de começar a cirurgia. Utilizaram-se tubos de 4,5 cc com citrato de sódio a 3,8 % como anticoagulante (0,5cc). A quantidade de sangue a ser extraída dependerá do tamanho do defeito a ser tratado. Para preencher um alvéolo, por exemplo, é necessário de 10 a 20 cc de sangue. Normalmente tem 1cc de plasma rico em fatores de crescimento para cada 10cc de sangue extraído.

A centrifugação para obtenção do plasma é realizada em centrifuga digital (Mod. PRGF System II) durante oito minutos, a uma velocidade de 1800 rpm à temperatura ambiente. Na figura a seguir<sup>9</sup> podemos observar o esquema das diferentes frações de concentração de plasma.

---

<sup>9</sup> Retirada de Pontual e Magini, 2004:203.



F. 1 → plaquetas similares ao sangue periférico;

F. 2 → mais concentrado de plaquetas que F.1;

F.3 → plasma duas vezes mais concentrado em plaquetas;

F. 4 → é o plasma mais rico em plaquetas e FC.

Uma vez que temos a fração de plasma, podemos provocar a formação do coágulo através de diferentes protocolos, que vamos enumerar:

1- acrescentamos 50 microlitros de cloreto de cálcio a 10 % por cada concentração da fração plasmática obtida. Entre cinco a oito minutos se formará o coágulo. O tempo vai variar em relação inversa ao número de plaquetas.

2- se o plasma for misturado com qualquer material de enxerto, primeiro colocamos o cloreto de cálcio e, em seguida, colocamos o material de enxerto. Entre dois a cinco minutos obteremos um agregado que contém o enxerto, com uma consistência gomosa muito fácil de manipular e muito cômoda de compactar.

### 3.2.7 – Protocolo de MARX et al. 1998

MARX et al. (1998), apud Lemos et al. (2004), obteve êxito em uma relação adequada a necessidade volumétrica de PRP para a utilização clínica. Para tal, o autor experimentou diversos diâmetros de centrífugas que foram utilizadas nas

rotações preconizadas para a obtenção de "papa de plaquetas". Em seguida, este foi usado em pacientes portadores de distúrbios de coagulação. Desse modo, foi possível reproduzir de maneira precisa o protocolo proposto utilizando uma simples centrífuga de laboratório biomédico de 8 x 15 ml (ex: FANEN 260 mp DE 8 X 15 ml). O PRP é obtido a partir do seguinte protocolo:

1 – através de punção venosa periférica, sangue venoso é obtido na quantidade de aproximadamente 15 ml, colhidos em 3 tubos de vácuo contendo citrato de sódio de 4,5 ml;

2 – os tubos são centrifugados em uma centrífuga de 8 x 15 a 2 gravidades (equivalente a 700 – 800 rpm por 10 minutos).

3 – a porção celular (leucócitos e hemácias) precipita na porção final do tubo e o plasma rico sobrenada.

4 – o PRP é pipetado diretamente dos tubos e acondicionado em um tubo único. Pipetamos 1 ml da "zona de névoa" e reservamos em outro tubo. Exata suspensão será utilizada juntamente com o PRP para a obtenção do coágulo, pois contém hemácias e plaquetas maiores.

Desse modo, podemos obter um volume de 1,0 ml de PRP autógeno por cada tubo em um total de 3 ml. No momento da utilização o PRP é mesclado ao enxerto e adicionado com 1 ml do tubo com as células maiores e hemácias, bem como a solução de trombina bovina e cloreto de cálcio para obtermos a coagulação.

### 3.3 – Aplicações Clínicas do PRP

O PRP tem várias aplicações<sup>10</sup>, particularmente na cirurgia cardíaca e neurocirurgia e recentemente foi introduzido na cirurgia bucomaxilofacial, adicionado ao osso medular particulado em procedimentos de reconstrução dos maxilares, conforme demonstrado nos vários estudos realizados por ANITUA, dentre outros.

A pluralidade das ações celulares do PRP habilita o seu uso em diversas situações clínicas, tais como: enxerto de seio, enxerto para crescimento de altura ou largura (particulado em bloco) do rebordo alveolar, fenestrações e deiscências, preenchimento de alvéolo associado com enxerto ósseo e reconstrução de tecidos periodontais. Atualmente, a cultura celular e fatores de crescimento, assim como a aquisição de PDGF já isolado e pronto para uso, são a tendência para novas pesquisas.

### 4 – Carreadores

Em função da solubilidade dos fatores de crescimento nos fluidos corporais é necessário um carreador biocompatível, biodegradável e osteocondutor. Segundo THOMSON et al. (1995), apud GRANJEIRO (2004), um carreador deve possuir as seguintes características:

- 1) altamente poroso, para permitir o crescimento celular, a circulação e transporte de nutrientes e resíduos metabólicos;
- 2) ser biocompatível e bioabsorvível, para a sua substituição pelo tecido;

---

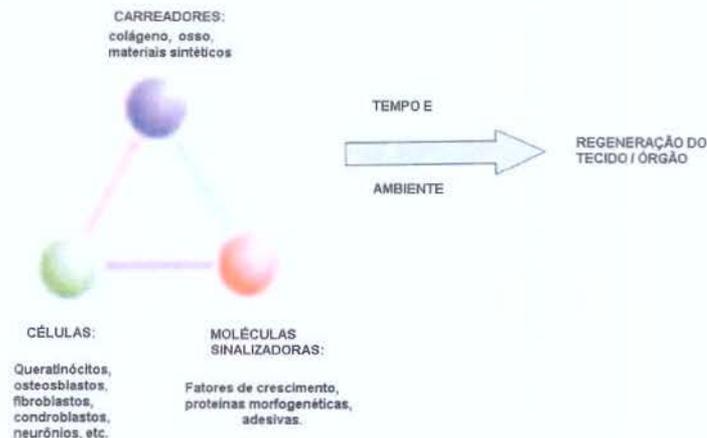
<sup>10</sup> Ver pesquisa realizada na veterinária no site [www.saber.usp.br](http://www.saber.usp.br). Veja o uso para *doping* no esporte no site [www.desporto.publico.pt/shownews](http://www.desporto.publico.pt/shownews) acesso em 16/08/2004.

3) características químicas adequadas em sua superfície para adesão, proliferação e diferenciação celular.

4) propriedades mecânicas, semelhantes àsquelas dos tecidos do local de implantação.

Em virtude dessas características torna-se um problema prático no uso de fatores de crescimento, pois há dificuldade de ser controlada e mantida a concentração local adequada, tendo em vista a meia vida curta destes mediadores biológicos, sua difusibilidade e tendência a serem removidos pela corrente sangüínea.

O sistema de liberação dos agentes osteoindutores deve preservar a forma e volume da reconstrução e assegurar a liberação local e sustentada dos fatores, que podem ser rapidamente deslocados, antes de exercerem seus efeitos. Os polímeros permitem a dosagem e a combinação de fatores a serem liberados concomitantemente ou em tempos diferentes. O material ideal deve ser biocompatível, absorvível e substituído por osso em período de tempo razoável, pois não pode inibir a formação óssea por indução de resposta inflamatória nem obstruir fisicamente a formação óssea - URIST et al. (1987), apud GRANJEIRO (2004). A figura abaixo, de PONTUAL e MAGINI (2004:81), ilustra a tríade de elementos da engenharia de tecidos; dentre eles podemos destacar os carreadores.



No entanto, como podemos verificar abaixo, muitos desses fatores de liberação não preenchem todos esse critérios:

- 1) polímeros e cerâmicos à base de vidro;
- 2) fosfato tricálcico  $\alpha$  puro;
- 3) vidro bioativo (bioglass);
- 4) cerâmica vítrea neutra (GB9N);
- 5) hidrogéis;
- 6) colágeno tipo I;
- 7) osso.

Quanto aos polímeros, apesar de bem descritos física e quimicamente, ainda pouco se conhece a respeito da proliferação e diferenciação celular desses materiais (MATSUMURA, 2003).

Em pesquisas realizadas com os materiais dos itens 2, 3, e 4, apesar da proliferação celular notada, foram observadas alteração na morfologia celular. Finalmente, conclui-se que a superfície do material pode interferir em aspectos celulares estruturais.

Os hidrogéis, apesar de apresentar crescimento de tecido em seu interior, permeabilidade a moléculas e consistência macia, eles possuem limitação para o uso clínico devido ao alto risco de ruptura do material e rápida reabsorção após implantação *in vivo* (VAN SUSANTE et al 2001). Já pesquisa realizada com colágeno do tipo I, por estes mesmos autores, apresentou resultados promissores *in vitro* (bovino).

O fosfato  $\beta$ tricálcico não absorvível (URIST et al., 1987), o co-polímero do poliglicóide-polilático (SCHIMITZ e HOLLINGER, 1988) e ácido polilático (LOVELL et al.1989) são também carreadores. Estes dois últimos têm sido usados como carreadores de FC graças as suas propriedades de biocompatibilidade, ausência de toxicidade e biodegradabilidade, mas foram detectados em quatro meses, vinte e quatro semanas e seis meses após a cirurgia respectivamente. A pasta de fibrina-colágeno e o selante de fibrina foram absorvidos incompletamente o que induziu um processo inflamatório crônico e inibindo a osteoindução heterotópica (PINHOIT et al.1992; SOLHEIM et al. 1992).

O poli-ortoéster não inibe a formação óssea, induz à pequena reação tecidual e é reabsorvido em quatro semanas, conforme os estudos realizados por PINHOIT et al. 1992 e SOLHEIM et al. 1992.

## **5 – Engenharia Tecidual**

O termo cultura de tecidos inclui cultura de órgãos e cultura de células. Este cultivo celular em laboratórios pode substituir os experimentos em animais. A engenharia tecidual é definida como o desenvolvimento e a manipulação em

laboratório de moléculas, células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas.

A engenharia tecidual aponta para a regeneração de órgãos danificados, além de não causar respostas imunológicas ou infecção e de não necessitar do uso de cadáveres o que não mutila órgão do paciente. O uso da cultura de tecidos vem aumentando e suas aplicações melhor divulgadas. O conceito básico é o reparo e regeneração de tecidos através do isolamento de células de um tecido original, as quais se expandem *in vitro* e, quando carregadas em um material apropriado, podem gerar um novo tecido funcional.

Na medicina estão sendo desenvolvidas pesquisas com cultura de células em diferentes especialidades como: reposição de pele, cartilagem, osso, componentes cardiovasculares e pâncreas (INCALLISTER, B. S. 1998).

Apesar do periodonto ser um tecido altamente complexo e especializado composto de tecidos duros e moles, estudos para a reposição do aparato periodontal, através do cultivo celular, têm se mostrado promissores. PINI PRATO et al. (2000) obtiveram êxito na obtenção de gengiva inserida através de cultura de fibroblastos.

As pesquisas com o uso de células-tronco osteogênicas para a reconstrução de tecidos ósseos são uma área de intensa pesquisa com alto potencial para o sucesso. Isso se deve, uma vez que a migração de células-tronco, derivadas da medula para sítios ósseos e a proliferação nestes sítios teciduais locais, evidenciam as possibilidades da utilização de células humanas osteoprogenitoras no tratamento de deficiências ósseas (UEDA, M. et al. (2001) apud ZORTEA, A. J. et al. 2004).

Conforme nos explica ZORTEA, A J. et al. (2004), o presente e o futuro pertencem ao estudo e pesquisa das células-tronco (células indiferenciadas) que permitirão a diferenciação de estruturas orgânicas complexas como dentes, osso alveolar e estrutura mucogengival, utilizando-se para isso, a bioengenharia.

## 6 – Discussão

É importante ressaltar que os materiais osteogênicos são os que contêm fatores de crescimento e estes, por sua vez, são os que possuem substâncias morfogênicas que estimulam as células indiferenciadas. Tais materiais devem ser biocompatíveis, absorvíveis e substituídos por osso em um prazo razoável de tempo, de modo a não inibir a formação óssea, nem induzir um processo inflamatório crônico.

Há muitos métodos que aceleram a reparação óssea, tais como: os materiais aloplásticos, osso autógeno e, atualmente, os fatores de crescimento autógenos derivados das plaquetas e de outras células sanguíneas.

Alguns dos fatores que contribuem para a regeneração óssea incluem o FCDP, o FTC2, o FCI, o FCF e as POMs, sendo eles principalmente, sintetizados e liberados pelas plaquetas. O FCDP atrai os macrófagos e isso induz a neoformação vascular, vital para a reparação e a osteogênese. Além disso, o FCDP acelera a reparação de tecidos moles e duros, pois aumenta a diferenciação osteogênica e separação óssea. Quanto ao FTC2, ele ativa os fibroblastos a formarem pró-colágeno, conforme nos esclarecem LOZADA et al. (2001). Já o FTCEB e FCDP aumentam a vascularização, a proliferação de fibroblastos, o colágeno e a osteogênese. Além dos fatores citados acima, há outros fatores presentes no PRP como o FCI e FCF que atuam sinergicamente com POMs presentes na matriz óssea.

Conforme mostrado anteriormente, a preparação do PRP por plasmaferese exige elevados custos. Por esse motivo, é realizada somente em hospitais e clínicas especializadas. Assim, a centrifugação é tomada como

alternativa por ser um método mais simples e de menor custo. Além disso, para a coleta do sangue do paciente é necessário a supervisão de um profissional da área médica ou enfermagem.

A aplicação do PRP exige desde o início do processo de coagulação, na maioria dos protocolos, a adição de 10ml de cloreto de cálcio a 10 % para neutralizar o efeito anticoagulante do citrato-fosfato-dextrose com 10 mil unidades de trombina bovina tópica. LANDESBURG et al. (2000), ROSENBERG e TOROSIAN (2000) observaram que a trombina bovina pode produzir coagulopatia pós-operatória por induzir a formação de anticorpos que reagiram de forma cruzada com o fator V de coagulação humana.

Quanto ao anticoagulante LANDESBURG et al (2000), MARX (2000) preferem citrato-fosfato-dextrose em relação ao EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético), uma vez que este pode causar fragmentação das plaquetas. Já o citrato-fosfato-dextrose estabiliza as membranas celulares preservando melhor as plaquetas.

De acordo com MARX (2000), no início dos anos 90, a trombina bovina continha maior concentração do fator bovino V (50 a 100g/ml). Mas, atualmente são submetidos à purificação adicional chegando a níveis inferiores a 0,2g/ml, sem contar que a trombina bovina é utilizada fora do corpo humano sem contato com a circulação sistêmica. Porém, isso não descarta possibilidades de risco. Outra questão é o alto custo, pois a trombina bovina chega a níveis que praticamente inviabilizam o benefício desta técnica. Além disso, no Brasil, o Ministério da Saúde ainda não legalizou o uso de trombina bovina para utilização em pacientes. Há um uso, porém, restrito aos usos laboratoriais.

VERCELLOTTI (2004) utilizou a botropase e constatou bons resultados com este coagulante. A demora pode variar de cinco a dez minutos para promover a coagulação do PRP. HANDEL et al. (2002) reforçam a necessidade de conhecermos melhor o real mecanismo de ação dos produtos anticoagulantes e coagulantes, a fim de que possamos ter uma maior controle das situações clínicas.

Outro aspecto que deve ser considerado é o controle da temperatura que tem grande influência na velocidade das reações de coagulação do PRP. Assim sendo, a temperatura corpórea deve ser de 37°C e previamente alcançada no momento em que o cloreto de cálcio a 10 % é misturado. As reações de cascata iniciam imediatamente e promovem a coagulação (2,42 a 10,45 minutos).

Sobre os resultados e usos do PRP, clinicamente, existem várias pesquisas que relatam o uso do PRP em diversas situações e patologias com o intuito de neoformação óssea como, por exemplo, defeitos periodontais, levantamento de seio maxilar, preenchimento de alvéolos pós-exodontia e implantes.

Sobre o uso de PRP em cirurgia oral, maxilo-facial e implantes, há vários estudos que demonstram benefícios, pois o seu uso pode aumentar a regeneração óssea o que, conseqüentemente, aumenta a formação de osso e acelera sua maturação, conforme ELIAS (2004)<sup>11</sup>. No entanto, o uso do PRP é limitado para pacientes com câncer (durante a radioterapia ou quimioterapia, pois

---

Comunicação pessoal (Uso do PRP nas reconstruções maxilares) apresentada no II Simpósio Brasileiro de PRP e FC, realizado na UNICID, São Paulo, 18 de novembro de 2004.

apresentam uma trombocitopenia induzida), pacientes trombocitopênicos em pré-operatório, idosos, pacientes com osteoporose e diabéticos.

SCHMITZ e HOLLINGER (2001) observaram dificuldades ao uso do PRP. Seu questionamento é quanto ao eventual efeito mitogênico do FCDP e o reconhecimento da presença de concentrações elevadas destes fatos em alguns tumores, ou seja, desenvolvimento de tecido neoplásico. MARX (2001) respondeu a estes pesquisadores afirmando que os constituintes do PRPs são biologicamente seguros, naturalmente produzidos pelos organismos sadios e com atividades fisiológicas próprias; diferem apenas na concentração. Na ortopedia usa-se PRP há mais de 20 anos sem correlação de processos proliferativos.

Embora não tenha tanta ênfase como o PRP, cremos ser interessante discutir sobre o plasma pobre em plaquetas (PPP). Também denominada PRF (plasma rico em fibrinogênio), esta fração sanguínea mostrou-se, nas pesquisas realizadas, de pouca importância relevância no processo cicatricial e fechamento de feridas cirúrgicas. No entanto, mesmo não sendo FC, a formação de fibrinas fornecerá a matriz osteocondutora natural para a reparação óssea, conforme explica LYNCH (1999). A formação da fibrina insolúvel, a partir da proteína solúvel fibrogênio, é ativada pela trombina bovina e cloreto de cálcio a 10%. A “cola alógena de fibrina” tem a função de obter hemostasia e adesão dos retalhos. JHAN (2004)<sup>12</sup>, faz uso e pesquisa o PPP em periodontia e implantodontia. Para o pesquisador, essa rede de fibrina funciona como uma espécie de cimento cirúrgico dando proteção ao procedimento cirúrgico realizado.

---

<sup>12</sup> Comunicação pessoal (Uso racional do PRP em Periodontia) apresentada no II Simpósio Brasileiro de PRP e FC, realizada em 18 de novembro de 2004 na UNICID, São Paulo.

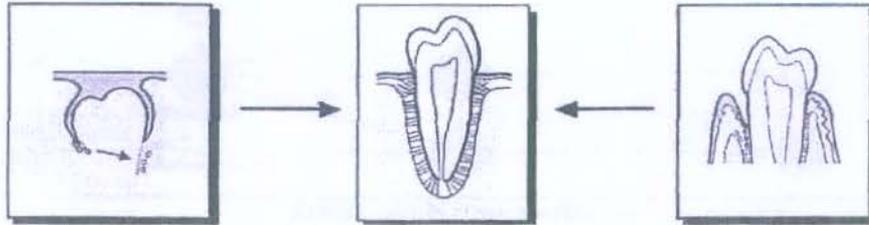
No que se refere ao uso de trombina autógena, observa-se que, mediante a possibilidade de produção de anticorpos contra a trombina bovina, tem-se pesquisado a utilização da trombina autógena. Segundo FILHO (2004)<sup>13</sup> o protocolo em humanos pode ser descrito da seguinte maneira. Primeiro coleta-se 8 tubos de 4,5 ml cada. Em seguida, centrifuga-se a 200 G durante 10 minutos. Após, deve-se pipetar o PRP e separar 2 ml e adiciona-se a este 0,6 ml de cloreto de cálcio a 10% e aguarde a geleificação parcial em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Juntamente com os tubos restantes, deve-se centrifugar a 400 G durante 10 minutos. Para a promoção do gel, para cada 3 ml de PRP obtido, adicionamos 1 ml de trombina autógena. O tempo de geleificação é em torno de 40 segundos.

É pertinente também discutirmos a comparação entre a formação x regeneração periodontal, pois conforme o esquema<sup>14</sup> a seguir, podemos observar que os eventos são os mesmos, mas as células no processo de formação e regeneração são diferentes.

---

<sup>13</sup> Comunicação pessoal (Obtenção e uso de trombina autógena) apresentada no II Simpósio Brasileiro de PRP e FC, realizada em 18 de novembro de 2004 na UNICID, São Paulo.

<sup>14</sup> Retirado de SAYGIN et al. 2000:76.



**CÉLULAS**

Folículo dental  
 Células epiteliais<sup>1</sup>  
 Osteoblastos  
 Células mesenquimais  
 Células endoteliais  
 Odontoblastos  
 Células nervosas

Cementoblastos – cementoclastos  
 Fibroblastos do ligamento periodontal  
 Osteoblastos e osteoclastos  
 Células epiteliais  
 Células mesenquimais  
 Células endoteliais  
 Células nervosas e inflamatórias

1 – HERS – restos epiteliais da bainha de Hertwig's

Finalmente, devemos ressaltar que, embora as pesquisas mostrem sempre os resultados positivos com o uso do PRP, urge a necessidade de mais estudos clínicos longitudinais para melhor compreendermos a real utilização dos FC tanto na área odontológica quanto médica.

## **7 – Considerações finais**

Pelas abordagens que realizamos neste trabalho, ficou evidente que o PRP é um método que oferece segurança ao paciente, além de ser barato e proporcionar um bom resultado, como enfatizam os diversos estudos que relatamos. No entanto, pudemos notar que, nesses mesmos estudos que destacam com grande ênfase os bons usos do PRP, parecem ignorar várias questões importantes.

Na bibliografia consultada, vimos que as pesquisas não contemplaram aspectos importantes, tais como: a quantidade de FC presente no PRP; se as células indiferenciadas e os osteoblastos contêm receptores de superfície para estes FC; não fica evidente se a taxa de regeneração tecidual é visível no raio-x, pois no histológico é diferente; a relação tempo/hora ideal para ser usado o FC no defeito; a disponibilidade do carreador adequado; deve-se saber a indicação correta, uma vez que nem todos pacientes necessitam; também não fica evidente se é realmente importante ou necessário modificar ou acelerar o processo de reparo tecidual. Neste último aspecto, talvez seria preferível se a célula produzisse FC ao invés de colocar no defeito. Assim, o organismo poderia responder positivamente.

Diante de tais questionamentos, fica explícito que há necessidade de muitos outros estudos clínicos para sabermos se, o uso do PRP, como tem sido abordado até o momento, tanto na clínica odontológica, quanto em todas as demais áreas médicas, realmente tem sempre um benefício positivo em qualquer defeito e para todos os pacientes.

## 8 – Referências Bibliográficas

- ANDRIOLO, A. R. *A participação dos mediadores biológicos presentes no plasma rico em plaquetas (PRP) na reparação óssea*. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2002.
- ANITUA, E. et al. *Plasma rich in growth factors*. Vitória: Puesta Al Diu Publicaciones, 2000.
- ANITUA, E. et al. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. In: *J. Oral maxillofac Implants*, 14 (4): 529-535, 1999.
- BARBIERI, C. M. O. Fator de crescimento derivado das plaquetas humanas (PDGF) – obtenção e perspectiva de aplicação clínica. In: PONTUAL, M. A. B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.
- BAR-KANA, I. et al. Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium. In: *European Journal of Oral Science*, 106(1), 357-364, 1998.
- BEZERRA, F. J. & LENHARO, A. *Terapia clínica avançada em implantodontia*. São Paulo: Artes Médicas, 2002.
- BOM, S. et al. The effect of insulin-like growth factor I and human growth hormone on periodontal ligament. Fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis, and receptor binding. In: *J. Periodontol*, 63 (12); 960-8, 1992

- CAFFESSE, R. G. & QUIÑONES, C. R. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. In: *Periodontology*, p. 69-79, 2000.
- CHAGAS, S. A. Regeneração tecidual – plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrogênio (PRF). In: PONTUAL, M. A B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.
- DIAS, E. C. L. C. M at al. Plasma rico em plaquetas. In: *Revista Brasileira de Implantodontia*, jul. /set., p. 36-38, 2002.
- FILHO, V. A. P. et al. Bases biológicas do tecido ósseo. In: PONTUAL, M. A B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.
- GIANNOBILE, W. V. et al. Comparative effects of platelet-derived growth factors BB and insulin-like growth factor I, individually and in combination, on periodontal regeneration in macaca fascicularis. In: *J. Periodontol*, 31(5): 301-12, 1996.
- GIANNOBILE, W. V. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. In: *Journal of Periodontology*, 67, nº 5, p. 545-553, 1996.
- GIL, J. N. at al. Emprego de plasma rico em plaquetas na reconstrução de fendas alveolares – apresentação de caso clínico. In: *Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia*, Curitiba, 9, nº 35, p. 197-201, 2002.

- GRANJEIRO, J. M. et al. Proteínas ósseas morfogenéticas: do laboratório para a clínica. In: PONTUAL, M. A B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.
- GRANJEIRO, J. M. et al. Aplicação da engenharia de tecidos na odontologia. In: PONTUAL, M. A B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.
- GRZESIK, W. J. & NARAYANAN, A S. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. In: *Crit Re Oral Biol Méd.*, 13(6): 474-484, 2002.
- HANDEL, M. et al. Influence of acid-citrate-dextrose anticoagulant on blood quality in retransfusion systems after total knee arthroplasty. In: *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 5, n. 122, p. 269-273, 2002.
- HAYASHI, F. et al. Associação do PDGF e IGF na regeneração periodontal – revisão de literatura. In: *Revista Periodontia*, 14, nº 1, p. 30-34, março 2004.
- HIRANO, H. et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. In: *Journal of Periodontology*, 73, nº 12, p. 1467- 1472, 2002.
- HOWELL, T. H. et al. Polypeptide growth factors for periodontal regeneration. In: *Current Opinion in Periodontology*, 3, p. 149-154, 1996.
- JUNIOR, F. F. Análise comparativa do índice de sucesso dos implantes osteointegrados com e sem a utilização de RRP, no protocolo de fixação. In: *Revista Paranaense Perio/Implante*, 1, nº 1, p. 38, 2003.

- KALPIDIS, C. D. R. & RUBEN, M. P. Treatment of intrabony Periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. In: *Journal of Periodontology*, 73, n° 1, p. 1360-1376, nov. 2002.
- KIM, et al. A comparative study of osseointegration of avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet rich plasma. In: *Facial maxillo surgery*, v. 60, p. 1018-25, 2002.
- LEÃO, M. P. *Formação in vitro da rede de fibrina durante ativação do plasma rico em plaquetas com cloreto de cálcio a 10 % em temperatura de 37°C.* (Dissertação de mestrado em Implantodontia). UNIVILLE: Florianópolis, SC, 2002.
- LEMOES, J. J. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – proposta de um protocolo de obtenção simplificado. Texto disponível no site [www.odontologia.com.br](http://www.odontologia.com.br). Acesso em 19/08/04.
- LENHARO, A. & MENDONÇA, R. G. Plasma rico em plaquetas. In: BEZERRA, F. J. & LENHARO, A. *Terapia clínica avançada em implantodontia*. São Paulo: Artes Médicas, 2002.
- LENHARO et al (2004). Plasma rico em plaquetas - PRP. In: PONTUAL, M. A B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda, 2004, p. 163-186.
- LYNCH, S. E. et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. In: *J. Periodontol*, 62, 458-467, 1991.

- LYNCH, S. E. et al. Effects of the platelet-derived growth factor/ Insulin-like growth factor I combination on bone regeneration around titanium dental implants: results of a Pilot study in beagle dogs. In: *J. Periodontol*, 62 (11): 710-716, 1991.
- LYNCH, S. E. et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. In: *Clin. Periodontol*, 16, p. 545-548, 1989.
- MACEDO, A. P. et al. Protocolo de obtenção e aplicações clínicas do PRP. In: PONTUAL, M. A. B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.
- MCCARTHY, T. L. et al. Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. In: *Endocrinology*, 124 (1) 301-9, 1989.
- MOCHIZUKI, H. et al. Insulin-like growth factors I supports formation and activation of osteoclasts. In: *Endocrinology*, 131 (3), 1075-80, 1992.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? In: *Implant Dentistry*, 10, nº 4, 225-228, 2001.
- \_\_\_\_\_. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: LYNCH, S. E; GENCO, R. J; MARX, R. E. *Tissue engineering – Applications Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintana Publishing Co, 1999.

- MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. In: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 85, nº 6, p. 638-646, 1998.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Illinois: Quintessence Books, p. 71-82, 1999.
- MARX, R. E. & GARG, A. K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. In: *Jensen OT editors. The sinus bone graft*. Colorado: Quintessence Books, p. 183-185, 1999.
- MARX, R. E. & GARG, A. K. A estrutura óssea, o metabolismo e a fisiologia: seu impacto na implantodontia. In: *J. Implants dent*, 5: 15-25, 1999-2000.
- MATSUDA, N. et al. Mitogenic and chemotactic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. In: *J. Periodontol*, 63, p. 515-525, 1992.
- MUMFORD, J. H. et al. The effects of platelet-derived growth factor – BB on periodontal cells in an In Vitro wound model. In: *Journal of Periodontology*, 72, nº 3, p. 331-340, March 2001.
- MOCHIZUKI, H. et al. Insulin-like growth factors I supports formation and activation of osteoclasts. In: *Endocrinology*, 131 (3), 1075-80, 1992.
- OKUDA, K. platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of

periodontally related cells in vitro. In: *Journal of Periodontology*, 74, nº 6, june 2003.

PONTUAL, M. A. B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.

REDDI, A. H. & BIDERMAN, I. Bone morphogenetic proteins in context. New concepts for stomatology and craniofacial biology. In: *Studies in Stomatology and Craniofacial biology*. COHEN, M. M. Jr. Baum. B. J. (eds.). p.117-126, 1997.

RINDERKNECHI, E. & HUMBLE, R.E. Amino-terminal sequences of two peptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. In: *Proc Natl Acad Sci: USA*, 73, 7, 1976.

SÁNCHEZ, A. R. et al. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. In: *The international Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18, nº 1, p. 93-103, 2003.

SANT'ANA, A. C. P. Efeitos da aplicação de diferentes fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-1 e TGF- $\beta$ 1) isolados ou combinados na taxa de proliferação e na adesão de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano a fragmentos radiculares tratados ou não com ácido cítrico e tetraciclina após raspagem. (Tese de doutorado). Bauru: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2001.

- SANTOS e SANTOS (2004). O sangue e a medula óssea. In: PONTUAL, M. A B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda, p. 1-44, 2004.
- SAYGIN, N. E. et al. Molecular and cell biology of cementum. In: *Periodontol*, 24, p. 73-98, 2000.
- SOARES, F. P. Influência do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) na regeneração periodontal – revisão de literatura. In: *Revista da Pós Graduação da Universidade de São Paulo*, 11, nº 1, p. 80-86, 2004.
- URIST, M. R. et al. Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments. In: *Methods Enzymol*, 312, 146-294, 1987.
- URIST, M. R. et al. Osteoporosis: bone morphogenetic protein auto-immune disorder. In: *Prog. Clin. Biol. Res*, 187, 77-96, 1985.
- VERCELLOTTI, T. et al. A new piezoelectric ridge expansion technique in the lower arch - a case report. Texto disponível no site [www.worlddent.com](http://www.worlddent.com), Acesso em 23/11/2004.
- ZHAO, M. et al. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. In: *Journal of Periodontology*, 75(1), 154-161, 2004.
- ZORTÉA, A. J. et al. Engenharia tecidual – cultura de células. In: PONTUAL, M. A B. & MAGINI, R. S. (Coord.). *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004.