



Fabília Ferreira Suaíd
CIRURGIÃ-DENTISTA

“AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS COM O ENXERTO DE TECIDO CONJUNTIVO SUBEPITELIAL EM
RETRAÇÕES GENGIVAS EM CÃES”.

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica na
Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum
Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

Piracicaba

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Su12a Suaid, Fabrícia Ferreira.
Avaliação histométrica da associação do plasma rico em plaquetas com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em retrações gengivais em cães. / Fabrícia Ferreira Suaid. - Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: Enilson Antônio Sallum, Francisco Humberto Nociti Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. Retração gengival. 3. Plasma sanguíneo. 4. Plaquetas (sangue). 5. Substâncias de crescimento. I. Sallum, Enilson Antônio. II. Nociti Junior, Francisco Humberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: The evaluation of connective tissue and platelet-rich plasma (PRP) on the periodontal regeneration in gingival recession. A histomorphometric study in dogs.

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontics. 2. Gingival recession. 3. Blood plasma. 4. Blood platelets. 5. Growth substances

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Enilson Antônio Sallum, Márcio Zaffalon Casati, Wilson Roberto Sendyk

Data da Defesa: 26-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



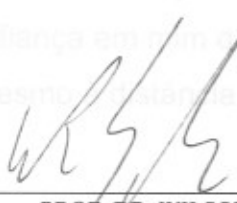
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



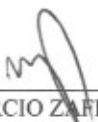
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata FABRÍCIA FERREIRA SUAID aprovada.



PROF. DR. ENILSON ANTONIO SALLUM



PROF. DR. WILSON ROBERTO SENDYK



PROF. DR. MÁRCIO ZAFFALON CASATI

8772221002

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, com muito carinho...

Aos meus pais, Dalila e Elias, que nunca mediram esforços para minha educação e minhas realizações. Obrigada pelo amor e confiança em mim depositados. O apoio incondicional de vocês, mesmo à distância, me conforta e ajuda na conquista de meus objetivos.

Aos meus irmãos, Fernanda e Rafael, que desde pequenos, cada um a sua maneira, têm me incentivado e ajudado a alcançar os meus sonhos.

À minha querida avó Dulce, pelo amor incondicional.

Ao Alan, pelo companheirismo e incentivo durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre guiou meus passos, iluminando o meu caminho e me consolando nos momentos difíceis. Agradeço-Lhe por me acolher como filha amada e por me dar força, coragem, sabedoria e serenidade, para seguir em frente, segundo Sua vontade.

Ao Prof. Dr. José Tadeu Jorge, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pela estrutura oferecida para esta etapa da minha formação profissional e aos seus funcionários que, com dedicação e profissionalismo, trabalham para manter tudo em ordem.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro indispensável ao desenvolvimento de todas as atividades durante meu curso de mestrado através do processo 04/12428-6.

Ao Prof. Enilson Antônio Sallum, pelo exemplo de profissionalismo e seriedade. Obrigada pela confiança no desenvolvimento dos projetos a mim incubidos.

Ao Prof. Antônio Wilson Sallum, pela grande força e estímulo sem os quais muitos obstáculos não teriam sido transpostos. Por estar sempre imbuindo em seus alunos a determinação pela busca incessante do conhecimento.

Ao Prof. Márcio Zaffalon Casati, exemplo de determinação e competência. Obrigada pelos ensinamentos e por toda atenção dispensada durante o curso de pós-graduação.

Ao Prof. Francisco Humberto Nociti Junior, o nosso convívio me faz aprender cada vez mais. Obrigada pelos conselhos. Espero que nossa amizade perdure.

Ao Prof. Sérgio de Toledo, convivemos pouco, mas o suficiente para admirá-lo. Meu grande abraço.

À Profa. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, que tão pacientemente me ajudou na estatística desta dissertação. Obrigada pelo seu exemplo de serenidade e competência.

À minha tia Cleuza e aos meus amigos-irmãos, Flávia e Vinícius, pelo carinho e apoio nas horas difíceis. Mesmo distantes fisicamente, vocês sempre estiverem presentes durante esta batalha.

À minha amiga Ângela Martins, por todo apoio no início de minha caminhada. Sua amizade e seus conselhos foram muito importantes para mim.

À querida Eliete, secretária da Periodontia, muito obrigada pela sua amizade e pelo grande apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos do mestrado, Liana, Wagner, Beatriz, Fernanda, Renato, Daniela, Kamile e Thaís. Obrigada pelo carinho e respeito. Vocês foram importantes para que os dias fossem menos cansativos. Torço por todos vocês.

Aos amigos do doutorado, Daiane, Saulo, Bruno, Sandro, Érica, Cléverson, Gabriela e Roberta. Aprendi muito com vocês.

Aos meus companheiros de trabalho, Mauro e Marcelo, muito obrigada pela disponibilidade e esforço em fazer com que tudo acontecesse da melhor maneira possível durante todos os experimentos.

À Mariana, técnica do laboratório de Periodontia, sempre simpática e atenciosa. Muito obrigado por tudo.

Às funcionárias da Clínica de Especialização, D. Cida, Rosângela, Rosa, Beth, Luíz Cláudio (técnico). Vocês são muito importantes para o funcionamento da nossa clínica. Obrigado por sempre ajudar.

Aos bioteristas Wanderley e Fábio, pelo indispensável cuidado e responsabilidade com os meus cães.

À banca de Qualificação, professores Francisco Humberto Nociti Junior, Sérgio de Toledo e Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pelas valiosas sugestões neste trabalho.

A todos que indiretamente tiveram grande importância para a realização de mais essa etapa da minha formação.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar histometricamente, o processo de cura dos defeitos periodontais tipo retrações gengivais, criados cirurgicamente em cães, após serem tratados pela técnica do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em associação com o plasma rico em plaquetas (PRP). Inicialmente foram criados cirurgicamente defeitos de retração Classe I de Miller nos caninos superiores de seis cães de raça indefinida. Após um mês de cronificação, os defeitos bilaterais semelhantes foram aleatoriamente designados a receber os seguintes tratamentos: Lado 1: enxerto de tecido conjuntivo subepitelial associado ao uso de PRP; Lado 2: enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. Decorridos 45 dias do tratamento os animais foram sacrificados e foram obtidas as peças para análise histológica dos seguintes parâmetros histométricos: novo cemento formado com fibras inseridas, novo osso, extensão do epitélio sulcular e juncional, área de adaptação conjuntiva e extensão do defeito. Observou-se uma maior extensão linear de novo cemento estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) nos dentes tratados com o PRP ($2,18 \pm 0,78$ mm) quando comparados aos dentes do lado controle ($1,19 \pm 0,62$ mm). Todos os outros parâmetros não tiveram diferenças estatísticas. As médias obtidas nos lados teste e controle, respectivamente, foram: extensão de epitélio sulcular e juncional, $2,04 \pm 0,57$ mm e $2,49 \pm 0,82$ mm; adaptação conjuntiva $0,29 \pm 0,28$ mm e $0,23 \pm 0,18$ mm; novo osso – $0,57 \pm 0,95$ mm e – $0,46 \pm 1,34$ mm, e extensão do defeito $4,13 \pm 0,83$ mm e $4,47 \pm 0,58$ mm. Considerando os limites deste estudo, pode-se concluir que a associação do PRP ao enxerto de tecido conjuntivo, no tratamento de defeitos de retração, promoveu maior neoformação cementária quando comparado ao tratamento controle.

PALAVRAS CHAVES: retração gengival, plasma rico em plaquetas (PRP), histometria e cães.

ABSTRACT

The aim of this study was to histometrically evaluate the healing process of gingival recessions treated by PRP in combination with subepithelial connective tissue graft (SCTG) and to compare it to that obtained with SCTG alone (Control). Six mongrel dogs were used in the experiment. Gingival recessions (5x7mm) were surgically created and exposed to plaque accumulation for 1 month. Contralateral defects were then randomly assigned to test group or control. Dogs were sacrificed 45 days after healing, and the blocks containing the experimental specimens were processed for histological analysis. The histometric parameters evaluated were: length of sulcular and junctional epithelium, connective tissue adaptation, new cementum, new bone and defect extension. A superior length of new cementum, statistically significant, was observed in sites treated with PRP ($2.18 \pm 0.78\text{mm}$) in comparison with the control ($1.19 \pm 0.62\text{mm}$). No statistical differences in any other parameters evaluated were detected. The extension of the sulcular and junctional epithelium was $2.04 \pm 0.57\text{ mm}$ for the PRP group and $2.49 \pm 0.82\text{mm}$ for the control. The new connective tissue adjacent to the root without cementum formation was $0.29 \pm 0.28\text{ mm}$ and $0.23 \pm 0.18\text{ mm}$ for the PRP group and control, respectively. Bone formation was $-0.57 \pm 0.95\text{ mm}$ for the PRP group and $-0.46 \pm 1.34\text{mm}$ for the control. Within the limits of this study, it was concluded that PRP in combination with subepithelial connective tissue graft, when compared to the other treatment (control), seems to be more effective in promoting new cementum formation.

KEY WORDS: gingival recession, platelet-rich plasma (PRP), histometric and dogs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Tratamento dos Defeitos Periodontais	04
2.2. Tratamento dos Defeitos de Retração – Estudos Histológicos	05
2.3. Plasma Rico em Plaquetas	13
2.4. Aplicação do PRP no Tratamento dos Defeitos Periodontais	22
3. PROPOSIÇÃO	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Seleção dos Animais	27
4.2. Procedimentos Cirúrgicos	27
Anestesia	27
Confecção dos Defeitos	28
Cronificação dos Defeitos	29
Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas	30
Obtenção do Enxerto de Tecido Conjuntivo Subepitelial	31
Tratamento dos Defeitos	32
Processamento Histológico	35
Análise Histométrica	37
5. RESULTADOS	38

5.1. Observações Clínicas	38
5.2. Observações Plasmáticas	38
5.3. Observações Histológicas	38
5.4. Observações Histométricas	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	63

1. INTRODUÇÃO

A retração gengival é caracterizada pelo posicionamento apical da margem gengival em relação à junção cimento esmalte (Academia Americana de Periodontia, 1992), decorrente da perda de fibras conjuntivas do aparelho de proteção e sustentação do dente, acompanhada de reabsorção da crista óssea alveolar e de necrose do tecido cementário, resultante de um quadro inflamatório presente no tecido conjuntivo gengival (Baker & Seymour, 1976).

Várias técnicas cirúrgicas mucogengivais têm sido indicadas para o tratamento das retrações gengivais apresentando bons resultados quanto ao recobrimento radicular e à resolução dos problemas estéticos e de hipersensibilidade dentinária. No entanto, embora essas técnicas cirúrgicas convencionais tenham se mostrado efetivas do ponto de vista clínico, segundo a análise histológica da interface entre a superfície radicular recoberta e os tecidos gengivais a ela sobrepostos, elas não são capazes de devolver à região tratada as estruturas perdidas pelo processo patológico.

Estudos histológicos em humanos e em animais demonstraram que o padrão de cura obtido ao se realizar estas técnicas caracteriza-se pela formação de epitélio juncional longo na maior parte da raiz (Pfeifer & Heller, 1971; Caffesse et al, 1984) sendo que algum grau de regeneração pode ser esperado (Weng, 1998; Pasquinelli, 1995). O relato de Pasquinelli (1995) mostrando formação de novo osso e nova inserção conjuntiva, em humano, após o tratamento de retração gengival com enxerto de mucosa mastigatória, ilustra bem a necessidade de mais avaliações histológicas neste campo.

Mais recentemente, uma estratégia de tratamento utilizada, é a identificação dos fatores que interferem no processo de regeneração visando à modulação da resposta cicatricial seja por adição de células, de biomateriais ou de fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e/ou regeneração tecidual. Agindo similarmente a hormônios, estes polipeptídeos são chaves para regular diversos eventos celulares tais como: quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular; angiogênese e síntese de matriz extracelular (Bahot & Alex, 2002; Anitua et al, 2004; Marx, 2004).

Vários estudos têm avaliado o plasma rico em plaquetas (PRP) como fonte rica em fatores de proliferação e de diferenciação celular, que garantiria uma quantidade suficiente de células novas e concentradas em um determinado local do organismo (Whitman et al, 1997, Marx et al, 1998; Anitua, 1999).

O PRP é um produto derivado do processamento laboratorial do sangue autógeno, coletado no período pré-operatório e rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α -plaquetários, entre eles o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β).

Estudos têm mostrado comprovada eficiência do PRP no tratamento de lesões de furca (Park et al., 1995); de defeitos ósseos ao redor de implantes de titânio associado a enxertos ósseos ou a membranas (Whitman & Berry, 1998; Petrungaro, 2002), e de defeitos intra-ósseos associado à RTG ou a enxertos ósseos (de Obarrio et al., 2000; Camargo et al., 2002).

No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que se propuseram a estudar a associação do plasma rico em plaquetas (PRP) ao tratamento das retrações gengivais. Vastardis et al (2004) utilizou o PRP para hidratar a matriz dérmica acelular (Alloderm[®]) antes de posicioná-la sobre o defeito de retração e recobri-la. Os autores observaram que o uso do PRP acelerou o processo de cicatrização obtendo os resultados clínicos superiores, quando comparado ao grupo controle no qual o Alloderm[®] foi hidratado com solução salina.

Porém, Huang et al. (2005) em um estudo piloto em humanos não observaram uma superioridade clínica da associação do PRP ao retalho

posicionado coronariamente (RPC) quando aplicado no tratamento de recessões gengivais Classe I de Miller.

Diante da ambigüidade de resultados clínicos e da inexistência de uma avaliação histológica documentando as possíveis vantagens da associação do PRP às técnicas de recobrimento radicular, este trabalho tem por objetivo avaliar, histometricamente, a ação do PRP como fator contribuinte ao processo cicatricial do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial no procedimento de recobrimento radicular, promovendo a regeneração periodontal de retrações cirurgicamente criadas em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – TRATAMENTO DOS DEFEITOS PERIODONTAIS

O objetivo do tratamento periodontal consiste, principalmente, na resolução do processo inflamatório por meio da eliminação dos depósitos e toxinas bacterianas da superfície dental, mas também se fundamenta na manutenção e longevidade funcional e estética de dentes saudáveis (Cortellini et al, 1990).

Procedimentos convencionais como raspagem e alisamento radicular, curetagem, gengivectomia, cirurgias a retalhos e cirurgia óssea agem de maneira positiva nos defeitos anatômicos produzidos pela doença periodontal, reduzindo a profundidade de sondagem tanto à custa da promoção de um ganho de inserção clínico como também devido à retração dos tecidos gengivais. Durante vários anos, essas mudanças favoráveis foram interpretadas como verdadeira regeneração periodontal (Rosling et al, 1976; Caton et al, 1982). Entretanto, Caton et al (1980), utilizando o modelo experimental em primatas, observaram que os procedimentos convencionais resultavam na formação de um epitélio juncional longo, sem a formação de nova inserção conjuntiva, mostrando a capacidade do epitélio em ocupar rapidamente a área da ferida, impedindo a regeneração periodontal.

Com o surgimento dos procedimentos regenerativos, que aumentaram o número de opções para o tratamento de defeitos periodontais, o termo “regeneração” vem sendo discutido e, segundo a Academia Americana de Periodontia (1986), pode ser definido como: processo de cura que reproduz ou reconstitui a arquitetura e função do tecido ferido ou perdido por ocorrência da doença. Seguindo esta definição, a Regeneração Periodontal é a reconstituição do periodonto de inserção através da formação de novo ligamento, novo cemento e

novo osso ao redor dos dentes que perderam estas estruturas após a instalação e progressão da doença periodontal (Lynch, 1992). Desta forma, a cura da ferida com formação de epitélio juncional longo, anquiose ou reabsorção radicular é um processo definido como reparo, já que não restaura completamente a arquitetura e função das estruturas perdidas (Caton & Greenstein, 1993).

Segundo Lindhe et al (1982), a cicatrização através da formação do epitélio juncional longo não compromete a estabilidade dos resultados obtidos com a terapia cirúrgica. Entretanto, em longo prazo, a presença de uma barreira epitelial tem sido vista como uma seqüela indesejável resultante dos eventos de cura periodontal, na medida em que parece impedir a formação de um novo aparato de inserção sobre a superfície radicular, além de não representar regeneração periodontal verdadeira (Cortellini, 1993).

Os estudos existentes na literatura até o presente momento, têm demonstrado que, embora seja possível modificar os eventos de cura de várias maneiras, a regeneração periodontal completa e desejada dos defeitos periodontais, ainda é um objetivo difícil de ser alcançado (Heijl et al, 1997).

2.2 – TRATAMENTO DE DEFEITOS DE RETRAÇÃO – ESTUDOS HISTOLÓGICOS

Um defeito periodontal bastante comum na clínica odontológica é a retração gengival. Trata-se de uma lesão periodontal caracterizada pelo posicionamento apical da margem gengival em relação à junção cimento-esmalte, (Academia Americana de Periodontia, 1992) decorrente da perda de fibras conjuntivas do aparelho de proteção e sustentação do dente, acompanhada de reabsorção da crista óssea alveolar e necrose do tecido cementário, originários de um quadro inflamatório presente no tecido conjuntivo gengival (Baker & Seymour, 1976).

Algumas técnicas cirúrgicas mucogengivais que objetivam a correção dos defeitos de morfologia, posição e dimensão dos tecidos gengivais adjacentes aos dentes (Academia Americana de Periodontia, 1992), têm sido indicadas para correção das retrações e podem ser agrupadas em: técnica do reposicionamento lateral do retalho (Grupe & Warren, 1956); técnica do retalho girado obliquamente (Pennel et al., 1965); enxerto de mucosa mastigatória (Bjorn, 1963; Nabers, 1966); técnica da dupla papila (Cohen & Ross, 1968); retalho reposicionado coronariamente (Sumner, 1969); associação de enxerto de mucosa mastigatória e posterior reposicionamento coronário do retalho (Bernimoulin, et al., 1975) e enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (Langer & Langer, 1985).

A avaliação histológica da natureza da interface entre a superfície radicular recoberta e os tecidos gengivais a ela sobrepostos, é baseada em estudos animais (Caffesse et al, 1984; Gottlow et al, 1986; Weng et al, 1998; Casati et al, 2000; Sallum et al, 2004, 2006) e em alguns relatos de caso (Common & McFall, 1982; Cortellini et al, 1993; Pasquinelli et al, 1995; Pfeifer & Heller, 1971; Sugarman, 1969).

Pfeifer & Heller (1971) compararam o retalho posicionado lateralmente de espessura total e de espessura parcial aplicados no tratamento de retrações gengivais. Nova inserção de fibras conjuntivas e uma nova camada de tecido cementóide foram observadas na metade apical da superfície radicular do dente onde foi realizado o retalho de espessura total. No dente em que foi realizado o retalho posicionado lateralmente de espessura parcial havia a presença de epitélio juncional longo por toda extensão.

Ao avaliar o recobrimento radicular de retrações gengivais criadas cirurgicamente em macacos Caffesse et al (1984) encontraram resultados semelhantes. Após a realização de um retalho posicionado lateralmente de espessura total foi observada a presença de nova inserção conjuntiva recobrando a porção mais apical do defeito (40 a 50% da superfície); enquanto na porção mais coronária foi observado epitélio juncional longo (50 a 60% da superfície radicular recoberta).

Embora efetivas no recobrimento radicular, do ponto de vista clínico, as técnicas cirúrgicas convencionais não demonstraram ser capazes de devolver à região tratada, as estruturas perdidas pelo processo patológico. Devido a esse tipo de reparo, durante a década de 80, foram realizados alguns estudos objetivando avaliar a utilização do condicionamento ácido da superfície radicular, como tentativa de se obter um recobrimento desta, através de uma nova inserção conjuntiva em toda extensão (Woodyard et al, 1984; Gottlow et al, 1986).

Woodyard et al (1984) avaliaram o efeito da aplicação tópica de ácido cítrico após a realização de retalho reposicionado coronariamente (RPC) no tratamento de retrações gengivais criadas cirurgicamente em macacos. Após 42 dias, nos dentes teste (ácido cítrico + RPC) foi observado a presença de novo cemento com fibras inseridas na metade apical da superfície radicular, enquanto nos dentes controle (RPC), foi observada a migração epitelial por toda a extensão da raiz. Estas diferenças foram estatisticamente significantes em relação ao recobrimento radicular.

No entanto, o condicionamento ácido da superfície radicular não demonstrou nenhum benefício em relação ao tipo de inserção ou de reparo obtidos em um trabalho de Gottlow et al (1986). Os autores avaliaram o recobrimento radicular de retrações gengivais criadas cirurgicamente em cães e encontraram os seguintes resultados: a) formação de nova inserção conjuntiva tanto nas raízes tratadas com ácido (2,2mm) com nas não tratadas (2,1 mm); b) uma nova camada de cemento radicular na área de nova inserção; c) nos defeitos estreitos observou-se uma tendência ao total recobrimento radicular, ao passo que nos defeitos largos essas retrações não eram totalmente recobertas. Os autores sugeriram que o reposicionamento coronário do retalho pudesse ter sido responsável pela presença de nova inserção, uma vez que houve um aumento da distância entre margem gengival e fundo do defeito, retardando assim a migração epitelial em direção apical. Com isso, células indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal repovoaram a superfície radicular levando a formação de novo cemento com fibras inseridas numa porção mais apical. No terço médio da

raiz, devido ao seu contato direto com o tecido conjuntivo, foi observada a presença de algumas zonas de reabsorção radicular entre porção apical do epitélio juncional e o novo cemento radicular com fibras inseridas. Neste estudo, não foram encontradas diferenças significantes entre o ganho de inserção nas raízes tratadas ou não com ácido cítrico. Além disso, o recobrimento de retrações localizadas levou a variáveis ganhos de inserção, relacionados ao tamanho e forma do defeito, independentemente da utilização ou não de condicionamento ácido da superfície radicular.

Com o surgimento dos procedimentos regenerativos como a regeneração tecidual guiada e a aplicação de proteína derivada da matriz de esmalte (ENDOGAIN®), o número de opções para o tratamento dos defeitos periodontais aumentou.

No estudo que serviu de base para a aplicação clínica da regeneração tecidual guiada, Gottlow et al (1984) trataram defeitos ósseos do tipo deiscência em três macacos com a associação do retalho posicionado coronariamente e um filtro milipore no grupo teste. A análise histológica após três meses de cicatrização demonstrou que as raízes recobertas pelo filtro exibiram maior extensão de nova inserção do que as raízes não cobertas. Os autores concluíram que o uso da barreira entre o retalho e a superfície radicular favoreceu a repopularização da área de cura pelas células do ligamento periodontal, não encontrando correlação entre formação do cemento e regeneração óssea.

Ao compararem o tratamento de regeneração tecidual guiada (RTG) realizado com membranas de politetrafluoretileno expandido (GORE-TEX®), ao tratamento convencional com retalho posicionado coronariamente, Gottlow et al (1990) observaram os seguintes resultados histológicos: a) uma extensão de novo cemento com fibras inseridas de 1,7mm para o grupo controle e de 3,4mm para o grupo teste (RTG), representando 36,9% e 74,3% da extensão do defeito, respectivamente; b) formação de novo osso similar em ambos os grupos, em média de 1,4mm (30% da extensão do defeito); c) reabsorção radicular em um

dente controle, no qual a porção apical do epitélio juncional não coincidiu com a porção coronária do novo cimento.

Em 1991, Cortelini et al, avaliaram histologicamente, o tipo de cura obtido após a utilização da técnica de RTG com membrana não reabsorvível de politetrafluoretileno, associado ao retalho reposicionado lateralmente. Devido ao longo período de cronificação dos defeitos (quatro meses), a extensão destes apresentou uma variação muito significativa. Em relação ao novo osso as diferenças mais expressivas entre o grupo teste e controle foram encontradas com 50 dias de pós-operatório, favorecendo o grupo teste. Em relação à nova inserção, as diferenças favoreceram o grupo teste em todos os períodos.

O mesmo grupo de autores, em 1993, tratou uma retração de 8 mm de extensão, com 1 mm de profundidade de sondagem e ausência de tecido queratinizado, localizada num incisivo lateral inferior que apresentava extração indicada. O tratamento de escolha foi a RTG com membrana não reabsorvível de politetrafluoretileno expandido (GORE-TEX®). Após cinco meses de pós-operatório, foi observada clinicamente uma retração residual de 4 mm de extensão, 1 mm de profundidade de sondagem e presença de uma faixa de gengiva queratinizada de 3 mm. A análise histológica realizada após a extração em bloco revelou as seguintes medidas: 1,5mm de extensão epitelial; 3,66mm de inserção conjuntiva, 1,84mm de novo osso e 2,84mm de novo cimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Vicenzi et al (1998), ao utilizar uma membrana reabsorvível (RESOLUT-GORE-TEX®), e por Parma-Benfenati & Tinti (1998) ao tratar uma retração Classe III de Miller com membrana não reabsorvível de politetrafluoretileno expandido com reforço de titânio (GORE-TEX®).

Sallum et al (1998) avaliaram histometricamente a utilização da membrana de ácido polilático em defeitos tipo deiscência em cães, observando, em média, uma nova inserção de $2,79 \pm 0,74$ mm no grupo teste, onde se utilizou a membranas reabsorvíveis, e de $1,47 \pm 0,20$ mm no grupo controle, tratado pela técnica do retalho posicionado coronariamente. A extensão epitelial (epitélio sulcular e juncional) no grupo teste foi de $1,65 \pm 0,37$ mm e no controle foi de 2,64

$\pm 0,83\text{mm}$. As membranas resultaram em nova inserção estatisticamente maior e uma extensão epitelial significativamente menor, quando comparada à técnica convencional. Não foram observadas diferenças significativas quanto à formação de novo osso.

Casati et al (2000) avaliaram, histometricamente, o processo de cura de retrações gengivais bilaterais criadas em cinco cães, e tratadas pela técnica de regeneração tecidual guiada com membranas reabsorvíveis de ácido polilático (GUIDOR[®]), em comparação com o tratamento pelo posicionamento coronário do retalho. Três meses após o tratamento os animais foram sacrificados e os seguintes parâmetros histométricos foram avaliados: extensão dos epitélios sulcular e juncional, adaptação conjuntiva, extensão de novo cemento e novo osso formados além da quantidade de defeito recoberta através das duas técnicas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos parâmetros avaliados.

Mais recentemente, Sallum et al (2003) avaliaram histometricamente aplicação da proteína derivada da matriz do esmalte (ENDOGAIN[®]) em retrações gengivais criadas cirurgicamente nos caninos superiores de cinco cães. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes quando o grupo teste foi comparado ao grupo controle no qual foi usado apenas o retalho posicionado coronariamente.

Ainda estudando a ação do ENDOGAIN[®], Sallum et al (2004) realizaram um estudo em sete cães nos quais foram criados defeitos tipo deiscência nos terceiros e quartos pré-molares inferiores bilaterais. Após um período de três meses de cronificação, os defeitos (4 defeitos/cão) receberam quatro tratamentos distintos: a) cirurgia a retalho, b) proteína derivada da matriz de esmalte (ENDOGAIN[®]), c) regeneração tecidual guiada com membranas reabsorvíveis, d) associação da regeneração tecidual guiada com a proteína derivada da matriz de esmalte (ENDOGAIN[®]). A avaliação histométrica mostrou que o ENDOGAIN[®], isoladamente (3,7mm) ou em associação com as membranas (3,8mm), mostrou-

se mais efetivo em promover a formação de novo cemento quando comparado à cirurgia a retalho (2,4mm) e a associação das duas terapias regenerativas não promoveu resultados adicionais.

Apesar do advento dos procedimentos regenerativos, na clínica odontológica, o tratamento das retrações gengivais tem sido realizado com maior frequência através de técnicas cirúrgicas mucogengivais, principalmente a técnica do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial descrita por Langer & Langer (1985). No entanto, o padrão histológico de cicatrização, quando da utilização destas técnicas, ainda é bastante questionável.

Pasquinelli (1995) observou a formação de novo osso (4 mm) e nova inserção conjuntiva (4,4mm) após a realização de enxerto gengival livre para recobrimento de uma retração Classe III de Miller, de 6 mm de extensão. Neste relato de caso, o autor sugere que a utilização deste enxerto espesso de tecido conjuntivo e epitelial poderia agir como uma barreira impossibilitando uma migração epitelial, permitindo uma diferenciação celular e posterior formação de novo cemento com fibras inseridas e novo osso.

Weng et al (1998) utilizaram defeitos periodontais tipo deiscência, criados cirurgicamente nos caninos superiores de sete cães, para avaliar histológica e histometricamente o processo de cura após o uso de membranas de politetrafluoretileno expandido e enxerto de tecido conjuntivo com periósteo. Em cinco cães, um canino foi aleatoriamente escolhido para o tratamento com a membrana e o dente contralateral recebeu o enxerto. Nos outros dois cães foi realizado um controle negativo, nos quais um dos dentes não recebeu tratamento nenhum e o dente contralateral recebeu o enxerto ou a membrana. Após a abertura do retalho e a execução da raspagem e alisamento radicular, um sulco de referência apical foi realizado na altura da crista óssea antes da adaptação da membrana e do enxerto. Os animais foram sacrificados após quatro meses de pós-operatório e o processamento histológico dos blocos obtidos revelou a formação de novo osso, novo cemento e nova inserção conjuntiva em todos os grupos. Entretanto, no grupo controle o potencial de regeneração foi mínimo e

houve presença de epitélio em grande parte da raiz. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo tratado com RTG e com enxerto, em relação à nova inserção conjuntiva e ao novo osso. Os autores concluíram que as duas técnicas utilizadas possibilitaram a regeneração da parte dos tecidos periodontais, sem diferenças estatisticamente significantes entre si.

Em 1999, Harris publicou dois relatos de casos onde o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial foi utilizado no tratamento de recessões gengivais em dentes humanos posteriormente extraídos. No primeiro relato de caso (Harris, 1999) dois dentes com indicação para extração apresentavam recessão gengival de 2 e 3 mm de altura sendo tratados com enxerto subepitelial. Seis meses após o tratamento, apresentaram um recobrimento radicular de 100% e 83,3% respectivamente. Após a extração e análise histológica, dois padrões cicatriciais diferentes foram observados. Enquanto um dos dentes apresentava um epitélio juncional longo com mínima formação de nova inserção conjuntiva, no outro dente era observada a formação de nova inserção conjuntiva com isoladas áreas cobertas por epitélio juncional.

Mais recentemente, Bruno & Bowers (2000) avaliaram histologicamente um dente humano cuja extração havia sido indicada durante tratamento ortodôntico. Um ano após a cirurgia de enxerto subepitelial, os autores observaram que na porção mais apical da superfície radicular exposta ocorreu regeneração periodontal (com formação de novo osso, cemento, e ligamento periodontal) enquanto a maior extensão do defeito havia sido coberta por uma nova inserção de tecido conjuntivo.

Resultado diferente foi observado por Majzoub et al (2001) também em uma análise histológica de dentes humanos. Inicialmente o paciente apresentava recessões gengivais bilaterais nos primeiros pré-molares superiores (3 e 2,5mm) que foram tratados com enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. Um ano após a procedimento, os sítios tratados apresentaram 83% e 100% de recobrimento, porém foram indicados para extração também por motivos ortodônticos. A avaliação histológica mostrou que a cicatrização ocorreu predominantemente

através da formação de um epitélio juncional longo, com a presença de um tecido semelhante ao cimento na porção mais apical do defeito.

Sallum et al (2006) realizaram um estudo histométrico avaliando a resposta regenerativa do substituto do enxerto subepitelial: o enxerto da matriz dérmica acelular (ALLODERM®). Defeitos de recessão gengival foram criados nos caninos superiores de seis cães, cronificados por três meses e randomizados para receberem um dos tratamentos: retalho posicionado coronariamente (grupo controle) ou enxerto de matriz dérmica acelular associado ao retalho posicionado coronariamente (grupo teste). Em ambos os grupos o padrão de cura caracterizou-se pela formação de um epitélio juncional longo.

2.3 – PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O processo de cicatrização tecidual, tanto dos tecidos moles como dos tecidos duros do organismo, é mediado por uma série de eventos intra e extracelular regulados por proteínas sinalizadoras (Beasley & Einhorn, 2000; Bhanot & Alex, 2002; Anitua et al, 2004; Anderson, 2000). Uma estratégia de tratamento que vem sendo estudada é a identificação dos fatores que interferem na regulação desses eventos visando à modulação de uma resposta regenerativa mais adequada.

Embora esse processo ainda não esteja completamente esclarecido, é certo que as plaquetas desempenham uma importante função, se não decisiva, nesta cascata de eventos (Anitua et al, 2004; Marx, 2004). A ativação plaquetária em resposta ao dano tecidual resulta na formação de um trombo plaquetário e posteriormente de um coágulo que não apenas vai promover a hemostasia como também vai ser responsável pela secreção de várias proteínas biologicamente ativas.

A degranulação plaquetária inicia-se cerca de 10 minutos após a formação do coágulo e, em aproximadamente uma hora 95% dessas proteínas bioativas já foram liberadas (Marx, 2004). Após essa “explosão”, inicial as

plaquetas continuam sintetizando e secretando proteínas adicionais por 5 a 10 dias (Marx, 2004; Froum et al, 2002; Tischler, 2002). Os componentes dos grânulos α -plaquetários incluem proteínas – como a osteocalcina, a osteonectina, o fibrinogênio e a fibronectina – e vários fatores de crescimento, dentre os quais podemos destacar: o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de crescimento e transformação β), IGF (fator de crescimento similar à insulina), EGF (fator de crescimento epidérmico) e a-FGF e b-FGF (fator de crescimento de fibroblastos ácido e básico, respectivamente) (Marx, 2004; Anitua, 1999).

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e/ou regeneração tecidual. Agindo similarmente a hormônios, estes polipeptídeos são chave para regular diversos eventos celulares tais como: quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular; angiogênese e síntese de matriz extracelular (Bahot & Alex, 2002; Anitua et al, 2004; Marx, 2004). Com o intuito de aumentar a concentração destes fatores nos sítios traumatizados, vários pesquisadores têm estudado a possibilidade de aplicar o plasma rico em plaquetas (PRP), fonte rica em fatores de proliferação e de diferenciação celular, o que garantiria uma quantidade suficiente de células novas concentradas em um determinado local do organismo (Whitman et al, 1997, Marx et al, 1998; Anitua, 1999).

O PRP é um produto derivado do processamento laboratorial do sangue autógeno, coletado no período pré-operatório e rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α -plaquetários. Na literatura este composto pode aparecer com outras denominações como: plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas ou ainda, gel de plaquetas (Anitua, 1999; Lynch et al, 1989; Marx et al, 1998; Whitman et al, 1997).

Em 1986, Knighton et al apresentaram o uso de gel de plaquetas obtido por centrifugação a 135 gravidades por 20 minutos, em pacientes com ferimentos

que não epitelizavam, e mostraram que a aplicação de plaquetas topicamente sobre essas lesões estimulava a formação de tecido de granulação e acelerava a epitelização. Esta aceleração no processo de reparação de ferimentos foi mostrada em animais por Kasander et al (1990) que atribuíram tal fato à liberação de PDGF e TGF- β , entre outros fatores de crescimento, que atuariam sinergicamente.

A aplicação do PRP em cirurgia bucal foi inicialmente proposta por Whitman et al (1997) e Marx et al (1998), e a sua utilização está baseada na premissa de que um elevado número de plaquetas resultaria em uma maior liberação de fatores de crescimento, amplificando e acelerando os efeitos destes sobre quase todos os processos de cicatrização (Marx et al, 1998).

Vários estudos têm promovido forte evidência que sustenta o uso clínico do PRP tanto na periodontia, como na cirurgia buco-maxilo-facial e na implantodontia (Anitua, 1999; Della Valle et al, 2003; Froum et al, 2000; Petrungaro, 2001). No entanto, poucos são estudos caso-controle que permitem a determinação do real papel do PRP (Pietrzak & Eppey, 2005). Além disso, não existe na literatura um consenso em relação ao protocolo de obtenção do PRP e a sua caracterização o que dificulta o intercâmbio entre os estudos laboratoriais e clínicos (Eppey et al, 2004; Kevy & Jacobson, 2004; Marx, 2004; Waters & Roberts, 2004; Zimmermann et al, 2003).

A efetividade do PRP está na dependência de algumas variáveis incluindo a concentração de plaquetas na amostra, a concentração de proteínas granulares liberadas, o método de obtenção do gel de plaquetas e ainda a saúde sistêmica do paciente, uma vez que se trata de um material autógeno.

Weibrich et al (2002) sugeriram que indivíduos diferentes requerem concentrações diferentes de plaquetas para promover um efeito biológico comparável. Haynesworth et al (2002) mostraram que uma resposta eficiente à concentração de plaquetas começa quando se alcança um aumento de 4 a 5

vezes do número de plaquetas presentes no sangue total, não apresentando assim um valor quantitativo fixo.

Marx (2004) estabeleceu que, para que realmente sejam alcançados efeitos biológicos vantajosos na reparação tecidual, a concentração adequada de plaquetas deve ser de 1.000.000 plaquetas/ μ l não havendo benefício adicional em concentrações superiores. Já Anitua et al (2004), propuseram que o objetivo final deve ser a obtenção de um concentrado de plaquetas que exceda 300.000 plaquetas/ μ l.

Seria razoável se esperar que a concentração de proteínas α -plaquetárias liberadas, fosse diretamente proporcional à concentração de plaquetas alcançada com a preparação do PRP. Porém, ainda não existe um consenso na literatura quanto a esta correlação. Embora em 2001, Kevy et al, tenham observado uma relação positiva entre a concentração de plaquetas e a de fatores de crescimento (PDGF- $\alpha\beta$, TGF- β , VEGF e EGF), Eppley et al (2004) e Weibrich et al (2002) não encontraram fundamento científico para usar a concentração de plaquetas na amostra do PRP como base para o cálculo da quantidade de fator de crescimento liberado.

A quantificação dos fatores de crescimento liberados é outro ponto bastante questionado na literatura. Weibrich et al (2002, a) compararam a concentração de fatores de crescimento presentes em uma amostra de sangue do doador e em uma amostra do PRP preparado a partir deste mesmo sangue, através de dois diferentes métodos – o Kit Curasan e o método da separação celular descontínua. O PDGF-AB, TGF- β 1 e IGF-I foram encontrados em maior quantidade em ambas as preparações do PRP, quando comparado com a amostra de sangue total, sendo que o nível de TGF- β 1 era maior no PRP preparado pelo método de separação celular descontínua (SCD=268,65 $\pm$ 70,77ng/ml, KC=95,02 $\pm$ 60,67ng/ml) enquanto o PDGF-AB foi o fator de crescimento predominante no PRP preparado através do Kit Curasan (SCD=133,59 $\pm$ 46,26 ng/ml, KC=233,70 $\pm$ 111,86 ng/ml). Neste mesmo trabalho

foi realizado a quantificação dos leucócitos presentes no sangue total e nas duas amostras de PRP, sendo observada uma alta correlação entre o número de leucócitos e a concentração do PDGF-AB no PRP do kit Curasan, o que levou os autores a apontarem as células leucocitárias como uma possível fonte secundária de PDGF-AB.

Em outro trabalho, Weibrich et al (2002, b) analisaram a concentração dos seguintes fatores de crescimento: PDGF-AB, PDGF-BB, TGF- β 1, TGF- β 2 e IGF-1, em amostras de PRP, procurando correlacionar ao gênero e à idade dos 115 pacientes. As concentrações do PDGF-AB ($117,5 \pm 63,4$ ng/ml), TGF- β 1 ($169,4 \pm 84,5$ ng/ml), e IGF-1 ($84,2 \pm 23,6$ ng/ml) estavam elevadas, mas não houve correlação com o gênero e a idade do paciente nem tão pouco, com a concentração de plaquetas. Os fatores de crescimento PDGF-BB ($9,9 \pm 7,5$ ng/ml) e TGF - β 2 ($0,4 \pm 0,3$ ng/ml) estavam presentes em menor concentração.

Zimmerman et al (2003) tentaram relacionar seis diferentes métodos de ativação da degranulação plaquetária com a concentração dos fatores de crescimento PDGF- $\alpha\beta$, PDGF- $\beta\beta$ e TGF- β 1 em amostras de PRP. No entanto, devido à grande variação dos resultados, os autores chegaram a conclusão que a concentração dos fatores obtidos nos diferentes métodos, deve ser investigado e interpretado separadamente.

Lacoste et al (2003) observaram uma quantidade de fatores de crescimento muito maior no PRP em relação à do sangue total, com um aumento variando de 80% a 100%. Nesse trabalho, a ativação plaquetária foi realizada através da adição de cloreto de cálcio e de trombina bovina, usados separadamente ou associados em diferentes concentrações. Os autores observaram que a associação da trombina com o cloreto de cálcio na concentração mais elevada ($142,8$ U/ml de trombina e $14,3$ mg/ml de CaCl_2) promoveu maior liberação dos fatores de crescimento. Para determinar a relevância fisiológica deste aumento na liberação de fator de crescimento sobre o processo de angiogênese, as diferentes amostras de PRP e de sangue total foram

incubadas a 37°C por 5 dias em meios de cultura contendo células endoteliais do cordão umbilical humano. Todas as amostras mostraram uma efetiva ação mitogênica sobre as células endoteliais embora o PRP tenha demonstrado uma superioridade principalmente quando ativado através da associação de trombina e de CaCl_2 (142,8 U/ml de trombina e 14,3 mg/ml de CaCl_2).

Okuda et al (2003) avaliaram os níveis de PDGF-AB e TGF - β encontrados no plasma não-concentrado e no PRP de 20 voluntários com idade entre 24 e 48 anos. Além da quantificação destes fatores também foi avaliado, in vitro, o efeito proliferativo do PRP sobre as seguintes células: células epiteliais, fibroblastos gengivais, osteoblastos e células do ligamento periodontal. Após a coleta sanguínea o PRP foi preparado através de um processo de dupla centrifugação e congelado a -20°C. Os osteoblastos (UMR 106) e as células epiteliais (SCC 25) foram cultivados a uma concentração de 2×10^5 células em pratos de cultura de 35 mm e incubados com 5% de PRP por 24 horas a 37°C. Os fibroblastos gengivais (1×10^5 cells /35 mm), as células do ligamento periodontal (2×10^5 cells / 35 mm) e os osteoblastos (2×10^5 cells /35 mm) foram tratados com 2% de PRP por 24 horas a 37°C. A atividade mitogênica dessas células foi avaliada através da contagem celular ou da análise imunocitoquímica da incorporação de 5-bromodeoxiuridina. Os autores encontraram elevados índices de PDGF-AB e TGF- β no PRP, quando comparado a análise de sangue total, estando em uma concentração de 182 ng/ml (440,6%) e 140,9 ng/ml (346,6%) respectivamente. Também foi observado que o PRP estimulou tanto a divisão celular como a síntese de DNA na cultura de células osteoblásticas, de fibroblastos gengivais e de células do ligamento periodontal. No entanto, o PRP suprimiu a atividade mitótica das células epiteliais. Segundo os autores, esses resultados fornecem evidências convincentes para a aplicação clínica do PRP na terapia periodontal regenerativa, uma vez que a supressão da proliferação das células epiteliais inibiria a formação de um epitélio juncional longo permitindo a formação de uma nova inserção conjuntiva sobre a superfície radicular.

Completando o estudo anterior, Kawase et al (2003) utilizaram as mesmas amostras de sangue e de PRP para realizar uma análise bioquímica do gel de plaquetas e para examinar seu efeito sobre a síntese de colágeno tipo I em culturas de osteoblastos e de células do ligamento periodontal (1×10^5 células). As células foram tratadas com diferentes concentrações de PRP e incubadas por 24 horas. Após este período, foi realizada uma análise imunocitoquímica para detecção de colágeno tipo I e de fibrina. Também foi realizada uma avaliação visual da viscosidade do meio de cultura. Os autores observaram que: 1) logo após a adição do PRP em concentrações $\geq 5\%$ aos meios de cultura, houve a formação de um material semelhante a um gel e subsequente houve uma alteração morfológica nas células que passaram a apresentar vários pseudópodes; 2) as células do ligamento periodontal embebidas no gel de plaquetas, expressaram maiores índices de colágeno tipo I; 3) nos meios de cultura que receberam o PRP havia a presença de fibrina/fibrinogênio detectado através de uma análise imunocitoquímica. Nos meios de cultura controle (não tratados com PRP) este último achado não foi observado, indicando que o fibrinogênio não seria produzido por essas células e sim fornecido pelo PRP.

Ainda nesse trabalho, com o objetivo de avaliar o envolvimento do fibrinogênio na formação do gel, os autores trataram meios de cultura de osteoblastos e células do ligamento (1×10^5 células) com diferentes concentrações de fibrinogênio (0,1 - 2,5 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas. Os autores observaram a formação de um gel mais consistente do que o gel formado com PRP embora o tempo decorrido para a sua formação ($\geq 20\text{h}$) tenha sido muito maior do que para o PRP ($\leq 30\text{ min}$). A adição de fibrinogênio (2,5 $\mu\text{g/ml}$) estimulou a produção de colágeno tipo I enquanto que a adição de um inibidor de trombina ao gel formado por PRP inibiu a expressão do colágeno tipo I pelas células do ligamento periodontal. Segundo os autores, o fibrinogênio presente no PRP é convertido em fibrina, formaria um coágulo de fibrina que estimularia a síntese de colágeno tipo I de maneira mais efetiva do que o PDGF e o TGF- β pois produziria alguns fatores de

crescimento endógenos liberados gradualmente. Sendo assim, o PRP apresentaria dois diferentes mecanismos de ação que combinados, promoveriam uma efetiva cicatrização dos efeitos periodontais. Enquanto os fatores de crescimento (PDGF e TGF- β) estimulam a proliferação das células do ligamento periodontal, o coágulo de fibrina estimularia a produção de matriz extracelular através da maior expressão de colágeno tipo I.

Outro fator que confere grande variabilidade aos resultados dos estudos sobre o PRP é a grande diversidade de métodos para sua obtenção (Whitman et al, 1997; Marx et al, 1998; Marx et al, 2004). A coleta do sangue periférico (utilizando bolsas de sangue ou tubos a vácuo); o tempo de utilização e de armazenamento do gel de plaquetas; as características da centrifugação (velocidade, tempo e número de processos) bem como o método de ativação e formação o gel, são alguns passos que diferem de um método para outro. Em razão disso, ainda não existe um protocolo único ou ideal para obtenção do plasma rico em plaquetas. Diferentes centrífugas, sejam automáticas ou não, em diferentes velocidades e tempo de centrifugação estão descritas na literatura (Whitman et al, 1997; Marx et al, 1999; Anitua et al, 1999; Lekovic et al, 2002; Weibrich & Kleis, 2002).

A centrifugação do sangue periférico tem por objetivo separar os componentes sangüíneos em três fases em função da densidade. As plaquetas são células pequenas, ricas em lipídeos, e por isso “flutuam” no plasma enquanto as demais células, mais pesadas, tendem a se sedimentar durante a centrifugação (Ferreira & Amorim Filho, 2000). Sendo assim, após a centrifugação, a fase menos densa compreende o plasma pobre em plaquetas (PPP) e se localiza mais superficialmente, é rico em fibrinogênio e fatores da coagulação e serve como uma matriz osteocondutora juntamente com o PRP. O PRP ou também denominado “*buffy coat*” situa-se na porção média e contém as plaquetas concentradas e as células brancas, enquanto que as hemácias compreendem a porção mais densa e se localizam na parte inferior (Marx, 1999). Se a

centrifugação for intensa e/ou o tempo de centrifugação for muito longo, as plaquetas podem “descer” para junto dos glóbulos vermelhos tornando difícil sua recuperação (Ferreira & Amorim Filho, 2000). Autores como Whitman et al (1997), Marx et al (1998) e Anitua (1999) citam em seus protocolos a velocidade da centrifugação empregada, o que não determina necessariamente a intensidade da centrifugação, uma vez que esta estará na dependência do raio da centrífuga utilizada. Segundo Jahn (2002) os autores deveriam sempre se referir à força centrífuga relativa (FCR) aplicada ao sangue, expressa em gravidades (G).

Outra etapa muito importante durante a obtenção do PRP é a adição de um agente coagulante que neutraliza a ação do anticoagulante do tubo ou bolsa para se obter o gel de plaquetas. Os principais agentes descritos na literatura são a trombina bovina associada ou não ao cloreto de cálcio e o aquecimento do cloreto de cálcio 10% a 37°C. O uso de trombina bovina é questionado por Landsberg et al (1998) que afirmaram que o uso de trombina bovina estaria associado à formação de anticorpos para os fatores de coagulação V e VI e, sendo assim, sua utilização poderia levar ameaça à vida. Em razão da trombina não estar disponível comercialmente no Brasil, o cloreto de cálcio 10% tem mostrado ser um método adequado para a formação do gel PRP.

A utilização do PRP em procedimentos clínicos requer alguns cuidados tanto em relação à técnica, e ao protocolo de centrifugação e ativação, como também em relação às condições de saúde sistêmica do paciente. Todos os procedimentos devem ser realizados de acordo com as Normas Técnicas em Hematoterapia (Portaria Nº 1376, de 19 de novembro de 1993 do Ministério da Saúde). Exames de sangue e coagulograma são necessários previamente para se avaliar as condições de se obter uma quantidade viável de plaquetas e assim obter os resultados esperados.

2.4 – APLICAÇÃO DO PRP NO TRATAMENTO DOS DEFEITOS PERIODONTAIS

O primeiro relato do uso do PRP no tratamento de defeitos periodontais foi realizado por de Obarrio et al (2000). Os autores apresentaram três casos clínicos (dois defeitos infra-ósseos e um defeito de furca Grau II) tratados com a associação do PRP ao osso alógeno desmineralizado (DFDBA) cobertos ou não por uma membrana de colágeno. Os autores observaram uma significativa redução na profundidade de sondagem em todos os casos, sendo que, em um dos casos, o acompanhamento radiográfico detectou formação de novo osso dois meses após o tratamento. A cirurgia de re-entrada foi realizada em dois casos mostrando completo preenchimento ósseo do defeito 13 meses após o tratamento.

Em 2001, Petrungaro advogou o uso do PRP como fonte de fatores de crescimento para a implantodontia e periodontia afirmando que seu uso em cirurgia periodontais estéticas, bem como ao redor de implantes saudáveis e doentes, proporcionaria rápida e efetiva reparação. Segundo o autor, o uso do PRP estaria indicado em cirurgias de elevação do assoalho do seio maxilar, enxertos de tecidos ósseo em bloco ou particulado, extração e instalação imediata de implantes além de enxerto gengival livre e enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. O autor defendeu ainda o uso do PRP em pacientes idosos afirmando que estes possuem menos células mesenquimais indiferenciadas apresentando melhor benefício com os fatores de crescimento. O uso em pacientes idosos também é indicado por Tischler (2002).

Camargo et al (2002) realizaram um estudo clínico controlado, randomizado com modelo de boca dividida, para avaliar a associação do PRP e do osso bovino à regeneração tecidual guiada no tratamento de defeitos infra-ósseos proximais. Para cada paciente, um defeito foi tratado com a associação PRP+ osso bovino + RTG enquanto o outro defeito recebeu apenas a membrana. Seis meses após o tratamento, foi realizada uma cirurgia de reentrada que mostrou maior preenchimento ósseo no grupo teste ($4,78 \pm 1,26\text{mm}$ por vestibular

e $4,66 \pm 1,32\text{mm}$ por lingual) quando comparado ao grupo controle ($2,31\text{mm} \pm 1,32\text{mm}$ por vestibular e $2,26 \pm 0,81\text{mm}$ por lingual). O ganho de inserção clínica também foi maior no grupo teste ($4,37 \pm 1,31\text{mm}$ / $4,28 \pm 1,33\text{mm}$) quando comparado aos defeitos que receberam apenas RTG ($2,62 \pm 1,23\text{mm}$ / $2,44 \pm 1,21\text{mm}$).

Estudo com desenho semelhante foi realizado por Lekovic et al (2002) com o objetivo de comparar a utilização do PRP com o osso bovino associado ou não à RTG, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação à redução na profundidade de sondagem, ao ganho de inserção ou ao preenchimento ósseo. Os autores concluíram que a associação do PRP com o osso bovino foi efetiva para o tratamento dos defeitos infra-ósseos estando ou não associados à RTG.

Os mesmos autores (Lekovic et al, 2003) estudaram a aplicação clínica do PRP no tratamento de defeitos de furca Grau II bilaterais em molares inferiores de humanos. Enquanto um dos defeitos recebeu tratamento com RTG associado ao PRP e ao osso bovino, o defeito contralateral recebeu apenas instrumentação periodontal. Os resultados mostraram superioridade para o grupo teste tanto para a redução da profundidade de sondagem e o ganho de nível clínico de inserção, como para o aumento do nível ósseo vertical e horizontal.

Hanna et al (2004) testaram a associação do PRP ao osso bovino no tratamento de defeitos infra-ósseos e observaram resultados clínicos superiores no grupo teste onde o PRP foi utilizado. Após seis meses, a média para redução na profundidade de sondagem foi de 3,54 e 2,53 mm para o grupo teste e controle, enquanto o ganho de inserção foi de 3,15 e 2,31 mm respectivamente ($p \leq 0,05$).

Mais recentemente, Sammartino et al (2005) realizaram um estudo no qual o PRP foi aplicado isoladamente em defeitos ósseos angulares, presentes na raiz distal dos 2^{os} molares inferiores, causados pela impactação mesio-angular dos

3° molares adjacentes. Doze semanas após a cirurgia, os autores observaram uma notável redução na profundidade de sondagem e aumento do nível de inserção nos casos tratados com PRP.

Em relação à aplicação do PRP em cirurgias de recobrimento radicular, existem poucos relatos na literatura. Petrungaro (2002) apresentou três casos clínicos de recobrimento radicular, em situações de recessão gengival, utilizando PRP associado ao enxerto de tecido conjuntivo, em dois casos, e à membrana de colágeno, em um caso. Segundo o autor o uso de PRP promoveu uma redução no sangramento nas áreas doadora e receptora além de reduzir a incidência de dor e o potencial de infecção pós-operatório. Além disso, o PRP ajudou na estabilização inicial do enxerto devido a suas propriedades coesivas e adesivas.

Em 2004, Griffin & Cheung apresentaram dois relatos de caso nos quais recessões gengivais de 2,0 a 2,5mm de altura foram tratadas com uma dupla camada de esponja de colágeno contendo o PRP. As esponjas de colágeno foram recortadas de acordo com as medidas dos defeitos e então foram embebidas no PRP antes da adição da trombina bovina (1000 U) e do cloreto de cálcio a 10%. Os autores observaram completo recobrimento radicular 6 meses após o procedimento cirúrgico e relataram que em um dos casos houve um ganho de 1,5mm de tecido queratinizado.

Posteriormente os mesmos autores (Cheung & Griffin, 2004), ainda tentando avaliar a eficácia clínica da associação do PRP à esponja de colágeno, realizaram um estudo clínico controlado com desenho em boca dividida. Nesse estudo foram tratados 15 pacientes com recessões gengivais bilaterais classe I ou II de Miller nos dentes anteriores ou nos pré-molares. Em cada paciente os defeitos foram sorteados e aleatoriamente designados para receber o tratamento teste (esponja de colágeno embebida no PRP) ou controle (enxerto de tecido conjuntivo subepitelial). Os resultados mostraram que ambas as técnicas são efetivas no tratamento de recessões gengivais Classe I ou II de Miller, apresentando 80% e 95% de recobrimento radicular nos lados teste e controle,

respectivamente. Após oito meses, as diferenças em relação à redução do tamanho da recessão ($2,48 \pm 0,62\text{mm}$ para grupo controle e $2,43 \pm 0,62\text{mm}$ para o grupo teste) bem como em relação ao ganho de inserção clínica ($3,61 \pm 0,57\text{mm}$ para o grupo controle e $3,48 \pm 0,58\text{mm}$ para o grupo teste) não foram estatisticamente significantes sendo que o lado tratado com PRP apresentou uma superioridade estética dos resultados e um menor desconforto pós-operatório.

Vastardis et al (2004) utilizaram o PRP para hidratar a matriz dérmica acelular (Alloderm[®]) antes de posicioná-la sobre o defeito de retração e recobri-la com retalho posicionado coronariamente. Os autores observaram que o uso do PRP acelerou o processo de cicatrização e os resultados clínicos, quando comparado ao grupo controle no qual o Alloderm[®] foi hidratado com solução salina.

Em um estudo piloto em humanos, Huang et al (2005) testaram o efeito do PRP quando associado ao retalho posicionado coronariamente (RPC) no tratamento de recessões gengivais Classe I de Miller. Seis meses após a cirurgia, a média de recobrimento radicular foi de $83,5\% \pm 21,8\%$ no grupo controle (RPC) e $81,0\% \pm 28,7\%$ no grupo teste ($P > 0,05$). Os autores concluíram que a aplicação do PRP durante o procedimento de recobrimento radicular realizado com retalho posicionado coronariamente não promoveu resultados clínicos superiores em defeitos de retração Classe I de Miller.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente a associação do plasma rico em plaquetas (PRP) e do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, na regeneração periodontal de defeitos do tipo retração criados cirurgicamente em cães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Seleção dos animais:

Foram utilizados seis (6) cães fêmeas, em idade adulta, sem raça definida, pesando em média 15 kg, em bom estado de saúde geral e com dentição completa.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e realizados sob aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP - Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) – Protocolo 758-1.

Após a chegada dos cães ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, os mesmos foram mantidos em baias separadas, as quais foram limpas diariamente. Os cães foram submetidos às mesmas condições ambientais e alimentares, e água *ad libitum*, além de monitorados diariamente até o final de todo o experimento.

4.2- Procedimentos Cirúrgicos:

- Anestesia

Antes da cirurgia, os animais foram pesados e, de acordo, com seu peso corpóreo, receberam via intramuscular, uma injeção de sulfato de atropina (Sulfato de Atropina 0,50mg[®], Hipolabor, São Paulo, SP, Brasil) e 1,5mg/10 kg de cloridrato de dihidrotiazina (Rompum[®], Bayer do Brasil AS, São Paulo, Sp, Brasil). Em seguida, os animais foram submetidos à anestesia geral, através de uma

injeção intravenosa de uma solução de 2,5% de tiopental sódio (Tiopental[®], Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, SP, Brasil), na dose de 1ml/kg. A via intravenosa foi mantida com soro fisiológico durante o ato cirúrgico, possibilitando a hidratação do animal e a administração de doses de manutenção do anestésico. A área cirúrgica foi localmente anestesiada com xilocaína 2% (Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil), contendo epinefrina (1:50.000), com o objetivo de reduzir o sangramento e assegurar um efeito anestésico adequado.

- Confecção dos defeitos:

Retrações gengivais bilaterais foram criadas cirurgicamente na superfície vestibular dos caninos superiores através da técnica descrita por Gottlow et al (1986), que consiste de duas incisões verticais, distantes 5 mm entre si, partindo da margem gengival, com extensão de 7 mm. Estas incisões foram unidas apicalmente por uma incisão horizontal e coronariamente, por uma incisão intra-sulcular (Figura 01). O tecido delimitado pelas incisões foi removido com o auxílio de um descolador de periósteo. O tecido ósseo subjacente foi removido com microcinzel e a superfície radicular foi instrumentada com curetas de Gracey 5/6 (Figura 02).

Utilizando-se uma broca esférica (Carbide ½ - KG-Sorensen[®]) em baixa rotação, sob irrigação com soro fisiológico, foi confeccionado um sulco na superfície radicular ao nível da junção cimento esmalte para que pudesse servir como um ponto de referência coronária durante a avaliação histométrica.

- Cronificação dos defeitos:

Visando reduzir o potencial de regeneração espontânea observado nos defeitos criados cirurgicamente em animais, e assim minimizar a interferência deste nos resultados finais do presente estudo, os defeitos foram submetidos a um processo de cronificação (Figura 03). Para tanto, foi adaptada sobre a superfície radicular exposta uma tira de matriz metálica do tipo Tofflemire envolta por um fio de algodão (Linha 10, Corrente Ind. e Com, SP, Brasil) e fixada à coroa do dente através de resina composta fotopolimerizável (Z100[®] 3M do Brasil). Este dispositivo de cronificação foi mantido justaposto à área do defeito por um período de um mês permitindo o acúmulo de biofilme dental.

Com o objetivo de preparar o tecido para a cirurgia subsequente, após este período de um mês, as tiras de matriz foram removidas, os defeitos foram submetidos à raspagem supragengival (ultrassom) e os animais passaram por um regime de escovação dental e aplicação tópica de digluconato de clorexidina a 1%, durante os sete dias que precederam os procedimentos cirúrgicos (Figura 04).

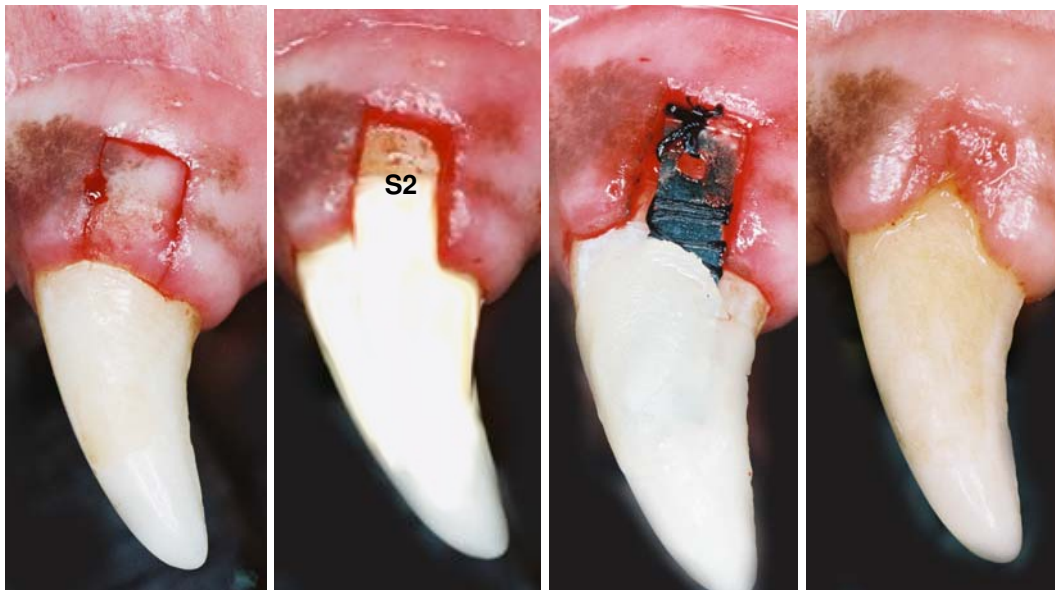


Figura 01 – Aspectos macroscópico da face vestibular de um canino esquerdo após a realização das incisões que delimitam a porção de tecido mole (5x7mm) a ser removida.

Figura 02 – Aspectos macroscópico da face vestibular de um canino esquerdo após ostectomia, raspagem e alisamento radicular e criação do sulco de referência coronário (S2).

Figura 03 – Aspectos macroscópico da face vestibular de um canino esquerdo após a adaptação de uma matriz para acúmulo de placa (um mês).

Figura 04 – Aspectos macroscópico da face vestibular de um canino esquerdo após a remoção da matriz e a realização de raspagem supragengival.

- Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas:

Para a obtenção do PRP imediatamente antes de iniciar a cirurgia para tratamento dos defeitos, foi coletado aproximadamente 40ml de sangue de cada animal, sob anestesia geral, através de tubos de coleta de sangue a vácuo tipo Vacutainer® (BD Brasil, São Paulo, SP) de 4,5ml contendo 0,5ml de anticoagulante (citrato de sódio a 3,2% tamponado). Foram obtidos cerca de oito tubos de sangue por animal sendo que, um dos tubos com uma amostra do sangue total assim como uma amostra do PRP obtido antes da adição de cloreto de cálcio a 10%, foram enviadas para um laboratório de análises clínicas veterinário (IMAGO, Piracicaba/SP) para a contagem de plaquetas nestas duas porções.

A metodologia de separação de plaquetas do sangue foi baseada no estudo de Jahn (2002) no qual foi desenvolvido um protocolo de dupla centrifugação. Esta técnica foi escolhida uma vez que os resultados do citado trabalho mostraram que a dupla centrifugação foi eficiente para a separação de plaquetas do plasma, levando a uma concentração média de plaquetas de 370,2% no terço inferior do tubo.

Os tubos foram centrifugados com uma força centrífuga relativa (FCR) de 200G (gravidades) e 1200 RPM (Rotações por minuto), já padronizada pelo fabricante da centrífuga, modelo odontológico SIN 1200 (CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri – SP) durante 10 minutos.

Decorrido este tempo, com a ajuda de uma micropipeta, a parte superior do tubo, contendo o plasma e leucócitos, foi separada da parte inferior, contendo as plaquetas, leucócitos e células vermelhas sanguíneas, sendo então descartada. Os tubos foram levados novamente à centrífuga, na qual foram submetidos a um segundo processo de centrifugação durante 15 minutos e FCR de 200G.

Após este período, três fases podiam ser observadas, estando o PRP localizado logo acima da porção vermelha do sangue (Figura 05, a). Ele foi então coletado com o auxílio de uma micropipeta de 1000µl e transferido para uma placa de petri esteril onde foi acrescentada a solução de Cloreto de Cálcio 10% na proporção de 1:8 da quantidade total de PRP coletado e homogeneizado com auxílio de uma ponteira de pipeta (Figura 05, b).

A placa contendo o PRP foi então levada a banho-maria a 37°C, juntamente com o enxerto previamente removido, por cerca de 10 minutos até que ocorresse a geleificação e pudessem ser aplicados aos defeitos (Figura 05, c).

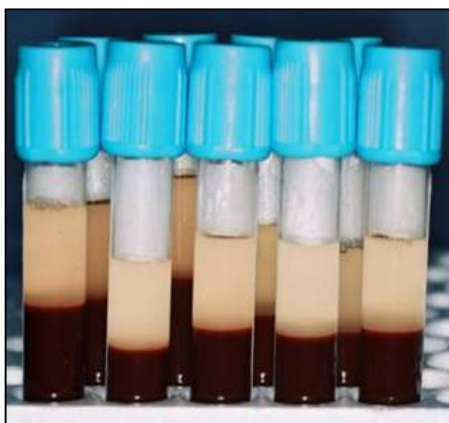


Figura 05.a – Resultado da primeira centrifugação. Estando o PRP localizado logo acima da porção vermelha do sangue.



Figura 05.b – Porção correspondente ao PRP localizada logo acima da porção vermelha do sangue.



Figura 05.c – Enxerto associado ao PRP após 10 min de banho-maria.

▪ Obtenção do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial:

Para a obtenção do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, duas faixas de tecido de 8 mm X 10 mm de extensão e de aproximadamente 1,0mm de espessura, foram removidas do palato duro de cada animal, na região do 1º. molar superior até o 2º. molar superior, através de dissecação total. Este tecido foi então desepitelizado, com auxílio de uma tesoura cirúrgica, e colocado em soro fisiológico até a transferência para o leito receptor, no lado controle, ou para o

PRP no lado teste. A região doadora recebeu suturas com fio reabsorvível Vycril 4-0 (Ethicon®, Jhonsons do Brasil SA, São José dos Campos, SP, Brasil) objetivando controlar a hemostasia.

- Tratamento dos defeitos:

O tratamento de cada par de defeitos foi determinado por sorteio, sendo que um hemi-arco recebeu o tratamento I (Controle – enxerto de tecido conjuntivo subepitelial) enquanto que o defeito contralateral recebeu o tratamento II (Teste – enxerto de tecido conjuntivo subepitelial + PRP).

Para confecção de um retalho trapezoidal combinado (espessura total até a junção mucogengival e espessura parcial a partir deste ponto), que foi utilizado tanto no lado teste como no lado controle, duas incisões horizontais foram realizadas na altura da junção cimento-esmalte. Estas incisões foram unidas mesialmente por uma incisão sulcular e se estendiam distalmente como duas incisões relaxantes oblíquas que ultrapassavam a linha mucogengival (Figura 06, a).

Após o rebatimento do retalho, as superfícies radiculares de ambos os lados, teste e controle, foram instrumentadas com curetas de Gracey 5/6, com o intuito de promover sua descontaminação. Um sulco de referência apical foi criado ao nível da crista óssea alveolar, com utilização de broca esférica (Carbide ½ - KG-Sorensen, São Paulo, SP) em baixa rotação, sob irrigação com soro fisiológico (Figura 06, b).

Nos dentes do lado controle, o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial removido da região do palato duro foi adaptado de forma a recobrir totalmente o defeito e pelo menos 2 mm da crista óssea adjacente a este, sendo mantido em posição através da sutura reabsorvível ao redor do dente (Figura 06, c). Com o enxerto adaptado e suturado, o retalho foi posicionado coronariamente para

recobrí-lo e recebeu sutura suspensória com fio reabsorvível Vycril 4-0 (Ethicon[®], Jhonsons do Brasil SA, São José dos Campos, SP, Brasil). O fechamento primário das incisões relaxantes foi conseguido através de suturas interrompidas com o mesmo fio reabsorvível (Figura 06, e).

No lado teste, os mesmos procedimentos foram realizados, porém o enxerto foi colocado no leito receptor após ser associado ao PRP e levado à banho Maria a 37°C por 10 minutos. Assim, a geleificação do PRP ocorria após a associação do enxerto, de maneira tal que este ficava envolto pelo gel de plaquetas (Figura 06, d).

Portanto, cada animal recebeu os dois tratamentos: enxerto de tecido conjuntivo subepitelial associado ao PRP e enxerto de tecido conjuntivo subepitelial isoladamente, em um tipo de desenho experimental de boca dividida.

Após os procedimentos cirúrgicos foi administrada uma dose única de Pentabiótico para animais de pequeno porte, uma associação de penicilina e estreptomicina (0,1ml/kg) , via intramuscular, (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Laboratório Wyeth-WhiteHall LTDA, São Paulo, SP, Brasil) imediatamente após o fechamento dos defeitos. Um antiinflamatório não esteroide (Fluxinin Meglumine - Banamine[®] 10mg/mL, Ind. Quim. e Farm Schering-Plough S/A Veterinária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), na dosagem de 1mL/10 kg, foi administrado por 3 dias consecutivos, via subcutânea, com objetivo de controlar a dor e o edema pós-operatório. Nas quatro semanas seguintes, os cães foram mantidos com colar protetor elizabetano e receberam dieta pastosa – ração em lata (BomGuy, Dumilho AS Ind. e Com., Espírito Santo, Brasil) e para prevenir qualquer trauma sobre a área operada e sobre as suturas. Também foi realizado um controle químico de placa por meio de aplicação tópica diária de digluconato de clorexidina 0,12%.



Figura 06.a – Aspectos macroscópico da face vestibular de um canino esquerdo após a confecção de um retalho trapezoidal



Figura 06.b – Aspectos macroscópico da face vestibular de um canino esquerdo após o rebatimento do retalho.



Figura 06.c – Adaptação do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial sobre o defeito (lado controle).

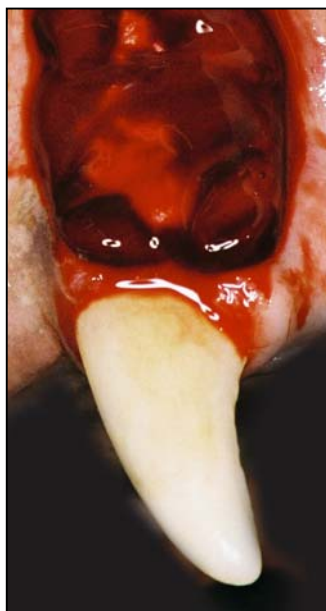


Figura 06.d – Adaptação do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, associado ao PRP, sobre o defeito (lado teste).



Figura 06.e – Reposicionamento coronário do retalho.

4.3 - Processamento Histológico:

Decorridos 45 dias dos procedimentos cirúrgicos de tratamento das retrações gengivais, os animais foram anestesiados e sacrificados pela técnica de perfusão endovenosa de formol a 4%. As arcadas foram dissecadas e divididas em blocos contendo os defeitos.

Os blocos foram descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico a 50%, citrato de sódio a 20% e água destilada, numa proporção de 1/2: 1/4: 1/4). As peças foram mantidas suspensas em um pedaço de tecido tipo tule, de maneira a ficarem submersas na solução, porém sem entrar em contato com o fundo do recipiente.

O progresso da descalcificação foi avaliado com perfurações em áreas que não eram de interesse para análise. Após dois meses, as peças foram aparadas removendo-se a sua porção palatina e a coroa dental. Após um período total no descalcificador de 4-5 meses, os espécimes foram lavados em água corrente, colocados em solução de sulfato de sódio a 5% por 48 horas e novamente lavados, procedendo-se a tramitação laboratorial de rotina, com desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

Os blocos foram seccionados com espessura de 6µm e orientação vestibulo-lingual, obtendo-se 20 lâminas por bloco, representativas da porção mediana do defeito. Posteriormente, estas lâminas foram coradas com HE.

4.4-Análise Histométrica:

Para cada dente, foram selecionadas e digitalizadas seis lâminas, representativas do terço mediano do defeito e distanciadas igualmente entre si. As imagens das lâminas foram capturadas por uma câmera digital acoplada em um

microscópio óptico (Microscópio Axioskop 2 plus®) e, com auxílio de um programa de análise de imagens (Image-Pro®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foram realizadas as mensurações dos parâmetros. Posteriormente foram obtidas médias para cada medida histométrica em cada animal.

A avaliação histométrica foi realizada tomando como referência o sulco apical (confeccionado durante o procedimento de tratamento do defeito, ao nível da crista óssea = S1) e o sulco coronário (confeccionado no momento da criação do defeito, ao nível da junção cimento-esmalte = S2) (Figura 07).

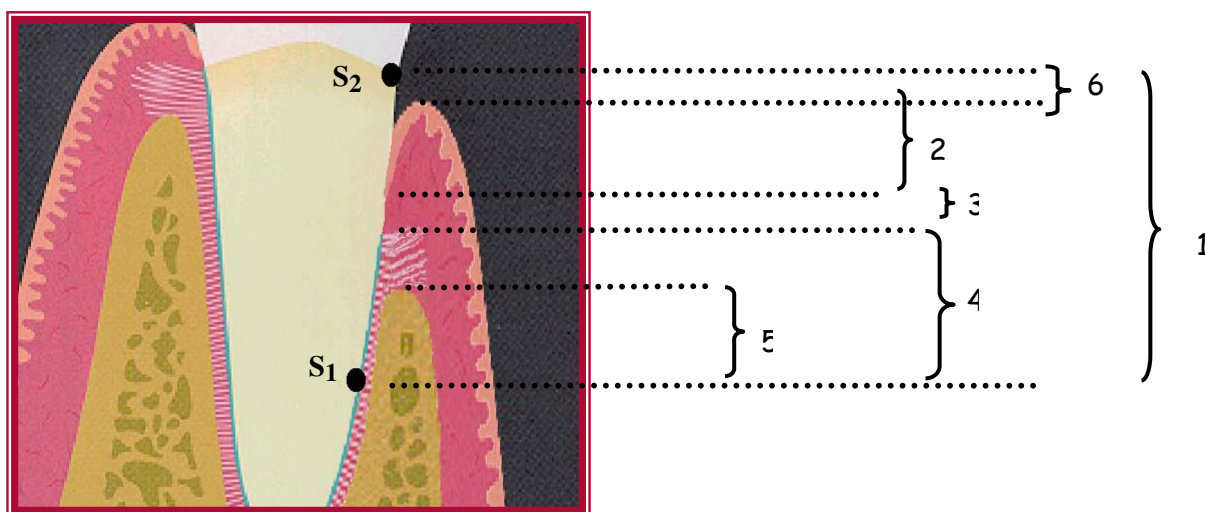


Figura 07 – Parâmetros histométricos avaliados.

Os parâmetros histométricos avaliados foram:

1. EXTENSÃO DO DEFEITO SOBRE A RAÍZ: (S1 – S2).
2. EXTENSÃO DO EPITÉLIO SULCULAR E JUNCIONAL: margem gengival ao limite apical do epitélio juncional.
3. ADAPTAÇÃO CONJUNTIVA: limite coronário do cimento ao limite apical

do epitélio juncional.

4. NOVO CEMENTO: do sulco de referência apical (S1) ao limite coronário do cimento.
5. NOVO OSSO: do sulco de referência apical (S1) ao limite coronário do osso.
6. POSIÇÃO GENGIVAL: margem gengival ao sulco de referência coronário (S2).

Um outro parâmetro avaliado foi o de EPITÉLIO SOBRE A RAÍZ, que foi calculado subtraindo-se da extensão do epitélio total a extensão da posição gengival.

4.5-Análise Estatística:

Foram obtidos a média e o desvio padrão para cada parâmetro, em que cada animal foi considerado um bloco, recebendo os dois tratamentos caracterizando um delineamento experimental em blocos ao acaso.

Inicialmente foi aplicada uma Análise Exploratória dos dados para cada parâmetro, utilizando o Proc Lab do Programa SAS versão 8.2, 2001 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Uma vez que os dados histométricos atenderam às pré-suposições da análise exploratória, foram submetidos ao Teste de t-Student pareado, com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1- Observações Clínicas:

Após o período de cronificação de um mês, anteriormente aos procedimentos básicos, foi observada a formação de cálculo e biofilme dental sob as superfícies radiculares expostas pela técnica de criação do defeito.

Durante os 45 dias de pós-operatório, os cães permaneceram em boa saúde, sem nenhuma complicação de ordem geral. O processo de cura foi caracterizado por uma resposta favorável do tecido gengival. Nenhum sinal clínico de inflamação ou reação adversa dos tecidos (deiscência ou formação de abscessos ou supuração) foi observado. Do ponto de vista clínico, o recobrimento radicular obtido nos lados teste e controle foi muito semelhante.

5.2- Observações Plasmáticas:

A média do número de plaquetas do sangue total dos animais coletado imediatamente antes da cirurgia foi de $182,00 \pm 76,35$ plaquetas/ μ L, aumentando para $413,00 \pm 142,59$ plaquetas/ μ L após o preparo do PRP. Esta concentração de plaquetas resultou em uma proporção aumentada de 241,95% (Tabela 02).

Tabela 02: Quantidade de plaquetas inicial (sangue total) e final (PRP) em μ l e Concentração total de plaquetas (em %).

Cão	Plaquetas Inicial /ml	Plaquetas Final /ml	Concentração (%)
1	308,00	694,38	225,45
2	136,00	290,37	213,51
3	148,00	431,77	291,73
4	96,00	325,72	339,29
5	232,00	497,42	214,40
6	172,00	287,85	167,35
Média	182,00	421,25	241,95
Desvio-Padrão	76,35	157,84	62,22

5.3- Observações Histológicas:

Em ambos os lados, observou-se um epitélio oral pavimentoso estratificado queratinizado com características de normalidade e com presença de cristas epiteliais bem desenvolvidas. No epitélio juncional também foram encontradas características de normalidade. A espessura foi progressivamente maior no sentido coronário, não apresentando cristas epiteliais, ulcerações e tendência à queratinização. No entanto, no lado teste (Figura 08.a), este epitélio apresentou uma extensão menor do que a observado no lado controle (Figura 08.b) onde atingiu áreas mais apicais. Não foi observado uma clara distinção entre as bordas do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial e o tecido conjuntivo da região receptora.

A superfície radicular apresentou irregularidades, tanto no lado teste como no lado controle, nas porções onde não houve uma adesão epitelial, ou seja, nas regiões onde ocorreu uma adaptação conjuntiva ou formação de novo cemento com fibras inseridas. Foram observadas em algumas lâminas presença de pequenas lacunas de reabsorção com presença de estruturas semelhantes a células multinucleadas.

No interior do sulco de referência apical, observou-se formação de uma camada mais espessa de tecido morfológicamente semelhante ao cemento, que se estendeu coronariamente, em maior extensão no lado teste. Este “novo cemento” estava revestido por uma camada de cementoblastos (Figura 09). Coronariamente a esta região, observou-se uma área de adaptação das fibras conjuntivas que estavam apenas justapostas e orientadas paralelamente à superfície radicular, sem a formação de novo cemento. Nestas regiões predominaram as lacunas de reabsorção e irregularidades na superfície radicular.

No presente estudo a formação de novo osso não foi um achado comum em todos os espécimes sendo observada apenas em dois elementos de cada grupo. Nos demais elementos, foi observada uma reabsorção do tecido ósseo que se encontrava apicalmente em relação ao sulco de referência apical (Figura 10).



Figura 08.a – Cão 1 – Lado Teste: aumento de 25x. Sulco apical (A), sulco coronário (B), extensão apical do epitélio juncional (E). Coloração HE.

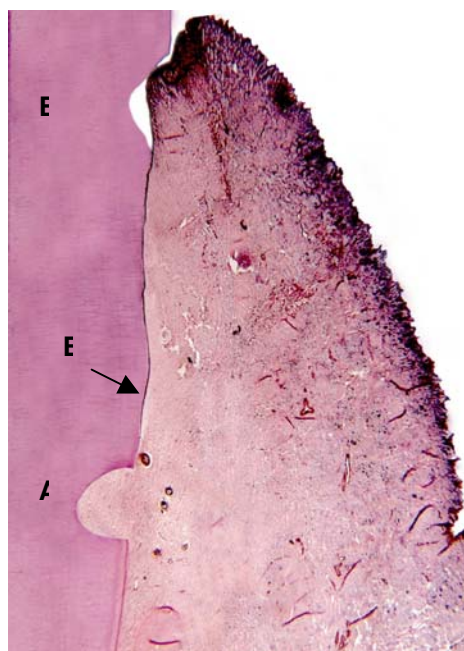


Figura 08.b – Cão 1 – Lado Controle: aumento de 25x. Sulco apical (A), sulco coronário (B), extensão apical do epitélio juncional (E) Coloração HE.

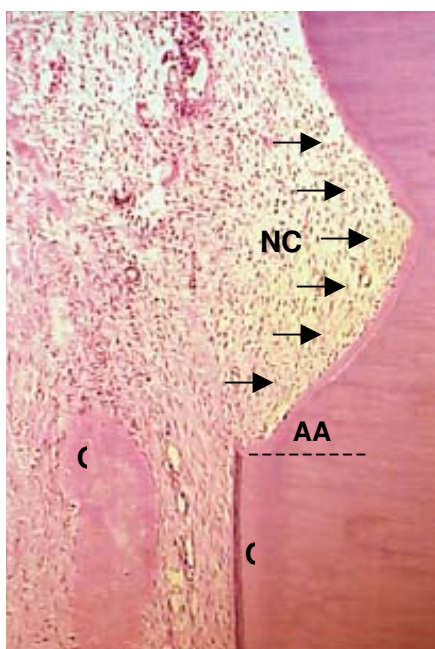


Figura 09 – Aumento de 400x. Limite apical do sulco apical (AA), novo cemento formado (NC), cemento antigo (C), tecido ósseo (O). Coloração HE.

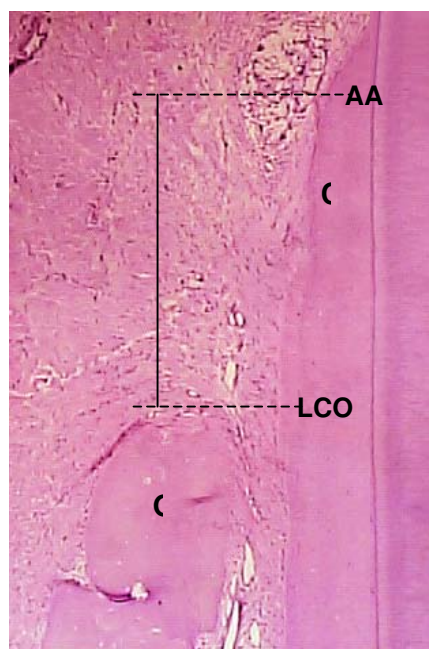


Figura 10 – Aumento de 400x. Limite coronário do tecido ósseo (LCO) apicalmente ao sulco apical caracterizando uma reabsorção óssea. Limite apical do sulco apical (AA). Cemento antigo (C), tecido ósseo (O). Coloração HE.

5.4-Observações Histométricas:

Considerando as médias em milímetros, houve diferença estatisticamente significativa apenas na extensão de novo cemento formado. O grupo teste teve uma formação de novo cemento de $2,18 \pm 0,78\text{mm}$ enquanto que no grupo controle, o valor observado foi de $1,19 \pm 0,62\text{mm}$ ($p = 0,05$). No entanto, a amplitude dos valores foi indicativa de uma menor extensão de epitélio sobre a raiz no lado teste $1,38 \pm 0,37\text{mm}$ quando comparado ao lado controle $2,31 \pm 1,23\text{mm}$. Os valores das médias finais, desvio padrão e mediana de cada parâmetro avaliado, nos grupos teste e controle, são mostrados na Tabela 03.

Os resultados das diversas medidas histométricas realizadas, expressos em porcentagem da distância ocupada, por cada parâmetro avaliado, entre os sulcos de referência apical e coronário são demonstrados no Gráfico 01.

Gráfico 01: Porcentagem da distância (em mm) ocupada pelos parâmetros histométricos entre os sulcos de referência coronário e apical.

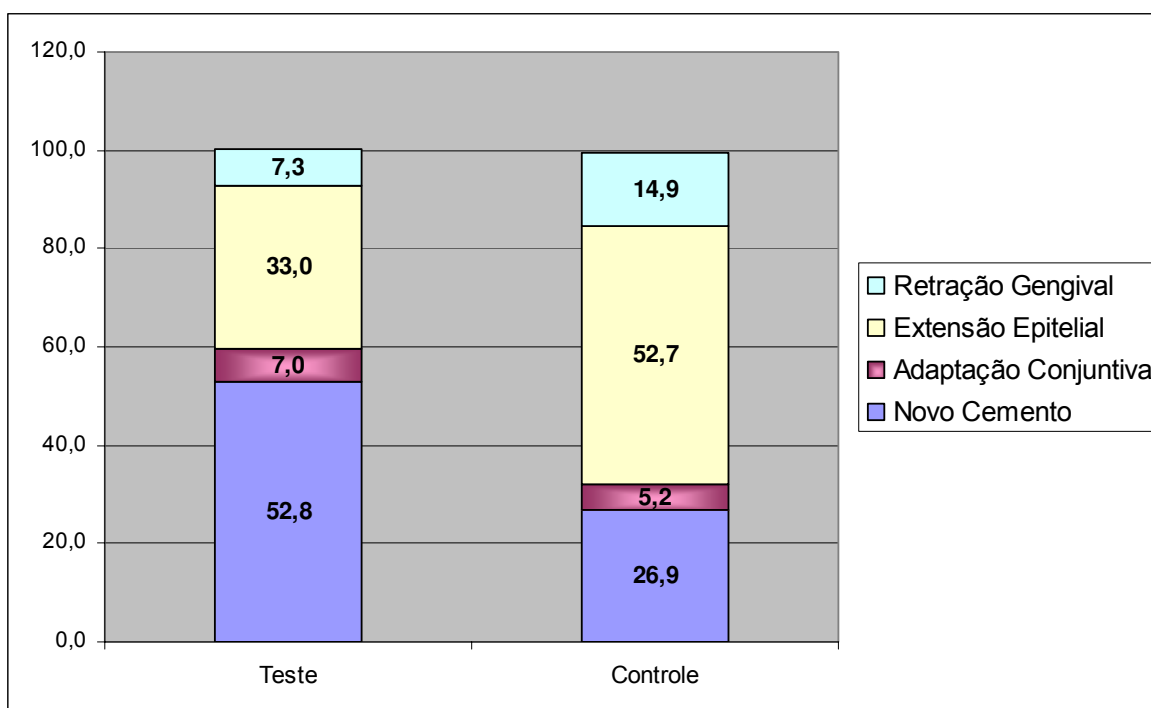


Tabela 03: Média, desvio padrão (DP) e mediana (em mm) e valores de p dos parâmetros histométricos.

	TESTE Média ± DP mediana	CONTROLE Média ± DP mediana	p
Extensão do Defeito	4,13 ± 0,83 4,13	4,47 ± 0,58 4,34	0,50
Extensão Epitelial	2,04 ± 0,57 1,91	2,49 ± 0,82 2,44	0,28
Adaptação Conjuntiva	0,29 ± 0,28 0,19	0,23 ± 0,18 0,15	0,64
Novo Cimento	2,18 ± 0,78 2,1	1,19 ± 0,62 1,12	0,05
Novo Osso	- 0,57 ± 0,95 0,59	- 0,46 ± 1,34 0,33	0,91
Posição Gengival	0,30 ± 0,73 0,00	0,62 ± 1,01 0,20	0,59
Epitélio sobre a Raiz	1,38 ± 0,37 1,30	2,31 ± 1,23 2,18	0,17

Teste t-Student pareado

($p \leq 0,05$)

6. DISCUSSÃO

Na prática clínica, a retração gengival é um problema muito comum tanto em pacientes com boa higiene oral (Sanges & Germon, 1976; Serino et al, 1994) como também em pacientes com higiene oral precária (Løe et al, 1992), podendo chegar a uma incidência de até 100% em pessoas acima de 46 anos (Reatzke, 1985). O recobrimento de superfícies radiculares expostas pode ser conseguido através de diversas técnicas cirúrgicas. No entanto, a busca pela técnica ideal deve levar em consideração não só os aspectos clínicos como também os histológicos.

Técnicas cirúrgicas mucogengivais convencionais mostraram bons resultados quanto ao recobrimento radicular e à resolução de problemas estéticos e de hipersensibilidade dentinária. Entretanto, estudos histológicos em humanos e em animais demonstraram que o padrão de cura obtido ao se realizar estas técnicas caracteriza-se pela formação de epitélio juncional longo na maior parte da raiz (Pfeifer & Heller, 1971; Caffesse et al, 1984) embora quantidades limitadas de regeneração também possam ser obtidas (Gottlow et al, 1986; Pasquinelli, 1995; Weng et al, 1998).

Diante da dificuldade em se avaliar histologicamente em humanos o tipo de reparação conseguida após técnicas para recobrimento radicular, devido aos aspectos éticos relacionados as biópsias em bloco, modelos animais são geralmente utilizados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, histometricamente, o processo de cura de retrações gengivais criadas cirurgicamente em cães e tratadas pela associação do PRP ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial.

O enxerto subepitelial de tecido conjuntivo associado ao retalho posicionado coronariamente (Reatzke, 1985; Langer & Langer, 1985) foi a técnica de escolha para este trabalho. Segundo os trabalhos de Rocuzzo et al (2002) e Clauser et al (2003) a porcentagem de recobrimento radicular conseguida pela

técnica do enxerto subepitelial varia entre 65% e 98% sendo que a porcentagem de recobrimento total varia entre 0% e 90%.

A utilização do PRP associado ao enxerto subepitelial teve como objetivo avaliar a sua interferência no processo cicatricial dos tecidos moles, através do aumento da concentração de fatores de crescimento liberados dos grânulos α -plaquetários. Em 2001, Petrungaro já havia observado uma aceleração do processo de maturação dos tecidos moles após a realização de cirurgias mucogengivais nas quais foi aplicado o PRP. Em 2004, Cheung & Griffin observaram resultados estéticos superiores quando da utilização do PRP no tratamento de recessões gengivais Classe I ou II de Miller. Porém, Huang et al. (2005) em um estudo piloto em humanos não observaram uma superioridade clínica da associação do PRP ao retalho posicionado coronariamente (RPC) quando aplicado no tratamento de recessões gengivais Classe I de Miller. Da mesma forma, no presente estudo o recobrimento radicular obtido nos lados teste e controle foi muito semelhante do ponto de vista clínico, sugerindo que ambos os procedimentos foram efetivos para o tratamento de retrações gengivais, criadas cirurgicamente em cães, pela técnica de Gottlow et al (1986).

A metodologia utilizada neste experimento permitiu a obtenção de defeitos bilaterais semelhantes e a manutenção de uma adequada altura óssea interproximal, o que seria difícil de obter com defeitos induzidos por ligadura. Os defeitos do lado teste apresentaram uma extensão média de $4,13 \pm 0,83$ mm enquanto que os do lado controle apresentaram $4,47 \pm 0,58$ mm, sem diferença estatisticamente significativa. Uma desvantagem desse tipo de defeito utilizado é a tendência a um recobrimento parcial da retração e a uma maior neoformação óssea, por possuir paredes laterais e não ser muito profundo. Esta tendência é aumentada devido a uma resposta cicatricial mais efetiva observada em cães. No entanto, o desenho experimental do presente estudo, permitindo um tempo de cronificação entre a criação e o tratamento do defeito, reduziu a interferência da regeneração espontânea sobre os resultados finais.

A quantificação das plaquetas nas amostras de sangue total e de PRP encaminhadas para o laboratório de análises clínicas veterinário, evidenciou que, no presente estudo, foi alcançada uma concentração de plaquetas em torno de 241,95 % (média de 413,75 plaquetas/ μ L) em relação à quantidade do sangue total dos animais. Estes valores foram inferiores aos obtidos no trabalho de Jahn (2002), estudo em humanos do qual a metodologia de separação de plaquetas foi retirada (370,2%), e no trabalho de Gurgel (2005) que também foi realizado em cães utilizando a mesma metodologia (320,6%).

No entanto, até o presente momento, a quantidade de plaquetas e de fatores de crescimento presentes no PRP, com o objetivo de se promover os efeitos biológicos esperados, ainda permanece desconhecida (Weibrich et al, 2002). De acordo com Lucarelli et al (2003), o conhecimento da concentração real ou pelo menos uma estimação da quantidade desses fatores, é necessária para assegurar uma confiável utilização clínica do PRP já que sua capacidade regenerativa está diretamente relacionada ao nível desses fatores. Segundo esses mesmos autores, nem a contagem de plaquetas do sangue total nem do PRP são previsíveis em relação aos níveis resultantes dos fatores de crescimento.

O padrão de cicatrização observado no presente estudo, no qual os defeitos de retração foram tratados com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, caracterizou-se pela formação de um epitélio juncional longo ($2,49 \pm 0,82$ mm) se estendendo em direção apical à área do defeito. Nos defeitos tratados com a associação do PRP ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, houve uma tendência à formação de um epitélio menos extenso ($2,04 \pm 0,57$ mm), porém sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Quando foi calculada a extensão do epitélio sobre a raiz e esta medida foi expressa em porcentagem da distância ocupada entre os sulcos de referência, observou-se que no lado controle o tecido epitelial ocupava grande parte da extensão do defeito (51,67%) semelhante ao observado no estudo de Weng et al (1998), no qual um tecido epitelial recobriu 43% da extensão do defeito. No lado

teste, ao contrário, a porcentagem da extensão do defeito recoberta por tecido epitelial foi bem menor, correspondente a 33,41% da distância entre os notchs.

Segundo Lindhe et al (1982) a cicatrização através da formação de um epitélio juncional longo não compromete a estabilidade dos resultados obtidos com a terapia cirúrgica. Entretanto, em longo prazo, a presença deste tecido epitelial tem sido vista como uma seqüela indesejável resultante dos eventos de cura periodontal, uma vez que parece impedir a formação de um novo aparato de inserção sobre a superfície radicular além de não apresentar uma regeneração periodontal verdadeira (Cortellini, 1993).

Uma maior faixa de tecido semelhante à cimento foi observada no lado teste ($2,18 \pm 0,78$ mm) quando comparado ao lado controle ($1,19 \pm 0,62$ mm) com diferenças estatisticamente significantes ($p=0,05$). Quando novamente a medida do parâmetro histométrico foi expressa em porcentagem da distância ocupada entre os sulcos de referência, observou-se que no lado controle apenas 26,9% da superfície radicular foi recoberta por novo cimento enquanto no lado teste mais da metade da área do defeito (52,8%) estava recoberta por este tecido. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Casati et al (2000) e Sallum et al (2003). Em ambos os trabalhos, retrações gengivais foram criadas cirurgicamente nos caninos superiores de cinco cães seguindo a mesma metodologia de Gottlow et al (1986) utilizada no presente estudo. Casati et al (2000), utilizando a regeneração tecidual guiada com membrana reabsorvível de ácido polilático, observaram um recobrimento de 61% da área do defeito com um tecido semelhante ao cimento, enquanto que Sallum et al (2003) encontraram um tecido cementóide recobrindo 67% do defeito ao aplicarem proteína derivada de esmalte (Emdogain®).

Provavelmente essa maior extensão de novo cimento com fibras inseridas, assim como a tendência à formação de um tecido epitelial menos extenso observadas no grupo teste, deve-se à ação biológica do PRP em nível celular e molecular como observado em estudos in vitro (Okuda et al, 2003; Kawase et al, 2003; Lacoste et al, 2003). Além disso, os fatores de crescimento

PDGF- β e TGF- β que estão presentes no PRP, apresentam a habilidade de promover a proliferação de células do ligamento periodontal (Kawase et al, 2005) e a proliferação e diferenciação de células cementoprogenitoras (Grzesik & Narayanam, 2002).

Conforme observado no estudo de Okuda et al (2003), o PRP apresenta uma ação inibitória sobre a atividade mitótica das células epiteliais. Tal fato não impediu a formação de um epitélio juncional longo nos elementos do grupo teste do presente estudo, porém pode ter retardado sua migração em direção apical resultando em um menor recobrimento do defeito por este tecido. Conseqüentemente, houve uma menor interferência do tecido epitelial na formação de um novo aparato de inserção resultando na formação de uma maior faixa de nova inserção conjuntiva nos elementos do lado teste. Aliado a esse fato está a ação indutiva do PRP sobre a divisão celular dos fibroblastos gengivais e das células do ligamento periodontal (Okuda et al, 2003, Kawase et al, 2005) e sobre a produção de colágeno tipo I pelas células do ligamento periodontal (Kawase et al, 2003).

Não existem na literatura estudos que avaliem a ação do PRP sobre as células indiferenciadas, presentes no ligamento periodontal, induzindo sua diferenciação em cementoblastos e levando a uma maior formação de cimento como observado no presente estudo. No entanto, tal resultado pode ser explicado pelo potencial de alguns fatores de crescimento, encontrados no PRP, em estimular a formação do tecido cementário. Lynch et al (1989) e Rutherford et al (1992), ao utilizarem uma combinação de PDGF-BB e IGI-I recombinantes no tratamento de defeitos periodontais criados em cães e em primatas, respectivamente, observaram que estes fatores de crescimento, agindo sinergicamente, resultaram em uma substancial formação de cimento. Da mesma forma, Takayama et al (2001) e Sato et al (2004) demonstraram um aumento na formação do cimento radicular quando da aplicação de bFGF recombinante no tratamento de defeitos periodontais criados em primatas e em cães, respectivamente.

No presente estudo a formação de novo osso não foi um achado comum em todos os espécimes, sendo observada apenas em dois elementos de cada grupo enquanto que, nos demais elementos, foi observada uma reabsorção do tecido ósseo. Este resultado foi atribuído à reabsorção óssea decorrente do trauma cirúrgico e pôde ser observado devido ao reduzido espaço de tempo entre o tratamento cirúrgico e a avaliação histométrica.

Todavia, este tempo de avaliação foi escolhido com o objetivo de identificar a influência do PRP no início do processo cicatricial baseado em estudos como o de Garg et al (2000) que relataram que todas as plaquetas disponíveis no PRP degranulam dentro de 3 a 5 dias e que sua atividade termina dentro de 10 dias. Após um intervalo de cicatrização maior, provavelmente, esta reabsorção óssea decorrente do trauma cirúrgico não seria observada porém os resultados finais não poderiam ser atribuídos à interferência do PRP.

Além de não ter sido encontrada a formação óssea em todos os elementos, não foi observado um benefício da adição do plasma rico em plaquetas, em relação à osteogênese, no grupo teste. Vale ressaltar que Arpornmaeklong et al (2004) demonstraram *in vitro* que o PRP inibiu de forma dose-dependente a diferenciação osteogênica de pré-osteoblastos e que o PRP não é um substituto da BMP-2 recombinante na indução osteogênica.

Os resultados do presente estudo devem ser avaliados com cautela antes de se extrapolar para a prática clínica, uma vez que até o presente momento, não existe na literatura um consenso em relação ao protocolo de obtenção do PRP e a sua caracterização (Eppley *et al*, 2004; Kevy & Jacobson, 2004; Marx, 2004; Waters & Roberts, 2004; Zimmermann et al, 2003). O conhecimento da concentração real ou pelo menos uma estimativa da quantidade dos fatores de crescimento encontrados no PRP, é necessária para assegurar uma confiável utilização clínica do gel de plaquetas uma vez que sua capacidade regenerativa está diretamente relacionada ao nível destes fatores.

7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites desse estudo podemos concluir que:

- 1) A associação do PRP ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial mostrou-se mais efetiva em promover neoformação cementária quando comparado ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial isoladamente.

REFERÊNCIAS ¹

1. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(3): 323-332.
2. American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms. J. Periodont., Chicago, 1992. Special issue.
3. Anderson JM. The cellular cascades of wound healing. In: Davies JE, ed. *Bone Engineering*. Toronto: em squared inc.; 2000: 81-93.
4. Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
5. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *J Oral Implantol* 1999; 14: 529-535.
6. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler NR, Würzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:60-70.
7. Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontology* 2000; 22: 44-50.
8. Beasley LS, Einhorn TA. Role of growth factors in fracture healing. In: Canalis E, ed. *Skeletal Growth Factors*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000: 311-322.
9. Becker W, Becker BE, Berg LE. Periodontal treatment without maintenance. A retrospective study in 44 patients. *J Periodontol* 1984; 55: 505-509.
10. Bernimoulin, J.P. et al. Coronally repositioned periodontal flap: clinical evaluation after one year. *J. Clin. Periodont.*, 1975; 2: 1-13.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

11. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plastic Surg* 2002; 18: 27-33.
12. Bjorn H. Free transplantation of gingiva propria. *Sween. Dent. J.* 1963; 22: 684-689, 1963.
13. Bruno JF, Bowers GM. Histology of a human biopsy section following the placement of a subepithelial connective tissue graft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20: 225- 231.
14. Caffesse RG, Kon S, Castelli WA, Nasjleti CE. Revascularization following the lateral sliding flap procedure. *J Periodontol* 1984; 55:352-359.
15. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodont Res* 2002;37: 300-306.
16. Casati MZ, Sallum EA, Caffesse RG, Nociti Jr FH, Sallum AW, Pereira SLS. Guided tissue regeneration with a bioabsorbable polylactic acid membrane in gingival recessions. A histometric study in dogs. *J Periodont* 2000; 71:238-248.
17. Caton J, Zander HA. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. *J Clin Periodontol* 1976; 3:54-58.
18. Caton J, Proye M, Polson A. Maintenance of healed periodontal pockets after a single episode of rootplaning. *J Periodontol* 1982; 53:420-424.
19. Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 224-231.
20. Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 1993; 1:9-15.
21. Cheung WS, Griffin TJ. A comparative study of root coverage with connective tissue and platelet concentrate grafts : 8-months results. *J Periodontol* 2004; 75:1678-1687.

22. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 56-59.
23. Christie RJ, Carrington L, Alving B. Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: Report of two cases. *Surgery* 1997; 121(6): 708-710.
24. Clauser C, Nieri M, Franceschi D, Pagliaro U, Pini-Prato G. Evidence-based mucogingival therapy. Part 2: Ordinary and individual patient data meta-analyses of surgical treatment of recession using complete root coverage as the outcome variable. *J Periodontol* 2003; 74:741-756.
25. Common J, McFall WT. The effect of citric acid on attachment of laterally positioned flaps. *J Periodontol* 1983; 54: 9-18.
26. Cortellini P, Pini Prato G, Baldi C, Clauser C. Guided tissue regeneration with different materials. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1990; 10: 136-151.
27. Cortellini P, De Sanctis M, Pini Prato G, Baldi C, Clauser C. Guided tissue regeneration procedure using a fibrin-fibronectin system in surgically induced recessions in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1991; 11: 151-163.
28. Cortellini P, Clauser C, Pini Prato G. Histologic assessment of new attachment following the treatment of human buccal recession by means of guided tissue regeneration procedures. *J Periodontol* 1993; 64: 387-391.
29. Della Valle A, Sammartino G, Marenzi G et al. Prevention of postoperative bleeding in anticoagulated patients undergoing oral surgery: use of platelet-rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:1275-1278.
30. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502-1508.
31. Ferreira, TM; Amorim Filho, L. Preparação de componentes sanguíneos. In: Fretz et al. *Hemoterapia*. 20ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2000. p. 15-39.

32. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP et al. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts : three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22 : 45-53.
33. Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implantol Update* 2000; 11(3): 17-21.
34. Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, Lynch SE. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodont Res* 1996; 31: 301-312.
35. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 494-503.
36. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. Treatment of localized gingival recessions with coronally displaced flap and citric acid. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 57-43.
37. Gottlow J, Nyman S, Karring T. Guided tissue regeneration following treatment of recession-type defects in the monkey. *J Periodontol* 1990; 61:680-685.
38. Griffin TJ, Cheung WS. Treatment of gingival recession with a platelet concentrate graft : A report of two cases. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004; 24: 589-595.
39. Grupe, H.E., Warren, R.F. Repair of ginival defects by a sliding flap operation. *J Periodont* 1978; 49(7): 351-356.
40. Gurgel BC. Efeito do plasma rico em plaquetas e das membranas não reabsorvíveis de FTFE-e no reparo de defeitos ósseos peri-implantares. Estudo histométrico em cães. [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/ Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2005.
41. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 474-84.

42. Hammarstrom L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997; 24 (9 Pt 2): 669-677.
43. Hanna R, Trejo PM, Weltman RL. Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma : A randomized clinical trial. *J Periodontol* 2004; 75:1668-1677.
44. Harris RJ. Human histologic evaluation of root coverage obtained with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft. A case report. *J Periodontol* 1999 a; 70:813-821.
45. Harris RJ. Successful root coverage : A human histologic evaluation as a case. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999 b; 19: 439- 447.
46. Haynesworth SE, Kadiyala S, Liang LN et al. Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet release suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates. Presented at the 48th Meeting of the Orthopedic Research Society , Boston, MA, 2002. In: Marx RE. Platelet –Rich Plasma : Evidence to Support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:489-496.
47. Heijl L, Heden G, Svardstrom G, Ostgren A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 705-714.
48. Huang LH, Neiva R E F, Soehren S E, Giannobile W V, Wang HL. The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure : a pilot study. *J Periodontol* 2005; 76:1768-1777.
49. Jahn RS. Metodologia para obtenção de plasma rico em plaquetas [tese]. São Paulo: Universidade de Santo Amaro/ Faculdade de Odontologia; 2002.
50. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *J Orthop Res* 2004; 22: 653-658.

51. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74:858-864.
52. Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H. In vitro evidence that the biological effects of Platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor- β or platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 2005; 76:760-767.
53. Kevy SV, Jacobson MS, Blasetti et al. Preparation of growth factor enriched autologous platelet gel. Society for Biomaterials 27th Annual Meeting Transactions. St. Paul, MN April 24-29, 2001, paper n° 262.
54. Kevy SV, Jacobson MS, Kadiyala S. Characterization of growth factor levels in platelet concentrates. 5th Annual Hilton Head Workshop on Engineering Tissues: 2001.
55. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *L Extra Corpor Technol* 2004;36 :28-35.
56. Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin – plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002a; 17:86-94.
57. Kim SG, Kim YK , Park JC et al. A comparative study of integration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002b; 60(9):1018-25.
58. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wound. *Ann Surg* 1986; 204(3): 322-329.
59. Ksander GA; Sawamura SJ; Ogawa Y; Sundson J, McPherson JM. The effect of platelet plasma release on wound healing in animal models. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22(5): 781-791.

60. Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: Effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol* 2003; 74: 1498-1507.
61. Landesberg R., Mosses M., Karpatkin M. Risks of using platelet plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56(9): 1116-1117.
62. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodont* 1985; 56 (13): 715-720.
63. Laurell L, Gottlow J. Guided tissue regeneration update. *Int Dent J* 1998; 48: 386-393.
64. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol* 2002; 73(2):198-205.
65. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenney EB. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol* 2003; 30(8):746-51.
66. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurstam K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol* 1993; 64(11 Suppl): 1116-1128.
67. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 1996; 67(4): 407-417.
68. Lindhe J, Ericsson I. The effect of elimination of jiggling forces on periodontally exposed teeth in the dog. *J Periodontol* 1982; 53(9): 562-7.
69. Linghorne WJ, O'Connell DC. Studies in the regeneration and reattachment of supporting structures of the teeth. I. Soft tissue reattachment. *J Dent Res* 1950;29:419-428.

70. Listgarten MA, Rosenberg MM. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. J Periodontol 1979; 50(7): 333-344.
71. Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J Periodontol 1991; 62(7): 458-467.
72. Lynch SE. Methods for evaluation of regenerative procedures. J Periodontol 1992; 63:1085-1092.
73. Majzoub Z, Landi L, Grusovin MG, Cordioli G. Histology of connective tissue graft. A case report. J Periodontol 2001; 72: 1607- 1615.
74. Marx RE. Platelet –Rich Plasma : a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics, Quintessence; 1999.
75. Marx RE. Platelet–Rich Plasma : What is PRP and what is not PRP ? Implant Dent 2001a; 10:225-228. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62:489-496.
76. Marx RE. The biology of platelet –rich plasma J Oral Maxillofac Surg 2001b; 59:1119-1121.
77. Marx RE. Platelet –Rich Plasma : Evidence to Support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004c; 62:489-496.
78. Masters LB, Mellonig JT, Brunsvold MA, Nummikoski PV. A clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with tetracycline in the treatment of periodontal osseous defects. J Periodontol 1996; 67 (8):770-781.
79. Moskow BS, Karsh F, Stein SD. Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. J Periodontol 1979; 50:291-300.
80. Nabers, J.M. Extension of vestibular fornix utilizing a gingival grafts. Case history. Periodontics, Chicago, v.4, n.2, p.77+9, Mar./April. 1996.

81. Nelson SW. The subpedicle connective tissue graft: a bilaminar reconstructive procedure for the coverage of denuded root surfaces. J Periodontol 1987; 58(2): 95-102.
82. Obarrio JJ, Araújo-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy : platelet gel biotechnology - Case Reports. Int J Periodontics Restorative Dent 2000; 20: 487-497.
83. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. J Periodontol 2003; 74:849-857.
84. Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H , Sato T, Kawase T, Saito Y, , Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: A comparative controlled clinical study. J Periodontol 2005; 76:890-898.
85. Page RC, Schoeder HE. Periodontitis'n man and other animals : a comparative review. Zurich: Jarger, 1982. p.272.
86. Park JB, Matsuura M, Han KY et al. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. J Periodontol 1995; 66(6): 462-77.
87. Parma-Benfenati S, Tinti C. Histologic evaluation of new attachment utilizing a titanium-reinforced barrier membrane in a mucogingival recession defect : a case report. J Periodontol 1998; 69: 834-839.
88. Pasquinelli KL. The histology of new attachment utilizing a thick autogenous soft tissue graft in an area of deep recession : a case report. Int J Periodontics Restorative Dent 1995; 15: 248-257.
89. Pasquinelli KL. The histology of new attachment utilizing a thick autogenous soft tissue graft in an area of deep recession : a case report. Int J Periodontics Restorative Dent 1995; 15(3): 248-257.

90. Pennel, B.M. et al. Oblique rotated flap. J. Periodont 1965; 5: 305-308.
91. Pereira SLS, Sallum AW, Casati MZ, Caffesse RG, Weng D, Nociti Jr FH, Sallum EA. Comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in the treatment of dehiscence-type defects. A Histomorphometric study in dogs. J Periodontol 2000, 71: 1306-1314.
92. Petrungaro PS. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. Compend Contin Educ Dent 2001; 22:729-736.
93. Petrungaro P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. Dent Implant Update 2002;12 (6): 41-46.
94. Pfeifer JA, Heller R. Histologic evaluation of full and partial thickness lateral repositioned flaps : a pilot study. J Periodontol 1971; 42: 331-333.
95. Pfeifer JH, Heller R. Histologic evaluation of full and partial thickness lateral repositioned flaps : a pilot study. J Periodont 1971; 42 (5): 331-333.
96. Ractzke PB. Covering Localized areas of root exposure employing the envelop technique. J Periodont 1985; 36(7): 347-402.
97. Raetzke, P.B. Covering localized areas of root exposure employing the envelop technique. J Periodont 1985; 36(7): 347-402.
98. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, Nissle RR, Stults DL. 4 modalites of periodontal treatment compared over 5 years. J Clin Periodontol 1987; 14(8): 445-452.
99. Renvert S, Nilveaus R, Egelberg J. Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. V. Effect of root planing versus flap surgery. J Clin Periodontol 1985; 12(8):616-629.
100. Roccuzzo M, Bunino M, Needleman I, Sanz M. Periodontal plastic surgery for treatment of localised gingival recessions: A systematic review. J Clin Periodontol 2002; 29 (Suppl. 3): 178-194.
101. Roccuzzo M et al . Comparative study of a bioresorbable and non-resorbable membrane in the treatment of human buccal gingival recessions. J Periodont 1996; 67(1): 1-14.

102. Roldán JC, Jepsen S, Schimidt C, Knüppel H, Rueger DC, Açil Y et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Oral Implant Res* 2004; 15: 716-723.
103. Rosling B, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J Clin Periodontol* 1976; 3(1):38-53.
104. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodont Res* 1992; 27: 285-290.
105. Sallum EA, Sallum AW, Nociti Jr FH, Marcantonio RAC, Toledo S. New attachment achieved by guided tissue regeneration using a bioabsorbable polylacti acid membrane in dogs. *Int J Periodontic Restor Dent Carol Stream* 1998; 18:502-510.
106. Sallum EA, Casati MZ, Caffesse RG, Funis LP, Nociti Jr FH, Sallum AW. Coronally positioned flap with and without enamel matrix protein derivative for the treatment of gingival recession. *Am J Dent* 2003; 16:287-291.
107. Sallum EA, Pimentel SP, Saldanha JB, Nogueira-Filho GR, Casati MZ, Nociti Jr FH, Sallum AW. Enamel matrix derivate and and guided tissue regeneration in the treatment of dehiscence-type defects: A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2004; 75:1357-1363.
108. Sallum EA, Nogueira-Filho GR, Casati MZ, Pimentel SP, Saldanha JB, Nociti Jr FH. Coronally positioned flap with and without acellular dermal matrix graft in gingival recession: A histometric study. *Am J Dent* 2006; 19:128-132.
109. Sammartino G, Marenzi G, D'Agostino E. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 766-770.
110. Sato Y, Kikuchi M, Ohata N, Tamura M, Kuboki Y. *J Periodontol* 2004; 75:243-248.

111. Schlegel KA, Kloss FR, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Wiltfang. Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(4): 505-511.
112. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E et al. Bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004; 25(23): 5387-93.
113. Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001;21(4):345-55.
114. Sugarman EF. A clinical and histological study of the attachment of grafted tissue to bone and teeth. *J Periodontol* 1969;40:381-387.
115. Sumner, C.F. Surgical repair of recession on the maxillary cuspid: incisally repositioning the gingival tissues. *J Periodont* 1969; 2 : 119-121.
116. Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2002;68 :22-24.
117. Vastardis R et al. Platelet rich plasma plus AlloDerm® for gingival recession treatment. *J Dent Res* 2004; 83(Spec Issue) Abstract 1151.
118. Vicenzi G, et al. Guided tissue regeneration using a resorbable membrane in gingival recession-type defects : a histologic case report in humans. *Int J Periodont Rest Dent* 1998; 18:24-33.
119. Waters JH, Roberts KC. Database review of possible factors influencing point-of-care platelet gel manufacture. *J Extra Corpor Technol* 2004; 36 : 250-254.
120. Weibrich G, Kleis WKG. Curasan PRP Kits vs. PCCS PRP system: Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet rich plasma. *Clin Oral Implant Res* 2002a; 13: 437.
121. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hiltzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cran Maxillofac Surg* 2002b ;30, 97-102.

122. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hiltzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Impl Res*; 2003;14:357-362.
123. Weibrich G, Hansen T, Kleis WKG, Buch R, Hiltzler WE. Effect of platelet concentration in platelet rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34: 665-671.
124. Weng D et al. Healing patterns in recession defects treated with ePTFE membranes and with free connective tissue grafts : a histological and histometric study in the beagle dog. *J Clin Periodont* 1998; 25:238-245.
125. Wilderman MN, Wentz FM. Repair of a dentalgingival defect with a pedicle flap. *J Periodontol* 1965;36:218-231.
126. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Orl Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294-1299.
127. Woodyard SG, Snyder AJ, Henley G, O'Neal RB. A histometric evaluation of the effect of citric acid preparation upon healing of coronally positioned flaps in nonhuman primates. *J Periodontol* 1984; 55:203-212.
128. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:15-22.
129. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang* 2003; 85 :283-289.

ANEXO

Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **758-1**, sobre "**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AO ENXERTO DE TECIDO CONJUNTIVO SUBEPITELIAL EM RETRAÇÕES GENGIVAIS DE CÃES**" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Enílson Antônio Sallum / Fabrícia Ferreira Suaid** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 02 de dezembro de 2004.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **758-1**, entitled "**THE EVALUATION OF CONNECTIVE TISSUE AND PLATELET-RICH PLASMA (PRP) ON THE PERIODONTAL REGENERATION IN GINGIVAL RECESSION. A HISTOMETRIC STUDY IN DOGS**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 2nd, 2004.

Campinas, 02 de dezembro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788-6359
FAX 55 19 32893124