



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



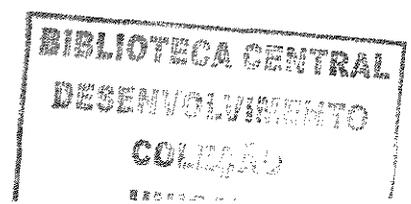
BRUNO CÉSAR DE VASCONCELOS GURGEL
Cirurgião-Dentista

***EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA DE DEFEITOS ÓSSEOS PERI-IMPLANTARES. ESTUDO HISTOMÉTRICO
EM CÃES.***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Periodontia.

PIRACICABA

2005



BRUNO CÉSAR DE VASCONCELOS GURGEL

Cirurgião-Dentista

***EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA DE DEFEITOS ÓSSEOS PERI-IMPLANTARES: ESTUDO HISTOMÉTRICO
EM CÃES.***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Delane Maria Rego

Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior

Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

Prof. Dr. Sérgio de Toledo

Suplentes:

Profa. Dra. Karina Teixeira Villalpando

Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa

PIRACICABA

2005

ii

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a resolução CCPG 036/83.
CPG, 01/08/05

.....
Assinatura do Orientador

UNIDADE	FC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	G962e
V	0 EX
TOMBO, BC/	65506
PROC.	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	12/9/05
Nº CPD	

1911 ID. 363729

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

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

G962e Gurgel, Bruno César de Vasconcelos.
Efeito do plasma rico em plaquetas na regeneração óssea guiada de defeitos ósseos peri-implantares. Estudo histométrico em cães. / Bruno César de Vasconcelos Gurgel. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005

Orientadores: Márcio Zaffalon Casati, Antônio Wilson Sallum
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Plasma sanguíneo. 2. Plaquetas (sangue). 3. Implantes dentários osseointegrados. 4. Substâncias de crescimento. 5. Ossos – Regeneração. I. Casati, Márcio Zaffalon. II. Sallum, Antônio Wilson III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Effect of the platelet-rich plasma on guided bone regeneration of peri-implant bone defects. Histometric study in dogs.

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Blood plasma. 2. Blood platelets. 3. Dental implants. 4. Growth substances. 5. Bone regeneration

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Delane Maria Rego, Élcio Marcantonio Júnior, Francisco Humberto Nociti Jr., Márcio Zaffalon Casati, Sérgio de Toledo

Data da defesa: 30/05/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 30 de Maio de 2005, considerou o candidato BRUNO CÉSAR DE VASCONCELOS GURGEL aprovado.

PROF. DR. MÁRCIO ZAFFALON CASATI

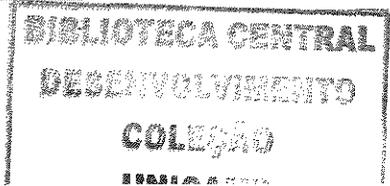
PROFa. DRa. DELANE MARIA REGO

PROF. DR. ELCIO MARCANTONIO JUNIOR

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

PROF. DR. SÉRGIO DE TOLEDO

200519172



DEDICATÓRIA

A **DEUS**, em primeiro lugar, meu Pai, Mestre e eterno Orientador. Agradeço-lhe pela minha vida, por tudo o que sou e o que alcancei até hoje. Agradeço por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Peço-lhe que meu caminho seja traçado e iluminado segundo a
Tua vontade.

Aos meus amados pais, **Sérgio e Tereza**, por todo o amor, carinho e confiança que dedicaram em toda minha trajetória. Sempre apoiaram todas as minhas decisões, tanto na vida pessoal como profissional e sem vocês não alcançaria mais essa vitória. A vocês, minha eterna
gratidão.

Às minhas irmãs, **Elisa e Luciana**, por todo amor, amizade e cumplicidade que compartilhamos, souberam compreender minha ausência e me deram todo apoio nesta etapa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Márcio Zafallon Casati**, pela amizade e inestimável contribuição na minha formação de pós-graduação. Com a sua seriedade e retidão pude aprender sempre um pouco mais. Agradeço-lhe por ter confiado em mim e me concedido à oportunidade de trabalhar com a sua pessoa. Aprendi a admirá-lo como amigo, orientador e profissional.

Ao Prof. Dr. **Antonio Wilson Sallum**, co-orientador deste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo, experiência e dedicação à carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Enilson Antônio Sallum**, pela amizade, incentivo e oportunidades concedidas durante todo o curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. **Francisco Humberto Nociti Jr**, pela contribuição científica nas fases de execução deste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa, e, sobretudo, pela amizade e atenção dispensadas durante o curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, orientador do mestrado e de parte do doutorado. Só tenho a agradecer por toda a oportunidade de estar nesta turma de pós-graduação, pela contribuição científica e a pela amizade conquistada neste período. A sua serenidade, enorme coração e bondade o fazem ser admirado por todos.

Ao Prof. Dr. **Antônio Fernando Martorelli de Lima** (in Memoriam), pela contribuição científica fornecida durante o curso de pós-graduação.

À sra. **Eliete Aparecida Ferreira Lima**, secretária da área de Periodontia, pela amizade, simplicidade, competência e pelos incomensuráveis auxílios prestados durante o curso de pós-graduação. Sem você tudo seria mais difícil.

À sra. **Mariana Piovezan Fugolin**, técnica do laboratório de Periodontia, pela ajuda indispensável na execução da parte laboratorial deste trabalho e pelos momentos agradáveis de convivência no laboratório.

Aos meus avós, **Raymundo e Zuleide, César** (*in memorian*) e **Therezinha** (*in memorian*), que sempre torceram pelo meu sucesso e que se alegram por tudo que alcancei até hoje.

À **Patrícia Furtado**, grande companheira que eu aprendi a admirar nesses quatro anos e ainda mais na realização dessa tese, porque sem você nada teria ocorrido tão certo. Por toda sua disponibilidade em ajudar e fazer com que tudo acontecesse da melhor forma possível. À **Suzana Pimentel**, uma peça fundamental na realização deste trabalho, por toda alegria, atenção e dedicação dispensadas.

À **Ângela Martins**, uma irmã como ela costuma me chamar, que tanto me ensinou periodontia. Pela paciência e atenção na clínica e por todas as experiências trocadas juntamente com sua mãe, D. Elodi, e sua tia Tatá, que tanto me acolheram e me receberam de braços abertos.

Aos grandes amigos **Renato Alves, Fernando Pinto, João Batista e Robert Silva**, companheiros de todas as horas, irmãos que a vida me apresentou e que os levarei comigo pra sempre. A **Poliana Duarte, Luciana Machion, Antonieta Côrtes, Cristina Villar e Juliana Saldanha** que também fizeram parte desta turma histórica, unida e participativa.

Enfim, aos meus grandes amigos de turma e doutores, porque sem a amizade e companheirismo de vocês nesses quatro anos de pós-graduação nada seria como foi. Crescemos e aprendemos, mas também apanhamos e sofremos juntos, porque a vida é cheia de altos e baixos, mas o mais importante é que chegamos até aqui e vencemos todas as barreiras.

AGRADECIMENTOS

Ao Excelentíssimo Senhor Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho e Diretor Associado, Prof. Dr. Mário Góes.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalém, coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP/Unicamp. Ao Prof. Dr. Roger William, coordenador do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/Unicamp.

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr., chefe do Departamento de Prótese e Periodontia. Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, responsável pela área de Periodontia.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Ferraz de Azevedo Veiga, responsável pelo Biotério. Ao Sr. Wanderley, Sra. Zuleica e Fábio, funcionários do Biotério desta faculdade pelos cuidados dispensados aos animais. A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pela ajuda e disposição na execução da estatística deste trabalho.

Aos professores Enilson Antonio Sallum, Gláucia Maria Bovi Ambrosano e Renato Mazzoneto, pela contribuição e sugestões realizadas durante o Exame de Qualificação.

A Capes pelo apoio financeiro concedido durante o curso de pós-graduação na forma de bolsa de Doutorado. A FAPESP pelo apoio na forma de auxílio pesquisa para a execução deste trabalho.

Aos amigos de longa data Murilo Faria, Pollyana Barbosa, Frederico Gurgel, Camilla Almeida, Tatiana Lima, Ricardo Dias, Edmaro Alexandre, Renzo Ramos, Leila Mota, Ana Karina Maciel, Dayse Bezerril, Valcácia Nunes, Domício Neto, Luís Henrique Baptista, Isana Álvares, Cristina Azevedo, Roberto e Laura Andrade, pela amizade e agradável convívio durante minha vida.

Aos meus professores de graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Lélia Souza, Leão Pereira Pinto, Cristina Medeiros e Leda Bezerra Quinderé por toda colaboração e incentivo durante a fase acadêmica.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp por todo apoio durante o início da minha a carreira na área de Periodontia.

Aos meus amigos André Ulisses, Rodrigo Souza, Pablo Ortiz, Ricardo Abreu, e atualmente Rhonan Silva, César Arrais, André Luís, Raphael Navarro e Paulo Simamoto, por terem compartilhado momentos agradáveis, onde aprendemos muito com o convívio diário dentro do mesmo ambiente.

Aos amigos de Pós-Graduação Stenyo Tavares, Grace Mendonça, Mauro Martins, Karina Devito, Janaína Araújo, Maria Luiza Pontual, Andréa Pontual, Emilena Lima, Juliana Moura, Alex Souza, Cicero Gadê, Patrícia Freitas, Karlla Almeida, Danna Moreira, Flávia Maria, Guilherme Gama, Vanessa Arias, por tornarem o convívio do dia a dia sempre mais agradável.

À Fernanda Ribeiro, pela oportunidade de ser minha primeira orientada de Iniciação Científica e de poder demonstrar um pouco a relação de como ser amigo e orientador. Aos demais amigos da Periodontia, alunos das novas turmas de mestrado e doutorado Bruno Benatti, Cléverson Silva, Daiane Peruzzo, Érica Peloso, Gabriela Cruz, Guilherme Zanatta, Marcelo Carvalho, Mariana Vogt, Sandro Bittencourt e Saulo Cabral. Fabrícia Suaid, Fernanda Ribeiro, Liana Linhares, Mauro Santamaría, Renato Casarin, Wagner Filho e demais alunos da nova turma de mestrado pela amizade e companheirismo, tornando a convivência dentro da pós-graduação sempre melhor.

Meus sinceros agradecimentos...

**“...Pai, agora agradeço tudo o que tenho
E até mesmo a vida que te ofereço
Mesmo que eu seja pequeno, me sinto tão grande
Pois sei que O tenho em meu coração...”**

SUMÁRIO

CAPÍTULOS	Pg.
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Implantes Dentais Osseointegrados	03
2.2 Tratamento dos Defeitos Ósseos Peri-implantares	04
2.3 Princípio da Regeneração Óssea Guiada	05
2.3.1 Membranas Não Reabsorvíveis Associadas aos Implantes Dentais	06
2.3.2 Estudos Clínicos e Histológicos em Humanos	09
2.3.3 Membranas Reabsorvíveis e Não Reabsorvíveis Associadas aos Implantes Dentais	11
2.4 Fatores de Crescimento e Regeneração Óssea	14
2.5 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	17
2.5.1 Protocolos de Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas	22
2.5.2 Aplicação do PRP e Associação com Implantes Dentais	24
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Amostra	29
4.2 Anestesia	29
4.3 Procedimento Cirúrgico de Extração dos Dentes	30
4.4 Procedimentos Cirúrgicos de Criação das Deiscências e Colocação dos Implantes	33
4.5 Tratamento das Deiscências Ósseas	34
4.6 Obtenção e Uso do Plasma Rico em Plaquetas	35

4.7 Processamento histológico	40
4.8 Análise Histométrica	41
4.9 Análise Estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Observações Clínicas	45
5.2 Resultados Histométricos	46
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	69

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente o reparo ósseo obtido após a utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) e/ou de membranas não reabsorvíveis no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares, do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães. Foram utilizados 10 cães adultos, machos, sem raça definida, nos quais os pré-molares inferiores (P2, P3, P4) e o primeiro molar foram extraídos. Após 3 meses das extrações, os leitos para os implantes foram criados e posteriormente 2 deiscências ósseas vestibulares bilaterais, sendo então inseridos 4 implantes dentais de titânio. As deiscências foram designadas aleatoriamente às seguintes modalidades terapêuticas: 1) controle; 2) ROG; 3) PRP; 4) PRP + ROG. Após 3 meses do tratamento, os animais foram sacrificados e os blocos contendo os implantes e tecidos duros adjacentes processados para secções não descalcificadas. Na análise histométrica, os parâmetros avaliados foram o contato osso-implante, a área de preenchimento ósseo dentro das roscas, a área e a densidade de tecido ósseo formado na região fora das roscas. Análise de Variância foi utilizada para a análise estatística dos dados ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram diferenças estatísticas significativas para todos os parâmetros analisados em favor dos grupos tratados com membrana ($p < 0,05$), no entanto, não foram observadas diferenças quando o PRP foi utilizado ($p > 0,05$). Dentro dos limites do presente estudo, pôde-se concluir que o PRP não exerce efeitos adicionais no reparo ósseo e que a ROG promove uma maior formação óssea ao redor dos implantes dentais.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate, histometrically, the bone healing after utilizing the platelet-rich plasma (PRP) and/or non-resorbable membranes on the treatment of peri-implant bone defects, deiscense type, surgically created in dogs. Ten mongrel male adult dogs were used; in which the three low premolars (P2, P3, P4) and the first molar were extracted. Three months after dental extraction, dental implants sites were created and lately two bilateral buccal bone dehiscence, in which four titanium dental implants were inserted. Dehiscences were randomly assigned for the following treatment: 1) control; 2) GBR; 3) PRP; 4) PRP + GBR. After 3 months, animals were sacrificed; dental implants and adjacent hard tissues were processed for undecalcified sections. At histometrical analysis, the parameters evaluated were bone-implant contact, bone filling area into threads, bone tissue area and bone density formed out the threads. Variance Analysis was utilized for statistical analysis of the data ($p < 0,05$). The results demonstrated statically significant differences for all parameters toward membrane treated groups ($p < 0,05$), although, differences were not observed when PRP was utilized ($p > 0,05$). Within the limits of the present study, it was concluded that PRP do not exert additional effects on bone healing and that guided bone regeneration provides increased bone formation around dental implants.

1. INTRODUÇÃO

A substituição dos dentes perdidos por implantes dentais está sendo amplamente realizada em pacientes totalmente ou parcialmente desdentados e tem demonstrado altas taxas de sucesso clínico em longo prazo (Adell *et al.*, 1981; Lindquist *et al.*, 1997; Merckse-Stern *et al.*, 2001). A rotina diária da utilização dos implantes dentais tem permitido o desenvolvimento de novos sistemas e técnicas em casos com reduzida perda óssea vertical, presença de defeitos ósseos, na região posterior dos ossos mandibulares e maxilares. Sendo assim, algumas características devem ser levadas em consideração para a obtenção do sucesso com este tipo de tratamento reabilitador como o tipo de implante, a modalidade de sua colocação (um ou dois estágios), o formato e a característica superficial, técnica cirúrgica, utilização de técnicas regenerativas e fatores de crescimento (Schenk & Buser, 1994, Marx *et al.*, 1998).

A qualidade e a quantidade de tecido ósseo presente na região receptora também são aspectos considerados de grande importância para o sucesso dos implantes dentais (Lekholm & Zarb, 1985; Khang *et al.*, 2001; Ersanli *et al.*, 2004), sendo a presença de defeitos ósseos tipo deiscência e fenestração achados comuns (Mellonig & Nevins, 1995; Bogaerde, 2004). Diante disso, a resolução destes defeitos por meio de técnicas regenerativas como a regeneração óssea guiada (ROG) tem promovido respostas favoráveis para aumentar o volume ósseo nestas regiões (Zablotsky *et al.*, 1991; Hämmerle & Karring, 1998; Hämmerle *et al.*, 2002). Uma barreira física é utilizada com o objetivo de prevenir o crescimento de células não osteogênicas do tecido conjuntivo e epitelial, permitindo, assim, que as células angiogênicas e osteogênicas derivadas do espaço medular proliferem e colonizem a região, o que possibilitaria a regeneração do defeito ósseo (Dahlin *et al.*, 1989; Becker *et al.* 1990).

O estímulo ou regulação do processo de cicatrização tecidual também tem ocupado um papel de destaque dentro da regeneração óssea (McCauley & Sommerman, 1998). Utilização de estratégias capazes de iniciar ou induzir a formação óssea pela utilização de fatores de crescimento tem contribuído para a sua utilização na implantodontia (Giannobile, 1996; Weibrich *et al.*, 2004). O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido estudado recentemente com o objetivo de melhorar a reparação tecidual (Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 2000). As plaquetas concentradas liberam os

fatores de crescimento, entre eles o PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), localizado dentro dos grânulos α -plaquetários, os quais apresentam vários efeitos positivos na reparação tecidual, tendo aplicação na periodontia (Lekovic *et al.*, 2003), cirurgia (Marx *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004; Schlegel *et al.*, 2004) e implantodontia (Kim *et al.*, 2002a, b; Zechner *et al.*, 2003; Fuerst *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2004; Weibrich *et al.*, 2004).

Em razão da ausência de estudos que utilizam o PRP na regeneração óssea guiada e com o intuito de acelerar e estimular a reparação óssea de defeitos ósseos peri-implantares do tipo deiscência, é que se propõe o presente estudo.

2. - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - IMPLANTES DENTAIS OSSEOINTEGRADOS

A utilização de implantes dentais de titânio com a finalidade de substituir dentes perdidos, buscando uma melhor qualidade de vida, tornou-se uma modalidade terapêutica aceita pela comunidade científica tanto para o tratamento de desdentados totais como parciais. Em razão do sucesso clínico em longo prazo demonstrado em diversos estudos (Adell *et al.*, 1981; Zarb & Schmitt, 1990, Lindquist *et al.*, 1997; Merckse-Stern *et al.*, 2001), a implantodontia tem se desenvolvido e buscado ampliar cada vez mais a indicação e previsibilidade dos implantes dentais.

A taxa de sucesso média observada varia de 80% a 98,9%, após 10 a 15 anos de acompanhamento (Adell *et al.*, 1981; Lindquist *et al.*, 1997), tanto na maxila quanto na mandíbula, respectivamente. Estas altas taxas de sucesso são decorrentes do tipo de interface obtida entre o implante e o tecido ósseo – osseointegração. Este fenômeno representa uma conexão direta entre o osso vital e o implante, sem a interposição de camadas de tecido mole, em microscopia óptica (Branemark *et al.*, 1969). Entretanto, o contato direto entre implante e osso não ocorre em 100% da extensão do implante dental (Branemark *et al.*, 1985). Em microscopia eletrônica, estudos demonstraram que um material amorfo estava interposto entre a superfície dos implantes dentais e o osso, variando de 100 a 500nm de espessura, o qual era composto de proteoglicanos e fibras colágenas (Linde *et al.*, 1983; Albrektsson *et al.*, 1985). Schroeder *et al.* (1981) denominaram este tipo de ancoragem como uma anquiose funcional, a qual é alcançada a partir da incorporação do implante por osso medular, seguido pela adaptação do osso à carga pela deposição de tecido ósseo lamelar e finalmente a remodelação óssea sob carga.

Este contato também pode ser influenciado por diversos fatores como textura da superfície do implante, tipo de material e formato do implante dental, qualidade óssea, técnica cirúrgica e o tempo de cicatrização (Cochran, 1999).

2.2 - TRATAMENTO DOS DEFEITOS ÓSSEOS PERIIMPLANTARES

Quando da utilização dos implantes dentais, a qualidade e a quantidade de tecido ósseo presente na região receptora são consideradas de grande importância para o sucesso desta técnica (Lekholm & Zarb, 1985). Volume ósseo insatisfatório resulta em complicações indesejáveis como exposição da superfície do implante e até mesmo inviabilizam a utilização de implantes dentais (Jovanovic, 1994). Mesmo na presença de uma espessura óssea satisfatória, a necessidade de se trabalhar em uma situação ótima com relação ao posicionamento do implante, na busca da estética e da função ideal, pode levar a formação de deiscências ou fenestrações (Jovanovic et al, 1992).

Desta forma, o sucesso ou o insucesso da técnica está intimamente relacionado com a resolução dos defeitos ósseos (Zablotsky *et al.*, 1991), tanto previamente ou no momento da colocação do implante. A presença destes defeitos está associada com exposição da superfície do implante e redução do contato osso-implante, podendo ocorrer o comprometimento do implante dental ou infecções peri-implantares (Newman *et al.*, 1988). Tradicionalmente, estes defeitos são tratados pela técnica da regeneração óssea guiada (ROG). As terapias ósseas regenerativas (enxertos ósseos e/ou regeneração óssea guiada) podem representar não apenas o tratamento de escolha dos defeitos ósseos resultantes da colocação dos implantes dentais, mas também ser utilizada com sucesso no tratamento das seqüelas decorrentes da doença infecciosa periimplantar posteriormente ao tratamento anti-infeccioso (Hämmerle & Karring, 1998).

O principal obstáculo para se obter formação de novo osso e uma cicatrização óssea de qualidade é a rapidez com que o tecido conjuntivo se forma e se prolifera. Esta proliferação rápida do tecido conjuntivo pode prejudicar ou até mesmo impedir a osteogênese na região de um defeito ósseo (Dahlin *et al.*, 1988; Linde *et al.*, 1993). Na tentativa de solucionar este problema, uma variedade de produtos e técnicas foi proposta baseada em quatro métodos que buscam auxiliar a nova formação óssea e o aumento do volume ósseo: osteoindução, por meio da utilização de fatores de crescimento; osteocondução, quando enxertos ósseos são utilizados como arcabouço para o crescimento ósseo; distração osteogênica, por meio de fraturas cirurgicamente induzidas na qual dois fragmentos ósseos são separados; e osteopromoção, por meio da criação e manutenção do espaço necessário para neoformação óssea, com a utilização de membranas (Linde *et al.*, 1993;

Hämmerle & Karring, 1998).

2.3 - PRINCÍPIO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

O princípio biológico da regeneração tecidual guiada foi inicialmente proposto visando a regeneração periodontal (formação de novo cemento, novo osso e novo ligamento periodontal). Este princípio baseia-se na capacidade dos diferentes tecidos periodontais em promover a regeneração, e foi estabelecido ao longo de uma série de estudos que visaram avaliar a participação destes tecidos no processo de cura (Nyman *et al.*, 1980; Karring *et al.*, 1980). Sua base racional surgiu dos postulados de Melcher (1976), o qual estabeleceu que as células capazes de neoformar as estruturas de sustentação dental eram as células do ligamento periodontal.

Já a utilização de técnicas regenerativas como a regeneração óssea guiada tem promovido respostas favoráveis para aumentar o volume ósseo em sítios que receberão implantes (Hämmerle & Karring, 1998). O princípio da regeneração óssea guiada aplicada ao redor de implantes dentais foi proposto inicialmente por Dählin *et al.* (1989) e, posteriormente, demonstrado por Zablotsky *et al.* (1991). Visando a regeneração do tecido ósseo, uma barreira física é utilizada prevenindo o crescimento de células não osteogênicas, derivadas do tecido conjuntivo da mucosa alveolar e do epitélio, permitindo o crescimento de células angiogênicas e osteogênicas derivadas do espaço ósseo medular, as quais repovoam a região possibilitando a regeneração do defeito ósseo (Dahlin *et al.*, 1989; Becker *et al.* 1990).

Situações em que o mesmo princípio da regeneração tecidual guiada poderia ser utilizado incluem a regeneração de tecido ósseo em defeitos de deiscência e fenestrações, defeitos localizados de rebordo alveolar e defeitos associados aos implantes imediatos (Dahlin *et al.*, 1989; Zablotsky *et al.*, 1991; Mellonig & Nevins, 1995; Buser *et al.*, 1999). Mellonig & Nevins (1995) revisaram criticamente a técnica de regeneração óssea guiada e afirmaram que os defeitos ósseos tipo deiscência e fenestração são os mais comuns associados aos implantes dentais, podendo ser divididos em defeitos com características que favorecem a manutenção de espaço (*spacemaking*) e os que não favorecem (*non-spacemaking*). Os defeitos que favorecem a manutenção de espaço não requerem necessariamente a utilização de enxertos ósseos, somente a membrana, ao contrário daqueles defeitos que não favorecem a manutenção do espaço. Neste último caso, torna-se

necessária a utilização de materiais de preenchimento (como enxertos ósseos autógenos, heterógenos e substitutos ósseos) o que permite a criação e manutenção de espaço e evita que a membrana colapse sobre o implante.

Em defeitos ósseos extensos, nos quais a estabilização primária do implante fica impossibilitada, a utilização da técnica da regeneração óssea guiada, previamente a colocação dos implantes dentais, também é considerada a técnica de escolha (Hämmerle & Karring, 1998; Bogaerde, 2004). A barreira física (membrana), utilizada na técnica da regeneração óssea guiada, deverá proteger de traumas mecânicos e micro-movimentações o coágulo formado no espaço entre esta barreira e o implante-tecido ósseo (Mellonig & Nevins, 1995). O osso regenerado obtido com a utilização desta técnica, responde da mesma maneira que o osso não regenerado à colocação de implantes (Simion *et al.*, 2001), mesmo após a instalação de próteses, ou seja, na presença de carga mastigatória (Buser *et al.*, 1995).

2.4.1 – Membranas Não Reabsorvíveis Associadas aos Implantes Dentais

Inicialmente, barreiras não reabsorvíveis foram utilizadas, constituídas principalmente de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), com a intenção de testar seu potencial em possibilitar a regeneração óssea ao redor de implantes de titânio. Becker *et al.* (1990) avaliaram a formação óssea em locais de deiscência associada a implantes dentais tratados com regeneração óssea guiada em cães. Implantes dentais foram colocados e em seguida defeitos tipo deiscência foram criados na face vestibular de cada implante. Um implante de cada lado foi recoberto pela barreira de PTFE-e. Os resultados demonstraram, após doze semanas, que o princípio de regeneração tecidual guiada poderia ser aplicado aos implantes dentais, sendo que a formação óssea era variada, mas clinicamente significativa. Já Zablotsky *et al.*, 1991, demonstraram em cães que a utilização de membranas não reabsorvíveis de PTFE-e em defeitos ósseos peri-implantares tipo deiscência (3 x 5mm), após 8 semanas, apresentavam maior preenchimento ósseo e maior reparo no grupo com membrana associada a implantes revestidos por hidroxiapatita (95,17%) do que nos implantes de titânio com superfície jateada (82,8%). No grupo controle, sem membrana, o preenchimento médio encontrado foi de 55% e 39%, respectivamente.

Jovanovic *et al.* (1995) compararam, em cães, a formação óssea obtida ao redor de

implantes de titânio com a utilização de membranas não reabsorvíveis de PTFE-e com e sem reforço de titânio com um grupo sem membrana. As dimensões médias dos defeitos tratados foram: deiscências ósseas vestibulares (5,1mm) e defeitos supracorticais (2,69mm). Após seis meses do tratamento, foi observado na análise histológica de cortes não descalcificados que os defeitos supracorticais tiveram um ganho ósseo vertical médio de 1,82mm (membrana com reforço de titânio), 1,90mm (membrana sem reforço de titânio) e 0,53mm (grupo controle). Nas deiscências vestibulares o ganho ósseo encontrado foi de 3,33mm (membrana com reforço de titânio), 2,46mm (membrana sem reforço de titânio) e 2,76mm (grupo controle). Estes resultados demonstraram que as membranas de PTFE-e com reforço de titânio foram capazes de criar e manter o espaço necessário para a regeneração óssea neste tipo de defeito, possibilitando um ganho ósseo maior que ao obtido nos grupos com membrana sem reforço de titânio e no grupo sem membrana.

Buser *et al.* (1995) criaram defeitos de deiscência peri-implantares de 7 x 7mm em cães e colocaram membranas de PTFE-e com reforço de titânio sobre os defeitos. Aos 6 meses da ROG, implantes dentais foram instalados e após 3 meses da colocação foi observada uma anquilose funcional. Neste momento, metade dos implantes foram submetidos à carga funcional até completar mais 6 meses. Pôde ser demonstrado que o tecido ósseo regenerado em defeitos protegidos por membranas respondem à colocação do implante como um tecido não regenerado e que este osso é capaz de resistir e sustentar carga funcional. Os autores concluíram que a colocação de implantes em osso regenerado estimulou a maturação e remodelação óssea, enquanto que implantes dentais submetidos à carga não influenciaram esta remodelação.

A associação entre membranas não reabsorvíveis e enxertos foi avaliada por Stentz *et al.* (1997), em cães, em que defeitos circulares de 5mm de profundidade e 9,2mm de diâmetro foram tratados com implantes dentais de titânio comercialmente puros de 3,75 x 10mm e implantes cobertos por hidroxiapatita de 3,3 x 10mm, os quais receberam enxerto de osso canino desmineralizado, seco e congelado e membranas de PTFE-e. Os resultados mostraram uma quantidade significativamente maior de preenchimento do defeito ósseo e contato osso-implante quando utilizou membranas de PTFE-e e enxerto ósseo quando comparado à membrana isoladamente em implantes de superfície lisa e tratada com hidroxiapatita; entretanto, o contato osso-implante foi superior para os implantes com superfície coberta por hidroxiapatita. Hammerle *et*

al. (1998) avaliaram a associação de osso bovino e ROG em defeitos de deiscência de 2,5 x 3mm criados cirurgicamente em macacos. Após 6 meses, os autores observaram uma superioridade em termos de ganho ósseo em altura e contato osso-implante para os grupos que utilizaram a associação entre os materiais (100% e 55%, respectivamente) ou a membrana isoladamente (91% e 64%, respectivamente), quando comparado ao grupo que recebeu apenas o enxerto ósseo (52 e 35%, respectivamente) e o grupo controle (42 e 20%, respectivamente).

Conner *et al.* (2003) também avaliaram em cães o contato osso-implante em implantes dentais com diferentes superfícies (hidroxiapatita: Nobel Biocare; Plasma spray de titânio: ITI; Condicionada por ácido: 3i Implant) submetidos à regeneração óssea guiada de defeitos peri-implantares de 7,3mm de largura x 5mm de profundidade com membranas de PTFE-e e osso canino desmineralizado, seco e congelado. Após 4 meses, quando a regeneração foi realizada no momento da colocação do implante, os resultados demonstraram que o contato osso-implante foi estatisticamente superior para os implantes com superfície de hidroxiapatita (48,25%) quando comparado aos implantes com plasma spray de titânio (25,08%) e condicionada por ácido (16,24%), porém sem diferenças entre estes últimos.

Em 2003, Lima *et al.* avaliaram a influência das características da superfície de titânio na regeneração óssea guiada ao redor de implantes dentais (ITI) instalados em cães, bem como descreveram o padrão de cicatrização peri-implantar após colocação simultânea dos implantes e membranas de PTFEe. Os defeitos circulares tinham dimensões de 7 x 7 x 7mm e implantes de 4,1 x 8mm com superfície de plasma spray de titânio e usinada, avaliados em 4 e 6 meses. Os resultados demonstraram que quando as membranas permaneceram em posição, houve um preenchimento do defeito de 79% (usinada) e 96% (TPS). A taxa de osseointegração na área de osso regenerado entre os períodos de avaliação variou de 12 a 32% para os implantes de superfície tratada e de 0 a 3,6% para os implantes usinados. Para o tecido pré-existente essa taxa foi de 16 a 35% e 0 a 11%, respectivamente. Os autores concluíram que a taxa de osseointegração neste osso pré-existente foi maior do que a do osso regenerado e que a superfície tratada influenciou positivamente essa taxa quando comparado aos valores de ambas as medidas para o implante de superfície usinada. Adicionalmente, os autores observaram que a remoção precoce das membranas pode afetar negativamente o preenchimento ósseo do defeito.

2.4.2 - Estudos Clínicos e Histológicos em Humanos

Estudos em humanos também têm buscado esclarecer questões surgidas quando da aplicação da regeneração óssea guiada ao redor de implantes em animais e, desta forma, fornecer embasamento para a aplicação clínica desta técnica, cujo objetivo é aumentar o volume de tecido ósseo em várias áreas da cavidade bucal.

Tem sido sugerido que a utilização de membranas de PTFE-e é um método viável para se obter preenchimento ósseo, observado clinicamente, em defeitos associados a implantes dentais. Entretanto, ao analisar clínica e histologicamente o preenchimento ósseo obtido com a técnica de regeneração óssea guiada com membranas de PTFE-e, comparando-o ao preenchimento ósseo obtido num grupo controle sem membrana, Palmer *et al.* (1994) notaram que a impressão clínica de preenchimento ósseo não condiz com a presença histológica de novo osso. Neste estudo foram tratados seis pacientes portadores de duas deiscências ósseas com tamanho padronizado (2,5 a 4mm), uma tratada com membranas de PTFE-e e outra deiscência controle sem membrana. Após cinco meses, foram feitas análises clínicas durante a reentrada, e então os implantes foram removidos juntamente com o tecido ósseo. Clinicamente, o preenchimento ósseo médio obtido no grupo teste foi 80,83% e no grupo controle foi de 20,83%. Histologicamente, a área óssea que ocupava as roscas do implante no grupo teste foi 20,6% e no grupo controle 14,7%, enquanto a deiscência residual média foi 2,1mm no grupo teste e 3,3mm no grupo controle, porém, sem diferenças significantes estatisticamente.

Jovanovic *et al.* (1992) trataram 19 deiscências peri-implantares (2 a 9mm) com membranas de PTFE-e e notaram, no momento da reentrada em 6 meses, uma porcentagem média de preenchimento ósseo de 89,6%, variando de 28 a 100%. Resultados semelhantes também foram encontrados por Dahlin *et al.* (1995), os quais avaliaram a eficácia da técnica de regeneração óssea guiada com membranas num estudo clínico multicêntrico. Foram tratadas 40 deiscências e 15 fenestrações observadas no momento da colocação dos implantes. Membranas de PTFE-e sem reforço de titânio foram utilizadas sem associá-las a enxertos ósseos ou qualquer dispositivo para criação de espaço. Após dois anos de acompanhamento foi observada uma redução média na altura da deiscência de 82%.

Em 1998, Palmer *et al.* criaram defeitos de deiscência de 4 a 5 mm e observaram em humanos um contato osso-implante de 6% para o osso regenerado com membrana não reabsorvível de PTFE-e e de 20-25% para o osso pré-existente, após 5 meses de avaliação. E que após submeter os implantes à carga, essa porcentagem aumentou para 22% e 28-52%, respectivamente. Os autores demonstraram que não houve diferenças na área óssea dentro das roscas sob carga funcional, tanto no osso regenerado quanto osso pré-existente. Da mesma forma, não houve diferenças para o contato osso-implante do osso regenerado abaixo de membranas sob carga, apenas para a região do osso pré-existente. Contudo, apenas o restabelecimento do contorno alveolar pode ser avaliado sob condições clínicas e mesmo assim permaneceu incerto se um aumento do contato ocorreu e se a regeneração óssea promoveu aumentada cobertura da superfície do implante durante a inspeção clínica quando da remoção da membrana.

Mesmo diante de todos os benefícios trazidos pela utilização de membranas para conseguir a formação de tecido ósseo, algumas complicações podem estar presentes quando da utilização desta técnica como deiscências de tecido mole com exposição prematura da membrana e possível contaminação, deslocamento da membrana durante o período de cicatrização e o seu colapamento, os quais apresentam um efeito negativo na resposta ao tratamento (Mellonig & Nevins, 1995; Buser *et al.*, 1999).

Simion *et al.* (1994) compararam os aspectos clínicos e microbiológicos do processo de cicatrização de defeitos ósseos associados à colocação de implantes dentais mediatos e imediatos, tratados com membranas de PTFE-e. As médias de regeneração observadas nos defeitos sem exposição e com exposição foram de 96,6% e 41,6%, respectivamente. No grupo com exposição, foi observado um grande número de bactérias na camada interna das membranas, demonstrando que na presença de exposição, as bactérias podem atravessar a sua estrutura. Nowzari & Slots (1995) também observaram que a presença de periodontopatógenos tem relação com a exposição das membranas ao tratar nove deiscências e oito defeitos ósseos com membranas de PTFE-e associadas à colocação de implantes dentais imediatos. Metade das membranas não foi exposta ao meio bucal e estava livre de microrganismos cultiváveis, enquanto que na maioria das membranas expostas foi encontrada grande quantidade de microrganismos (*Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces actinomycetencomitans*, *Prevotella intermedia* e *Tanarella forsythensis*) e

apresentaram uma proporção maior de insucesso.

Segundo Haas *et al.* (2000), avaliando o efeito do tratamento da peri-implantite em humanos, observaram que quanto maior o tempo de exposição da membrana, menor é o ganho ósseo esperado. Entretanto, mesmo sendo um achado freqüente, os defeitos tratados pela técnica da regeneração óssea guiada têm mostrado um resultado satisfatório. Em um estudo de meta-análise, Machtei (2001) relatou que a média de altura de osso regenerado foi 6 vezes maior em sítios não expostos (3,01mm) do que em quando houve exposição (0,56mm). Em alguns casos a remoção destas membranas expostas pode ser considerada, principalmente antes do desenvolvimento de processos agudos.

2.4.3 - Membranas Reabsorvíveis e Não Reabsorvíveis Associadas aos Implantes Dentais

A grande desvantagem dos materiais não reabsorvíveis é a necessidade do segundo ato cirúrgico para sua remoção. Do ponto de vista da morbidade do paciente, do risco de dano tecidual e da relação custo/benefício/tempo, a substituição da utilização de materiais não reabsorvíveis por reabsorvíveis seria desejável. Atualmente, as membranas de colágeno e de copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico têm sido muito utilizadas e estudadas (Hämmerle & Karring, 1998).

Algumas características das membranas reabsorvíveis devem ser consideradas, como a biocompatibilidade, longevidade da função como barreira (tempo de reabsorção) e capacidade de manter o espaço para a regeneração, os quais são aspectos fundamentais para a regeneração óssea. No entanto, diante do curto tempo de reabsorção e da incapacidade de manutenção de espaço da maioria das membranas reabsorvíveis foi proposta a associação destas com enxertos ou substitutos ósseos (Mellonig & Nevins, 1995; Buser *et al.*, 1999).

Ao comparar a membrana de PTFE-e com uma membrana reabsorvível de colágeno, ambas associadas a um material de preenchimento ósseo (Bio-Oss®) em humanos, comparados a um grupo controle, Zitzmann *et al.* (1997) observaram um preenchimento ósseo médio de 92% com a membrana reabsorvível e com a membrana de PTFE-e de 78%, porém, sem diferenças estatisticamente significantes na reentrada aos 2 anos. Na avaliação longitudinal de 5 anos, Zitzman *et al.* (2001), após a instalação das próteses, os pacientes foram avaliados a cada 6 meses em

relação a parâmetros clínicos e radiográficos (sobrevivência dos implantes, nível ósseo, nível de placa, faixa de tecido queratinizado). A taxa de sucesso dos implantes dentais variou entre 93 e 97% para implantes com e sem ROG, respectivamente; entretanto, uma maior reabsorção óssea ao redor dos implantes foi observada nos implantes tratados com membranas não reabsorvíveis e reabsorvíveis (2,21mm e 1,83mm, respectivamente) em relação ao controle (1,7mm). Entretanto, os autores sugerem que a ROG é de fato indicada quando o defeito inicial for maior que 2mm no sentido vertical.

No entanto, outros estudos têm demonstrado que a utilização de membranas reabsorvíveis não promoveu maior formação óssea e preenchimento dos defeitos quando comparadas aos grupos sem membranas (Gotfredsen *et al.*, 1994; Schliephake & Kracht, 1997). Hürzeler *et al.* (1997) observaram superioridade da membrana não reabsorvível de PTFE-e ao compará-la a uma membrana reabsorvível de ácido polilático no tratamento de defeitos circunferenciais em macacos que possibilitaram a exposição de 4-5mm da porção coronal do implante. A média de contato osso-implante observada com a membrana reabsorvível foi 32% e com a membrana de PTFE-e foi de 58%.

Lorenzoni *et al.* (1998) observaram diferenças estatísticas significantes quando utilizaram membranas não reabsorvíveis de PTFE-e sem e com reforço de titânio com membranas reabsorvíveis, associados a materiais de preenchimento (osso autógeno e matriz óssea bovina – Bio-Oss) no tratamento de defeitos peri-implantares em humanos e puderam observar que a taxa média de regeneração óssea foi de 84%, 81% e 60%, respectivamente. Na avaliação longitudinal retrospectiva de 5 anos, Lorenzoni *et al.* (2002) observaram que os implantes dentais apresentavam condições de estabilidade peri-implantar e de osseointegração por meio do Periotest®. Não foram observadas perdas ou falhas de implantes, no entanto, uma perda óssea marginal radiográfica que variou de 0 a 3,5mm aos 5 anos de acompanhamento, porém, sem diferenças em relação à região, osso maxilar e enxerto ósseo.

Mellonig *et al.* (1998) também não observaram resultados positivos após utilizarem uma membrana reabsorvível de copolímero láctico e glicólico no tratamento de deiscências em cães quando comparada à membrana de PTFE-e e a um grupo controle sem membrana, ambas associadas a um enxerto ósseo desmineralizado, seco e congelado. Após 3 meses, a média de

contato ósseo encontrado no grupo tratado com membrana reabsorvível foi 24,6%, no grupo da membrana não reabsorvível foi de 76,2% e no grupo controle de 42,0% e a área de novo osso foram, 1,1mm²; 4,8mm² e 0,8mm², respectivamente. Esta superioridade da membrana de PTFE-e, em relação ao contato osso-implante, também foi observada por Kohal *et al.* (1999) ao avaliarem em cães o efeito da regeneração óssea guiada em defeitos de deiscências vestibulares de 5 x 5mm, criados cirurgicamente ao redor de implantes não submersos (3,3 x 10mm, ITI) comparando a barreiras reabsorvíveis de ácido poliláctico e poliglicólico por um período de 6 meses. Os autores observaram que as dimensões dos defeitos remanescentes foram de 2,5mm em altura para o grupo com membrana de PTFE-e, 5,7 para o controle e 6,0 para o grupo com membrana reabsorvível, em que demonstrou diferenças desta para os demais grupos. O contato osso-implante foi respectivamente: 51,5%, 46,3% e 37,5%, com diferenças significantes entre os dois grupos de membranas, porém, sem diferenças entre a reabsorvível e o controle.

De acordo com alguns autores, a regeneração óssea pode ser influenciada pela superfície dos implantes (Schliephake *et al.* 2000; Lima *et al.*, 2003; Abrahamsson *et al.*, 2001, 2004). Schliephake *et al.* (2000) propuseram avaliar em cães a regeneração óssea quando da utilização de implantes dentais de 4 x 10mm (Nobel Biocare) com membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis de PTFE-e em defeitos periimplantares de 5 x 5 x 5mm por um período de 3 e 6 meses sob utilização de um marcador ósseo de tetraciclina. O aumento na altura óssea foi significativamente maior para ambos grupos com barreiras (2,23 e 1,99mm, respectivamente, para não reabsorvível e reabsorvível) quando comparado ao controle sem membrana (1,4mm) após 3 meses, principalmente na área da crista óssea alveolar do que adjacente à superfície do implante. Após 6 meses, a altura óssea aumentou significativamente no topo do contorno alveolar abaixo da membrana de PTFE-e, enquanto que na membrana reabsorvível de ácido poliláctico áreas de reabsorção superficial foram observadas. Os autores concluíram que a regeneração óssea guiada abaixo da membrana pode restabelecer o contorno ósseo alveolar, mas não é necessariamente associado com o aumento no contato osso-implante.

Ao utilizar membranas reabsorvíveis para o tratamento de defeitos ósseos circunferenciais com aproximadamente 5,3mm de largura x 5mm de profundidade, Botticelli *et al.* (2003a) avaliaram o grau e qualidade do novo osso formado e a osseointegração em defeitos

ósseos marginais circunjacentes a implantes de titânio de superfície jateada e condicionada por ácido (3.3 x 10mm) colocados na mandíbula de cães nos períodos de 1 e 2 meses. O contato osso-implante foi primeiro estabelecido na porção apical do defeito e em seguida, este novo osso foi em direção coronal contínua. Os resultados sugerem que a cicatrização de um amplo defeito marginal ao redor de implantes é caracterizada por crescimento ósseo aposicional das paredes laterais e apicais do defeito. Na porção coronal a essa área, observou-se um tecido mole aderido ao implante e que após 2 meses, a zona de osseointegração aumentou em altura óssea de 1,7mm para 3,1mm e o tecido mole se tornou menor. O mesmo grupo de autores (2003b), em um experimento similar, observou que após 4 meses de cicatrização, a remodelação estava mais avançada, quando comparada com a do estudo de 1 e 2 meses anterior, em razão da maior quantidade de osso lamelar que se formou nesse intervalo.

Também avaliando em cães, Veis *et al.* (2004) analisaram o contato osso-implante entre superfícies tratadas por condicionamento ácido e lisas no mesmo implante (Osseotite® 3i Implant) associadas ao osso autógeno pela técnica da regeneração óssea guiada de defeitos ósseos circunferenciais (5 x 5 x 5mm) ao redor de implantes de 2 x 10mm com membranas reabsorvíveis, simultaneamente à colocação dos implantes. Após 5 meses de cicatrização, os resultados mostraram que a superfície tratada, em relação à lisa, apresentou contato osso-implante significativamente maior tanto para o osso regenerado (46,44 e 28,59%), como para a área do osso basal (32,32 e 17,25%). Esses achados demonstraram que a utilização do enxerto de osso autógeno resultou em maior contato ósseo para a área de osso regenerado do que para o osso basal, para ambas as superfícies, bem como uma maior densidade, e pode ser explicado pela ação do osso enxertado compartilhar como uma deposição óssea secundária, aumentando a densidade óssea final.

2.5 - FATORES DE CRESCIMENTO E A REGENERAÇÃO ÓSSEA

Nos últimos anos, muito se tem pesquisado sobre o mecanismo de regeneração e reparação tecidual. Uma das estratégias tem sido a identificação de fatores que interferem nesse processo e na modulação da resposta tecidual seja por meio da adição de células, materiais e fatores de crescimento (Giannobile, 1996; Weibrich *et al.*, 2004).

Dentre estas técnicas para aumentar a taxa de formação óssea, os enxertos ósseos autógenos têm sido considerados o melhor material, pois fornecem os elementos-chave para a regeneração óssea: osteocondução, osteoindução e células osteogênicas (Burchardt, 1983). Porém, muitos pacientes não apresentam áreas ósseas doadoras intrabucais suficientes, o que requer a remoção de osso de regiões extra-orais, envolvendo procedimentos cirúrgicos de maior complexidade, maior custo e morbidade para os pacientes. Diante disso, iniciou-se a busca por novas técnicas para a solução desses problemas e permitir o ganho ósseo. A realização de estudos e o desenvolvimento de materiais capazes de iniciar ou induzir a formação óssea (osteoindução) tem ocupado um papel de destaque dentro da regeneração óssea. Urist *et al.* (1965) demonstraram o princípio da indução óssea com a formação e mineralização após a colocação de matriz óssea desmineralizada em sítios ectópicos (região subcutânea e intramuscular de roedores). Com a descalcificação da matriz, o componente mineral foi eliminado, expondo os componentes protéicos, que produziu a formação óssea por meio de células indiferenciadas do leito receptor e não pela proliferação de células do tecido implantado.

Em 1971, Urist & Strates identificaram um componente protéico de crescimento não colagenoso da matriz óssea, que possivelmente possuía um potencial osteogênico, e o denominou de proteína óssea morfogenética (BMP). Foi demonstrado por esses mesmos autores que as BMPs induzem a diferenciação de células-tronco e células mesenquimais indiferenciadas em células osteogênicas, formadoras de osso. Recentemente, estudos têm observado em cães que a aplicação das BMPs recombinantes humanas 2 (BMPrh-2) ao redor de implantes aumentaram o contato osso-implante e a quantidade de tecido ósseo (Wikesjo *et al.*, 2003; Jovanovic *et al.*, 2003).

Outros fatores de crescimento também estão presentes na matriz óssea e são secretados pelas células ósseas, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento e crescimento do tecido ósseo, além de participarem na dinâmica do remodelamento (McCauley & Sommerman, 1998). Dentre esses fatores incluem ainda o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF I e II), Fator de Crescimento Transformador (TGF α e β), Fator de Crescimento dos Fibroblastos (FGF ácido e básico), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) entre outros (Weibrich *et al.*, 2002b; Lacoste *et al.*, 2003). Tais fatores são proteínas sinalizadoras sintetizadas com o objetivo de modular a cicatrização normal de uma

forma ordenada (Anitua, 1999), estimulando e regulando o processo de cicatrização tecidual. São incluídos como um tipo de citocina, produzidos por uma grande variedade de células e que podem estimular a quimiotaxia, proliferação e função secretora tanto de maneira autócrina (estimulando a célula responsável pela sua síntese) quanto parácrina (estimulando células próximas às células responsáveis pela sua síntese) (McCauley & Sommerman, 1998). Por essa capacidade de promover a cicatrização, a sua utilização pode ter alguma implicação clínica (Koveker, 2000).

Dentre os fatores de crescimento, o PDGF é o principal por ser liberado pelas plaquetas e por ser um dos primeiros fatores presentes na lesão. Apresenta vários efeitos positivos na reparação tecidual como mitogênese celular, angiogênese, estimulação da síntese de colágeno, além de induzir a quimiotaxia de células na lesão como os fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, bem como atuar na estimulação de outros fatores de crescimento (Marx, 1999).

A regeneração tecidual envolve uma série de eventos biológicos que consistem desde a coagulação sanguínea até a reparação da lesão. Todos os fenômenos seguem um processo dinâmico com a chegada das plaquetas no local do vaso sanguíneo lesado, as quais se aderem ao colágeno exposto e à membrana basal do vaso, formando um tampão plaquetário e liberando fatores de crescimento presentes nos grânulos α -plaquetários (Aukhil, 2000). Outros fatores de crescimento também são liberados no momento da reparação, não só pelas plaquetas, mas também por macrófagos, osteoblastos, fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas, os quais atuam simultaneamente no local da lesão (Marx, 1999).

A utilização de fatores de crescimento tanto na regeneração periodontal (Lynch *et al.*, 1991a; Howell *et al.*, 1997) como ao redor de implantes (Lynch *et al.*, 1991b; Becker *et al.*, 1992) tem sido investigada. Um dos estudos que verificou o efeito da combinação de fatores de crescimento ao redor de implantes imediatos foi o de Stefani *et al.* (2000). O estudo avaliou o processo de cicatrização ao redor de implantes de titânio comercialmente puros de 3,75 x 8,5mm, colocados em alvéolos após extração de cães, associados ou não à aplicação da combinação de fator derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) por um período de 3, 8 e 12 semanas. Os resultados demonstraram que um contato osso-implante significativamente maior foi observado no grupo teste (22,4%) em relação ao controle (17,2%) em 3 semanas, bem como uma maior intensidade de marcação óssea em relação às 12 semanas. No

entanto, não foram observadas diferenças quanto à área óssea dentro das roscas do implante para nenhum dos grupos (48,4% para o grupo teste e 45% para o controle, em 12 semanas).

Desta forma, a utilização dos fatores de crescimento se torna uma nova abordagem na terapia clínica e cria um paradigma que afeta todos os segmentos das profissões ligadas à área da saúde (Lynch *et al.*, 1991a, b; Becker *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 1998; Anitua, 1999). No entanto, em razão da dificuldade em se obter os fatores de crescimento comercialmente, devido ao custo da produção, aquisição e ainda a presença de poucos estudos clínicos que comprovem a sua real efetividade é que a utilização de uma fonte autógena desses fatores, encontrados no PRP, tem recebido considerável atenção, apesar de iniciais, em estudos mais recentes.

2.6 - PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Desde o início da década de 90, a ciência tem reconhecido vários componentes no sangue que fazem parte do processo de cicatrização e que adicionados aos tecidos lesados e locais cirúrgicos podem acelerar o processo de cura. Esses componentes específicos incluem além do PDGF, TGF- β , IGF e EGF, os quais se encontram nos grânulos α das plaquetas, a fibronectina e vitronectina (glicoproteína plasmática, mediadora das reações inflamatórias e reparativas que ocorrem nos locais das lesões teciduais), que são moléculas de adesão celular encontradas no plasma e na fibrina (Whitman *et al.*, 1997). Com o intuito de aumentar a concentração desses fatores de crescimento nos sítios traumatizados, vários pesquisadores têm estudado a possibilidade de aplicar o plasma rico em plaquetas (PRP), uma fonte rica em elementos celulares requeridos pelo organismo em determinado local, de modo que os fatores de proliferação e diferenciação celular possam garantir a geração de quantidade suficiente de células novas e promover a osseointegração do implante (Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998; Anitua, 1999).

O plasma rico em plaquetas tem sido investigado em virtude do seu papel em modular e melhorar a cicatrização tecidual e todo processamento do PRP tem envolvido a concentração das plaquetas e os fatores de crescimento a ele relacionado (Lynch *et al.*, 1991a, b; Marx, 1999; Anitua, 1999). 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 uma grande quantidade de plaquetas é liberada e seus fatores de crescimento seriam adicionados na reparação óssea (Marx *et*

al., 1998; Marx, 2001a, b), o que desta forma amplificaria e aceleraria os efeitos destes fatores responsáveis por quase todos os processos de reparação (Marx, 1999).

As plaquetas ou trombócitos são unidades do sangue com origem na medula óssea, em que 2/3 se encontram na circulação sanguínea e 1/3 no baço. Apresentam uma meia vida no sangue de 9,5 dias e uma renovação de 35.000 plaquetas/ μ l por dia. Na presença de uma lesão, as plaquetas são as primeiras células a chegarem por meio da corrente sanguínea, formando um tampão plaquetário. Estas células atraem a fibrina e a utiliza para formar um denso emaranhado que aprisiona os glóbulos vermelhos (hemácias) e rapidamente forma o coágulo. O coágulo tem uma importância fundamental no processo de reparo por funcionar como uma matriz provisória para migração celular e ser um reservatório de fatores de crescimento e citocinas, liberados por plaquetas ativadas no local da lesão (Aukhil, 2000).

Os fatores de crescimento e citocinas liberadas são responsáveis pelos sinais iniciais para a cicatrização como a migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos, adicionando um componente antimicrobiano ao local. Os neutrófilos têm o papel de eliminar bactérias, debris e partículas estranhas, enquanto que as citocinas ativam fibroblastos e queratinócitos adjacentes. Esses fatores de crescimento também promovem angiogênese, fibroplasia e síntese de colágeno, levando a uma rápida reepitelização e aumentada força tênsil da ferida (Aukhil, 2000). A migração de neutrófilos cessa em alguns dias e os macrófagos assumem e dão continuidade ao processo de cicatrização (Andreassen & Andreassen, 2001).

O PRP é um produto derivado do sangue autógeno obtido em processo laboratorial, por centrifugação do sangue total, e que contém uma alta concentração de plaquetas, de fibrinogênio (Whitman *et al.*, 1997) e rico em fatores de crescimento, os quais exercem efeito na homeostasia e no início do processo de cicatrização (Marx, 1999; Andreassen & Andreassen, 2001), tanto de tecidos moles como ósseo (Marx *et al.*, 1998; Fuerst *et al.*, 2003), bem como um selante de feridas (Soffer *et al.*, 2003). Os fatores de crescimento, como o PDGF e TGF β , demonstraram auxiliar na maturação de enxertos ósseos (Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998), regulando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos durante o processo de remodelação óssea, além de iniciar e controlar a reparação após um trauma (Gianobile, 1996). A sua presença no PRP tem mostrado comprovada eficiência no tratamento de lesões de furca (Park *et al.*, 1995), de defeitos

ósseos ao redor de implantes de titânio associado a enxertos ósseos (Kim *et al.*, 2002a,b; Jensen *et al.*, 2004) ou a membranas em defeitos periodontais, promovendo um rápido crescimento e diferenciação das células do ligamento periodontal e do osso alveolar resultando em melhoras clínicas das áreas tratadas (Lekovic *et al.*, 2002, 2003).

Em razão dos fatores de crescimento do PRP não penetrarem nas células ou no seu núcleo e de se ligarem a receptores de superfície de diversos tipos celulares como células mesenquimais, osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais (Marx *et al.*, 1998), não são considerados mutagênicos e atuam apenas por estimulação normal acelerando a cicatrização (Marx, 2001b).

A presença da quantidade de fatores de crescimento é um ponto questionado na literatura, com o objetivo de saber qual a quantidade encontrada nos concentrados e se realmente tem influência no reparo. Weibrich *et al.* (2004) analisaram a contagem de plaquetas e a concentração de fatores de crescimento no PRP de 213 pacientes, obtido por uma centrifugação de 10.000rpm por 10 minutos, procurando relacionar o sexo e a idade. Os resultados demonstraram que a contagem de plaquetas no PRP ($1,407,640 \pm 320,100/\mu\text{l}$) foi 5 vezes maior do que do sangue total ($266,040 \pm 60,530/\mu\text{l}$). As concentrações do PDGF ($117 \pm 63\text{ng}/\mu\text{l}$), TGF β - 1 ($169 \pm 84\text{ng}/\mu\text{l}$) e IGF I ($84 \pm 23\text{ng}/\mu\text{l}$) estavam elevadas, porém não houve correlação com a contagem de plaquetas do sangue total nem do PRP, bem como em relação ao gênero e idade.

Lucarelli *et al.* (2003) avaliaram *in vitro* o efeito do PRP liberado pelo gel de plaquetas sobre a proliferação e diferenciação de células indiferenciadas. Como resultado, foi demonstrado que o PRP induziu a proliferação das células indiferenciadas de uma forma dependente da concentração (10% de PRP) e que após a remoção do PRP houve uma restauração das características à taxa de proliferação normal. Outros estudos *in vitro* também buscaram avaliar os efeitos do PRP sobre diversos tipos celulares e assim tentar compreender a sua influência na cicatrização tecidual. Com o objetivo de avaliar o efeito do PRP sobre a produção de matriz extracelular em cultura de células do ligamento periodontal e osteoblastos, Kawase *et al.* (2003) observaram uma modificação na forma das células e que o PRP regula o colágeno tipo I. Tais resultados sugerem que o coágulo de fibrina encontrado em uma espécie de gel insolúvel regula positivamente a síntese de colágeno na matriz extracelular e que os fatores de crescimento

presentes podem promover a cicatrização periodontal. 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.

Diversos estudos têm sido descritos na literatura procurando demonstrar os benefícios do PRP e suas aplicações dentro da Implantodontia, Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia (Kim *et al.*, 2002a; Garg *et al.*, 2000; Shanaman *et al.*, 2001; Lekovic *et al.*, 2003). Whitman *et al.* (1997) relataram resultados clínicos favoráveis após a adição de PRP em procedimentos cirúrgicos na região maxilofacial, reconstrução de mandíbula, reparos de alvéolos e fistulas, levantamento de seio maxilar, extração dental, aumento de rebordo bem como quando da colocação de implantes. Marx *et al.* (1998) e Aghaloo *et al.* (2002) encontraram que o PRP associado a enxertos ósseos apresentou um efeito positivo na regeneração óssea por promover uma aceleração da formação e aumento da densidade óssea, possivelmente influenciada pela concentração de plaquetas no PRP.

Anitua (1999) avaliou a utilização do PRP, obtido por centrifugação a 160G por 6 minutos, sobre a regeneração óssea de alvéolos associada ou não a enxertos ósseos em 20 pacientes, sem a utilização de membranas por um período de 2 e 4 meses. Os resultados histológicos mostraram que os defeitos no grupo do PRP apresentaram regeneração quase completa com osso compacto maduro, bem organizado e de morfologia normal, enquanto que o grupo controle apresentou um tecido conjuntivo preenchendo parte do defeito sem a presença de osso maduro, demonstrando que a utilização do PRP melhora e acelera a regeneração óssea bem como a cicatrização do tecido mole.

Entretanto, o estudo de Shanaman *et al.* (2001) não demonstrou efeito adicional do PRP em relação à quantidade e qualidade do novo osso formado quando associado com enxerto autógeno para melhorar a regeneração óssea em defeitos do rebordo alveolar em pacientes, previamente à colocação de implantes. Da mesma forma, Choi *et al.* (2004) demonstraram que a adição de PRP não parece aumentar a formação óssea de enxertos ósseos autógenos na regeneração óssea obtida após extrações dentárias em cães. O PRP foi obtido de acordo com a técnica preconizada por Whitman *et al.* (1997), após duas centrifugações, a primeira com 5600rpm e a segunda com 2400rpm e a quantidade de PRP variou de 910,000 to 1,804,000 plaquetas/ μ l. Seis semanas depois, os resultados mostraram pequenos níveis de formação óssea no grupo do PRP

(36,8%) e ainda um atraso na remodelação dos enxertos com PRP quando comparado ao outro grupo (56,7%). Os autores observaram um atraso na remodelação dos enxertos, o que poderia estar relacionado com a concentração de plaquetas no PRP.

Roldán *et al.* (2004) também não observaram benefícios da adição do PRP em melhorar a formação óssea tanto ao osso autógeno como o osso bovino anorgânico. O PRP foi obtido pela centrifugação de 3ml de sangue por 7 minutos a 1700rpm e uma segunda centrifugação por 10 minutos a 3000rpm (Marx *et al.*, 1998). Os autores observaram na análise qualitativa do aumento da mandíbula de ratos com enxerto ósseo extra-oral quando da utilização de fluorocromo que o PRP e a BMP-7 aceleraram o crescimento ósseo ao final de 50 dias. No entanto, a análise histomorfométrica não revelou diferenças significantes na área de novo osso mineralizado tanto sob a influência do PRP ou da BMP-7 juntamente com o osso autógeno bem como na adição do PRP ao osso bovino anorgânico, apenas na adição da BMP com este último.

Schlegel *et al.* (2004) também buscaram avaliar o efeito do PRP sobre a formação óssea. Os autores avaliaram a regeneração de defeitos ósseos após a colocação de materiais de preenchimento em porcos (osso autógeno e colágeno bovino) associados ou não ao PRP, obtidos por dois métodos de centrifugação (Kit Curasan e PCCS – 3i) e avaliados em 2, 4 e 12 semanas. Os resultados demonstraram que o osso autógeno em combinação com o PRP teve uma significativa aceleração na regeneração óssea inicial (2 semanas), mas esse efeito não foi observado nos grupos do colágeno bovino. Ao final de 3 meses, não foram observadas diferenças no processo de cicatrização entre os grupos e que a adição do PRP não promoveu resultados superiores.

Garg *et al.* (2000) e Marx (2001b) relataram que as plaquetas e os fatores de crescimento provavelmente atuam mais durante os estágios iniciais da reparação do tecido ósseo (3 a 5 dias) e que a meia vida da plaqueta no local da ferida bem como a influência dos fatores ocorre em um período inferior a 10 dias. Uma vez que as plaquetas exercem seu papel, os macrófagos presentes na região, atraídos pelas plaquetas, também produzem os mesmos fatores de crescimento e assumem a regulação da cicatrização (Marx *et al.*, 2004). Esses mesmos autores também relataram que a secreção destes fatores se inicia quando da formação do coágulo, dentro de 10 minutos da sua formação. Outros autores afirmaram que 95% dos fatores pré-sintetizados são secretados em 1 hora (Kevy & Jacobson, 2001).

Marden *et al.* (1993) também relataram que em certas concentrações, o PRP pode até inibir a regeneração. Dugrillon *et al.* (2002) observaram que o efeito osteogênico das plaquetas depende da quantidade de fatores de crescimento liberados. Haynesworth *et al.* (2002) mostraram que uma resposta suficiente à concentração de plaquetas começa quando se alcança um aumento de 4 a 5 vezes do número inicial de plaquetas. Já Marx *et al.*, 1998, observaram uma concentração de 338% de plaquetas após a centrifugação. No entanto, pouco se sabe ainda qual a concentração ideal de plaquetas e de seus fatores de crescimento para promover e acelerar a regeneração óssea (Kassolis *et al.*, 2000). Sendo assim, pesquisas adicionais são necessárias para determinar se existe uma concentração mais adequada e, desta forma, permitir que os fatores de crescimento promovam um aumento na formação óssea.

2.6.1 - Protocolos de Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas

A obtenção do sangue se dá pela punção venosa e coleta sanguínea, separação celular e preparo do plasma. A coleta do sangue em bolsas requer um volume sanguíneo maior (450ml) e são processadas em centrífugas especiais de laboratórios e hospitais. Quando da utilização em ambulatório ou consultório odontológico, a coleta deve ser feita por uma equipe especializada e capacitada para a punção de veias, e uma quantidade menor é obtida por meio de tubos de coletas de 5ml. No entanto, a quantidade a ser coletada varia de acordo com o procedimento e o leito receptor.

Os tubos de ensaio utilizados devem ser de plástico ou siliconizados para não produzir danos às plaquetas durante o processo de centrifugação. Dentro destes tubos deve existir um agente anticoagulante que impede a coagulação do sangue, permitindo assim a separação dos constituintes do sangue. Os anticoagulantes mais empregados são o citrato de sódio, o citrato-fosfato-dextrose e menos comumente o EDTA, o qual tem mostrado diminuir os efeitos dos fatores de crescimento (Jensen *et al.* 2004).

A centrifugação tem por objetivo separar os componentes em três fases em função da densidade. A fase menos densa compreende o plasma dito 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 células vermelhas sanguíneas ou hemácias compreendem a porção mais densa e se localizam na parte inferior (Marx, 1999). Este autor ainda relatou que a camada mais superficial da porção vermelha também contém grandes quantidades de plaquetas recém sintetizadas e que deveria ser incluída no PRP.

Existem na literatura diversos métodos para obtenção do PRP, o que confere uma grande variabilidade de resultados nos estudos (Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998; Marx, 1999). A utilização de bolsas de sangue, tubos de coleta, tempo de utilização e armazenamento, bem como o aparelho, regulação da velocidade, do tempo, número de centrifugações e a ativação e formação do gel são alguns exemplos dessa variação. Em razão disso, ainda não existe um protocolo único ou ideal para sua obtenção. Centrífugas específicas com a finalidade de se obter o plasma rico em plaquetas, sejam automáticas ou que exigem o monitoramento por uma pessoa capacitada também estão descritas na literatura (Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998, 1999; Anitua, 1999; Lekovic *et al.*, 2002; Weibrich & Kleis, 2002).

Uma 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, a botropase (enzima proveniente de ofídios) ou o aquecimento do cloreto de cálcio 10% a 37°C (Leão, 2002). Esta fase final da coagulação consiste em um gel insolúvel de consistência gelatinosa inicial, resistente e elástica (Aukhil, 2000). Em razão da trombina não estar disponível comercialmente no Brasil, o cloreto de cálcio 10% tem mostrado ser um método adequado para formação do gel de PRP.

A utilização do PRP em procedimentos clínicos requer alguns cuidados tanto em relação à técnica de obtenção, protocolos de centrifugação e ativação, mas também quanto à indicação do caso e as condições do paciente. Tais procedimentos devem ser realizados de acordo com as Normas Técnicas em Hemoterapia (Portaria N° 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.

2.6.2 - Aplicação do PRP e Associação com Implantes Dentais

Na tentativa de acelerar a formação óssea ao redor de implantes e aumentar o contato osso-implante, a utilização de proteínas morfogenéticas do osso (BMP) (Cochran *et al.*, 1999), fatores de crescimento (Lynch *et al.*, 1991a, b; Stefani *et al.*, 2000) e atualmente o plasma rico em plaquetas têm sido aplicados no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares (Kim *et al.*, 2002a, b; Zechner *et al.*, 2003; Fuerst *et al.*, 2004; Weibrich *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2004).

Estudos que avaliaram o efeito de enxerto de sulfato de cálcio associado ou não ao plasma rico em plaquetas (Kim *et al.*, 2002a) ou enxerto ósseo humano seco, congelado e desmineralizado (DFDBA) (Kim *et al.*, 2002b) na formação óssea ao redor de implantes demonstraram um significativo aumento na porcentagem do contato osso-implante, preenchimento de defeitos ósseos bem como uma maior maturação óssea, principalmente quando o PRP foi utilizado. No primeiro estudo (2002a), os autores procuraram avaliar o efeito de dentina particulada Paris™ (rica em sulfato de cálcio) com ou sem a associação do PRP na reparação óssea e formação óssea de defeitos ósseos circulares (4 x 6mm) ao redor de implantes de titânio comercialmente puros de 4 x 10mm, colocados na mandíbula de cães, por um período de 6 e 12 semanas. O PRP foi obtido por dupla centrifugação, a primeira por 10 minutos a 1000rpm e a segunda também por 10 minutos a 1500rpm. Os resultados histológicos demonstraram que todos os defeitos ósseos ao redor dos implantes tratados com a dentina particulada com ou sem PRP foram preenchidos com novo osso, e o grupo controle apresentou formação óssea apenas na porção inferior dos implantes, entretanto, um maior contato osso-implante e maturidade óssea foram observados quando o PRP foi utilizado. Os valores do contato osso-implante foram: 6 semanas (72%, 43% e 24%) e 12 semanas (57%, 60% e 30%) para o grupo do substituto associado ao PRP, substituto isoladamente e o controle, respectivamente. Enquanto os valores da área óssea dentro das roscas foram: 6 semanas (75%, 47% e 16%) e 12 semanas (78%, 58% e 25%), respectivamente.

Num segundo estudo, com metodologia semelhante ao estudo anterior, realizado também em cães, procurou avaliar a eficácia do osso desmineralizado, seco e congelado sozinho

ou combinado com PRP em implantes de titânio comercialmente puros de 4 x 10mm colocados em defeitos ósseos circulares de 4 x 6 x 6mm (sentido mesiodistal e bucolingual), por um período de 6 e 12 semanas. Os autores observaram que da mesma forma, os defeitos ósseos foram preenchidos com osso com diferenças significativamente maiores para o grupo que associou o material de preenchimento ao PRP, com maior contato osso-implante e formação óssea dentro das roscas quando comparados ao grupo controle.

Quando utilizaram a aplicação imediata do PRP prévia à colocação de implantes, Zechner *et al.* (2003) avaliaram se o PRP apresentava influência na cicatrização óssea de implantes dentais (superfície usinada, anodizada e coberta com hidroxiapatita) colocados em miniporcocos e analisados histometricamente em 3, 6 e 12 semanas. A obtenção do PRP foi conseguida por uma primeira centrifugação do sangue de bolsas de 450ml por 6 minutos a 2890G e a segunda por 12 minutos a 153G e a quantidade resultante variou entre 800.000 e 1.000.000 plaquetas/ μ l. Os autores observaram um contato osso-implante significativamente maior após aplicação tópica do PRP previamente a colocação do implante nas primeiras 3 e 6 semanas, mas em 12 semanas, os valores foram semelhantes, não apresentando diferenças. Os valores para o contato osso-implante para o grupo controle foram: 15,41%, 24,20%, 51,34%, respectivamente para 3, 6 e 12 semanas e para o grupo teste foram: 28,31%, 44,21%, 41,76%. Para o osso formado dentro das roscas do grupo controle foi: 6,35%, 15,49% e 38,43%, para os mesmos períodos respectivamente e os valores do grupo PRP foram: 14,03%, 28,30% e 31,07%. A área de osso até 1mm fora das roscas para o grupo controle foram: 12,84%, 23,08% e 35,05%, enquanto que para o grupo tratado foi: 19,26%, 25,35% e 34,70%. Também não foi observada diferença entre os tipos de superfícies em função da aplicação do PRP.

Schlegel *et al.* (2003) também procuraram analisar a osseointegração de implantes de 3,5 x 4mm por meio do condicionamento prévio do leito ósseo e da superfície do implante com colágeno bovino osteoindutivo (Colloss) e PRP em porcocos, durante um período de 2, 4 e 8 semanas. O PRP foi obtido pelo método automático Curasan e uma concentração de cinco vezes o valor inicial foi alcançada. Nos estágios iniciais, significativo efeito em relação ao contato osso-implante em comparação ao controle (2 semanas: Controle 31%, Colloss 60% e PRP 47%; 4 semanas: controle 39%, Colloss 48% e PRP 42%) e a densidade óssea ao redor do implante (2

semanas: controle 31%, Colloss 48% e PRP 39%; 4 semanas: controle 47%, Colloss 53% e PRP 50%) foram observados. No entanto, em 8 semanas, não foram observadas diferenças, em que os valores eram praticamente os mesmos. Os autores concluíram que um efeito tóxico do condicionamento pode ser alcançado por diferentes métodos.

Fuerst *et al.* (2003) procuraram avaliar os efeitos do PRP sobre o contato osso-implante na cortical óssea da mandíbula de miniporcos por um período de 4 e 8 semanas. O PRP foi obtido por dupla centrifugação (2890G por 6 minutos e 153G por 12 minutos) e posteriormente o concentrado de plaquetas foi centrifugado novamente por 10 minutos a 1400G, resultando em 2.000.000 plaquetas/ μ l. Em 4 semanas, o contato foi significativamente maior para ambos os grupos (tratado: 55,30% e controle 38,91%), no entanto, sem diferenças entre os períodos e entre os grupos (4 semanas: PRP - 44,20%, controle -29,62%; 8 semanas: PRP - 70,36%, controle - 48,20%).

Embora estes estudos tenham demonstrado efeitos positivos do PRP em relação ao contato osso-implante em diversos modelos animais, outros estudos também têm mostrado resultados contraditórios (Jensen *et al.*, 2004; Weibrich *et al.*, 2004).

Jensen *et al.* (2004) avaliaram a influência do PRP e enxerto ósseo sobre a fixação de implantes cilíndricos de 6 x 10mm e a formação óssea em cães. Cada implante com cobertura de hidroxiapatita foi circundado por um espaço de 2,5mm e divididos em 4 grupos: espaço vazio, PRP, enxerto ósseo canino fresco congelado e enxerto ósseo canino fresco congelado + PRP. A contagem de plaquetas no PRP alcançou 670% por meio de uma centrifugação de 20 minutos com 4000rpm (1.884.000 plaquetas/ μ l). Os resultados obtidos após 3 semanas de cicatrização mostraram que o enxerto ósseo aumentou a fixação do implante ao osso, a formação óssea no espaço e o crescimento ósseo sobre a superfície do implante, no entanto, sem diferenças para os grupos que receberam o PRP, tanto sozinho quanto misturado ao enxerto ósseo. Tais resultados podem ser atribuídos à forma de obtenção do PRP e do anticoagulante utilizado, pois o EDTA utilizado pode diminuir os efeitos dos fatores de crescimento, ou ainda diminuir a quantidade de plaquetas conseguida com o processo de centrifugação.

Já Weibrich *et al.* (2004) procuram demonstrar o efeito da contagem de plaquetas no PRP produzido pelo Sistema PCCS (3i implants) sobre a regeneração óssea ao redor de implantes

(3,75x7mm) em fêmures de coelhos por um período de 1 mês. Foi observada diferença na regeneração óssea pela marcação com o fluorocromo apenas quando uma quantidade intermediária de concentrado de plaquetas foi utilizada (503,000 – 1,729,000 plaquetas/ μ l PRP). No entanto, não foram observadas diferenças entre o contato osso-implante entre os grupos com diferentes concentrações de plaquetas (baixa: 164,000 – 373,000 plaquetas/ μ l PRP) e alta: 1,845,000 – 3,200,000 plaquetas/ μ l PRP). Tais autores também observaram que a concentração de plaquetas necessária para se obter um efeito positivo do PRP na regeneração óssea parece incluir uma extensão muito limitada. Segundo esses mesmos autores, efeitos biológicos vantajosos parecem ocorrer quando a concentração alcança aproximadamente 1.000.000 plaquetas/ μ l. Em concentrações menores o efeito parece ser inferior, entretanto, quando muito superior a este pode ter um efeito inibitório. Isso pode ser uma explicação parcial para os diferentes resultados de estudos anteriores. Os autores concluíram que o efeito deste tipo de concentrado de plaquetas não trouxe benefícios em acelerar o processo de osseointegração em implantes.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente o efeito do plasma rico em plaquetas na regeneração óssea guiada com membranas não reabsorvíveis de PTFE-e com reforço de titânio de PTFE-e no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares em cães.

4. - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Amostra

Foram selecionados 10 cães adultos, machos, sem raça definida, com aproximadamente 2 anos de idade, pesando em média 25kg, com dentição completa e bom estado de saúde periodontal previamente à realização do estudo. Os animais foram submetidos a tratamento profilático, incluindo vacinação, dieta e higiene.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, sob as mesmas condições ambientais, em baias individuais, tratados com ração e água "*ad libitum*".

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp - Bioterismo da Unicamp (CEMIB) sob protocolo 555-1 (Anexo).

4.2.- Anestesia

Todas as cirurgias foram realizadas sob anestesia geral por meio de injeção intravenosa de uma solução de 2,5% de tiopental sódico (Tiopental®- Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), no volume de 1ml/kg, posteriormente a uma sedação com cloridrato de dihidrotiazina (Rompun®- Bayer do Brasil SA, São Paulo, Brasil), intramuscular, na dose de 1,5 ml/10 kg de peso corpóreo. A área cirúrgica foi localmente anestesiada com Lidocaína 2% (DFL Indústria e Comércio LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), contendo epinefrina (1:100.000), com o objetivo de reduzir a hemorragia e assegurar um efeito anestésico local adequado. 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 pela médica veterinária que participava durante os procedimentos cirúrgicos.

4.3.- Procedimento Cirúrgico de Extração dos Dentes

Três meses antes da instalação dos implantes e criação das deiscências ósseas vestibulares (Figura 1) foram realizadas extrações bilaterais do segundo, terceiro e quarto pré-molares e primeiro molar inferiores. Para isso, foram realizadas incisões intra-sulculares nas faces vestibular e lingual, estendendo-se da mesial do primeiro pré molar (P1) até mesial do segundo molar (M2) inferiores de ambos os lados.

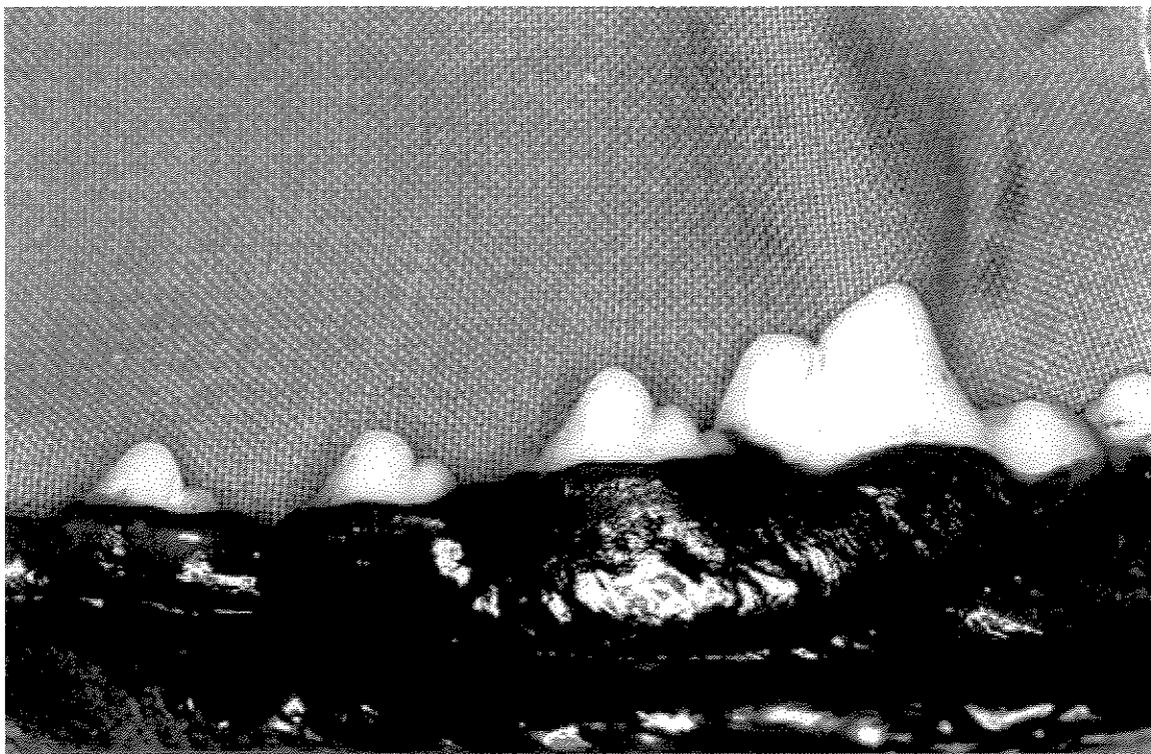


Figura 1 – Aspecto clínico inicial dos pré-molares (P2, P3, P4) e do primeiro molar inferiores, previamente ao descolamento do retalho.

Um retalho de espessura total foi elevado e os pré-molares (P2, P3 e P4) e molares inferiores (M1), de ambos os lados, foram seccionados através da bifurcação de suas raízes com auxílio de brocas para odontosecção em alta rotação (Carbide FG nº 703 - SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e irrigação contínua com soro fisiológico estéril a 0,9%. As raízes mesial e distal foram removidas separadamente (Figura 2), os alvéolos curetados (Figura 3) e os tecidos reposicionados e suturados como fio reabsorvível catgut simples 4.0 (Figura 4).



Figura 2 – Aspecto clínico cirúrgico dos dentes P2, P3, P4 e M1 após elevação do retalho de espessura total e secionamento das coroas na altura da bifurcação.

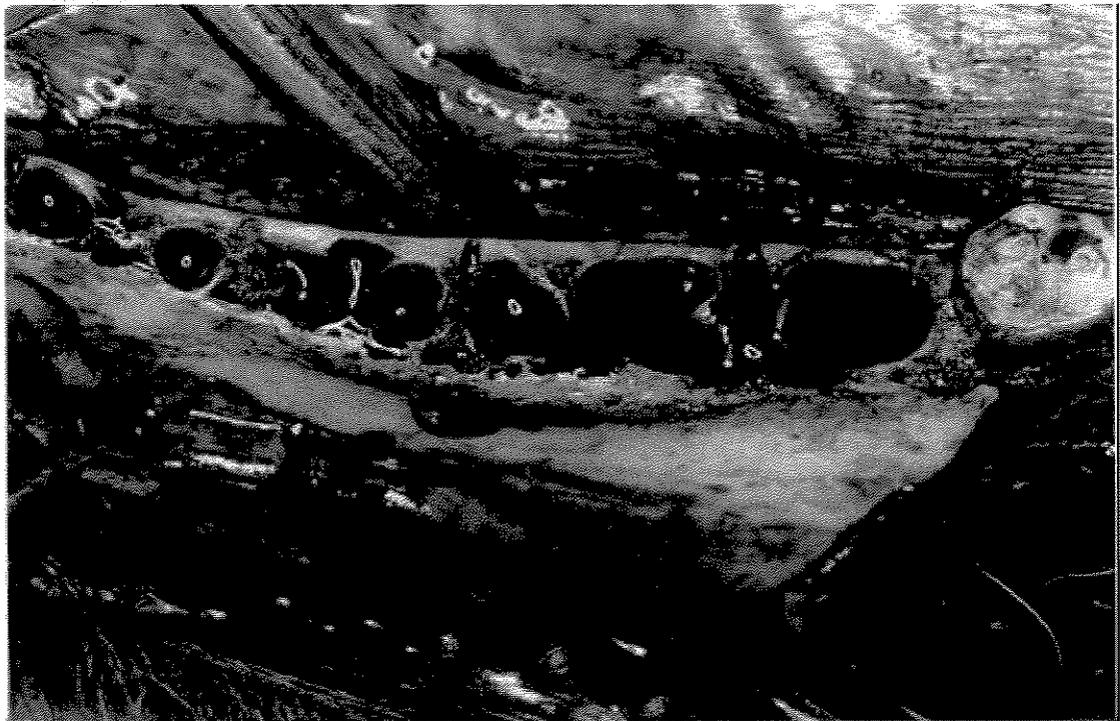


Figura 3 – Aspecto clínico cirúrgico do rebordo alveolar após extração dental e curetagem dos alvéolos.

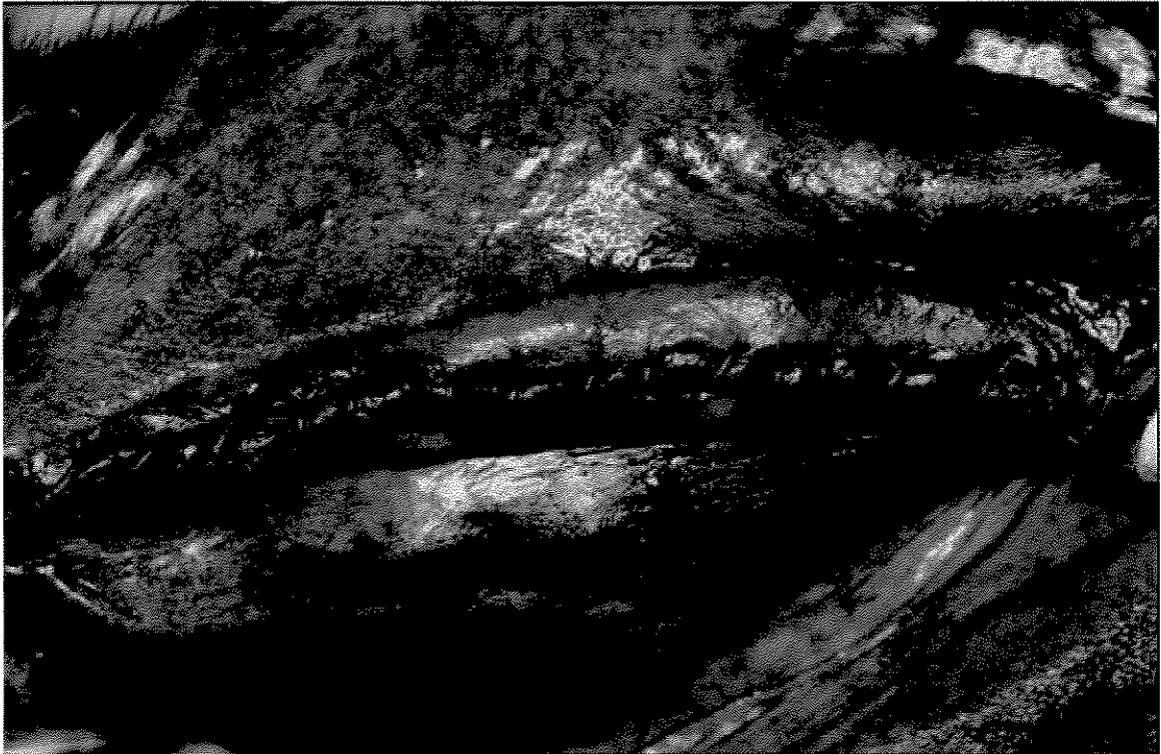


Figura 4 – Aspecto clínico após a extração dos dentes e sutura dos retalhos.

Durante o procedimento cirúrgico, foi administrado Pentabiótico para animais de pequeno porte (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Laboratório Wyeth – WhiteHall Ltda, São Paulo, SP, Brasil), uma associação de penicilina e estreptomicina (0,1ml/kg). Uma segunda dose com 4 dias de pós-operatório, de forma subcutânea, também foi aplicada com o objetivo de minimizar qualquer risco de infecção da área cirúrgica. Um antiinflamatório não-esteroidal (Flunixin Meglumine - Banamine® 10mg/ml, Ind. Quim. E Farm Schering-Plough S/A Veterinária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), na dosagem de 1ml/10kg, também foi administrado por 3 dias consecutivos, de forma subcutânea, com o objetivo de eliminar a dor e o edema pós-operatório. Durante um período de 15 dias, os animais receberam alimentação pastosa (BomGuy, Dumilho SA Ind. e Com., Espírito Santo, Brasil), para prevenir qualquer trauma sobre a área operada e sobre as suturas.

4.4 - Procedimentos Cirúrgicos de Criação das Deiscências e Colocação dos Implantes

Quinze dias antes dos procedimentos de colocação dos implantes e tratamento dos defeitos, radiografias padronizadas foram tomadas por meio de um aparelho de Raio-X (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com películas radiográficas convencionais (Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil) utilizando a mesma kilovoltagem (70kv) e miliamperagem (10mA) com o objetivo de avaliar a distância do rebordo para o canal mandibular e determinar o tamanho dos implantes a serem utilizados. Remoção de cálculo e placa dental supragengival também foram realizados com auxílio de ultra-som (Jet Sonic, Gnatus, Ribeirão Preto, São Paulo, SP) e posterior profilaxia dental com pedra pomes e taça de borracha. Três meses após a extração dental, foi realizada uma incisão sobre o rebordo alveolar se estendendo da distal do P1 até a mesial do M2. Um retalho de espessura total foi elevado com a finalidade de expor o tecido ósseo subjacente. Foram preparados 2 leitos ósseos por hemi-arco utilizando a seqüência de brocas até a broca 3.15, sem passar o macho de rosca. Posteriormente ao preparo dos leitos e utilização do *counter sink*, foram produzidos 2 defeitos ósseos bilaterais, tipo deiscência, na face vestibular dos leitos dos implantes, com o auxílio de uma broca 703 e cinzel de Oschinbein (Neumar Instrumentos Odontológicos LTDA, Brasil) e dimensões de 4,0mm de largura por 5,0 mm no sentido ápico-oclusal, medidos com uma sonda milimetrada Carolina do Norte (Neumar Instrumentos Odontológicos LTDA, Brasil), (Figura 5).



Figura 5 – Aspecto clínico após a confecção dos defeitos de deiscência.

Uma vez criadas as deiscências ósseas vestibulares, quatro implantes dentais de titânio comercialmente puro - comprimento 8,5 mm / 4 mm de diâmetro com superfície tratada por corrosão eletroquímica com ácido fosfórico (Branemark System MKIII TiUnite® RP, Nobel Biocare™, Göteborg, Sweden) foram colocados, dois por hemi-arco dos animais (Figura 6). Os implantes foram colocados manualmente e o travamento obtido com auxílio de uma catraca sem torquímetro.

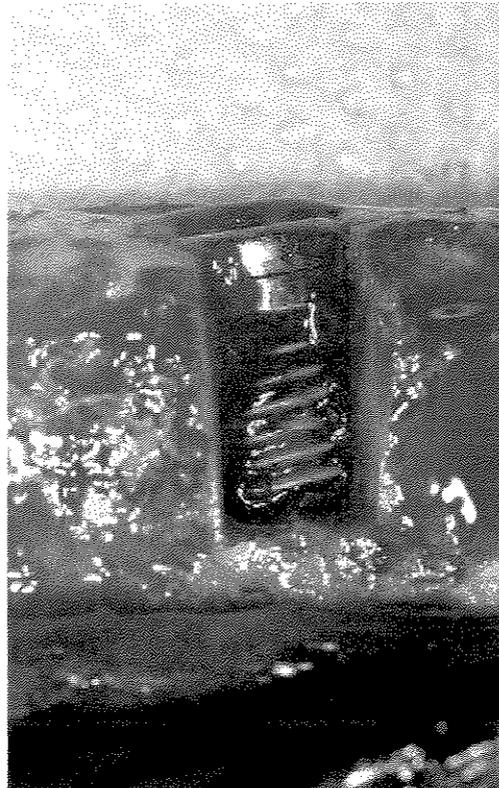


Figura 6 – Aspecto clínico após a colocação dos implantes dentais.

4.5 - Tratamento das Deiscências Ósseas

Posteriormente a colocação dos implantes, um sorteio foi realizado para se determinar qual lado seria tratado com PRP. Em um novo sorteio, foi definido quais defeitos seriam tratados pela técnica da ROG. Desta forma, foram utilizados quatro grupos experimentais:

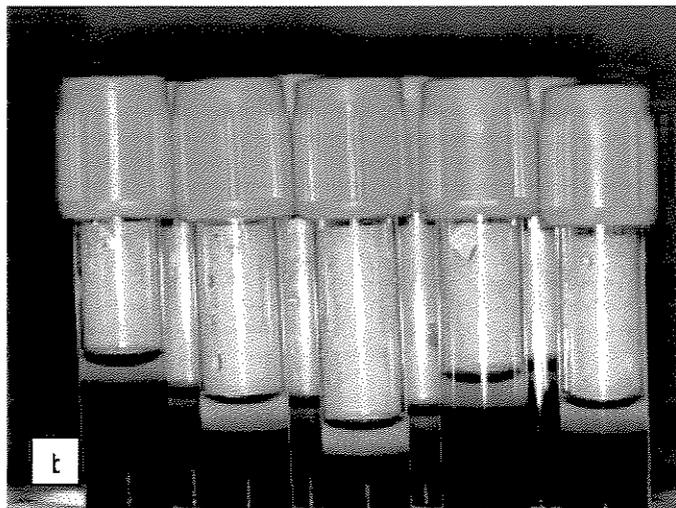
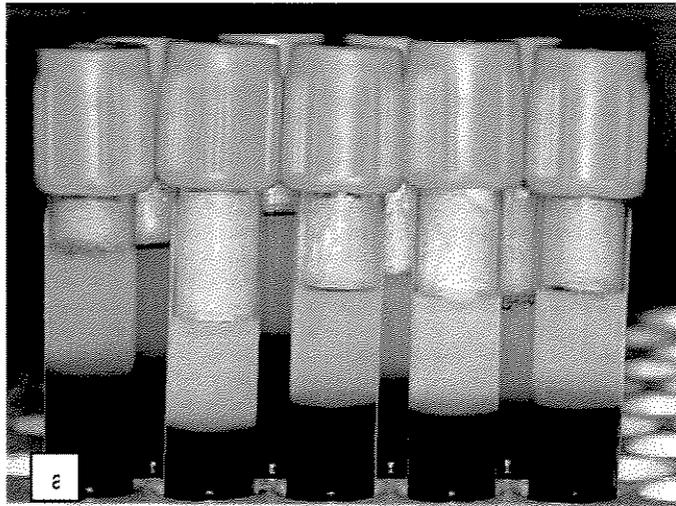
- 1- Controle
- 2- ROG

3- PRP

4- ROG + PRP

4.6 - Obtenção e Uso do Plasma Rico em Plaquetas

Para obtenção do PRP, aproximadamente 30ml de sangue de cada animal foram coletados por meio de tubos à vácuo tipo Vacutainer® (BD Brasil, São Paulo, SP) 4,5ml contendo 0,5ml de anticoagulante citrato de sódio 3,2% tamponado. No momento da punção venosa dos animais, o sangue total coletado bem como a porção do plasma rico em plaquetas, obtidos após a centrifugação e anteriormente à formação do gel de plaquetas pela adição de cloreto de cálcio a 10%, 2 tubos foram enviados para um Laboratório de Análises Clínicas Veterinário (IMAGO, Piracicaba/SP) para a contagem de plaquetas nestas duas porções. Os tubos restantes foram centrifugados com uma força centrífuga relativa (FCR) de 200G (Gravidade) e 1200 RPM (Rotações por minuto), já padronizada pelo fabricante, durante 10 minutos por meio de uma centrífuga, modelo odontológico SIN 1200 (CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri - SP). Decorrido este tempo, separou-se a parte superior do tubo, contendo o plasma, da parte inferior, contendo as plaquetas, leucócitos e células vermelhas sanguíneas com a ajuda de uma micropipeta de 1000µl. Os tubos foram levados novamente à centrífuga, os quais se submeteram a um segundo processo de centrifugação durante 15 minutos e FCR de 200G (Figuras 7a e b). Após este período, com o auxílio de uma micropipeta, separou-se a porção que compreende ao plasma rico em plaquetas, localizado logo acima da porção vermelha do sangue (Figura 8). Aproximadamente 400µl de PRP foram coletados de cada tubo e colocado em uma placa de petri estéril, formando porções separadas sobre a placa. Foi adicionada solução de Cloreto de Cálcio 10% (Index Farmacêutica – São Paulo/SP) na proporção de 1:8 da quantidade total de PRP coletado e homogeneizado com auxílio de uma ponteira de pipeta, com o objetivo de neutralizar a ação do anti-coagulante citrato de sódio dar início o processo de coagulação. A partir daí, a placa contendo o PRP foi levada a banho-maria (37°C) até ocorrer a geleificação do material. Após a sua geleificação, o mesmo foi aplicado com auxílio de uma pinça de titânio (Nobel Biocare™, Göteborg, Sweden) nos defeitos de deiscência de acordo com cada tratamento designado.



Figuras 7 a e b – Porção do plasma (mais clara) correspondente à primeira centrifugação (a). Porção do plasma e hemácias correspondente à segunda centrifugação (b).

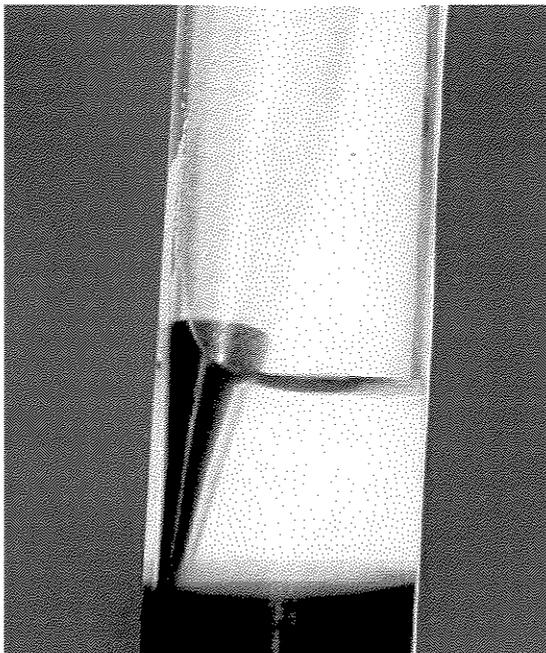


Figura 8 – Porção correspondente ao plasma rico em plaquetas, localizado imediatamente acima da porção vermelha do sangue.

Nos implantes selecionados para receber a membrana de PTFE-e com reforço de titânio (Gore-Tex® TR4Y, Flagstaff, Arizona, USA), esta foi recortada e ajustada sobre o local do defeito ósseo, ultrapassando dois a três milímetros das margens do defeito (Figura 9) e fixados com parafusos metálicos estéreis manuais (Proline, São Paulo, SP, Brasil), após a aplicação do PRP (Figura 10). Os retalhos foram reposicionados e suturados com suturas interrompidas e contínuas não reabsorvíveis de PTFE-e de maneira a recobrir totalmente os implantes e os materiais utilizados (Figura 11). As mesmas foram removidas aos 15 dias de pós-operatório.

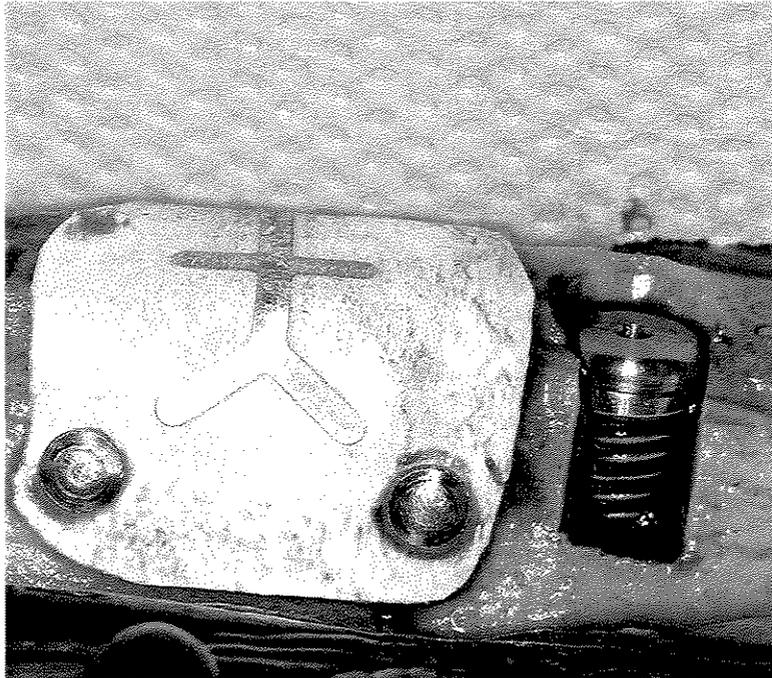


Figura 9 – Aspecto clínico após a colocação dos implantes e tratamento do defeito do lado sem PRP com a membrana não reabsorvível de PTFE-e e o implante que não foi tratado.

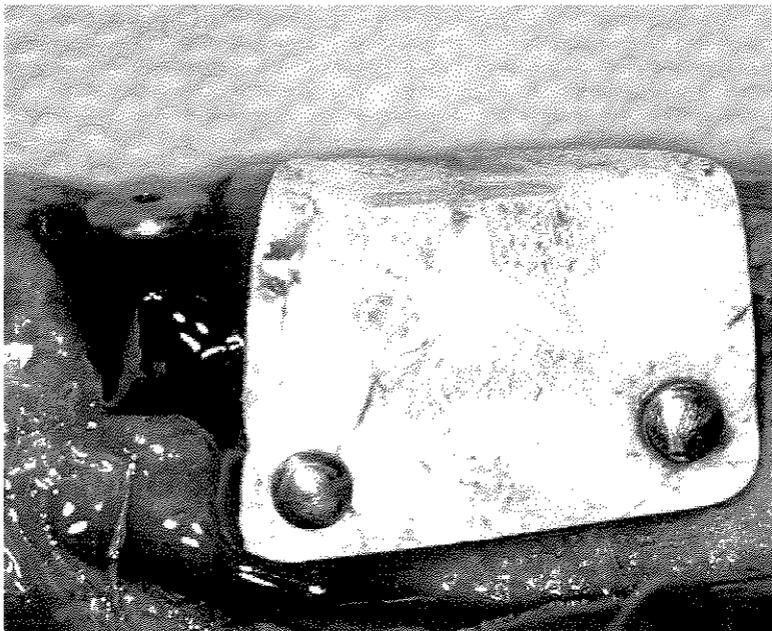


Figura 10 – Aspecto clínico após a colocação do gel de plaquetas sobre os defeitos previamente à fixação da membrana e sutura dos tecidos.

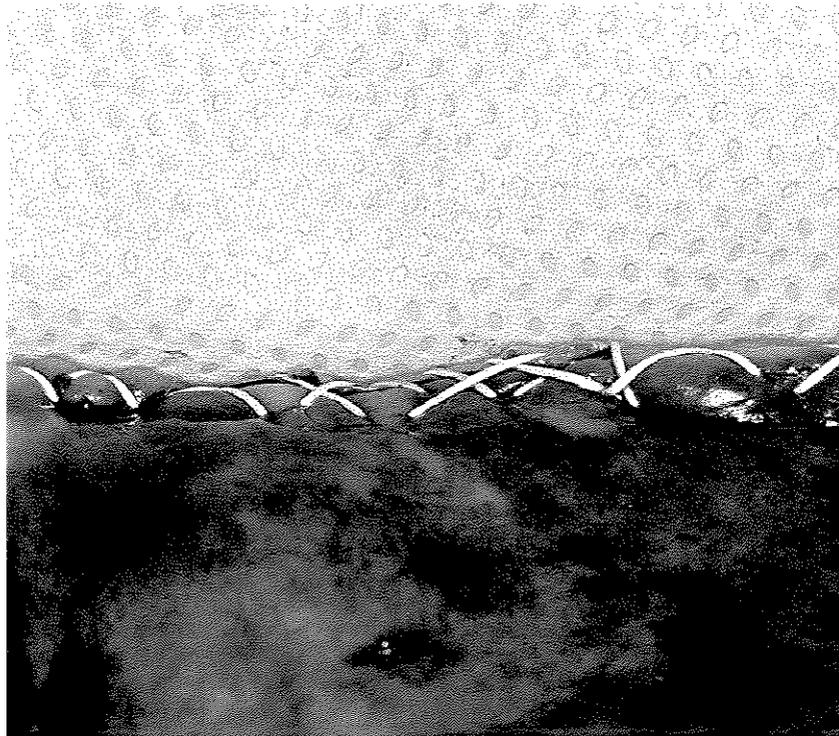


Figura 11 – Aspecto clínico após o reposicionamento dos tecidos e suturas interrompida e contínua com fio não reabsorvível de PTFE-e.

Após os procedimentos cirúrgicos de colocação dos implantes, foi administrado Pentabiótico, por via subcutânea, imediatamente após a colocação dos implantes e uma segunda dose aos 4 dias de pós-operatório com o objetivo de prevenir infecção da área cirúrgica ou por exposição precoce da membrana. Os cães receberam alimentação pastosa em lata até o final do período experimental, bem como controle químico de placa por meio de aplicação tópica diária de clorexidina a 0,12% (Farmácia Proderma, Piracicaba, São Paulo), durante 30 dias. Mensalmente, os cães também foram submetidos à remoção de cálculo supragengival com ultra-som e profilaxia dental por meio de taças de borracha e pedra pomes.

4.7 - Processamento histológico:

Após 3 meses do tratamento dos defeitos ósseos, os animais foram mortos por meio do aprofundamento da anestesia e injeção letal de cloreto de potássio a 19,1% (Farmácia Proderma, Piracicaba, SP, Brasil). As mandíbulas foram removidas e colocadas em formol 4% tamponado, pH neutro, por 48 horas. Nas primeiras 24 horas, os tecidos duros adjacentes foram seccionados em blocos contendo apenas um implante em cada espécime, os quais foram codificados para que o examinador não soubesse a que grupo pertencia cada implante.

Após o processo de fixação e posterior lavagem com água destilada, os espécimes foram desidratados em uma série de solução de álcool etílico (60-100%) sob constante agitação. A infiltração plástica foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC – Kulzer, Werheim, Alemanha) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro, sob agitação constante. Após a infiltração plástica, os espécimes foram incluídos e polimerizados por 10 horas. Os blocos de resina foram removidos do molde e montados em lâmina acrílica com o auxílio de resina (Technovit 4000, Kulzer, Wehrreim, Alemanha).

Por meio da utilização de um sistema de corte (Exakt – Cutting System, Apparatebau GmbH, Hamburgo, Alemanha), segundo técnica descrita por Donath & Breuner (1982), foi realizado um corte preliminar e obtida uma secção de 300-500 μ m de espessura. Esta secção foi submetida a um sistema de microdesgaste (Exakt – Micro Grinding System[®], Apparatebau GmbH, Hamburg, Alemanha), resultando em uma secção de aproximadamente 50 μ m de espessura, na porção mais central do defeito, representando uma lâmina por implante dental. As secções obtidas foram então fixadas em lâminas, coradas com coloração de Azul de Toluidina a 1% , laminulas posicionadas e coladas com resina e polimerizadas.

Com auxílio de um programa de análise de imagens (Image-Pro[®]; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), as imagens da região da deiscência foram capturadas por uma câmera digital (MC80 DX[®], Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada em um microscópio óptico (Axioskop 2 Plus[®], Zeiss, Jena, Alemanha) e armazenadas no computador para posterior análise histométrica.

4.8 - Análise Histométrica

Foram obtidas imagens da região central da deiscência por implante, agrupadas em duas imagens, correspondendo a região acima da linha reversão óssea com aumento original de 12,5X, para avaliação dos parâmetros de contato osso-implante e área de preenchimento ósseo dentro das roscas. Para avaliação dos parâmetros área de novo osso e densidade óssea fora das roscas, as imagens foram capturadas com um aumento de 6,25X, o que também incluía a região acima da linha de reversão óssea. Após a avaliação, obteve-se uma média das roscas dos implantes por animal e tratamento para cada grupo, para os seguintes parâmetros histométricos:

- Contato Direto Osso-implante (CO) (%): calculado dividindo-se a média da extensão de tecido ósseo neoformado em contato direto com a superfície do implante pela média da extensão total da rosca multiplicado por 100 para obter a porcentagem (Sennerby *et al.*, 1992) (Figura 12).
- Área de preenchimento ósseo dentro das roscas (AD) (%): área relativa de tecido ósseo neoformado dentro das roscas, obtida dividindo-se a média da área de tecido ósseo neoformado dentro das roscas pela média da área total da rosca multiplicado por 100 para obter a porcentagem (Sennerby *et al.*, 1992) (Figura 13).
- Área de Tecido Ósseo fora das Roscas em mm² (AF): medida obtida circundando todo o tecido ósseo neoformado compreendido acima da linha de reversão óssea na parte inferior, a superfície do implante até a primeira rosca do implante (Figura 14).
- Densidade Óssea fora das roscas (DO) (%): obtida dividindo-se a média do tecido ósseo neoformado mineralizado fora das roscas pela média da área total fora da rosca e multiplicado por 100 para obter a porcentagem, em uma região adjacente à região das roscas selecionadas anteriormente, expostas pelo defeito e a linha de reversão correspondente ao osso pré-existente (Figura 15).

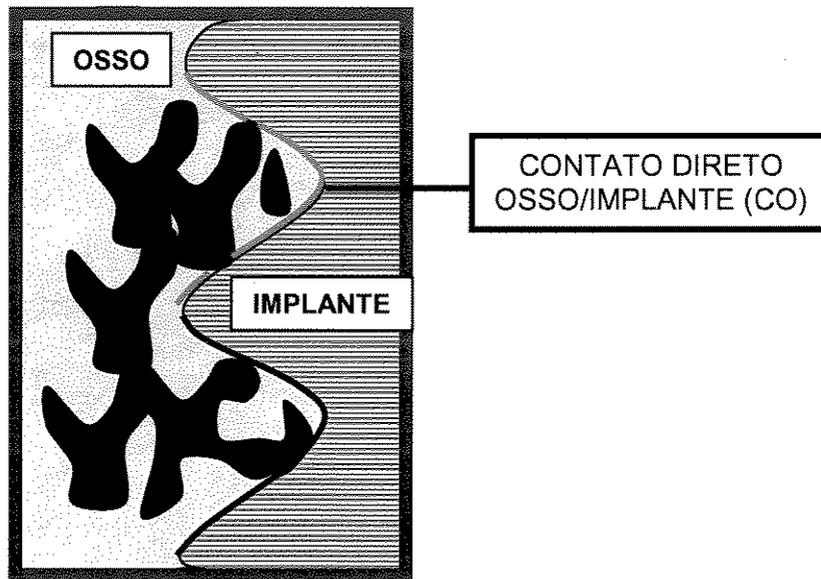


Figura 12: Desenho esquemático representando o contato osso-implante analisado dentro das roscas dos implantes (CO). Em azul, o tecido coincidente com osso em contato com o implante e em vermelho a extensão total da rosca.

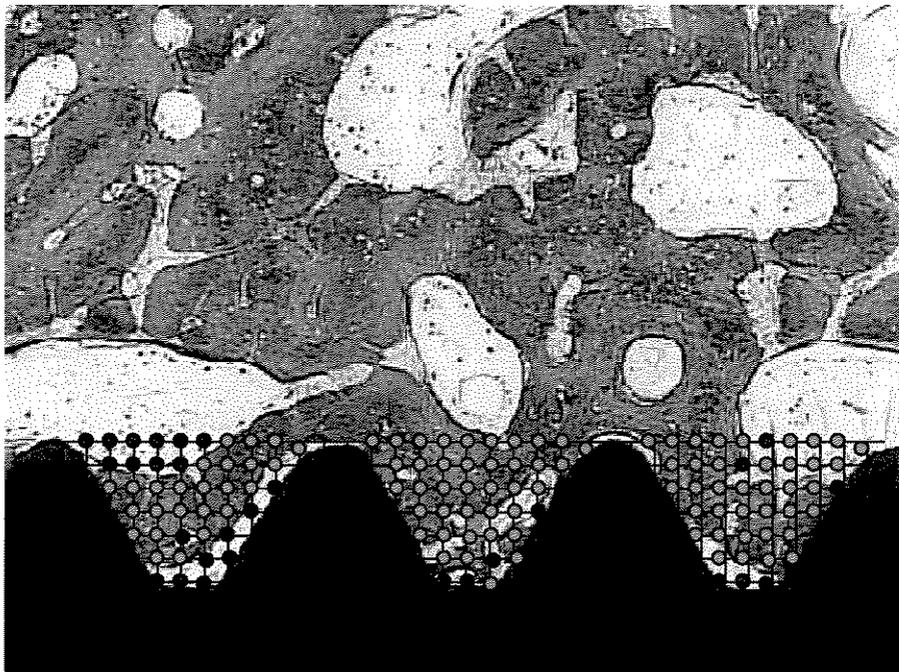


Figura 13 - Fotomicrografia representando a área analisada dentro das roscas dos implantes por meio do Programa Image-Pro®. Notar retículo quadriculado posicionado e os pontos verdes correspondentes ao tecido ósseo.

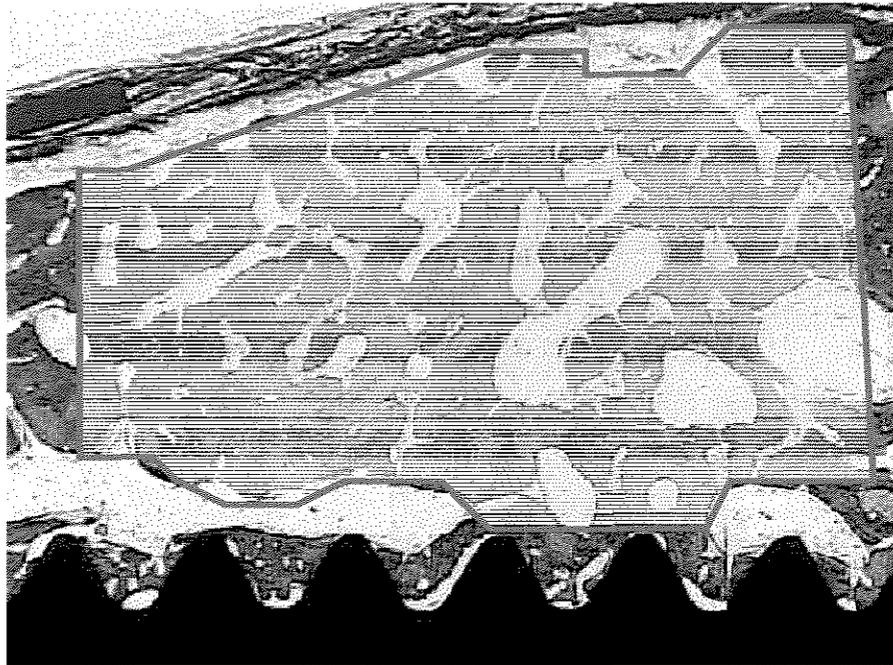


Figura 14 - Fotomicrografia representando o tecido ósseo neoformado medido fora das roscas dos implantes.

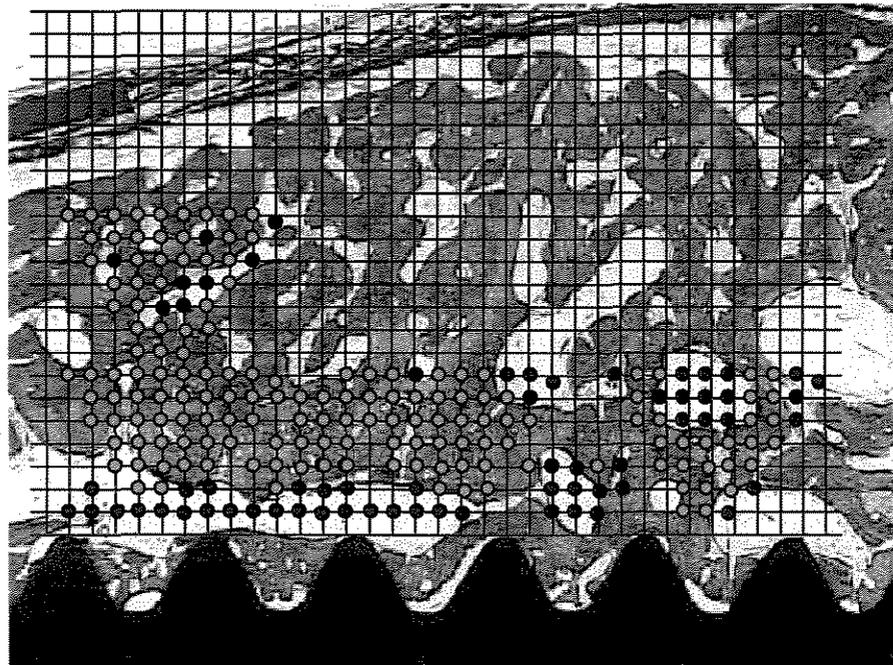


Figura 15 - Fotomicrografia representando a densidade óssea analisada fora das roscas dos implantes.

4.9 - Análise Estatística:

Foram obtidas as médias para cada parâmetro e o desvio padrão para cada parâmetro, em que cada cão foi considerado um bloco recebendo os quatro tratamentos, o qual tem um delineamento experimental em bloco ao acaso. Inicialmente, para testar a normalidade dos dados, 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). Na análise estatística, a hipótese de que a utilização do PRP e da membrana e a interação entre eles não influenciam o reparo ósseo ao redor dos implantes foi testada usando uma Análise de Variância, em Esquema Fatorial 2 x 2 ($\alpha= 5\%$).

5. RESULTADOS

5.1- Observações Clínicas

Durante os 3 meses de pós-operatório, os cães permaneceram em boa saúde, sem nenhuma complicação de ordem geral. Não houve perda de implante ou exposição das membranas. Nenhum sinal clínico de inflamação ou reação adversa dos tecidos (deiscência ou formação de abscessos ou supuração) foi observado.

A média do número de plaquetas do sangue total dos animais no momento da cirurgia foi de 148520 ± 33760 plaquetas/ μ l de sangue e do PRP foi de 460350 ± 138960 plaquetas/ μ l. Esta concentração final de plaquetas resultou em uma proporção aumentada de 320,6% ($\pm 121,80\%$). A tabela com os resultados das concentrações obtidas está expressa na Tabela 1.

Tabela 1: Quantidade de Plaquetas Inicial do Sangue Total e Final (PRP) em μ l e Concentração total de plaquetas (em %)

Cão	Inicial plaquetas/ μ l	Final plaquetas/ μ l	Concentração %
1	168000	440550	262
2	169000	745375	441
3	192000	520650	270
4	124000	289250	233
5	132000	598525	453
6	142400	378250	265
7	184000	380475	206
8	93450	534000	570
9	173550	458350	264
10	106800	258100	242
Média	148520	460350	320,6
DP	33763	138960	121,8

5.2- Resultados Histométricos

O processamento histológico permitiu distinguir o tecido ósseo pré-existente do tecido neoformado, uma vez que o novo tecido foi corado com uma tonalidade azul mais escura (Figuras 15a e b, 16a e b). Os dados histométricos de acordo com cada parâmetro utilizado estão relatados separadamente a seguir:

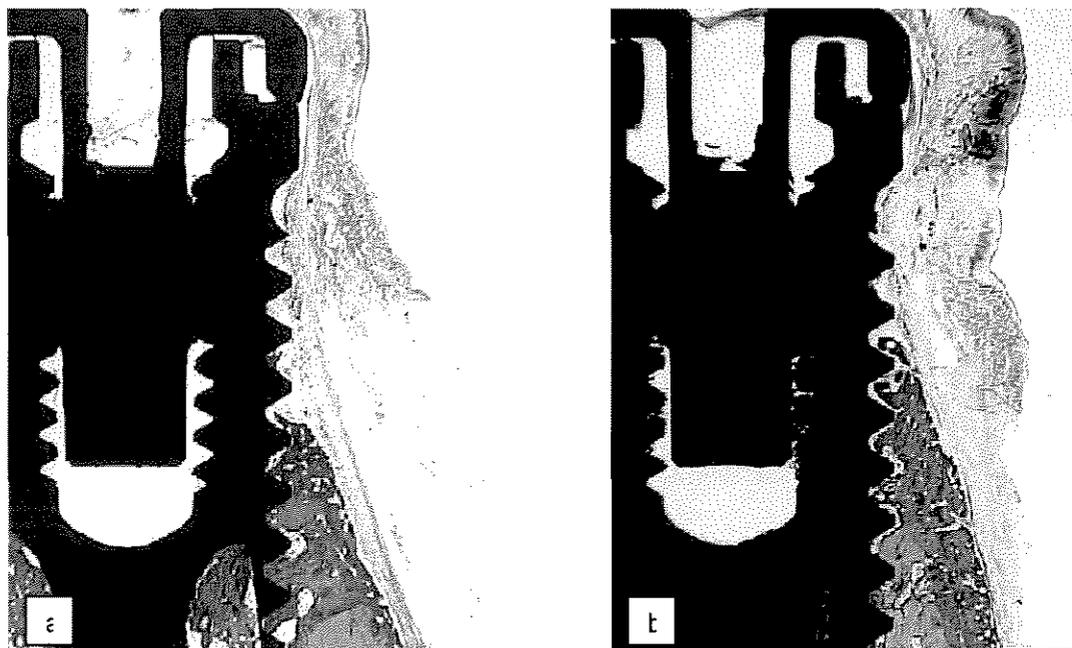


Figura 15 – Fotomicrografias dos grupos sem membrana. Em “a”, fotomicrografia do grupo sem PRP. Em “b”, fotomicrografia do grupo com PRP. Observar tecido ósseo formado dentro e fora das roscas, na região do defeito ósseo.

Novo tecido ósseo corado com tonalidade azul mais escura. Aumento Original 3,125X.

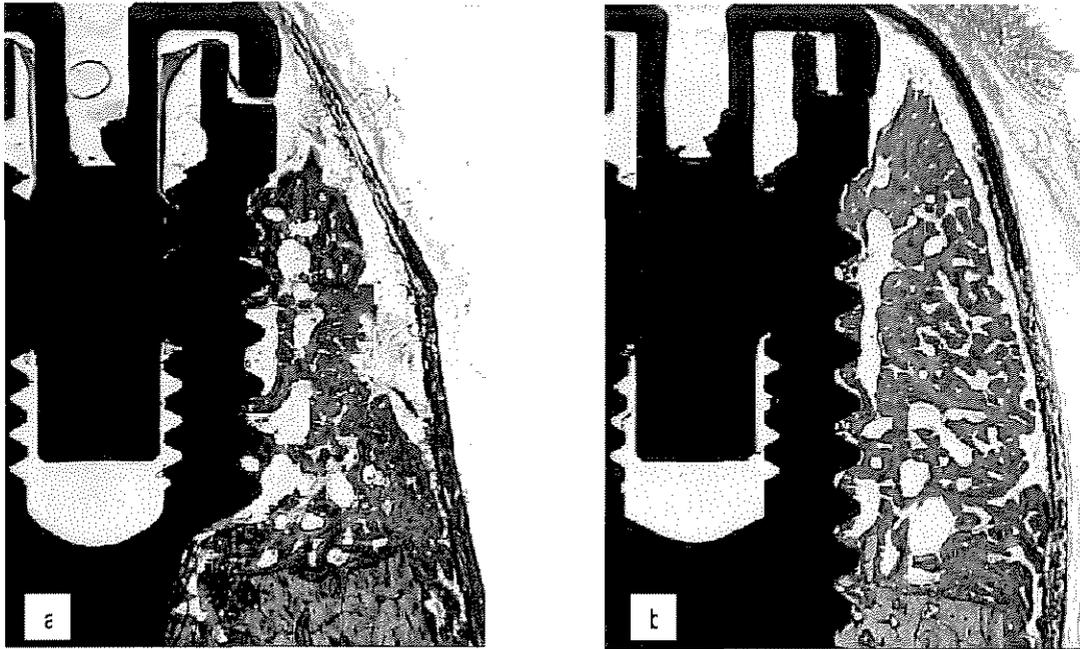


Figura 16 – Fotomicrografias do Grupo ROG. Em "a", fotomicrografia do grupo sem PRP e em "b", fotomicrografia do grupo com PRP. Observar tecido ósseo formado neoformado dentro e fora das roscas, na região do defeito ósseo.

Aumento Original 3,125X.

5.2.1- Contato Direto Osso-Implante (CO):

Durante a avaliação histométrica pôde-se observar uma diferença entre a porcentagem de contato osso-implante entre os implantes na presença ou não da membrana. Nos implantes em que foram utilizadas as membranas houve uma porcentagem significativamente maior de contato osso-implante (com PRP: $39,70 \pm 23,52$ vs. $17,63 \pm 17,73$ e sem PRP: $40,86 \pm 22,73$ vs. $16,52 \pm 15,96$) ($p=0,0014$), independente da presença do PRP, o qual não apresentou influência sobre esse parâmetro ($p=0,996$), sendo igual ao controle (com ROG: $39,70 \pm 23,52$ vs. $40,86 \pm 22,73$ e sem ROG: $17,63 \pm 17,73$ vs. $16,52 \pm 15,96$), (Tabela 2).

Tabela 2 – Média e desvio padrão da porcentagem de contato osso-implante (CO) quando da aplicação do PRP associado ou não a ROG

	ROG	Controle
PRP	Média ± DP	Média ± DP
Com	39,70 ± 23,52 Aa	17,63 ± 17,73 Ab
Sem	40,86 ± 22,73 Aa	16,52 ± 15,96 Ab

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais em coluna não diferem entre si quanto ao parâmetro PRP (p=0,996).

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes em linha diferem entre si pelo teste ANOVA em Esquema Fatorial quanto ao parâmetro ROG (p=0,0014). Interação entre os Fatores PRP e ROG, p=0,863.

5.2.2- Área de Preenchimento Ósseo dentro das Roscas (AD):

Os resultados mostraram uma superioridade na porcentagem do preenchimento da área dentro das roscas dos implantes, cujos defeitos foram tratados pela técnica da ROG (com PRP: 36,24±21,04 vs. 18,51±15,90 e sem PRP: 37,49±21,30 vs 19,27±18,13) (p=0,0089), independente da presença do PRP (com ROG: 36,24±21,04 vs. 37,49±21,30 e sem ROG: 18,51±15,90 vs. 19,27±18,13), (p=0,973) (Tabela 3).

Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem de preenchimento ósseo dentro das roscas (AD) quando da aplicação do PRP associado ou não a ROG

	ROG	Controle
PRP	Média ± DP	Média ± DP
Com	36,24 ± 21,04 Aa	18,51 ± 15,90 Ab
Sem	37,49 ± 21,30 Aa	19,27 ± 18,13Ab

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais em coluna não diferem entre si dentro do fator PRP (p=0,973).

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes em linha diferem entre si pelo teste ANOVA em Esquema Fatorial dentro do fator ROG (p=0,0089). Interação entre os Fatores PRP e ROG, p=0,938.

5.2.3- Área de Novo Osso fora das Roscas (AF):

Também foi observada uma superioridade da área de tecido ósseo neoformado fora das roscas (mm²) nos defeitos tratados pela ROG (com PRP: 4,45±2,65 vs. 1,08±1,16 e sem PRP: 3,10±2,27 vs. 0,61±0,94) (p<0,0001), independente também da presença do PRP (com ROG: 4,45±2,65 vs. 3,10±2,27 e sem ROG: 1,08±1,16 vs. 0,61±0,94), (p=0,1208) (Tabela 4).

Tabela 4 – Média e desvio padrão da área de novo osso fora das roscas em mm² (AF) quando da aplicação do PRP associado ou não a ROG

	ROG	Controle
PRP	Média ± DP	Média ± DP
Com	4,45 ± 2,65 Aa	1,08 ± 1,16 Ab
Sem	3,10 ± 2,27 Aa	0,61 ± 0,94 Ab

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais em coluna não diferem entre si dentro do fator PRP (p=0,1208).

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes em linha diferem entre si pelo teste ANOVA em Esquema Fatorial dentro do fator ROG (p<0,0001). Interação entre os Fatores PRP e ROG, p=0,437.

5.2.4- Densidade Óssea fora das Roscas (DO):

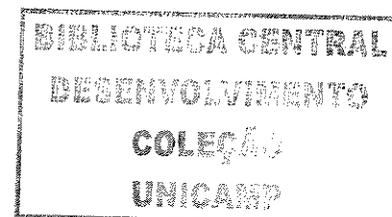
Neste parâmetro também houve uma diferença estatística significativa na porcentagem da densidade óssea fora das roscas nos defeitos tratados com a ROG (com PRP: 50,16±15,41 vs. 23,89±14,10 e sem PRP: 38,31±21,02 vs. 17,98±23,78) (p<0,0006), independente também da presença do PRP (com ROG: 50,16±15,41 vs. 38,31±21,02 e sem ROG: 23,89±14,10 vs. 17,98±23,78), (p=0,0614) (Tabela 5).

Tabela 5 – Média e desvio padrão da porcentagem da densidade óssea fora das roscas (DO) quando da aplicação do PRP associado ou não a ROG

	ROG	Controle
PRP	Média ± DP	Média ± DP
Com	59,59 ± 14,00 Ab	79,48 ± 9,40 Aa
Sem	56,92 ± 21,02 Ab	89,37 ± 9,28 Aa

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais em coluna não diferem entre si dentro do fator PRP (p=0,0614).

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes em linha diferem entre si pelo teste ANOVA em Esquema Fatorial dentro do fator (p<0,0006). Interação entre os Fatores PRP e ROG, p=0,989.



6. – DISCUSSÃO

Os defeitos ósseos associados aos implantes dentais são um achado freqüente (Mellonig & Nevins, 1995) e podem comprometer a estabilidade destes (Newman *et al.*, 1988). Sendo assim, a proposta do presente estudo foi avaliar, histometricamente, o tratamento de defeitos ósseos peri-implantares do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães, por meio da utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) e da técnica de regeneração óssea guiada (ROG) com membranas não reabsorvíveis de PTFE-e com reforço de titânio.

Os princípios biológicos da utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) estão baseados na premissa de que uma grande quantidade de plaquetas encontradas neste concentrado libera quantidades significantes de fatores de crescimento (Marx *et al.*, 1998; Marx, 2001). A sua aplicação em cirurgia oral foi inicialmente proposta por Whitman *et al.* (1997) e Marx *et al.* (1998) com o objetivo de modular e melhorar a cicatrização tecidual (Marx, 1999; Anitua, 1999). Estudos clínicos (Marx *et al.*, 1998, Anitua, 1999), radiográficos (Schlegel *et al.* 2003), histológicos (Kim *et al.*, 2002a,b; Choi *et al.*, 2004; Schlegel *et al.* 2004; Roldan *et al.*, 2004) e celulares (Lucarelli *et al.*, 2003; Kawase *et al.*, 2003; Arpommaeklong *et al.*, 2004) demonstraram que o PRP tem ação na reparação dos tecidos. Embora diversos estudos têm suportado que a utilização do PRP aumenta significativamente a regeneração óssea ao redor de implantes (Kim *et al.*, 2002a, b; Zechner *et al.*, 2003), existem resultados que não demonstram essa superioridade (Shanaman *et al.* 2001; Weibrich *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2004).

O PRP tem sido sugerido como uma nova modalidade terapêutica regenerativa e em razão da ausência de estudos que avaliem a associação do PRP e ROG no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares com o objetivo de amplificar e acelerar os efeitos destes fatores responsáveis por quase todos os processos de reparação é que se propõe o presente estudo. Entretanto, a utilização do PRP associado à membrana ou de forma isolada não resultou em diferenças estatísticas em relação à porcentagem de contato osso-implante nem em maior quantidade de formação óssea tanto dentro das roscas quanto fora delas. Entretanto, foi observada uma superioridade do grupo tratado com a técnica da ROG, em todos os parâmetros avaliados, quando comparado com o grupo controle.

Alguns aspectos podem ser apontados em relação à ausência de resultados estatisticamente diferentes quando da utilização do PRP. Embora, no presente estudo, tenha se alcançado uma concentração de plaquetas em torno de 320% (média de 460,000 plaquetas/ μ l) em relação à quantidade do sangue total dos animais, esses valores não foram suficientes para demonstrar uma superioridade da aplicação do PRP nos defeitos peri-implantares. Embora Marx *et al.* (1998) tenham observado uma concentração de 338% de plaquetas após a centrifugação com resultados favoráveis, a quantidade encontrada neste estudo demonstrou ser inferior a encontrada em outros trabalhos (Kim *et al.*, 2002a, b; Zechner *et al.*, 2003; Fuerst *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2004; Weibrich *et al.*, 2004) e pode ser uma possível explicação para a ausência de diferenças em relação ao contato osso-implante bem como uma na capacidade de indução de formação óssea promovida pelo PRP. Segundo Lacoste *et al.* (2003), o processo de reparo é complexo e envolve diversos mediadores que atuam em tempos específicos e em concentrações adequadas. De acordo com Koveker (2000), a osteogênese não ocorre antes de duas semanas e que alguns fatores de crescimento adicionados com o objetivo de acelerar o processo, são degradados antes desse período, o que poderia justificar também a ausência de resultados favoráveis quando da adição do PRP.

Ainda não é conhecida a concentração ideal de plaquetas e de seus fatores de crescimento para promover e acelerar a regeneração óssea (Kassolis *et al.*, 2000). Haynesworth *et al.* (2002) mostraram que uma resposta suficiente à concentração de plaquetas começa quando se alcança um aumento de 4 a 5 vezes do número inicial de plaquetas. Marden *et al.* (1993) relataram que em certas concentrações, o PRP pode até inibir a regeneração. Alguns autores têm sugerido que a quantidade de 1,000,000 de plaquetas/ μ l é uma concentração adequada para alcançar efeitos biológicos vantajosos na reparação tecidual (Marx *et al.*, 2001b; Weibrich *et al.*, 2004), como observado nos estudos de Marx *et al.* (1998), Kim *et al.* (2002a) e Zechner *et al.* (2003). No entanto, Weibrich *et al.* (2004) não encontraram diferenças em relação ao contato osso-implante em diferentes concentrações de PRP (163,000 - 373,000, 503,000 - 1,729,000 e 1,845,000 - 3,200,000) e sugeriram que concentrações muito altas de plaquetas podem até apresentar um efeito inibitório.

Garg *et al.* (2000) relataram que todas as plaquetas disponíveis degranulam dentro de 3 a 5 dias e que sua atividade inicial termina dentro de 10 dias. Desta forma, o PRP pode ter

apresentado uma resposta favorável no início da cicatrização. Entretanto, o presente estudo não pôde demonstrar tal fato em razão do tempo não ter sido uma variável no estudo. Em 3 meses não houve diferenças entre os parâmetros avaliados quando o PRP foi utilizado. Schlegel *et al.* (2004) observaram que nos estágios iniciais da formação de novo osso o PRP exerceu efeito na maturação de enxertos ósseos e sugeriram que o PRP não é essencialmente osteoindutor, mas pode ter também um efeito positivo na regeneração óssea de uma forma osteopromotora.

Os níveis dos fatores de crescimento na preparação do PRP e a sua quantidade necessária para alcançar os efeitos biológicos pretendidos (Weibrich *et al.*, 2002) são um ponto questionado na literatura. Segundo Dugrillon *et al.* (2002), o efeito osteogênico das plaquetas depende da quantidade de fatores de crescimento liberados. Weibrich *et al.* (2002) relataram que 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. Lacoste *et al.* (2003) observaram uma concentração de fatores de crescimento de 3 a 8 vezes no PRP em relação ao sangue total quando submetidos à ativação com cloreto de cálcio e trombina bovina. Stefani *et al.* (2000) observaram que a aplicação de doses de 5µg/ml da associação de PDGF e IGF recombinantes humanas foram capazes de demonstrar maior formação óssea ao redor de implantes dentais em cães.

No entanto, de acordo com Lucarelli *et al.* (2003), o conhecimento ou pelo menos uma previsão aceitável desses níveis de fatores de crescimento é necessária para assegurar uma confiável utilização clínica do PRP, já que a capacidade regenerativa do PRP depende desses níveis de fatores de crescimento. Isto poderia significar que diferentes indivíduos necessitam de diferentes concentrações de plaquetas para alcançar um efeito biológico comparável. Todavia, não existe um procedimento simples disponível para se obter níveis de fatores de crescimento estimados pré-operatórios numa amostra de PRP. Segundo esses mesmos autores, nem a contagem de plaquetas do sangue total nem do PRP são previsíveis em relação aos níveis resultantes de fatores de crescimento no PRP.

A ausência de identificação dos fatores presentes no PRP representa uma limitação do presente estudo. Contudo, devido ao grande número de fatores de crescimento contidos no PRP, tais como IGF, PDGF, TGF-β e EGF, existe ainda a necessidade de identificação da exata

combinação entre eles em estudos adicionais. O retorno à taxa normal de proliferação é importante por questões de segurança, o que é clinicamente desejado é um aumento transitório da atividade mitótica. Embora alguns estudos tenham demonstrado resultados promissores, até o presente momento não existem evidências suficientes por meio de estudos clínicos controlados em longo prazo que forneçam informações substanciais a respeito da utilização de fatores de crescimento na regeneração óssea.

Danos durante o processo de centrifugação e preparo do PRP podem ter levado à perda de plaquetas. A utilização de centrífugas mais especializadas ou destinadas somente ao processo de produção do PRP parece demonstrar ser um método mais seguro de preservar as plaquetas, evitando sua perda ou sua adesão às paredes dos tubos (Marx *et al.*, 2001a). A variabilidade na produção celular ou armazenagem de citocinas bem como no processamento do PRP ainda precisam ser esclarecidos (Lucarelli *et al.*, 2003). Mais estudos também são necessários para avaliar se existem mais razões para a perda de plaquetas e analisar o mecanismo de danos às mesmas, seja durante o processo de separação e contagem ou na ativação e agregação das plaquetas (Lucarelli *et al.*, 2003; Lacoste *et al.*, 2003).

Uma outra razão para que não tenha havido essas diferenças pode ser a não associação com algum material de preenchimento, em que uma rápida dissolução do gel pode ocorrer e perda dos efeitos positivos promovidos pela liberação dos fatores de crescimento do concentrado de plaquetas. Estudos como os de Kim *et al.* (2002a e b) e Schlegel *et al.* (2003) demonstraram uma superioridade nos resultados em favor da associação do PRP a enxertos ósseos. De acordo com Weibrich *et al.* (2004), os enxertos ósseos funcionam como um arcabouço por onde as células osteogênicas migram e colonizam a área ou ainda como fonte de células osteogênicas, quando o osso autógeno é utilizado. Segundo Freymiller (2004), o efeito benéfico do PRP pode ser em razão da fibrina funcionar como um adesivo biológico na agregação das partículas ósseas. No entanto, o presente estudo demonstrou uma maior formação óssea para o grupo tratado com a ROG mesmo sem a presença de enxertos ósseos, demonstrando um efeito positivo da membrana na osteopromoção.

Mellonig & Nevins (1995) relataram que os defeitos ósseos de deiscência e fenestração são os mais comuns associados aos implantes dentais, podendo ser divididos em defeitos com

características que favorecem a manutenção de espaço e os que não favorecem. A presença destes defeitos pode estar associada com exposição da superfície do implante e redução do contato osso-implante, podendo ocorrer o comprometimento do implante ou infecções peri-implantares (Newman *et al.*, 1988). Tradicionalmente, estes defeitos são tratados pela técnica de regeneração óssea guiada (ROG), associada ou não a enxertos ósseos, com o objetivo de promover respostas favoráveis para aumentar o volume ósseo em sítios que receberão implantes (Hämmerle & Karring, 1998; Hämmerle *et al.*, 2002), por isolar as células provenientes do tecido conjuntivo gengival da região do defeito ósseo, e assim, promover a sua reparação (Becker *et al.*, 1990; Zablotsky *et al.*, 1991).

O tipo de defeito utilizado no presente estudo representa um defeito ósseo de deiscência de 3 paredes (defeitos abertos) em contato com o pescoço do implante, sendo menos favorável, segundo Bogaerde (2004), do que os defeitos que preservam as paredes circunjacentes (defeitos fechados). Esse autor classificou os defeitos ósseos peri-implantares levando em consideração a anatomia do defeito na progressão do processo regenerativo. Dentre estes tipos de defeitos abertos com 3 paredes, existem aqueles que diferem em relação ao contorno ósseo pelos implantes estarem localizados dentro do tecido ósseo ou protruídos do contorno alveolar. Weng *et al.*, (2003) também sugeriram que a inclinação não paralela da cortical óssea da mandíbula com o longo eixo do implante também podem implicar em diminuição do espaço abaixo da membrana, prejudicando a manutenção adequada do espaço para a estabilidade do coágulo sanguíneo, comprometendo assim, os resultados. No presente estudo, não foi necessária a utilização de materiais de preenchimento em razão da anatomia dos defeitos permitir a manutenção do espaço sob a membrana.

A perda da cortical óssea vestibular representa a diminuição do suprimento sanguíneo e células osteoprogenitoras das paredes ósseas adjacentes (Conner *et al.*, 2003). Estudos que utilizaram defeitos ósseos circunferenciais como o de Lima *et al.* (2003) relataram que quando o defeito ósseo é circular, existe mais fonte de células provenientes das 5 paredes ósseas circunjacentes (vestibular, lingual, mesial, distal e inferior). O defeito de deiscência deste estudo apresenta três paredes (duas laterais e uma inferior), o que diminuiria a fonte de células osteogênicas, explicando a menor taxa de contato em relação ao estudo de Lima *et al.* (2003).

Mesmo assim, uma maior formação óssea abaixo da membrana foi observada.

Apesar do defeito de deiscência utilizado ser um defeito agudo, sendo favorável ao reparo, em alguns dos espécimes não houve formação de osso que recobrisse toda a deiscência. Aos 3 meses, provavelmente o tecido ósseo não se encontrasse totalmente maduro, e que em um tempo maior, um preenchimento das roscas poderia ser alcançado, como demonstrado em outros estudos na literatura avaliando esses parâmetros aos 4 meses (Conner *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003), 5 meses (Veis *et al.*, 2004) e 6 meses (Buser *et al.*, 1995, Lima *et al.*, 2003). Ersanli *et al.* (2004) demonstraram em humanos que o procedimento de ROG promoveu uma completa osteogênese apenas em 7 meses e que a vascularização e atividade osteoclástica encontrava-se aumentada ainda na maxila em relação à mandíbula, demonstrando que a localização anatômica do defeito e a qualidade óssea são uma característica importante para se obter sucesso na terapia regenerativa.

Os resultados deste trabalho demonstraram, mesmo na ausência de enxerto ósseo, superioridade estatística em favor da membrana, comprovando que a mesma foi capaz de manter espaço para o coágulo e promover regeneração óssea. Em algumas situações, o tamanho do defeito ósseo a ser regenerado ou aumentado pode ser grande ou largo demais e está além da capacidade da membrana isoladamente conseguir tratar (Schenk *et al.*, 1994). Desta forma, a utilização de materiais de preenchimento pode ser necessária associada às membranas. Alguns autores não têm demonstrado superioridade dessa associação (Becker *et al.*, 1992), enquanto outros observaram que a associação demonstrou formação óssea aumentada quando comparado à membrana isoladamente em implantes de superfície lisa e tratada com hidroxiapatita (Stentz *et al.*, 1997). Veis *et al.* (2004) também demonstraram uma superioridade do osso autógeno pela técnica da regeneração óssea guiada em defeitos ósseos circunferenciais, em que observaram um maior contato osso-implante para a superfície tratada quando enxerto foi usado. Os autores atribuem esses resultados à ação do osso enxertado compartilhar como uma deposição óssea secundária, aumentando a densidade óssea final.

Todas as membranas permaneceram recobertas por tecido mole durante os três meses do estudo, sem a presença de exposição e contaminação. Além disso, demonstraram ser capazes de criar e manter o espaço necessário para a regeneração óssea, neste tipo de defeito utilizado. Estes

fatores, provavelmente, influenciaram positivamente a reparação óssea dos grupos tratados com as membranas, como pôde ser observado pela maior área de formação óssea fora das roscas. A porcentagem de tecido mineralizado, representada pela densidade óssea fora das roscas, apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos grupos tratados pela ROG. Essa menor densidade nos grupos da ROG também foi observada no estudo de Saldanha *et al.*, 2004, em que defeitos ósseos mandibulares tratados pela ROG com finalidade de aumento de rebordo, associado ou não a administração de nicotina. Esse fato pode ser explicado pelo fato da membrana isolar o periósteo do defeito ósseo e retardar a mineralização desse tecido ósseo (Ohnishi *et al.*, 2000).

No presente estudo, observou-se que a utilização da membrana promoveu um maior contato osso-implante e área de tecido formado dentro das roscas, independente da utilização PRP para os mesmos parâmetros respectivamente. Segundo alguns autores, o contato direto osso-implante e o volume de preenchimento ósseo das roscas são de grande importância para o sucesso clínico em longo prazo dos implantes dentais (Buser *et al.* 1991; Gotfredsen *et al.* 1995; Lazzara *et al.* 1999). Os resultados do presente estudo podem ser confirmados por Mellonig *et al.* (1998), os quais observaram uma porcentagem de contato osso-implante para o grupo tratado com membrana não reabsorvível de PTFE-e. Resultados semelhantes também aos encontrados por Hämmerle *et al.* (1998) e Kohal *et al.* (1999). No entanto, Schliephake *et al.* (2000) relataram que a regeneração óssea guiada abaixo da membrana pode restabelecer o contorno ósseo alveolar, mas não é necessariamente associado com o aumento no contato osso-implante. Esses mesmos autores também observaram que a característica de formação óssea observada no estudo se deu mais na área da crista óssea alveolar, próxima à membrana, do que adjacente à superfície do implante tanto aos 3 quanto aos 6 meses.

Os parâmetros se mostraram inferiores para aqueles implantes que não receberam a membrana, independente da utilização do PRP. Tal resultado pode ser explicado em razão da competição celular na região do defeito no período de cicatrização. A barreira física previne o crescimento de células não osteogênicas, derivadas do tecido conjuntivo da mucosa alveolar, permitindo o crescimento de células angiogênicas e osteogênicas derivadas do espaço medular, as quais repovoam a região possibilitando a regeneração do defeito ósseo (Dahlin *et al.*, 1989; Becker

et al. 1990).

Em razão da dificuldade e até impossibilidade em se avaliar clinicamente os parâmetros utilizados no presente estudo bem como se avaliar histologicamente em humanos o tipo de reparo obtido com os tratamentos, é que avaliações histológicas utilizando modelos animais são necessárias, pois permitem eliminar determinadas variáveis além de padronizar uma metodologia adequada para as diversas técnicas. Os cães são freqüentemente utilizados como modelo para o estudo histológico com implantes dentais, principalmente, devido ao tamanho e simplicidade da anatomia radicular. A grande variabilidade interanimal e a rápida formação óssea associada à regeneração espontânea deste modelo (Weinberg & Bral, 1999) representam algumas desvantagens da sua utilização. A metodologia utilizada no presente experimento (criação cirúrgica dos defeitos em cães) permitiu a obtenção de defeitos bilaterais semelhantes, caracterizando um estudo de boca dividida (*split-mouth*).

Embora estudos anteriores tenham demonstrado efeitos positivos favoráveis à utilização do PRP tanto em cirurgia oral (Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998; Anitua, 1999) como associado a implantes dentais (Kim *et al.*, 2002a,b); atualmente, outros estudos, tanto *in vivo* como *in vitro* não têm demonstrado efeitos adicionais. Desta forma, diante das diferenças entre esses resultados é que mais estudos ainda são necessários para comprovar a real eficácia das plaquetas concentradas para que a utilização do PRR tenha alguma aplicação clínica em pacientes candidatos a receberem implantes dentais ou outros procedimentos clínicos.

7. CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada e dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a utilização do PRP associado a ROG não promove benefícios adicionais no reparo ósseo. No entanto, a ROG promove um maior contato osso-implante e formação óssea tanto dentro como fora das roscas dos implantes dentais.

REFERÊNCIAS*:

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): 323-32.
2. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res*. 15, 2004; 381-392.
3. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981; 10(6): 387-416.
4. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 ; 60(10): 1176-81.
5. Albrektsson T, Hansson HA, Ivarsson B. Interface analysis of titanium and zirconium bone implants. *Biomaterials*. 1985; 6(2): 97-101.
6. Albrektsson T, Jacobsson M. Bone-metal interface in osseointegration. *J Prosthet Dent*. 1987; 57(5): 597-607.
7. Andreassen JO, Andreassen FM. *Texto e Atlas Colorido de Traumatismo Dental*. 3ª edição. Artmed Editora, Porto Alegre, RS, p. 13-76, 2001.
8. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14(4): 529-35.
9. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler 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(1): 60-70.
10. Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontology 2000* 2000; 22, 44-50.
11. Becker W, Becker BE, Handlesman M *et al*. Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: a pilot study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990; 10(2): 92-101.
12. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K *et al*. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol*. 1992; 63(11): 929-40.
13. Bogaerde LV. A proposal for the classification of bony defects adjacent to dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2004; 24 : 264-271.
14. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. Appositional bone formation in marginal defects at implants *Clin Oral Impl Res*. 2003a;14(1); 1-9.
15. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. The jumping distance revisited: An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14(1): 35-42.
16. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3(2): 81-100.
17. Branemark PI *et al*. Tissue integrated prosthesis: osseointegration in clinical dentistry. Chicago, Quintessence, 1985; 350

* De acordo com a norma da Unicamp/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

18. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983; 174: 28-42.
19. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991; 25(7): 889-902.
20. Buser D, Ruskin J, Higginbottom F, Hartdwick R, Dahlin C, Schenk R. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects. A histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10: 666-681.
21. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(5): 611-9.
22. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol 2000* 1999a; 19: 151-63.
23. Buser D. Effects of various titanium surface configurations on osseointegration and clinical implant stability. In: Lang, N.P., Karring, T. & Linde, eds. **Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology**. Implant Dentistry 30 Jan, 1999b, pp. 88-101. Berlin: Quintessence Verlag-GmbH.
24. Choi B.-H, Im C.-J, Huh J.-Y., Suh J.-J, Lee S.-H. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33: 56-59.
25. Cochran DL. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol*. 1999; 70(12): 1523-39.
26. Conner KA, Sabatini R, Mealey BL, Takacs VJ, Mills MP, Cochran DL. Guided bone regeneration around titanium plasma-sprayed, acid-etched, and hydroxyapatite-coated implants in the canine model. *J Periodontol*. 2003; 74(5): 658-68.
27. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989; 4(1): 19-25.
28. Dahlin C, Lekholm U, Becker W, Becker B, Higuchi K, Callens A, *et al*. Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around oral implants using the guided tissue regeneration technique: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10(3): 312-8.
29. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *International J Prosthodontics*. 1998; 11: 391-401.
30. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11(4): 318-26.
31. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 31(6): 615-9.
32. Ersanli S, Olgac V, Leblebicioglu B. Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *J Periodontol*. 2004; 75: 750-756.
33. Freymiller EG. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62(8): 1046-8.

34. Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Sanroman F, Watzek G. Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18(5): 685-90.
35. Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Sanroman F, Watzek G. Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15(3): 301-7.
36. 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.
37. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996; 19(1 Suppl): 23-37.
38. Gotfredsen K, Nimb L, Hjorting-Hansen E. Immediate implant placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforced with polyglactin 910. An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 1994; 5(2): 83-91.
39. Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res*. 1995; 29(10): 1223-31.
40. Haas R, Baron M, Dortbudak O, Watzek G. Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15(3): 374-82.
41. Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998; 9(3): 151-62.
42. Hammerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol* 2000 1998; 17: 151-75.
43. Hammerle CH, Jung RE, Feloutzis A. A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *J Clin Periodontol*. 2002; 29 Suppl 3: 226-31; discussion 232-3.
44. 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.
45. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol*. 1997; 68(12): 1186-93.
46. Hürzeler MB, Quinones CR, Schupbach P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a biosorbable barrier. An experimental study in the monkey. *Clin Oral Implant Res*. 1997; 28: 323-331.
47. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol*. 1991; 62(1): 2-4.

48. Jemt T, Chai J, Harnett J, Heath MR, Hutton JE, Johns RB *et al.* A 5-year prospective multicenter follow-up report on overdentures supported by osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11(3): 291-8.
49. 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.
50. Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscenced defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992; 7(2): 233-45.
51. Jovanovic AS. Diagnosis and treatment of peri-implant disease. *Curr Opin Periodontol.* 1994: 194-204.
52. Jovanovic SA, Schenk RK, Orsini M, Kenney EB. Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10(1): 23-31.
53. Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, Spiekermann H, Nishimura R, Wozney JM *et al.* Long-term functional loading of dental implants in rhBMP-2 induced bone. A histologic study in the canine ridge augmentation model. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14(6): 793-803.
54. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7(2): 96-105.
55. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent.* 1983; 49(6): 832-7.
56. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol.* 2000; 71(10): 1654-61.
57. 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(6): 858-64.
58. Keller JC, Draughn RA, Wightman JP, Dougherty WJ, Meletiou SD. Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990; 5(4): 360-7.
59. Kevy S, Jacobson M: Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel. Proceedings of the 27th Annual Meeting of Service Biomaterials, April 2001. In: Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62: 489-496.
60. Khang W, Feldman S, Hawley CE, Gunsolley J. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol.* 2001; 72(10): 1384-90
61. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert Tw, Cochran DI, Simpson DI, Dean Dd *et al.* Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG63 cells. *J Biomed Mat Res.* 1996; 32: 55-63.
62. 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.

63. Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. **J Oral Maxillofac Surg** 2002b; 60(9): 1018-25.
64. Kohal RJ, De LaRosa M, Patrick D, Hurzeler MB, Caffesse RG. Clinical and histologic evaluation of submerged and nonsubmerged hydroxyapatite-coated implants: a preliminary study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1999; 14(6): 824-34.
65. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K *et al*. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**. 1997; 30; 89(5): 755-64.
66. Koverver GB. Growth factors in clinical practice. **Int J Clin Pract** 2000; 54: 590-593.
67. 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.
68. Lazzara RJ, Testori T, Trisi P, Porter SS, Weinstein RL. A human histological analysis of osseotites and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. **Int J Periodontics and Restorative Dent** 1999 19: 117-129.
69. Leão MP. **Formação in vitro da rede de fibrina durante ativação do plasma rico em plaquetas com cloreto de cálcio a 10% em temperatura de 37°C**. 2002. 123p. Dissertação de Mestrado em Odontologia – opção Implantodontia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
70. Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation in Branemark *et al*. (Eds) Tissue integrated prosthesis: Osseointegration in clinical dentistry. Quintessence, 1985:199-109. Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Linden U, Bergstrom C, van Steenberghe D. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 10-year prospective multicenter study. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1999; 14(5): 639-45.
71. 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.
72. 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.
73. Lima LA, Fuchs-Wehrle AM, Lang NP, Hammerle CHF, Liberti E, Pompeu E *et al*. Surface characteristics of implants influence their bone integration after simultaneous placement of implant and GBR membrane. **Clin Oral Implant Res**. 2003; 14: 669-679.
74. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurstram K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol**. 1993; 64(11 Suppl): 1116-28.
75. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. **Clin Oral Implants Res**. 1996; 7(4): 329-36. Erratum in: **Clin Oral Implants Res**. 1997; 8(4): 342.

76. Lorenzoni M, Pertl C, Keil C, Wegscheider WA. Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(5): 639-46.
77. Lorenzoni M, Pertl C, Polansky RA, Jakse N, Wegscheider WA. Evaluation of implants placed with barrier membranes. A retrospective follow-up study up to five years. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13(3): 274-280.
78. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM *et al*. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*. 2003; 24(18): 3095-100.
79. 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*. 1991a; 62(7): 458-67.
80. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH *et al*. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991b; 62(11): 710-6.
81. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *J Periodontol*. 2001; 72(4): 512-6.
82. Marden L, Fan R, Pierce G, Reddi A, Hollinger J. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenic protein, in rat craniotomy defects. *J Clin Invest*. 1993; 92: 2897-2905.
83. Marinho VC, Celletti R, Bracchetti G, Petrone G, Minkin C, Piattelli A. Sandblasted and acid-etched dental implants: a histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18(1): 75-81.
84. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 638-646.
85. 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* 1999. Quintessence Publishing Co, Inc.
86. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001a; 10: 225-228.
87. Marx RE. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2001b; 59: 1119-1121.
88. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62: 489-496.
89. McCauley LK, Somerman MJ. Biologic modifiers in periodontal regeneration. *Dent Clin North Am*. 1998; 42(2): 361-87.
90. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976; 47(5): 256-60.
91. Mellonig JT, Nevins M. Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1995; 15(2): 168-85.

92. Mellonig JT, Nevins M, Sanchez R. Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and a bone replacement graft. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998; 18(2): 129-37.
93. Meredith N, Book K, Friberg B, Jemt T, Sennerby L. Resonance frequency measurements of implant stability in vivo. A cross-sectional and longitudinal study of resonance frequency measurements on implants in the edentulous and partially dentate maxilla. *Clin Oral Implants Res*. 1997; 8(3): 226-33.
94. Merickse-Stern R, Aerni D, Geering AH, Buser D. Long-term evaluation of non-submerged hollow cylinder implants. Clinical and radiographic results. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12(3): 252-9.
95. Morris HF, Ochi S, Crum P, Orenstein I, Plezia R. Bone density: its influence on implant stability after uncovering. *J Oral Implantol*. 2003, 29(6): 263-269.
96. Newman MG, Flemmig TF. Periodontal considerations of implants and implant associated microbiota. *J Dent Educ*. 1988; 52(12): 737-44.
97. Novaes AB Jr, Souza SL, de Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002; 17(3): 377-83.
98. Nowzari H, Slots J. Microbiologic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10(1): 67-73.
99. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*. 1980; 7(5): 394-401.
100. Ohnishi H, Fujii N, Futami T, Taguchi N, Kusakari H, Maeda T. A histochemical investigation of the bone formation process by guided bone regeneration in rat jaws. Effect of PTFE membrane application periods on newly formed bone. *J Periodontol*. 2000 Mar;71(3):341-52.
101. Ong JL, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Implant Dent*. 1996; 5(2): 83-8.
102. Palmer RM, Floyd PD, Palmer PJ, Smith BJ, Johansson CB, Albrektsson T. Healing of implant dehiscence defects with and without expanded polytetrafluoroethylene membranes: a controlled clinical and histological study. *Clin Oral Implants Res*. 1994; 5(2): 98-104.
103. Palmer RM, Smith BJ, Palmer PJ, Floyd PD, Johansson CB, Albrektsson T. Effect of loading on bone regenerated at implant dehiscence sites in humans. *Clin Oral Implants Res*. 1998; 9(5): 283-91.
104. Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ *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.
105. Roldán JC, Jepsen S, Schmidt 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: 716-23.
106. Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum EA, Barbieri D, Moreno HJ *et al*.

- Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. *J Periodontol*. 2004 Apr;75(4):565-71.
107. Schenk RH, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane protected defects: A histologic study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994; 9: 13–30.
 108. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000*. 1998; 17:22-35.
 109. 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): 505-11.
 110. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E *et al*. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2004; 25(23): 5387-93.
 111. Schliephake H, Kracht D. Vertical ridge augmentation using polylactic membranes in conjunction with immediate implants in periodontally compromised extraction sites: an experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997; 12(3): 325-34.
 112. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Jakob A. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clin Oral Impl Res*. 2000; 11: 230–241.
 113. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*. 2003; 82(5): 372-6.
 114. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*. 1981; 9(1): 15-25.
 115. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanics comparisons of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992; 7: 62-71.
 116. 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.
 117. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994; 14(2): 166-80.
 118. Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12(1): 35-45.
 119. Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrins selants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95: 521-528.
 120. Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti FH Jr. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around

- implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent.* 2000; 9(2): 126-31.
121. Stentz WC, Mealey BL, Gunsolley JC, Waldrop TC. Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. II. Histologic analysis. *J Periodontol.* 1997; 68(10): 933-49.
 122. Trisi P, Lazzara R, Rao W, Rebaudi A. Bone-implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseotite implant surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002; 22(6): 535-45.
 123. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150(698): 893-9.
 124. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971; 50(6): 1392-406.
 125. Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris AK *et al.* Osseointegration of Osseotites and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implant Res.* 2004; 15: 54-61.
 126. Weibrich G, Kleis WKG: Curasan PRP kit 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.
 127. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002b; 17(2):184-90.
 128. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34: 665- 671.
 129. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal model in periodontology. *J Clin Periodontol.* 1999, 26: 335-340.
 130. Weng D, Hoffmeyer M, Hürzeler MB, Richter E-J. The Osseotite vs. machined surface in poor bone quality. A study in dogs. *Clin Oral Implant Res.* 14, 2003; 703-708.
 131. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov; 55(11): 1294-9.
 132. Wikesjo UM, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM *et al.* Space-providing expanded polytetrafluoroethylene devices define alveolar augmentation at dental implants induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an absorbable collagen sponge carrier. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003; 5(2): 112-23.
 133. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implant Res.* 2004; 15: 589-597
 134. Zablotsky M, Meffert R, Caudill R, Evans G. Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehisced hydroxylapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991; 6(3): 294-303.
 135. Zarb GA, Schmitt A. The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: the Toronto study. Part I: Surgical results. *J Prosthet Dent* 1990; 63(4): 451-7.
 136. 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.

137. Zitzmann NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997; 12(6): 844-52.
138. Zitzman NU, Scharer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001; 16(3): 255-366.

ANEXOS



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 555-1 sobre "Efeito do Plasma Rico em Plaquetas associado ou não a membranas não reabsorvíveis no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares: Estudo Histomátrico em cães", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati 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 09 de Maio 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 555-1, entitled "Effect of the platelet-rich plasma associated or not non-resorbable membranes in the treatment of peri-implantar bone defects: 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 May 09, 2003.

Campinas, 09 de Maio de 2003.

Prof. Dra. Liana Verinaud
Presidente
CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária Executiva
CEEA/IB/UNICAMP