

CAROLINE CANTIERI DE MELLO

**Associação do Plasma Rico em
Plaquetas e células tronco-mesenquimais
na regeneração óssea. Uma revisão de
literatura.**

ARAÇATUBA - SP

2011

CAROLINE CANTIERI DE MELLO

**Associação do Plasma Rico em Plaquetas e células tronco-
mesenquimais na regeneração óssea. Uma revisão de
literatura.**

**Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Graduação
em Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”.**

**Orientadora: Prof^a Adjunto Maria José Hitomi
Nagata**

ARAÇATUBA - SP

2011

Agradecimientos

Agradeço em primeiro lugar a Deus e aos meus pais e meu irmão, por estarem comigo desde o princípio, me apoiando e me dando todo o suporte necessário para seguir em frente. Agradeço à Professora Maria José Hitomi Nagata por ter se disponibilizado a me orientar neste trabalho e as pós-graduandas Natália Marcumini Pola, Carolina dos Santos Santinoni e Natália Campos, que me ajudaram no que foi necessário para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

Muito Obrigada a todos,

Resumo

Mello, CC. **Associação do Plasma Rico em Plaquetas e células tronco-mesenquimais na regeneração óssea. Uma revisão de literatura.** Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Resumo

A cicatrização tecidual é um processo complexo e crescente que envolve muitos tipos celulares e fatores de crescimento (FCs). As plaquetas possuem um papel importante não somente na hemostasia mas também na regeneração de tecidos danificados. São uma fonte segura, de baixo custo e facilmente acessível de FCs. O Plasma rico em Plaquetas (PRP) tem sido utilizado como fonte de FCs e arcabouço na regeneração óssea. É um composto autógeno, seguro, livre de riscos relativos à transmissão de doenças ou desenvolvimento de reações antigênicas. A racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no aumento dos níveis de FCs no sítio da ferida após a degranulação plaquetária. Devido à concentração e liberação aumentada desses FCs, o PRP pode potencialmente aumentar o recrutamento e a proliferação de células-tronco e células endoteliais. No ramo da engenharia tecidual, a terapia com células-tronco mesenquimais (CTMs) tem sido bastante explorada em diversos estudos. As CTMs são células multipotentes que possuem capacidade de replicação em células indiferenciadas e podem diferenciar-se em linhagens de tecidos mesenquimais, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendões, músculos e estroma medular. Alguns estudos *in vitro* demonstraram a influência do PRP sobre as CTMs. Lucarelli et al. (2003) avaliaram os efeitos do PRP sobre CTMs de origem humana e observaram um aumento significativo no número dessas células no terceiro, sexto e nono dia do experimento quando estas foram cultivadas com 10% de PRP. Uma vantagem potencial da associação CTMs-PRP é que ela é simultaneamente osteogênica, osteocondutiva e osteoindutiva, devido à capacidade de formação óssea das CTMs e à presença dos FCs secretados pelas plaquetas em um arcabouço

tridimensional de fibrina. Além disso, esta associação CTMs-PRP é autógena, não-tóxica e possui ótima plasticidade. O objetivo deste estudo foi revisar as evidências atuais que sustentam o uso da associação CTMs-PRP para a potencialização da regeneração óssea, bem como discutir a racionalidade biológica para a associação de ambos nos procedimentos regenerativos.

Palavras-chave: Regeneração óssea; plaquetas; células-tronco.

Abstract

Mello, CC. Association of Platelet-Rich Plasma and mesenchymal stem cells on bone regeneration. A literature review. Trabalho de Conclusão de Curso – Dental School of Araçatuba, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Abstract

The wound healing is a complex and growing area that deals with many cell types and growth factors (GFs). Platelets play important roles not only in hemostasis but also in regenerating damaged tissue. Platelets are an easily accessible, inexpensive, and safe source of GFs. The Platelet-rich Plasma (PRP) has been used as a source of GFs and as a scaffold in bone regeneration. It is autologous, inherently safe and free from transmissible diseases or antigenic reactions development. The rationale for the local use of PRP is the increased levels of GFs in the wound site after platelet degranulation. Due to the increased concentration and release of GFs, PRP can potentially enhance the recruitment and proliferation of stem cells, and endothelial cells. In the field of tissue engineering, therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) has been widely investigated in several studies. MSCs are multipotent cells that can replicate as undifferentiated cells and that have the potential to differentiate into lineages of mesenchymal tissues, including bone, cartilage, fat, tendon, muscle, and marrow stroma. Some *in vitro* studies have demonstrated the influence of PRP on MSCs. Lucarelli et al. (2003) evaluated the effects of PRP on human MSCs and observed a significant increase in the number of these cells in the third, sixth and ninth days of the experiment when they were treated with 10% PRP. One potential advantage of this MSCs–PRP mixture is that it is simultaneously osteogenic, osteoconductive and osteoinductive due to the bone forming capacity of MSCs and the presence of secreted GFs in the three-dimensional fibrin scaffold. Additionally, this MSCs–PRP mixture is autologous, non-toxic and exhibits excellent plasticity. The aim of this study was to review current evidence supporting the use of the

MSCs-PRP association for the enhancement of bone regeneration, as well as to discuss the biological rationale for this association of treatments for regenerative procedures.

Key-words: Bone regeneration; platelets, stem cells.

SUMÁRIO

1	Introdução	9
2	Revisão de Literatura	12
2.1.	Plasma Rico em Plaquetas	12
2.1.1.	A Evolução	12
2.1.2.	A Técnica	15
2.1.3.	As Controvérsias	21
2.2.	Células-Tronco	29
2.3.	Associação PRP/CTMs	34
3	Referências	37

1. Introdução

Recentes avanços na área da bioengenharia têm trazido um grande impacto na restauração e reabilitação de estruturas teciduais perdidas do corpo humano (ATALA, 2004; CHOUMERIANOU et al. 2008). O campo da medicina regenerativa engloba diversas áreas da tecnologia, tais como engenharia de tecidos, células-tronco e clonagem. A engenharia de tecidos, um dos principais componentes da medicina regenerativa, segue os princípios do transplante de células, ciência de materiais e engenharia para o desenvolvimento de substitutos biológicos que podem restaurar e manter a função normal de tecidos (ATALA, 2004). Está consolidada na utilização de células, arcabouços biocompatíveis e fatores de crescimento (FCs) (KASTEN, 2008).

O osso, sendo resistente e rígido, representa o principal elemento de sustentação do corpo. O tecido altamente mineralizado que o constitui exibe, além das suas propriedades mecânicas, uma alta capacidade de regeneração espontânea (VIKJAER et al., 1997). Assim, fraturas ou defeitos ósseos são curados com a produção de novo tecido ósseo com a mesma alta organização estrutural do tecido original. No entanto, esta capacidade regenerativa é limitada pelo tamanho da lesão. Defeitos ósseos extensos provocados por traumas, infecções, neoplasias e anomalias de desenvolvimento não se regeneram espontaneamente, representando um problema atual na medicina e odontologia (ASCENCIO et al., 2004).

Em 1998, Marx et al. propuseram o uso local do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) para acelerar a maturação de enxertos ósseos autógenos. Segundo estes autores, os enxertos ósseos autógenos com PRP repararam mais rapidamente e apresentaram maior densidade óssea que os enxertos sem PRP. A racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no aumento do nível de FCs no sítio da ferida após a degranulação das plaquetas.

Os FCs representam uma classe de mediadores biológicos que possuem um papel essencial no processo de cicatrização e formação de tecidos. Todos os estágios do processo de

reparo são controlados por uma grande variedade de citocinas e FCs que agem localmente como reguladores das mais básicas funções celulares. Os FCs influenciam muitos dos processos comuns, tanto à cicatrização tecidual como à doença, incluindo a angiogênese, quimiotaxia, proliferação celular, síntese e degradação das proteínas da matriz extracelular (ANITUA et al., 2006).

Entre os FCs presentes no PRP, destacam-se o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF) e o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) (WHITMAN et al. 1997; MARX et al. 1998). Estudos *in vivo* e *in vitro* da ação isolada destes fatores concluíram que os mesmos são potenciais agentes terapêuticos para acelerar o reparo de defeitos ósseos (LYNCH et al. 1987; NASCH et al. 1992; CASSIEDE et al. 1996; DUCY et al. 2000).

Além do PRP, a terapia envolvendo células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea tem sido avaliada, em vários estudos, em associação com enxertos ósseos e biomateriais, com o objetivo de obter-se um reparo mais rápido e com maior densidade óssea (FREITAS, et al. 2001; FRECHETTE, et al. 2005). As CTMs são células multipotentes que possuem capacidade de replicação em células indiferenciadas e podem diferenciar-se em linhagens de tecidos mesenquimais, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendões, músculos e estroma medular (FREYMILLER. & AGHALOO. 2004; FROUM. et al. 2002). Elas podem ser obtidas de muitos tecidos tais como medula óssea (FUERST. et al. 2004a); polpa dental (FURST. et al 2003; GARCIA. et al. 2009), tecido adiposo (GOLDJESTANI, et al. 1994; GRAGEDA, 2004) e cordão umbilical (GRAGEDA, et al. 2005), entre outros. Essas células são capazes de fazer cópias idênticas delas mesmas durante toda a vida do organismo. Esta propriedade é referida como “auto-renovação” (KIRSCHSTEIN, 2001).

O interesse na aplicação clínica das CTMs tem aumentado, com as recentes descobertas mostrando que as CTMs podem melhorar a integração do enxerto ósseo alógeno (LUCARELLI et al. 2003; DE KOK et al. 2005; DALLARI et al. 2006). Estudos *in vitro* têm

sido realizados para avaliar o comportamento celular do cultivo de CTMs durante o reparo ósseo.

O potencial regenerativo das CTMs tem sido avaliado em diferentes sistemas de expansão celular (GUYTON, & HALL 2002; GUZZARDELLA, et al. 2002), no processo de adesão a ligas de titânio (HALL, et al. 1994) e na associação a diferentes substitutos ósseos (HARRIS, et al. 2003; ISHIKAWA, et al. 2009).

Pesquisas têm revelado que o papel das plaquetas no processo regenerativo é muito mais do que simplesmente promover a formação do coágulo sanguíneo, pois elas são responsáveis por liberar FCs ativamente, os quais iniciam a cicatrização dos tecidos moles, a formação óssea e o recrutamento de células-tronco (MEHTA & WATSON, 2008). Os FCs liberados pelas plaquetas são fortes indutores angiogênicos e são conhecidos por serem mitogênicos para as CTMs *in vitro*. Contudo, a sua capacidade para melhorar a osteogenicidade das CTMs *in vivo* ainda não foi bem explorada. Estudos recentes têm sugerido efeitos sinérgicos positivos da mistura de CTMs e PRP no aumento da formação óssea em regiões orais e maxilofaciais (PIERI et al., 2009).

Uma vantagem potencial da associação CTMs-PRP é que ela é simultaneamente osteogênica, osteocondutiva e osteoindutiva, devido à capacidade de formação óssea das CTMs e à presença dos FCs secretados pelas plaquetas em um arcabouço tridimensional de fibrina. Além disso, esta associação CTMs-PRP é autógena, não-tóxica e possui ótima plasticidade. O objetivo deste estudo foi revisar as evidências atuais que sustentam o uso da associação CTMs-PRP para a potencialização da regeneração óssea, bem como discutir a racionalidade biológica para a associação de ambos nos procedimentos regenerativos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Plasma Rico em Plaquetas

A Evolução

Diante de uma injúria traumática ou cirúrgica onde ocorre dano vascular, manifesta-se um dos mais complexos mecanismos a favor da vida: a hemostasia. Três grupos de fenômenos fisiológicos compõem este evento: histovascular, plasmáticos e trombodinâmicos (VANDER et al., 1981; BERNE; LEVY, 2000; GUYTON; HALL, 2002; SANTOS; SANTOS, 2004).

A destruição da rede vascular é seguida de vasoconstrição reflexa. Assim, há diminuição da velocidade do fluxo do sangue e conseqüente aumento de sua viscosidade, que permitirá a concentração de leucócitos, hemácias e, principalmente, plaquetas no ambiente da lesão. Com a exposição do subendotélio e dos tecidos adjacentes, as plaquetas exercem sua primeira função: adesividade. Elas aderem a qualquer superfície diferente do endotélio vascular íntegro. A seguir, exercem sua segunda função: agregabilidade, ou seja, a capacidade de aderir a outras plaquetas e, assim, formar o trombo plaquetário ou trombo branco (BERNE; LEVY, 2000).

Em seguida, as plaquetas, contidas dispersamente no coágulo formado, sofrem uma transformação metabólica denominada metamorfose viscosa. São emitidos pseudópodes que, em sua extensão máxima, encontram outros com os quais se aderem, formando uma rede celular plaquetária. Nesse momento, há produção de uma proteína (tromboastenina) que, liberando energia, promove a retração dos pseudópodes e do coágulo. Essa retração expulsa o plasma que permeia o trombo, tornando-o mais firme, mais obliterante, mais tamponante e eficaz (VANDER et al., 1981).

Começam, então, neste ambiente delimitado pelo coágulo sangüíneo, todos os processos biológicos de regeneração ou reparação tecidual através da liberação de fatores de crescimento (FCs) contidos nas plaquetas (GUYTON; HALL, 2002). Plaquetas são reservatórios naturais de FCs, que são proteínas que servem como agentes sinalizadores para as células. Três tipos de ações são possíveis: (1) a autócrina, (2) a parácrina, (3) a endócrina. Portanto, um FC pode ter efeito em múltiplos tipos de células, induzindo uma infinidade de funções celulares em vários tecidos (LIEBERMAN et al., 2002).

Basicamente, para que o processo de regeneração tecidual ocorra, é necessária a consolidação de uma tríade composta por três pilares: um arcabouço, moléculas sinalizadoras e células especializadas (UEDA, 2001). O coágulo sangüíneo parece estar estruturado sobre estes três pilares, sendo, na verdade, o palco perfeito para que o espetáculo regenerativo possa ocorrer.

Assim, há uma constante busca por sistemas apropriados que permitam ao cirurgião-dentista ou médico utilizar os FCs aplicando técnicas bem sucedidas da engenharia tecidual, com menor custo e morbidade. Uma das estratégias propostas é acelerar e otimizar os efeitos dos FCs contidos nas plaquetas (YAZAWA et al., 2004b).

Alguns FCs foram identificados durante diferentes fases de reparo de fraturas ósseas experimentais. Avaliando-se esses FCs, pôde-se concluir que eles são potenciais agentes terapêuticos para acelerar o reparo de defeitos ósseos. Dentre estes fatores, o PDGF e o TGF- β são liberados, principalmente, pelos grânulos α plaquetários (LIEBERMAN et al., 2002).

Estudos em culturas de células mostraram um importante papel do PDGF no processo de regeneração tecidual. Dentre suas habilidades, são contundentes a capacidade de estimular a quimiotaxia, promover a ativação celular e aumentar a proliferação de fibroblastos e osteoblastos (LYNCH et al., 1987; MATSUDA et al., 1992). A administração de PDGF exógeno permitiu o reparo ósseo de fraturas em tibia (NASH et al., 1994) e defeitos de

tamanho crítico (DTC) em calvária de coelhos (VIKJAER et al., 1997). Algumas evidências sugerem, também, que o PDGF pode aumentar o reparo e a regeneração periodontal (PARK et al., 1995).

O papel de TGF- β no reparo ósseo foi estudado nos modelos experimentais que envolvem injeções subperiosteais em fêmur (JOYCE et al., 1990) e calvária (NODA; CAMILLIERE, 1989) de ratos, DTC em tíbias de coelhos (LIND et al., 1993) e dispositivos protéticos para crescimento ósseo em cães (SUMNER et al., 1995). A mais importante função do TGF- β parece ser a promoção da quimiotaxia de precursores de osteoblastos e o controle da diferenciação de osteoblastos *in vivo* (DUCY et al., 2000). TGF- β também aumenta a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas *in vitro* e induz a formação óssea a partir destas células *in vivo* (CASSIEDE et al., 1996).

Whitman et al. (1997), buscando a excelência da regeneração e observando as propriedades do coágulo natural, propuseram, então, o uso de uma cola de fibrina autógena associada a FCs, o denominado Plasma Rico em Plaquetas (PRP). O PRP é usado como uma tentativa de enriquecer o coágulo natural. Enquanto este último contém 95% de células vermelhas, 4% de plaquetas e 1% de células brancas, o PRP possui 4% de células vermelhas, 95% de plaquetas e 1% de células brancas (DINATO et al., 2001). A alta concentração de plaquetas e, conseqüentemente, de FCs, consolidam o segundo dos três pilares essenciais para a regeneração dos tecidos, ou seja, a presença de moléculas sinalizadoras.

Os FCs presentes no PRP incluem os três isômeros do Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB), dois dos numerosos Fatores de Crescimento Transformadores- β (TGF- β 1 e TGF- β 2), o Fator de Crescimento Endotelial Vascular e o Fator de Crescimento Epitelial (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998). Além destas substâncias, o PRP contém fibrina, fibronectina e vitronectina. Estas proteínas são capazes de favorecer a adesão celular e atuam como uma matriz para a formação de osso,

tecido conjuntivo e epitélio (MARX, 2004). A presença de leucócitos em sua constituição também lhe confere uma resistência natural aos processos infecciosos e/ou alérgicos (MARX; GARG, 1999).

Os reais benefícios do PRP no reparo ósseo foram melhor evidenciados somente com o trabalho de Marx et al. (1998). Estes autores estudaram, em 88 pacientes, a combinação de PRP e enxertos ósseos medulares no tratamento de defeitos mandibulares contínuos, com 5 a 6 cm, resultantes da remoção de tumores benignos e malignos. Os resultados deste estudo mostraram maturação mais rápida dos enxertos com PRP (1,16 a 2,16 vezes), bem como uma maior densidade óssea dos mesmos quando comparados aos enxertos sem PRP. A contagem de plaquetas de todas as amostras de sangue mostrou um aumento de 338% de plaquetas no PRP em relação ao sangue periférico dos pacientes. Com a utilização de anticorpos monoclonais, foi possível identificar fatores de crescimento presentes no PRP, especificamente PDGF e TGF- β , como também a presença de receptores para estes fatores na células dos enxertos. Segundo Marx (2001), o PRP é um composto autógeno, seguro, livre de riscos relativos à transmissão de doenças ou desenvolvimento de reações antigênicas. Sua ação é marcada pelo aumento (mitogênese) de células responsáveis pela regeneração dos tecidos perdidos e pelo estímulo do crescimento vascular (angiogênese).

A Técnica

A partir dos promissores resultados do estudo de Marx et al. (1998), o PRP destacou-se, no campo odontológico, como um agente capaz de potencializar os caminhos naturais da regeneração tecidual de forma segura e barata. O interesse inicial concentrou-se, então, nas formas de produção deste composto.

A técnica de obtenção do PRP, segundo Whitman et al. (1997), envolve a coleta pré-operatória imediata de sangue total do paciente, aproximadamente 450 ml, diretamente para

uma bolsa de coleta contendo o anticoagulante citrato-fosfato-dextrose. O sangue é, inicialmente, centrifugado (Elmd-500 Autotransfusion system, Medtronic Electromedic, Parker, CO, USA) à 5600 rpm para separar o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) dos eritrócitos e do “buffy coat”, que contém plaquetas e leucócitos. A velocidade da centrífuga é então reduzida para 2400 rpm, a fim de permitir uma separação adicional do “buffy coat”, suspenso em 30 ml de plasma, da camada de células vermelhas. Quantidades de plaquetas no PRP em torno de 500.000 a 1.000.000 são rotineiramente obtidas com esta técnica.

O PRP é armazenado até que o cirurgião esteja pronto para seu uso. Uma vez preparado o leito cirúrgico, o PRP é misturado com trombina bovina (10.000 unidades) dissolvida em 10 ml de cloreto de cálcio a 10%. Dentro de 5 a 30 segundos, o conteúdo assume a consistência de um gel, o que facilita a sua aplicação (WHITMAN et al., 1997).

Segundo Whitman et al. (1997) e Marx et al. (1998), o PRP é obtido através do método de separação celular descontínua e o volume de sangue utilizado é de aproximadamente 450 ml. Entretanto, este protocolo é limitado pela tecnologia empregada e pelo volume de sangue necessário, ficando restrito a institutos de transfusão de sangue ou ambiente hospitalar (TOZUM; DEMIRALP, 2003).

Assim, a produção do PRP em pequenas quantidades, usando-se centrífugas de bancada controladas eletronicamente, tornou-se uma técnica mais atrativa em função do baixo custo de produção envolvido e da possibilidade de execução em ambiente ambulatorial e consultórios dentários (WEIBRICH et al., 2003).

Surgiram, portanto, diversos protocolos simplificados para produção do PRP (ANITUA, 1999, LANDESBURG et al. 2000, SONNLEITNER et al. 2000). Diferentes velocidades e tempos de centrifugação do sangue foram testados e recomendados. Em ambulatório, o PRP pode ser obtido através do protocolo proposto por Sonnleitner et al. (2000). De acordo com estes autores, o sangue deve ser colhido através de punção venosa e

acondicionado em tubos a vácuo contendo citrato de sódio como anticoagulante. Os tubos são primeiramente centrifugados a 160 G por 20 minutos, resultando na divisão do sangue em três componentes básicos, conforme o protocolo de Anitua (1999). Para maximizar a concentração de plaquetas, os autores enfatizaram a necessidade de marcar-se um ponto, localizado de 6 a 8 mm aquém da linha que separa o plasma das células vermelhas do sangue. Todo líquido acima deste ponto deve ser pipetado e acondicionado em outro tubo, sem anticoagulante, para uma segunda centrifugação a 400 G por 15 minutos. Após esta segunda centrifugação, obtém-se o PRP.

O PRP atua acelerando o processo de regeneração tecidual através da degranulação dos grânulos α das plaquetas, os quais contêm FCs. A secreção ativa destes fatores é iniciada 10 minutos após a formação do coágulo sangüíneo e mais de 95% deles são secretados na primeira hora após a coagulação do sangue (MARX, 2004). Percebe-se, portanto, que alterações na quantidade de plaquetas podem resultar em maiores ou menores concentrações de FCs que modularão diretamente a reconstrução dos tecidos perdidos (FREYMILLER; AGHALOO, 2004).

Dentro dos grânulos α plaquetários, os FCs permanecem em um estado incompleto. Assim que o processo de coagulação é ativado, os FCs são secretados através da membrana celular. Neste processo, os grânulos α fundem-se com a membrana plaquetária, através da qual os FCs protéicos são completados, mudando para um estado bioativo pela adição de carboidratos. Portanto, qualquer dano às plaquetas durante o processamento do PRP fará com que as mesmas secretem FCs que não se encontram em um estado bioativo, o que pode resultar em efeitos clínicos desapontadores (MARX, 2004).

Como visto, alterações qualitativas e/ou quantitativas nas plaquetas podem afetar diretamente o poder regenerativo do PRP. Em relação à quantidade de plaquetas, Liu et al. (2002) mostraram que a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno tipo I foram

aceleradas dependendo da quantidade de plaquetas utilizada nos meios de cultura. Marx (2004) define, então, como um “PRP terapêutico” aquele que possui aproximadamente 1.000.000 de plaquetas/ μ l, considerando que os seres humanos apresentam cerca de 200.000 ± 75.000 plaquetas/ μ l no sangue periférico. Estudos em animais demonstraram, também, que esta concentração de plaquetas no PRP é capaz de acelerar o reparo ósseo em cães (KIM et al., 2002a), coelhos (WEIBRICH et al., 2004) e ratos (MESSORA et al., 2008a, MESSORA et al. 2008b, NAGATA et al. 2009, NAGATA et al. 2010).

É preciso ressaltar que as forças mecânicas usadas no preparo do PRP podem, também, ativar precocemente as plaquetas, levando à liberação dos FCs e, conseqüentemente, perda dos mesmos no plasma sobrenadante durante o processo de centrifugação, comprometendo a eficiência terapêutica do PRP (DUGRILLON et al., 2002; NIKOLIDAKIS & JANSEN, 2008).

A eficiência do PRP depende, indubitavelmente, do nível de FCs presentes. Assim, a determinação dos níveis destes fatores é fundamental para assegurar a validade terapêutica do PRP antes de qualquer aplicação clínica (WEIBRICH et al., 2002a). Entretanto, o alto custo dos testes envolvidos e o tempo necessário para este tipo de análise são fatores que dificultam o uso clínico rotineiro destes testes (DUGRILLON et al., 2002).

A quantidade exata de FCs necessária para um relevante efeito biológico ainda não foi determinada (WEIBRICH et al., 2003). Os números considerados satisfatórios são baseados em estudos *in vitro* ou aplicações de fatores isolados em modelos animais (MUSTOE et al., 1987; PIERCE et al., 1989; BECK et al., 1991). Estes modelos, porém, não representam o que de fato ocorre no PRP, ou seja, múltiplos fatores agindo simultaneamente, com efeitos sinérgicos uns sobre os outros.

Além do modelo de centrífuga, da velocidade de centrifugação, da quantidade de plaquetas e dos níveis dos FCs, outro fator extremamente importante no processamento do

PRP é o anticoagulante selecionado para a coleta do sangue. Algumas dessas substâncias podem danificar as plaquetas (LANDESBURG et al., 2000).

Entre os anticoagulantes usados para a coleta do sangue, o Ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 15% promove níveis mais altos de plaquetas durante o preparo do PRP quando comparado ao citrato de sódio. Esta é a conclusão do estudo de Landesberg et al. (2000), mas é preciso considerar que, nas amostras de EDTA, a microscopia de luz revelou plaquetas com superfícies alteradas e consideráveis restos não-celulares suspensos. Segundo os autores, embora o citrato de sódio tenha proporcionado menor rendimento plaquetário, as amostras de PRP com este anticoagulante apresentavam plaquetas íntegras e em quantidades suficientes para a formação de um bom coágulo.

O citrato de sódio inibe o processo de coagulação do sangue ligando-se aos íons de cálcio e formando um composto químico chamado quelato. Este anticoagulante não altera a membrana das plaquetas, permitindo que o estado anticoagulado da amostra possa ser revertido para um estado coagulado pela adição de uma solução de cloreto de cálcio (ANITUA, 1999). Além disso, a ativação das plaquetas durante os procedimentos de coleta do sangue com citrato de sódio é menor quando comparada com as amostras coletadas com EDTA (EFEOGLU et al., 2004).

A estocagem do sangue centrifugado ou não, até seu uso clínico é outro fator importante, pois se armazenado em baixas temperaturas, podem ocorrer alterações na contagem de plaquetas (OLSEN et al., 2001). Estas alterações são ainda mais acentuadas se a coleta de sangue foi realizada no trans-operatório ou se houve demora na separação do PPP e PRP após a centrifugação (MARX, 2001).

No momento da aplicação clínica do PRP, é necessário que a amostra anticoagulada passe para um estado coagulado. A obtenção desse coágulo é importante para que ocorra a liberação dos FCs dos grânulos α plaquetários e formação de uma rede de fibrina, mecanismos

pelos quais o PRP agirá na regeneração dos tecidos perdidos (MARX et al., 1998, 2001, 2004). Assim como na coleta de sangue, a substância utilizada neste processo de coagulação da amostra não deve danificar ou promover a lise das plaquetas, mas apenas iniciar uma atividade biológica.

Diversos agentes podem ser usados para promover a coagulação do PRP, como a trombina bovina, solução de cloreto de cálcio, agente ITA[®] e, mais recentemente, o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) e trombina humana (MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; LANDESBURG et al., 2000; LANDESBURG et al., 2005; DE SOMER et al., 2005).

Estudos realizados em humanos, utilizando PRP ativado com cloreto de cálcio, mostraram resultados favoráveis. Anitua (1999) relatou a produção do coágulo de PRP unicamente a partir de solução de cloreto de cálcio a 10%, na proporção de 50 µl para 1,2 ml de PRP. Segundo este autor, a não utilização de qualquer componente homogêneo no preparo do PRP preservaria uma de suas principais vantagens, ou seja, sua natureza autógena. A ativação do PRP apenas com cloreto de cálcio foi também facilmente obtida nos estudos de Dugrillon et al. (2002). Messoria et al. (2008a) avaliaram, em modelo animal, o uso do PRP ativado somente com cloreto de cálcio na regeneração óssea, comparando-o com o uso de PRP ativado com trombina bovina. Os resultados foram positivos na regeneração óssea, sendo que aqueles obtidos com o uso de PRP ativado com cloreto de cálcio foram significativamente melhores que aqueles obtidos com o uso de PRP ativado com trombina bovina.

Em relação à retração do coágulo deve-se salientar que uma menor retração evitará a rápida liberação dos FCs presentes nas plaquetas, fazendo com que a biodisponibilidade destes polipeptídeos seja prolongada, evitando a perda dos mesmos no interstício tecidual. Além disso, ajudará a manter o enxerto ósseo dentro dos limites do defeito ósseo (LANDESBURG et al., 2005; TSAY et al., 2005).

Na verdade, muitos dos estudos avaliando técnicas de obtenção do PRP foram desenvolvidos com o objetivo de tentar elucidar a controvérsia de resultados observada nos trabalhos que analisaram o efeito biológico do PRP. À luz desses conhecimentos, o clínico pode, atualmente, observar de forma crítica os estudos disponíveis na literatura. Todo estudo deveria, fundamentalmente, envolver a produção de um PRP de qualidade para então avaliar os efeitos biológicos produzidos por ele (MARX, 2004). Neste contexto, a aplicação clínica controlada de um determinado protocolo de produção do PRP ou o estudo deste em modelos animais é de fundamental importância para que se possa, concretamente, mensurar e compreender os seus verdadeiros benefícios biológicos no processo de regeneração tecidual (WEIBRICH et al., 2005).

As Controvérsias

Pesquisadores no campo da cirurgia buco-maxilo-facial buscam, continuamente, melhorar as técnicas de enxerto ósseo, bem como tentam encontrar meios para obter-se uma regeneração dos defeitos existentes com maior densidade óssea e no menor tempo possível (RAGHOEBAR et al., 2005). Foi prometendo estes benefícios, demonstrados no estudo de Marx et al. (1998), que o PRP despontou no campo odontológico como uma nova estratégia regenerativa para acelerar a maturação de enxertos autógenos (BUTTERFIELD et al. 2005).

De acordo com Karring et al. (1999), os vários enxertos e materiais utilizados para o tratamento de defeitos ósseos podem ser divididos em 4 categorias: enxertos autógenos, aloenxertos, heteroenxertos ou xenoenxertos e materiais aloplásticos. O uso desses enxertos e materiais aloplásticos favorecem o reparo ósseo, pois podem conter células formadoras de osso (osteogênese), servir como suporte para a formação óssea (osteocondução) ou possuir substâncias indutoras da formação óssea (osteoindução). Sob o ponto de vista da aceitação biológica, o melhor material de enxerto ou transplante é o autógeno, sendo aquele que

apresenta o melhor prognóstico. Por isso e, também, devido ao seu potencial osteogênico, é considerado o “padrão ouro” nos procedimentos regenerativos (KIM et al., 2002a, 2002b; SCHLEGEL et al., 2004; WILTFANG et al., 2004; YAMADA et al., 2004; THORWARTH et al., 2005).

A possibilidade de aumentar o potencial osteogênico destes enxertos com a adição do PRP foi demonstrada de maneira promissora por Marx et al. (1998) na reconstrução de defeitos mandibulares contínuos. Estes benefícios foram confirmados por Oyama et al. (2004) ao mostrarem potencialização do reparo ósseo quando enxertos ósseos autógenos com PRP foram utilizados no tratamento de pacientes com fissuras labiais e palatais. Mazor et al. (2004) relataram redução no período de maturação óssea, melhor manuseio do enxerto e recuperação mais rápida dos tecidos moles quando o PRP foi utilizado juntamente com enxertos ósseos autógenos e implantes osseointegráveis na reabilitação posterior de maxila severamente atrófica de 105 pacientes.

Apesar dos bons resultados clínicos dos estudos citados anteriormente (OYAMA et al., 2004; MAZOR et al., 2004; ROBIONY et al., 2002), a ausência de grupos controle não permitiu uma análise comparativa para avaliação apropriada dos verdadeiros benefícios do PRP. Seguindo este raciocínio, Raghoobar et al. (2005) propuseram-se a avaliar os efeitos do PRP na formação óssea em levantamento bilateral de seio maxilar, onde um dos lados poderia funcionar como controle no mesmo indivíduo. Os autores estudaram o efeito do PRP na remodelação de enxertos ósseos autógenos utilizados para levantamento bilateral de assoalho de seio maxilar de 5 pacientes. Apenas em um dos lados os enxertos foram associados com PRP. As análises radiográfica e histométrica deste estudo não confirmaram os resultados de Marx et al. (1998), pois nenhum benefício adicional do uso do PRP foi observado. Entretanto, os autores utilizaram defeitos ósseos de tamanho não-crítico (defeitos ósseos que têm

capacidade espontânea de reparo) e afirmaram que, em DTC, como nas reconstruções do estudo de Marx et al. (1998), o PRP poderia ter algum valor terapêutico.

Outros estudos em modelos animais que utilizaram defeitos ósseos não-críticos não mostraram benefícios significativos advindos do uso do PRP associado ao osso autógeno. Jakse et al. (2003) realizaram a elevação do seio maxilar de ovelhas com osso autógeno com ou sem PRP e concluíram que a capacidade regenerativa do PRP aos 6 e 12 meses pós-operatórios foi de baixa potência. Estas conclusões foram corroboradas por Butterfield et al. (2005) que também não mostraram nenhum efeito estimulante direto do PRP na remodelação de enxertos de osso autógeno em levantamentos de seios maxilares de coelhos.

Tentando reproduzir, então, defeitos de natureza crítica, semelhantes àqueles reportados por Marx et al. (1998), Fennis et al. (2002) realizaram um estudo radiográfico em cabras, no qual um total de 28 animais foram submetidos à ressecção do ângulo da mandíbula e divididos em dois grupos, tratados com enxertos obtidos da crista ilíaca associados ou não ao PRP. O grupo com PRP mostrou-se significativamente melhor, com maior obliteração dos “gaps” ósseos localizados anterior e posteriormente ao defeito após 6 e 12 semanas, maior formação de calo ósseo em 6 semanas e ausência de reabsorção interna em 12 semanas pós-operatórias. Os achados histomorfométricos do estudo de Fennis et al. (2004) foram publicados 3 anos depois e confirmaram as informações obtidas através da análise radiográfica. A encapsulação fibrosa dos enxertos foi vista mais frequentemente no grupo não tratado com PRP. Já o grupo tratado com PRP apresentou maior crescimento vascular e preenchimento ósseo do defeito.

Também utilizando defeitos de tamanho crítico, Schlegel et al. (2004) investigaram a capacidade do PRP, com duas diferentes concentrações plaquetárias, de acelerar a formação óssea quando combinado com enxertos ósseos autógenos ou materiais aloplásticos em calvárias de porcos. As análises micro-radiográfica e histológica dos defeitos mostraram que o

PRP alterou significativamente a cronologia de formação óssea no grupo do osso autógeno, acelerando a maturação desses enxertos de maneira diretamente proporcional à concentração de plaquetas. Contudo, os achados de Schlegel et al. (2004) não foram confirmados por Choi et al. (2004) em defeitos contínuos, de natureza crítica, criados cirurgicamente em mandíbula de cães. A análise histológica deste estudo não mostrou nenhum benefício do PRP na formação óssea e a microscopia de fluorescência evidenciou um atraso no processo de remodelação dos enxertos ósseos autógenos com PRP. A análise histométrica confirmou estas observações, mostrando baixos percentuais de formação óssea nos defeitos do grupo tratado com PRP (36,8%) quando comparados com o grupo do osso autógeno sozinho (56,7%).

Uma possível explicação para as controvérsias nos resultados obtidos nos estudos apresentados é o tipo de enxerto autógeno utilizado, que pode ser resultante de ossificação intramembranosa (CHOI et al., 2004; SCHLEGEL et al., 2004) ou endocondral (MARX, 1998; FENNIS et al., 2004), bem como o método de obtenção do PRP. Em relação a este último, no estudo de Schlegel et al. (2004) o PRP foi preparado através de métodos cujas eficiências foram reconhecidamente comprovadas em outros trabalhos. Além disso, o valor terapêutico das amostras foi garantido com a determinação da concentração de plaquetas e dos níveis de FCs presentes. Contrariamente, Choi et al. (2004), apesar de realizarem a contagem de plaquetas do PRP, não avaliaram os níveis de FCs e modificaram o método de Whitman et al. (1997) para o preparo do PRP.

Tentando compreender o resultado negativo do uso do PRP associado ao osso autógeno em seu estudo realizado em cães, Choi et al. (2005) investigaram os efeitos de variadas concentrações de PRP sobre osteoblastos *in vitro*. Observaram que altas concentrações de PRP podem suprimir o crescimento celular, sendo as amostras com mais de 30% de PRP consideradas citotóxicas. Os autores constataram, também, que a relação entre o volume de PRP e a quantidade de enxerto ósseo é capaz de influenciar os resultados dos

procedimentos regeneradores. Nagata et al. (2009) realizaram, então, um estudo imunoistoquímico para avaliar a influência da proporção de enxerto ósseo autógeno / PRP na cicatrização óssea em DTC criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Os autores concluíram que essa proporção parece influenciar a cicatrização óssea. Os achados histomorfométricos do estudo de Nagata et al. (2010) confirmaram os resultados obtidos através da análise imunoistoquímica.

Existem, realmente, poucos estudos controlados, principalmente em humanos, avaliando a influência do PRP quando associado ao osso autógeno no reparo de defeitos do esqueleto maxilo-facial. Embora as vantagens desta associação não tenham sido comprovadas, vários pesquisadores propuseram-se a avaliar o uso do PRP associado a aloenxertos, xenoenxertos ou materiais aloplásticos, em procedimentos regenerativos (FURST et al. 2003). Sabe-se que estes materiais não têm as mesmas propriedades dos enxertos autógenos, como, por exemplo, a capacidade de osteogênese e osteoindução (THORWARTH et al., 2005). A adição do PRP poderia facilitar e acelerar a integração biológica destes materiais ou enxertos (WILTFANG et al., 2003).

Em um estudo clínico, radiográfico e histológico, Kassolis et al. (2000) avaliaram levantamentos de seios maxilares e aumentos de rebordo alveolar realizados com osso mineralizado seco congelado (FDBA) e osso desmineralizado seco e congelado (DFDBA) associados ao PRP em 15 pacientes. A análise histológica mostrou numerosas áreas de formação de tecido ósseo ao redor das partículas dos enxertos, sem a ocorrência de nenhum infiltrado significativo de células inflamatórias. Estas conclusões foram corroboradas pelos achados de Shanaman et al. (2001). Estes autores concluíram que a adição de PRP aos enxertos alógenos permitiu uma nova formação óssea e melhorou o manuseio desses enxertos para aumentos de rebordo alveolar em 3 pacientes, facilitando a colocação e estabilização dos materiais.

Apesar dos bons resultados relatados por Kassolis et al. (2000) e Shanaman et al. (2001), estes estudos não apresentaram grupo controle de pacientes, dificultando, portanto, a avaliação objetiva dos possíveis benefícios terapêuticos da adição do PRP aos materiais de enxerto. Assim, Kassolis et al. (2005) realizaram um estudo clínico controlado para investigar a influência do PRP em enxertos alógenos. Levantamentos bilaterais de seios maxilares foram realizados em 10 pacientes, onde um dos lados foi preenchido com PRP e FDBA e o outro lado com FDBA e uma membrana. A análise histométrica mostrou, aos 4, 5 e 6 meses pós-operatórios, maior quantidade de osso vital presente no grupo com PRP.

Três outros estudos investigaram a eficiência do PRP combinado com osso alógeno. Defeitos criados em calvária (PALMISANO et al., 2002), arco zigomático (HARRIS et al., 2003) ou processo alveolar (DUZIAK & BLOCK, 2003) de cães não exibiram, na avaliação radiográfica ou histológica, nenhuma vantagem no reparo ósseo quando tratados com PRP e enxertos alógenos. Estes achados foram corroborados por Aghaloo et al. (2005) que também mostraram, através de análises radiográfica e histométrica, que a adição de PRP ao FDBA ou DFDBA para o tratamento de defeitos cirúrgicos não-críticos em calvária de coelhos não proporcionou aumento significativo na densidade óssea ou na quantidade de novo osso formado obtidos com o uso dos enxertos ósseos somente.

O PRP também tem sido avaliado em associação com enxertos xenógenos. Froum et al., (2002) associaram o enxerto xenógeno (Bio-Oss®) ao PRP em cirurgias de levantamentos de seios maxilares e não encontraram nenhuma diferença quanto à quantidade de formação óssea em 3 pacientes que receberam este tratamento. Um paciente teve, inclusive, implantes testes colocados no momento da cirurgia, os quais foram removidos e avaliados quanto ao percentual de contato osso-implante. Nenhum benefício foi notado com a adição de PRP ao Bio-Oss® (38% de contato osso-implante no grupo Bio-Oss® e PRP e 34% no grupo do Bio-Oss® sozinho). Roldán et al. (2004) avaliaram o potencial regenerativo do PRP ou da Proteína

Morfogenética Óssea Recombinante Humana-7 (rhBMP-7) associados ao Bio-Oss[®]. A análise histométrica e o exame de microscopia de fluorescência revelaram que o PRP não foi capaz de acelerar ou aumentar a osseointegração de implantes de titânio quando comparado com rhBMP-7.

Diversos estudos têm avaliado o uso do PRP associado a outros substitutos ósseos (Trombelli & Farina, 2008; Nikolidakis et al. 2008; Wiltfang et al. 2003; Danesh et al., 2001). Em uma série de casos clínicos, Danesh et al., (2001) avaliaram o potencial do PRP em aumentar a formação óssea quando associado a vidro bioativo, enxerto ósseo alógeno ou enxerto ósseo xenógeno, em cirurgias de levantamentos de seios maxilares. Quando o vidro bioativo foi utilizado, não se observou diferenças de resultados entre os grupos tratados com ou sem PRP. A análise histológica mostrou a presença de tecido conjuntivo circundando as partículas de vidro bioativo com limitada quantidade de novo osso formado (DANESH et al., 2001). Wiltfang et al. (2003), em estudo realizado sobre levantamento de seios maxilares, avaliaram a ação do PRP na degradação dos grânulos de β -Fosfato de Tricálcio (β -TCP). Uma degradação mais rápida do material cerâmico associado ao PRP não foi constatada. Em modelos experimentais realizados em mandíbula de cães, o PRP mostrou-se capaz de influenciar a velocidade e qualidade de neoformação óssea quando combinado com β -TCP (KOVACS et al., 2005; SUBA et al., 2004).

De todos os materiais utilizados para o tratamento de defeitos ósseos, apenas o osso autógeno possui células osteocompetentes e células mesenquimais indiferenciadas na base do canal medular. A ação do PRP ocorre sobre estas células que têm, reconhecidamente, potencial para responder às citocinas presentes no PRP (MARX, 2001, 2004). Sabe-se que a ação do PRP ocorre sobre células vivas. Assim, os vários enxertos ou materiais substitutos do osso autógeno agem apenas como carreadores para o PRP, retendo por mais tempo os FCs liberados pelas plaquetas. Todavia, o tempo de retenção destes fatores é dependente do tipo de

substituto ósseo usado (TSAY et al., 2005), o que pode explicar a grande controvérsia de resultados existentes entre os estudos que avaliaram a adição do PRP a vários substitutos do osso autógeno.

2.2. Células-Tronco

O princípio essencial da engenharia tecidual é combinar, *in vitro*, o crescimento de células em substratos (*scaffolds*) específicos, para repor ou recompor determinado tecido. Os tipos celulares escolhidos como única fonte de crescimento celular e implantação são críticos para o sucesso da engenharia tecidual (CARDOSO, & ARRUDA; 2009). Dentre estes tipos celulares estão as células-tronco. Considera-se como célula-tronco um tipo especial de célula que apresenta capacidade de renovar-se e originar diferentes tipos celulares especializados (KIRSCHSTEIN, 2001). De acordo com CARDOSO & ARRUDA (2009), as células-tronco classificam-se em totipotentes ou embrionárias, pluripotentes ou multipotentes, oligopotentes e unipotentes. As embrionárias são totipotentes, ou seja, possuem a capacidade de formar todos os tecidos do embrião além dos extra-embriônicos. Estas células só podem ser encontradas no embrião. As células-tronco pluripotentes ou multipotentes também só podem ser encontradas em embriões e conseguem diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos, com exceção da placenta dos anexos embrionários. Já as oligopotentes são derivadas de fontes adultas e possuem capacidade de diferenciar-se em diversos tecidos, sendo assim muito utilizadas em pesquisas científicas. As unipotentes, também derivadas de fontes adultas, diferenciam-se em um único tecido, ou seja, ao tecido ao qual pertencem. As não embrionárias, ou seja, as oligopotentes e unipotentes, podem ser derivadas de diversas fontes, tais como fluido amniótico (DE COPPI et al., 2007), tecido do cordão umbilical (WANG et al., 2004), sistema nervoso central (GAGE, 2000), osso medular (CAPLAN, 1991), retina (TROPEPE et al., 2000) e pele (TOMA et al., 2001).

São encontrados dois tipos de células-tronco na medula óssea: as hematopoiéticas e as mesenquimais. Essas células-tronco têm como característica principal a capacidade de auto-renovação e pluripotencialidade (SOUZA et al., 2003). As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido testadas para o tratamento de doenças cardíacas isquêmicas e degenerativas,

lesões ósseas, condrais, tendinosas, pulmonares, da medula espinhal, do sistema nervoso central, do fígado e em doenças genéticas como a osteogênese imperfeita (ZAGO & COVAS, 2006). O interesse neste tipo celular cresceu significativamente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados, como tem sido demonstrado em inúmeros estudos pré-clínicos e clínicos (BARRY; MURPHY, 2004).

No estudo *in vitro* de Pittenger et al. (1999), células que tinham características de CTMs humanas foram isoladas do aspirado medular de doadores voluntários. Foram realizadas, então, a expansão e a caracterização dessas CTMs. Essas células multipotentes, responsáveis pela composição de aproximadamente 0,001% a 0,01% das células nucleadas da medula óssea adulta, cresceram *in vitro* de maneira aderente, como células fibroblastóides em meio de cultura apropriado ao crescimento celular. Observou-se que essas CTMs adultas poderiam ser induzidas a diferenciarem-se, exclusivamente, em linhagens de adipócitos, condrócitos e osteócitos.

As CTMs podem ser expandidas por até 40 gerações, enquanto ainda mantêm suas capacidades de linhagem mesenquimal multipotente, embora suas taxas de crescimento sejam reduzidas (DEANS & MOSELEY, 2000). Essas células expressam um grande número de moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento (FCs), associados com suas funções e interações celulares dentro do estroma da medula óssea (BOBIS et al., 2006). As CTMs secretam moléculas bioativas que inibem a apoptose e limitam o campo de dano ou injúria; inibem a fibrose ou a formação de cicatriz nos sítios da injúria; estimulam a angiogênese e trazem um novo suprimento sanguíneo; e estimulam a mitose de progenitores teciduais intrínsecos e tecido-específicos, tais como células-tronco neurais ou cardíacas (CAPLAN, 2009).

Diversos estudos avaliaram o isolamento e cultura das CTMs com o objetivo de usá-las em procedimentos regenerativos (CASTRO-MALASPINA, 1980; HAYNESWORTH,

1992; JIANG et al., 2010; MAEDA et al., 2011). CTMs foram isoladas de muitas outras fontes que não a medula óssea, tais como sangue periférico (ZVAIFLER et al., 2000), sangue do cordão umbilical (ERICES et al., 2000) tecido adiposo (ZUK et al., 2002), líquido amniótico (INT ANKER et al., 2003), osso compacto (GUO et al., 2006), periósteo (NAKAHARA et al., 1991), dentre outros. Células derivadas de diferentes tecidos mostram heterogeneidade fenotípica e diferentes capacidades de crescimento, mas elas também mostram similaridades, com o potencial de diferenciarem-se em linhagens mesenquimais clássicas e a expressão de marcadores de superfície comuns (BAKSH et al., 2007). Contudo, há evidências crescentes que marcadas diferenças existem na biologia das CTMs que são dependentes do tecido de origem, que parecem ser a principal fonte de variação nas propriedades biológicas das CTMs (De BARI et al., 2008).

A maioria das informações disponíveis sobre as propriedades fenotípicas e funcionais das CTMs são derivadas de estudos realizados avaliando culturas de células *in vitro* (BERNARDO et al., 2011). Zhou et al., 2011 analisaram a capacidade da camada superior de colágeno e da camada inferior de colágeno/hidroxiapatita de um arcabouço osteocondral de colágeno/hidroxiapatita de promover o crescimento e diferenciação de CTMs humanas em condrócitos e osteoblastos. A viabilidade e proliferação celulares, diferenciação condrogênica e osteogênica foram os parâmetros avaliados. A camada de colágeno foi mais eficiente em induzir a diferenciação condrogênica das CTMs, enquanto a camada colágeno-hidroxiapatita demonstrou superioridade em promover indução osteogênica sobre o colágeno ou a hidroxiapatita pura. Os autores concluíram que estes tipos de materiais podem efetivamente promover geração de tecido ósseo e cartilagem *in vitro*, podendo ser potencialmente utilizados na engenharia tecidual osteocondral (ZHOU, et al. 2011).

Resultados positivos têm sido demonstrados em estudos *in vivo* que avaliaram o potencial terapêutico de CTMs expandidas com ou sem diferenciação osteogênica na

regeneração de defeitos ósseos. Recentemente, estudos que associaram ou compararam a utilização de CTMs a outros biomateriais no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico foram realizados em ratos (JAKSE, et al. 2003; JENSEN, et al. 2005; BURASTERO et al., 2010), miniporcos (JOYCE, et al. 1990) e carneiros (KARRING, et al. 1999). Em um desses estudos realizados em rato, avaliou-se o potencial regenerativo ósseo das CTMs quando usadas sozinhas ou combinadas com Proteína Morfogenética Óssea 7 (BMP-7), no tratamento de defeitos de tamanho crítico segmentado. Os resultados mostraram que a associação de CTMs expandidas *in vitro* e BMP-7 proporcionou uma melhor capacidade osteoindutora em comparação com as CTMs ou BMP-7 usados isoladamente (BURASTERO et al., 2010).

Estudos clínicos também têm sido realizados para avaliar o potencial das CTMs na regeneração óssea. Jager et al. (2009) relataram os achados clínicos de uma série de 10 casos de pacientes com deficiência óssea volumétrica (pseudoartrose, cistos ósseos ou defeitos ósseos endoprotéticos) que foram tratados com CTMs isoladas do aspirado de medula óssea. O sucesso clínico foi definido por redução ou ausência de dor combinada com formação de novo osso no sítio do transplante. O osso neoformado na área dos defeitos foi avaliado radiograficamente. Todos os pacientes apresentaram cicatrização óssea suficiente no período analisado. Os resultados demonstraram que as CTMs foram capazes de permitir a diferenciação osteogênica *in vitro*, sem qualquer estímulo osteogênico. A aplicação local das CTMs no tratamento de deficiências ósseas pode ser uma alternativa promissora aos enxertos ósseos autógenos e pode auxiliar a reduzir a morbidade do sítio doador.

Recentemente, Behnia et al. (2011) utilizaram CTMs no tratamento de pacientes com fissura palatina. As CTMs foram obtidas através da aspiração da medula óssea do osso íliaco posterior dos pacientes e foi realizada a cultura dessas células. Após a expansão das CTMs, elas foram colocadas em arcabouços bifásicos e combinadas com PDGF. Aos três meses pós-operatórios, tomografias computadorizadas “cone beam” foram realizadas e a média do

volume ósseo na fissura foi de 51,3%, sugerindo que a associação CTMs/PDGF pode melhorar a capacidade regenerativa dessas células.

CTMs derivadas da medula óssea parecem ser uma fonte popular de células-tronco adultas e têm sido amplamente utilizadas em vários procedimentos de engenharia tecidual e terapia celular. Essas células não têm se mostrado perfeitamente capazes de promover a osteogênese em ambientes *in vitro* ou *in vivo*. De qualquer forma, o comportamento dessas células é diferente e menos previsível em um contexto vivo (BEHNIA et al., 2011).

2.3. Associação PRP/CTMs

O uso da associação PRP/CTMs vem sendo explorada por diversos autores na literatura mundial (LUCARELLI et al., 2005; ITO et al., 2006, XU et al. 2011; KOHGO et al. 2011; CHO et al. 2011). Alguns estudos *in vitro* demonstraram a influência do PRP sobre as CTMs (GRUBER et al., 2004; LUCARELLI et al., 2003). Lucarelli et al. (2003) avaliaram os efeitos do PRP sobre CTMs de origem humana e observaram um aumento significativo no número dessas células no terceiro, sexto e nono dia do experimento quando estas foram cultivadas com 10% de PRP. A taxa de crescimento foi aproximadamente duas vezes mais alta quando comparada com a das células controle (não tratadas). Os autores concluíram que este aumento na taxa de proliferação das CTMs poderia ser vantajoso para aplicações clínicas, tais como o uso destas células para a reconstrução de grandes defeitos ósseos.

Em um estudo recente, CTMs derivadas da medula óssea foram cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% ou PRP 5% e 10% até a primeira ou a segunda passagem da cultura. Os parâmetros avaliados foram produção celular, clonogenicidade, fenótipo, bem como o potencial de migração e diferenciação celulares. Os resultados demonstraram que o uso de PRP resultou em uma taxa de expansão e produção celulares significativamente maiores nas passagens 0 e 1 da cultura. Os autores concluíram que o PRP humano pode ser visto como uma fonte alternativa ao SFB para o cultivo de CTMs (GOEDECKE, 2011).

Uma vantagem da associação PRP/CTMs é o seu potencial osteogênico, osteocondutivo e osteoindutivo, devido à capacidade de formação óssea das CTMs e à presença dos FCs secretados pelas plaquetas em um arcabouço tridimensional de fibrina (ANITUA et al., 2006). O PRP também apresenta excelente biodegradabilidade, a qual é contínua com a nova formação óssea. Isto torna o PRP diferente de outros arcabouços clássicos, como a cerâmica de fosfato de tricálcio ou matrizes de coral, que não se degradam

durante as primeiras semanas após sua implantação. Além disso, esta associação PRP/CTMs é autógena, não-tóxica e possui ótima plasticidade (ANITUA et al., 2006).

Fundamentado nestes princípios, Ito et al. (2005) estudaram o potencial da associação PRP/CTMs comparada com enxerto ósseo autógeno, enxerto ósseo xenógeno e apenas PRP no tratamento de defeitos ósseos mandibulares em cães. A associação PRP/CTMs proporcionou maior maturação óssea e acelerou o processo de regeneração óssea quando comparada com os outros tratamentos. Yamada et al. (2004a) já haviam relatado que o uso de PRP/CTMs em defeitos ósseos induziu à formação de osso maduro e vascularizado quando comparado com defeitos controle em mandíbula de cães. Além disso, os dados deste estudo demonstraram que o PRP permitiu a proliferação das CTMs sem deformar a estrutura celular, o que o tornaria um excelente veículo para manter as células na correção ou reconstrução de defeitos ósseos na prática clínica. Assim, Yamada et al. (2004b) usaram a associação PRP/CTMs para aumento de rebordo alveolar com a colocação simultânea de implantes de titânio em três pacientes. Segundo os autores, este procedimento foi menos invasivo e proporcionou boa estabilidade aos implantes (YAMADA et al., 2004b). O potencial terapêutico da associação PRP/CTMs também foi comprovado com o sucesso obtido em três casos de distração osteogênica de ossos longos, o que levou à conclusão de que este tipo de terapia da engenharia tecidual poderia diminuir o tempo de tratamento e as possíveis complicações da técnica, acelerando a formação óssea (KITOH et al., 2004).

Outros estudos também relataram o cultivo de CTMs e sua associação com o PRP na terapia regenerativa (LUCARELLI et al., 2005; DALLARI et al., 2006; YAMADA et al., 2006; FILHO CERRUTI et al., 2007). Vogel et al. (2006) avaliaram se a expansão de CTMs em meio com PRP iria manter a capacidade de diferenciação destas células em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas *in vitro* e, se elas iriam manter sua capacidade de formação óssea sobre condições definidas *in vivo*. As CTMs foram expandidas de seis

doadores em meios de expansão celular contendo SFB a 2 % ou PRP a 3 %. Para o teste da formação óssea *in vivo*, as células expandidas foram semeadas em blocos de hidroxiapatita deficiente em cálcio e de fosfato de β -tricálcio, os quais foram cobertos com fibronectina ou soro humano. Foram, então, implantados subcutaneamente em ratos com imunodeficiência combinada, removidos após 8 semanas e analisados histologicamente. Os resultados mostraram que o meio de expansão suplementado com PRP produziu número de células duas vezes maior quando comparado ao meio com SFB após 3 semanas de cultivo, mantendo capacidade similar de diferenciação para as linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. Os resultados do teste *in vivo* demonstraram que a formação óssea foi igual para as células expandidas com PRP e SFB (VOGEL et al., 2006).

A associação PRP/CTMs tem-se mostrado interessante do ponto de vista científico, porém a literatura carece de estudos clínicos controlados e randomizados que avaliem o potencial regenerativo desta associação. Somente após a realização desses estudos, que proverão bases científicas confiáveis, é que esta associação poderá ser integrada na rotina dos procedimentos cirúrgicos regenerativos.

6. Referências Bibliográficas

AGHALOO, T.L.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 16, n. 2, p. 250-257, Apr. 2005.

ANITUA, E. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006;24:227-34.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, v. 14, n. 4, p. 529-534, July/Aug. 1999.

ASCENCIO, D. et al. Experimental induction of heterotopic bone in abdominal implants. *Wound Repair Regen.*, v. 12, n. 6, p. 643-649, Nov./Dec. 2004.

ATALA, A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Res* 2004;7:15-31.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25: 1384-1392. 2007.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 568–584. 2004.

BECK, L.S. et al. In vivo induction of bone by recombinant human transforming growth factor beta 1. *J. Bone Miner. Res.*, v. 6, n. 9, p. 961-968, Sep. 1991.

BEHNIA, H. et al. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg.* Mar 17, 2011.

BERNARDO, M.E. et al. Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* Mar;24(1):73-81. Epub 2011 Feb 23. Review. 2011.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. O sistema cardiovascular. In: _____. *Fisiologia.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 303-308. 2000.

BOBIS, S.; JAROCHA, S.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical Applications. *FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA* Vol. 44, No. 4, pp. 215-230. 2006.

BURASTERO, G. et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone* 47 (2010) 117–126.

BUTTERFIELD, K.J. et al. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 3, p. 370-376, Mar. 2005.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 9 (5), 641–650. 1991.

CAPLAN, A.L. Right to reform. *J Clin Invest.* Oct;119(10):2862. 2009

CARDOSO, G.B.C.; ARRUDA, A.C.F. O papel das células tronco na engenharia tecidual. *Ciências & Cognição*; Vol 14 (3): 214-219. 2009.

CASSIEDE, P. et al. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cell exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, v. 11, n. 9, p. 1264-1273, Sep. 1996.

CASTRO-MALASPINA, H.; GAY, R.E.; RESNICK, G. et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 56: 289-301. 1980.

CHO, H.S. Individual Variation in Growth Factor Concentrations in Platelet-rich Plasma and Its Influence on Human Mesenchymal Stem Cells. *Korean J Lab Med.* Jul;31(3):212-8. Epub 2011 Jun 28. 2011.

CHOI, B.H. et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation alveolar bone cells: an in vitro study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 34, n. 4, p. 420-424, June 2005.

CHOI, B.H. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 33, n. 1, p. 56-59, Jan. 2004.

CHOUMERIANOU, D.M.; DIMITRIOU, H.; KALMANTI, M. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14:53-60.

DALLARI, D. et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res.*, v. 24, n. 5, p. 877-888, May 2006.

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

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F. Cell therapy: A challenge in modern medicine. *Biomed Mater Eng* 18: S11–S17. 2008.

DE KOK, I.J. et al. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Jul-Aug;20(4):511-8 2005.

DE SOMER, F. et al. Can autologous thrombin with a rest fraction of ethanol be used safely for activation of concentrated autologous platelets applied on nerves? *Eur. Spine J.*, v. 17, June 2005.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* 28, 875–884. 2000.

DINATO, C.J. et al. Plasma Rico em Plaquetas. In: DINATO, C. J.; POLIDO, D. W. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 315-342.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, Sep. 2000.

DUGRILLON, A. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (PRPc) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, v. 31, p. 615-619, 2002.

DUZIAK, M.E.; BLOCK, M.S. Ridge augmentation with PRP/PPP and mineralized bone in dogs. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v. 61, suppl, p. 41, 2003. (Abstract)

EFEOGLU, C.; AKCAY, Y.D.; ERTURK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, Nov. 2004.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Hematol* 109: 235–242. 2000.

FENNIS, J.P.; STOELINGA, P.J.; JANSEN, J.A. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 31, n. 3, p. 281-286, June 2002.

FENNIS, J.P.; STOELINGA, P.J.; JANSEN, J.A. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 33, n. 1, p. 48-55, Jan. 2004.

FILHO CERRUTI, H. et al. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif Organs*. Apr;31(4):268-73. 2007.

FRECHETTE, J.P.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.*, v. 84, n. 5, p. 434-9, May, 2005.

FREITAS, A.C. et al. Assessment of anti-inflammatory effect of 830nm laser light using C-reactive protein levels. *Braz Dent J.*, v. 12, n. 3, p. 187-190, 2001.

FREYMILLER, E.G.; AGHALOO, T.L. Platelet-rich plasma: ready or not? *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 4, p. 484-488, Aug. 2004.

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

FUERST, G. et al. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs. *J. Clin. Periodontol.*, v. 31, n. 9, p. 784-790, Sep. 2004a.

FURST, G. et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 4, p. 500-582, Aug. 2003.

FURST, G. et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 4, p. 500-582, Aug. 2003.

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. *Science*, 287 (5457), 1433-1438. 2000.

GARCIA, V.G. et al. Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone. *Lasers Med Sci*, v. 14, May 2009.

GOEDECKE, A. et al. Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro. *J Tissue Eng Regen Med*. Aug;5(8):648-54. 2011.

GOLDJESTANI, M.; DERMAUT, L.; THIERENS, H. Infrared laser and bone metabolism: A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, v. 23, p. 54–56, 1994.

GRAGEDA, E. et al. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *J. Oral Implantol.*, v. 31, n. 1, p. 2-17, 2005.

GRUBER, R. et al. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 15:29-35. 2004.

GUO, Z.; LI, H.; LI, X. et al. *In vitro* characteristics and *in vivo* immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 24: 992-1000. 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Hemostasia e Coagulação Sangüínea. In: _____ . *Tratado de Fisiologia Médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 394-404. 2002.

GUZZARDELLA, G.A. et al. Laser Stimulation on Bone Defect Healing: an In Vitro Study. *Lasers Med Sci.*, v. 17, p. 216-220, 2002.

HALL, G. et al. Effect of low level laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. *Swed. Dent. J.*, n.18, p.29-34, 1994.

HARRIS, D.; FARRELL, B.; BLOCK, M.S. Zygomatic arch defects grafted with mineralized bone with PRP or PPP in dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 61, suppl, p. 42, 2003.

HAYNESWORTH, S.E.; GOSHIMA, I.; GOLDBERG, V.M. et al. Characterization of cells with osteogenic potential from bone marrow. *Bone* 13: 81-88. 1992.

IN ‘T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C. et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102: 1548-1549. 2003.

ISHIKAWA, I. et al. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontology* 2000., v. 50, p. 90-126, 2009.

ITO, K. et al. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. DOI: 10.1002/jbm.a.30248.

ITO, K. et al. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin. Oral Impl. Res.* 17, 579–586. 2006.

JÄGER, M. et al. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr Stem Cell Res Ther.* Jan;4(1):34-43. 2009.

JAKSE, N. et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 5, p. 578-583, Oct. 2003.

JAKSE, N. et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 5, p. 578-583, Oct. 2003.

JENSEN, T.B. et al. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int. Orthop.*, v. 29, n. 2, p. 67-72, Apr. 2005.

JIANG, X. et al. bFGF-Modified BMMSCs enhance bone regeneration following distraction osteogenesis in rabbits. *Bone.* Apr;46(4):1156-61. 2010.

JOYCE, M.E.; JINGUSHI, S.; BOLANDER, M.E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop. Clin. North Am.*, v. 21, n. 1, p. 199–209, Jan. 1990.

JOYCE, M.E.; JINGUSHI, S.; BOLANDER, M.E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop. Clin. North Am.*, v. 21, n. 1, p. 199–209, Jan. 1990.

KARRING, T.; LINDHE, J.; CORTELLINI, P. Tratamento Periodontal Regenerativo. In: LINDHE, J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 428-462. 1999.

KARRING, T.; LINDHE, J.; CORTELLINI, P. Tratamento Periodontal Regenerativo. In: LINDHE, J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 428-462. 1999.

KASSOLIS, J.D.; REYNOLDS, M.A. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J. Craniofac. Surg.*, v. 16, n. 2, p. 280-287, Mar. 2005.

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

KASTEN, P. et al. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 2008; 29:3983-92.

KIM, S.G. et al. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 60, n. 9, p. 1018-1025, Sep. 2002a.

KIM, S.G. et al. 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*, v. 17, n. 1, p. 86-94, Jan./Feb. 2002b.

KIRSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L.R. Preface. "Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Direction. " National Institute of Health June 2001.

KITOH, H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone*. Oct;35(4):892-8. 2004.

KOHGO, T. et al. Bone regeneration with self-assembling Peptide nanofiber scaffolds in tissue engineering for osseointegration of dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent.* Jul-Aug;31(4):9-e16. 2011.

KOVACS, K. et al. Histomorphometric and densitometric evaluation of the effects of platelet-rich plasma on the remodeling of beta-tricalcium phosphate in beagle dogs. *J. Craniofac. Surg.*, v. 16, n. 1, p. 150-154, Jan. 2005.

LANDESBERG, R. et al. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 4, p. 529-35, Apr. 2005.

LANDESBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R.S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 58, n. 3, p. 297-300, Mar. 2000.

LIEBERMAN, J.R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T.A. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. *J. Bone Joint Surg.*, v. 84-A, n. 6, p. 1032–1044, June 2002.

LIND, M. et al. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop. Scand.*, v. 64, n. 5, p. 553–556, Oct. 1993.

LIU, Y. et al. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.*, v. 10, n. 5, p. 336-40, Sep./Oct. 2002.

LUCARELLI, E. et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003;24:3095-100.

LUCARELLI, et al. Stromal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Improve Bone Allograft Integration. *CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH*. Number 435, pp. 62–68. 2005.

LYNCH, S.E. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 84, n. 21, p. 7696-7700, Nov. 1987.

MAEDA, H. et al. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium. *Stem Cell Res Ther.* Jul 28;2(4):33. 2011.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, v. 85, n. 6, p. 638-646, June 1998.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.*, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 4, p. 489-496, Apr. 2004.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone Graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In: _____. *The Sinus Bone Graft*. 1. ed. Colorado: Quintessence Books, p.183-189. 1999.

MATSUDA, N. et al. Mitogenic, chemotatic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J. Periodontol.*, v. 63, n. 6, p. 515-525, June 1992.

MAZOR, Z. et al. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent.*, v. 13, n. 1, p. 65-72, Mar. 2004.

MEHTA, S.; WATSON, J.T. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 22:432-8. 2008.

MESSORA, M.R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.*, v. 43, p. 217-223, 2008b.

MESSORA, M.R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008 Dec;43(6):723-9. Epub 2008a Aug 14.

MUSTOE, T.A. et al. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*, v. 237, n. 4820, p. 1333-6, Sep. 1987.

NAGATA MJ, et al. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res.* 2010 Apr;28(4):468-73.

NAGATA, M.J. et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: An immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone*, v. 45, p. 339-345, 2009.

NAKAHARA, H. et al. *In vitro* differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195: 492-503. 1991.

NASH, T.J. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 15: 203-208 (1994).

NIKOLIDAKIS, D.; JANSEN, J.A. The Biology of Platelet-Rich plasma and its Application in Oral Surgery: Literature Review. *Tissue Engineering: part B.*, v. 14, n. 3, p. 249-258, 2008.

NODA, M.; CAMILLIERE, J.J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*, v. 124, p. 2991-2994, June 1989.

OLSEN, A.K. et al. Effect of pre-analytical handling on haematological variables in minipigs. *Lab. Anim.*, v. 35, n. 2, p. 147-152, Apr. 2001.

OYAMA, T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 5, p. 555-558, May 2004.

PALMISANO, W.; DEGEN, M.; BLOCK, M.S. Craniotomy bone defect healing with PRP combined with mineralized bone. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 60, suppl, p.39, 2002. (Abstract)

PARK, J.B. et al. Periodontal regeneration in Class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J. Periodontol.*, v. 66, n. 6, p. 462-477, June 1995.

PIERCE, G.F. et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J. Cell Biol.*, v. 109, n. 1, p. 429-440, July 1989.

PIERI, F. et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg* 67:265-72. 2009.

PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143- 147. 1999.

RAGHOEBAR, G.M. et al. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin. Oral Implants Res.*, v. 16, n. 3, p. 349-356, June 2005.

ROBIONY, M. et al. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 60, n. 6, p. 630-635, June 2002.

ROLDAN, J.C. et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, n. 6, p. 716-723, Dec. 2004b.

SANTOS, M.D.; SANTOS, M.C.D. O sangue e a medula óssea. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento – das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica. São Paulo: Santos, p. 3-44. 2004.

SCHLEGEL, K.A. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials*, v. 25, n. 23, p. 5387-5393, Oct. 2004.

SHANAMAN, R.; FILSTEIN, M.R.; DANESH-MEYER, M.J. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, v. 21, n. 4, p. 345-355, Aug. 2001.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D.Y. A simplified technique for producing Platelet-rich plasma and Platelet Concentrate for intraoral bone grafting techniques: A technical note. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 15, n. 6, p. 879-882, Nov./Dec. 2000.

SOUZA, V.F. et al. Células-tronco: uma breve revisão. *R. Ci. méd. biol.*, 2, 2, 251-256, 2003.

SUBA, Z. et al. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 19, n. 6, p. 832-838, Nov./Dec. 2004.

SUMNER, D.R. et al. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 77, n. 8, p. 1135-1147, Aug. 1995.

THORWARTH, M. et al. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*, v. 26, n. 15, p. 2575-2584, May 2005.

TOMA, JG. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.*, 3 (9), 778-784. 2001.

TOZUM, T.F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J. Can. Dent. Assoc.*, v. 69, n. 10, p. 664. Nov. 2003.

TROMBELLI, L.; FARINA, R. Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* Sep;35(8 Suppl):117-35. 2008.

TROPEPE, V.; COLES, B.L.; CHIASSON, B.J. et. al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, 287(5460), 2032- 2036. 2000.

TSAY, R.C. et al. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 63, n. 4, p. 521-528, Apr. 2005.

UEDA, M.; TOHNAI, I.; NAKAI, H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artif. Organs*, v. 25, n. 3, p. 164-171, Mar. 2001.

VANDER, A.J. et al. Circulação. In: _____. *Fisiología Humana: os mecanismos da função de órgãos e sistemas*. São Paulo: MCGran-Hill, p. 368-377.1981.

VIKJAER, D. et al. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur. J. Oral Science*, v. 105, n. 1, p. 59-66, Feb.1997.

VOGEL, et al. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets*, November 17(7): 462–469. 2006.

WANG, H.S.; HUNG, S.C.; PENG, et. al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22 (7), 1330-1337. 2004.

WEIBRICH, G. et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, n. 3, p. 357-362, June 2003.

WEIBRICH, G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, v. 34, n. 4, p. 665-671, Apr. 2004.

WEIBRICH, G. et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v. 30, n. 2, p. 97-102, Apr. 2002a.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 55, n. 11, p. 1294-1299, Nov. 1997.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 55, n. 11, p. 1294-1299, Nov. 1997.

WILTFANG, J. et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, n. 2, p. 187-193, Apr. 2004.

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

XU, R. et al. Human platelet lysates promotes the proliferation of mesenchymal stem cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. Aug 20;31(8):1396-1400. Chinese. 2011.

YAMADA, Y. et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.*, v. 10, n. 5-6, p. 955-964, May/June 2004.

YAMADA, Y. et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.* May-Jun;10(5-6):955-64. 2004.

YAMADA, Y. et al. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res.* Oct;15(5):589-97. 2004.

YAZAWA, M. et al. Influence of antiplatelet substances on platelet-rich plasma. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 62, n. 6, p. 714-718, June 2004b.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. *Células-tronco, a nova fronteira da medicina.* São Paulo: Ed. Atheneu; 2006.

ZHOU J. et al. In vitro generation of osteochondral differentiation of human marrow mesenchymal stem cells in novel collagen-hydroxyapatite layered scaffolds. *Acta Biomater.* Jun 30, 2011.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295. 2002.

ZVAIFLER, N.J. et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2: 477-488. 2000.