

Carolina dos Santos Santinoni

***Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas, do Laser
de Baixa Intensidade ou da associação de
ambos na regeneração óssea. Uma revisão de
literatura.***

ARAÇATUBA - SP

2009

Carolina dos Santos Santinoni

***Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas, do Laser
de Baixa Intensidade ou da associação de
ambos 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: Profª Adjunto Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA - SP

2009

Dedicatória

A Deus

*“Neste momento tão especial, volto a Ti o meu olhar e elevo o meu louvor. Agradeço por tanto amor e por ter-me permitido
superar mais esta etapa.*

*Quero hoje, entrelaçando as minhas mãos em suas mãos,
pedir que continue a caminhar comigo por toda minha vida.
Deu-me serenidade para aceitar tudo aquilo que não poderia
e não deveria ser mudado.*

*Deu-me força para mudar tudo o que pôde ser mudado.
E, acima de tudo, deu-me sabedoria para distinguir uma coisa
da outra.”*

Agradecimentos

À minha sincera gratidão. . .

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba -
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP,
nas pessoas de seu
Diretor **Pedro Felício Estrada Bernabé** e
Vice-Diretora **Ana Maria Pires Soubhia**
pela oportunidade da realização deste curso.

Agradecimentos

À minha família,

Pai (Vanderlei), Mãe (Ana) e Juliana,

Vocês me presentearam com a riqueza do estudo e fizeram de mim não apenas
profissional mas, sobretudo, um ser humano.

A vocês que se fizeram presentes por toda minha luta meu reconhecimento
sincero pela compreensão e minhas desculpas pelas horas roubadas de seu
convívio.

Companheiros de todos os meus momentos.

Estimuladores supremos de minhas vontades para a caminhada do amanhã.

Sem o amor de vocês, eu nada seria.

Ao meu anjo,

Daniel,

Deus colocou você em minha vida pra que pudesse me guardar me proteger, me
velar e me cuidar. Seus olhos são a fonte de minha força.

Sem você, muitas conquistas não seriam possíveis e muitos sonhos não seriam
realizados.

Você compartilhou comigo os meus momentos de felicidade e minimizou os
meus momentos de angústias.

Palavras são insignificantes para demonstrar o quão especial é ter você em
minha vida.

Porém, não poderia deixar de agradecê-lo por estar presente em cada passo meu.

Amo você!

Agradecimentos

À minha orientadora,

Prof.^a Adjunto Maria José Hitomi Nagata

Ensinar é acreditar que se pode contribuir para a formação de um caráter, é
compartilhar de sua própria existência.

À mestre que me guiou para além das teorias, das filosofias e das técnicas, que
me deu a consciência do valor de minha profissão, alertando-me sobre as
responsabilidades e mostrando-me que sempre há algo mais para se aprender a
cada dia, a minha eterna gratidão!

Aos professores Álvaro e Valdir,

Quero agradecer-los por sempre me receberem com tanto carinho, nos
momentos de dúvida, necessidade ou tranquilidade.

O incentivo que tive através do exemplo de vocês me fez amar ainda mais
a Periodontia.

Desejo continuar a aprender sempre mais, a cada dia, na presença de
vocês.

Agradecimentos

Aos meus amigos da Periodontia,

Desde que comecei o meu tão sonhado estágio, vocês foram minha segunda família, afinal passávamos a maior parte das horas dos nossos dias juntos. Fomos família nos momentos de risos, nos momentos de pressa, nos momentos de desentendimentos. Vocês foram a família que se fez guia para os meus passos, para os meus acertos e para as minhas escolhas dentro do mundo acadêmico. Obrigada pela dedicação e por cada minuto que passaram comigo. Com certeza vocês estão se formando com êxito no que estão empenhados nesse momento de suas vidas: ser mestres!

Aos meus amigos pessoais,

Sem citar nomes para não cometer injustiças, sei que tocarei o coração daqueles que assim se sentem: meus amigos! Gostaria de agradecê-los por fazerem parte da construção do que hoje é a minha vida. Vocês também foram muito importantes para o meu crescimento. Quero desculpar-me pelos erros e pelos momentos de ausência. Mas saibam que muitos dos meus passos visam deixar orgulhosos aqueles que são tão importantes para mim. Saber que posso contar com vocês mesmo com a distância que muitas vezes persiste em existir, contrariando nossas vontades, é o que mais me leva a crer que nossa amizade permanecerá por todos os tempos.

Epígrafe

*“Somente quem vê a mão de Deus em todas
as coisas pode colocar todas as
coisas em suas mãos.”*

Resumo

Santinoni, CS. **Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas, do Laser de Baixa Intensidade ou da associação de ambos na regeneração óssea. Uma revisão da literatura.** Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Resumo

A regeneração de defeitos ósseos tem atraído o interesse de pesquisadores de vários ramos da saúde. Atualmente, a reconstrução óssea pode ser obtida, basicamente, com a aplicação de estímulos físicos (ultra-som, campos eletromagnéticos, laser) ou químicos (biomateriais, fatores de crescimento). Entre os estímulos físicos, uma técnica que tem sido muito estudada e discutida recentemente é o uso do laser. Os lasers podem ser classificados como cirúrgicos (alta intensidade) ou não-cirúrgicos (baixa intensidade). Os Lasers de Baixa Intensidade (LBI) são usados para estimular tecidos e promover a cicatrização de feridas. Em relação aos estímulos químicos utilizados para a regeneração óssea, destaca-se o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). O uso do PRP é baseado na premissa de que plaquetas constituem um reservatório natural de fatores de crescimento que, uma vez liberados, podem regular positivamente o processo de regeneração óssea. É importante ressaltar que estudos clínicos e em animais têm mostrado resultados contraditórios em relação aos benefícios do PRP na regeneração óssea. O uso do LBI como um agente biomodulador tecidual também é bastante controverso, principalmente quando se trata de sua aplicação em tecidos mineralizados. O objetivo deste estudo foi revisar as evidências atuais que sustentam o uso do PRP e do LBI para a potencialização da regeneração óssea, bem como discutir a racionalidade biológica para a associação de ambos nos procedimentos regenerativos.

Palavras-chave: Regeneração óssea; substâncias de crescimento; plaquetas.

Abstract

Santinoni, CS. **Effect of Platelet Rich Plasma, Low Level Laser Intensity and the combination of both on bone healing. A literature review.** Dental School of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba, 2009.

Abstract

Researchers continuously strive to improve bone grafting techniques and to provide means to obtain a faster and denser bone regeneration. At present, bone reconstruction can be obtained by the application of either physical (ultra-sound, electromagnetic fields, laser) or chemical stimulus (biomaterials, growth factors). Among the physical stimulus, a technique that has been extensively studied lately is the use of laser. The lasers can be classified as surgical (high power) and non-surgical (low-power) for therapeutic purposes. Low level lasers therapy (LLLT) is widely used to stimulate tissues and improve wound repair. With regard to chemical stimulus used for improving bone regeneration, the Platelet-Rich Plasma (PRP) has been largely used. The rationale behind the use of PRP is the assumption that it may improve wound healing by increasing the levels of growth factors in the wound site after degranulation of the platelets. It is important to emphasize that clinical and animal studies have yielded contradictory results with regard to the effect of PRP on bone healing. The use of the low level laser as a tissue biostimulation agent is also controversial, mainly with regard to mineralized tissues. The purpose of this study was to review the present available evidences that support the use of PRP and LLLT to enhance bone regeneration, as well as to discuss the rationale to combine both therapies for regenerative procedures.

Keywords: LLLT; Platelet-Rich Plasma; Bone regeneration.

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura	17
2.1. Plasma Rico em Plaquetas	17
A Evolução	17
A Técnica	20
As controvérsias	30
2.2. Laser de Baixa Intensidade	42
2.3. Associação Plasma Rico em Plaquetas/ Laser de Baixa Intensidade	47
4. Conclusão	49
5. Referências Bibliográficas	50

1. Introdução

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).

Métodos de reconstrução óssea são pré-requisitos essenciais para a reabilitação funcional de perdas ósseas traumáticas ou decorrentes de patologias. Há uma constante busca por meios de se obter um reparo mais rápido e com maior densidade óssea (RAGHOEBAR et al. 2005).

Atualmente, a reconstrução óssea pode ser obtida, basicamente, com a aplicação de estímulos químicos tais como biomateriais e proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e físicos, tais como ultrassom, campos eletromagnéticos e, mais recentemente, a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) (PRETEL et al., 2007).

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 fatores de crescimento no sítio da ferida após a degranulação das plaquetas.

Entre os fatores de crescimento 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).

Apesar dos resultados promissores relatados por Marx et al. (1998), estudos clínicos avaliando o uso do PRP associado a diversos enxertos e materiais aloplásticos para levantamento de seios maxilares (WILTFANG et al. 2003; KASSOLIS & REYNOLDS 2005), aumento de rebordos alveolares (SHANAMAN et al. 2001), reconstrução de mandíbulas atroficas (ROBIONY et al. 2002) ou tratamento de defeitos periodontais

(CAMARGO et al. 2002; LEKOVIC et al. 2002) têm apresentado resultados controversos em relação à formação e maturação ósseas.

Resultados controversos também têm sido obtidos em estudos animais. O PRP tem sido avaliado como meio de acelerar a osseointegração de implantes de titânio (ZECHNER et al. 2003), em levantamento de seio maxilar combinado com hidroxiapatita bovina (FURST et al. 2003) ou com osso autógeno (JAKSE et al. 2003), em tratamento de defeitos mandibulares associado ao osso autógeno (FENNIS et al. 2004; CHOI et al. 2004) e no tratamento de defeitos craniais combinado com osso autógeno (AGHALOO et al. 2002), osso bovino (AGHALOO et al. 2004) ou enxertos alógenos (AGHALOO et al. 2005).

Portanto, vários estudos foram realizados para avaliar a associação do PRP com enxertos ou materiais aloplásticos. Contudo, como esses enxertos e materiais são geralmente osteocondutores, eles poderiam, potencialmente, obscurecer os efeitos osteocondutores genuínos do PRP (PRYOR et al. 2005). Assim, a realização de novos estudos é fundamental para avaliar os reais benefícios do uso isolado do PRP na reconstrução dos tecidos duros e moles (WILTFANG et al. 2003).

Poucos estudos foram realizados para avaliar a ação isolada do PRP no reparo ósseo. Defeitos ósseos tratados apenas com PRP em fêmur (DALLARI et al. 2005) ou crânio (AGHALOO et al. 2005) de coelhos e mandíbulas de cães (YAMADA et al. 2004) não mostraram vantagens no processo de neoformação óssea. Entretanto, resultados favoráveis foram relatados por Anitua (1999), Sammartino et al. (2005) e Simon et al. (2004) no reparo ósseo de cavidades alveolares tratadas apenas com PRP. Ao analisar alguns desses estudos, verifica-se que a falta de análise histométrica do novo osso formado (ANITUA 1999; SAMMARTINO et al. 2005), a não utilização de defeitos de tamanho crítico (ANITUA 1999; SAMMARTINO et al. 2005; AGHALOO et al. 2005) e a ausência de análise histológica dos sítios controle (SAMMARTINO et al. 2005) foram fatores que dificultaram o estabelecimento de conclusões definitivas sobre o efeito biológico do PRP quando usado isoladamente. Portanto, Messora et al. (2008) realizaram um estudo planejado para avaliar todos esses fatores e, assim, poderem obter conclusões confiáveis a respeito do real efeito do uso isolado do PRP no reparo ósseo. Os autores concluíram que o PRP aumentou significativamente a cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos.

Outra técnica que tem sido muito estudada e discutida recentemente é o uso do laser. Os lasers podem ser classificados como cirúrgicos (alta intensidade) ou não-cirúrgicos (baixa intensidade). Os Lasers de Baixa Intensidade (LBI) são usados para estimular tecidos e promover a cicatrização de feridas (AMORIM et al., 2006; NICOLAU et al., 2003) e também

possuem efeito antiinflamatório e analgésico (WELDLOCK et al., 1996; ENWEMEKA et al., 2004; TAM, 1999). Resultados positivos têm sido obtidos no tratamento de úlcera oral (WALSH, 1997), gengivite (QADRI et al., 2005) e periodontite (QADRI et al., 2005; de ALMEIDA et al., 2007, GARCIA et al., 2009). O mecanismo de ação do LBI no processo de cicatrização tecidual ainda não está totalmente compreendido. Acredita-se que o LBI atua na biomodulação tecidual (NICOLAU et al., 2003) através de um processo fotoquímico, no qual o feixe de luz é absorvido pelos componentes intracelulares e convertido em energia metabólica envolvendo o processo de respiração celular por intermédio do citocromo (BELKIN et al., 1988).

O uso do LBI como um agente biomodulador tecidual é bastante controverso, principalmente quando se trata de sua aplicação em tecidos mineralizados. De fato, o LBI é mais frequentemente utilizado em tecidos moles, mas há um crescente interesse na sua aplicação em tecidos duros (WEBER et al., 2006). Vários estudos demonstraram que o LBI pode potencializar o reparo de defeitos ósseos e fraturas (LUGER et al., 1998; FREITAS et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003; MERLI et al., 2005; WEBER et al., 2006; PRETEL et al., 2007). Contudo, é preciso considerar que resultados desfavoráveis também foram observados por outros autores (BRAEKT et al., 1991; GOLDJESTANI et al., 1994; DAVI et al., 1996).

O LBI tem sido indicado para diferentes tratamentos clínicos. As finalidades de sua aplicação variam desde o controle da dor até o estímulo de complexos mecanismos envolvidos na cicatrização tecidual. Contudo, a ação do LBI na cicatrização óssea ainda precisa ser melhor avaliada (PRETEL et al., 2007).

A associação PRP/LBI também merece ser investigada, uma vez que ambos, PRP e LBI, podem atuar de forma sinérgica no processo de reparo ósseo.

Alguns estudos *in vitro* já demonstraram que o processo de secreção das plaquetas e a liberação de substâncias armazenadas nos grânulos específicos (adenina, nucleotídeos e proteínas) podem ser potencializados pela ação do laser (OLBAN et al., 1998; GRESNER et al., 2005). O uso do LBI associado ao PRP poderia, então, aumentar a concentração de fatores de crescimento no sítio da ferida.

O objetivo deste estudo foi revisar as evidências atuais que sustentam o uso do PRP e do LBI 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: histovascuoplaquetários, plasmáticos e trombotinâmicos (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).

Entretanto, o trombo plaquetário é suficiente para promover a hemostasia apenas de pequenos vasos. Caso o volume hemorrágico seja maior, o organismo utilizará outros fenômenos, chamados plasmáticos, ou simplesmente, coagulação. É a fase da hemostasia em que o organismo transforma o tecido sangüíneo líquido em gel e, a seguir, em sólido (coágulo). As globulinas presentes no plasma e fabricadas pelo fígado, medula óssea e outras células são ativadas pela ação de enzimas plasmáticas e proteínas não-enzimáticas ou, simplesmente, pelo contato com uma superfície diferente do endotélio vascular íntegro (SANTOS; SANTOS, 2004).

Inicia-se, então, um conjunto de eventos biológicos de maneira seqüencial e perfeitamente ordenados. No local da injúria tecidual, forma-se a tromboplastina, com a participação de fatores unicamente plasmáticos (via intrínseca) ou a partir de material tromboplástico tecidual (via extrínseca). A tromboplastina, por sua vez, atua sobre a protrombina, que se transforma em trombina (a mais potente substância coagulante

conhecida). A ação da trombina sobre o fibrinogênio o converte em fibrina, finalizando a coagulação do sangue (GUYTON; HALL, 2002; SANTOS; SANTOS, 2004).

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 contidos nas plaquetas (GUYTON; HALL, 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 e ponto de partida para o estudo e compreensão dos mecanismos envolvidos na reconstrução dos tecidos. Fibrina, plaquetas e fatores de crescimento, constituintes naturais do coágulo, são alvo de quase um século de pesquisas e tentativas de imitar os caminhos naturais da regeneração tecidual.

A rede de fibrina do coágulo sangüíneo é uma matriz fértil na qual populações celulares poderão aderir-se e iniciar diversos eventos, tais como síntese de Ácido Desoxirribonucléico (DNA), quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz extracelular (LYNCH et al., 1999). As plaquetas são reservatórios naturais de moléculas sinalizadoras que são os chamados fatores de crescimento. Fatores de crescimento são proteínas que servem como agentes sinalizadores para as células. Três tipos de ação são possíveis: (1) a autócrina, na qual o fator de crescimento influencia a célula de origem ou outras células de fenótipo idêntico (por exemplo, um fator de crescimento produzido por um osteoblasto influencia a atividade de um outro osteoblasto); (2) a parácrina, na qual o fator de crescimento influencia uma célula vizinha que tenha fenótipo diferente da célula de origem (por exemplo, um fator de crescimento produzido por um osteoblasto estimula a diferenciação de uma célula indiferenciada); e (3) a endócrina, na qual o fator de crescimento influencia uma célula com fenótipo diferente da célula de origem e que se encontra em um local anatômico remoto (por exemplo, um fator de crescimento produzido no tecido neural estimula a atividade de um

osteoblasto). Portanto, um fator de crescimento pode ter efeitos em múltiplos tipos de células, induzindo uma infinidade de funções celulares em vários tecidos (LIEBERMAN et al., 2002).

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

Alguns fatores de crescimento foram identificados durante diferentes fases de reparo de fraturas ósseas experimentais (LIEBERMAN et al., 2002). Avaliando-se esses fatores de crescimento, pôde-se concluir que eles são potenciais agentes terapêuticos para acelerar o reparo de defeitos ósseos. Entre estes polipeptídeos, pode-se citar a família do Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β), as Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs), o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas e suas isoformas (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB) e o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF). 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 tíbia (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).

Posto que o PDGF e TGF- β podem agir de diversos modos no processo de cicatrização das feridas, pode-se pressupor que a combinação destes fatores de crescimento é capaz de

resultar em um estímulo sinérgico de diferentes funções metabólicas (YAZAWA et al., 2004b). Alguns estudos mostraram resultados satisfatórios após o uso da combinação de PDGF-BB e TGF- β 1 (PFEILSCHIFTER et al., 1990; LIND, 1998). De fato, estes fatores combinados podem realmente aumentar a vascularização dos tecidos, promover a proliferação de fibroblastos, elevar a taxa de colágeno, acelerar a formação de tecido de granulação e realçar a osteogênese (LOZADA et al., 2001).

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 fatores de crescimento, 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 fatores de crescimento consolidam o segundo dos três pilares essenciais para a regeneração dos tecidos, ou seja, a presença de moléculas sinalizadoras.

Os fatores de crescimento 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).

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) (MARX, 2001).

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 centrifuga 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. Diferentes velocidades e tempos de centrifugação do sangue foram testados e recomendados. No protocolo de Anitua (1999), por exemplo, o sangue é colhido antes da anestesia do paciente em tubos de 5 ml contendo 10% de solução de citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante. Os tubos são centrifugados a 160 G por 6 minutos em temperatura ambiente, promovendo a separação do sangue em três componentes: células vermelhas do sangue, que se depositam no fundo do tubo; PRP, localizado no meio do tubo; e PPP, na porção superior do tubo. O autor recomenda a pipetagem do composto em duas etapas. Inicialmente, 1 ml do plasma da parte superior de cada tubo (PPP) é pipetado e separado. Este composto contém apenas 15% das plaquetas do sangue total. Logo em seguida, o plasma remanescente dos

tubos de 5ml é coletado, incluindo 1 a 2 mm da porção superior de células vermelhas e armazenado em outro recipiente. Este último corresponde ao PRP e contém altas concentrações de plaquetas.

O PRP também pode ser obtido, em ambulatório, 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.

Landesberg et al. (2000) também propuseram um protocolo de dupla centrifugação, semelhante ao protocolo de Sonnleitner et al. (2000). Entretanto, neste protocolo, os autores recomendaram que tanto a primeira como a segunda centrifugação do sangue fosse de 200 G por 10 minutos.

Analizando-se o desenvolvimento dos vários protocolos simplificados para obtenção do PRP conclui-se que houve uma euforia inicial no uso desta biotecnologia, o que fez com que vários detalhes técnicos envolvidos na sua produção fossem negligenciados. Somente com o amadurecimento científico neste campo de pesquisa, estes detalhes, tais como o tipo de centrífuga, o anticoagulante usado nos sistemas de coleta de sangue, a velocidade de centrifugação selecionada, a quantidade e tipo de fatores de crescimento existentes, o número de plaquetas presentes (EFEOGLU et al., 2004) e o volume usado (NAGATA et al., 2009), dentre outros, passaram a ser cuidadosamente observados nas investigações atuais como parâmetros determinantes da correlação existente entre a qualidade do concentrado de plaquetas e o efeito biológico proporcionado.

O PRP atua acelerando o processo de regeneração tecidual através da degranulação dos grânulos α das plaquetas, os quais contêm fatores de crescimento. 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 fatores de crescimento que modularão diretamente a reconstrução dos tecidos perdidos (FREYMILLER; AGHALOO, 2004).

Dentro dos grânulos α plaquetários, os fatores de crescimento permanecem em um estado incompleto. Assim que o processo de coagulação é ativado, os fatores de crescimento são secretados através da membrana celular. Neste processo, os grânulos α fundem-se com a membrana plaquetária, através da qual os fatores de crescimento 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 fatores de crescimento 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 é capaz de acelerar o reparo ósseo. Kim et al. (2002a) e Weibrich et al. (2004) confirmaram que esta dose de plaquetas/ μ l no PRP demonstrou-se eficaz na aceleração da formação óssea em cães e coelhos.

De acordo com o estudo de Weibrich et al. (2004), o PRP que apresentou aproximadamente 1.000.000 de plaquetas/ μ l foi capaz de acelerar a formação óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em fêmur de coelhos. De modo inverso, o grupo que recebeu o PRP com concentrações plaquetárias menores que 1.000.000 de plaquetas/ μ l não exibiu nenhuma vantagem, em termos de aceleração da formação óssea, sobre o grupo controle. Concentrações maiores de plaquetas (1.845.000 a 3.200.00 plaquetas/ μ l) foram capazes de, inclusive, inibir a formação óssea.

Uma investigação dos protocolos de obtenção do PRP disponíveis na literatura mostrou que nem todas as técnicas garantem adequadas concentrações plaquetárias (MARX, 2004). Os protocolos de Anitua (1999) e Landesberg et al. (2000) revelaram aumentos nas concentrações de plaquetas de apenas 190% e 150% respectivamente (MARX, 2004). Uma possível explicação para a baixa concentração de plaquetas obtida com o protocolo de Anitua (1999) seria o fato de haver uma única centrifugação do sangue no processo de preparação do PRP. De acordo com Marx (2001), para que se possa verdadeiramente concentrar plaquetas do sangue autógeno, o protocolo selecionado deve utilizar dupla centrifugação. A primeira centrifugação (chamada também de centrifugação pesada) separará a maioria das células

vermelhas do plasma, o qual contém plaquetas, leucócitos e fatores da coagulação. A segunda centrifugação (chamada de centrifugação leve) refina a amostra, separando as plaquetas do plasma, juntamente com leucócitos e uma pequena quantidade de células vermelhas. Esta segunda centrifugação, livre do grande número de células vermelhas presentes no momento da primeira centrifugação, produz o PRP e o separa do PPP. Portanto, de acordo com Marx (2001), protocolos de única centrifugação não produzem PRP, mas sim uma mistura de PPP e PRP que tem revelado baixas concentrações plaquetárias.

Não só o número de centrifugações é importante no preparo do PRP, mas também a força de rotação selecionada. No protocolo de Landesberg et al. (2000), recomenda-se a utilização de centrifugações a 200 G por 10 minutos, o que proporcionou um aumento médio na concentração de plaquetas de $205.7\% \pm 22.2$. Efeoglu et al. (2004) fizeram uma modificação deste protocolo, alterando as forças de rotação e tempo de preparo das amostras de sangue em coelhos. Com uma centrifugação inicial do sangue a 300 G por 10 minutos e uma segunda centrifugação de 5000 G por 5 minutos, foi possível obter o PRP com um aumento médio de 429% de plaquetas em relação à quantidade de plaquetas encontradas no sangue periférico.

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

Dugrillon et al. (2002) mostraram em seu estudo que, embora a concentração de plaquetas tenha aumentado proporcionalmente quando forças de 400 G e 1200 G foram utilizadas, a quantidade de TGF- β_1 não aumentou após centrifugações maiores que 800 G. Os autores concluíram que forças superiores a esta promoveram a ativação das plaquetas, com liberação e conseqüente perda dos fatores de crescimento.

Partindo do princípio de que um determinado número de plaquetas pode não corresponder à quantidade de fatores de crescimento presentes, Weibrich et al. (2002a) investigaram a correlação existente entre a idade do doador, sexo e quantidade de plaquetas com os níveis de fatores de crescimento nas amostras de PRP. Os autores, contrariamente aos estudos de Weibrich et al. (2002b) e Yazawa et al. (2004a), não encontraram nenhuma correlação entre a quantidade de plaquetas e de fatores de crescimento, bem como nenhuma influência do sexo e idade nestas variáveis. Alertaram, então, que o número de plaquetas, um

dos critérios primordiais no controle de qualidade das amostras de PRP, não é um parâmetro confiável para prever seguramente a quantidade de fatores de crescimento.

A eficiência do PRP depende, indubitavelmente, do nível de fatores de crescimento 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).

Recomenda-se que o PRP seja preparado no máximo até 6 horas antes da cirurgia e seu uso tem que ser imediato após a ativação (MARX et al., 1998). Isto dificulta a avaliação da qualidade do PRP produzido. Para contornar estes problemas, Fuerst et al. (2004a, 2004b) propuseram a utilização do Plasma Rico em Fatores de Crescimento (PRGF), obtido a partir do sobrenadante do PRP após centrifugação das plaquetas ativadas. Como vantagem deste composto, os autores citaram a possibilidade de utilizar-se sangue alogênico, já que não existem membranas plaquetárias e, portanto, nenhum risco de reações imunológicas. Ressaltaram, ainda, a vantagem de poder armazenar o PRGF após o seu preparo, possibilitando a realização de testes que assegurem a sua qualidade antes da aplicação clínica. Entretanto, em seus estudos experimentais, nenhum benefício adicional foi obtido na quantidade de formação óssea em relação aos grupos controles, quando o PRGF foi usado para tratamento de defeitos mandibulares de mini-porcos (FÜERST et al. 2004a, 2004b).

A despeito das dificuldades existentes para mensurar o nível de fatores de crescimento presentes no PRP antes de sua utilização clínica e da inexistência de uma correlação segura entre a quantidade de plaquetas e fatores de crescimento (WEIBRICH et al., 2002a; WEIBRICH et al, 2003), sistemas padronizados para o preparo do PRP surgiram no mercado com o objetivo de produzir amostras com melhor potencial terapêutico.

Entre os sistemas comercialmente disponíveis, encontra-se o SmartPreP® (Harvest Technologies Inc, Plymouth, MA, EUA), o Curasan PRP Kit® (Curasan, Kleinostheim, Alemanha) e o Platelet Concentrate Collection System – PCCS II™ (Biomet 3i, Palm Beach Gardens, FL, EUA). Estes sistemas são acompanhados de dispositivos especiais de coleta de sangue e alguns deles possuem, ainda, modelos específicos de centrífugas.

Em 2004, Marx relatou que apenas os sistemas PCCS® (a primeira versão do PCCS II™) e SmartPreP® foram aprovados pelo FDA.

A quantidade exata de fatores de crescimento 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 centrifuga, da velocidade de centrifugação, da quantidade de plaquetas e dos níveis dos fatores de crescimento, um 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).

Marx (2001) afirma que existem apenas dois anticoagulantes capazes de sustentar o metabolismo das plaquetas: o Ácido Citrato Dextrose-A (ACD-A) e o Citrato Fosfato Dextrose (CPD). Nestes compostos, o citrato, como anteriormente mencionado, liga-se ao cálcio para impedir a coagulação do sangue, enquanto a dextrose e outros ingredientes sustentam o metabolismo plaquetário. De acordo com Marx (2001), ambos são efetivos, mas o ACD-A é preferido por manter a viabilidade das plaquetas de forma mais significativa, sendo também o anticoagulante de escolha para o estoque de plaquetas em bancos de sangue. O CPD, embora bastante útil, é 10% menos efetivo do que o ACD-A na manutenção da viabilidade plaquetária.

É importante destacar que o meio de coleta de sangue e o acesso escolhido para isso podem interferir nos parâmetros hematológicos das amostras, produzindo hematócritos

variados e severos graus de hemólise (SUBER; KODELL, 1985; SMITH et al., 1986; NEMZEK et al., 2001). Estes fatores devem ser levados em consideração nos estudos envolvendo a utilização do PRP, uma vez que podem comprometer a sua qualidade. 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 fatores de crescimento 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. Quando uma substância promove a lise das plaquetas, como o NP40[®] (Calbiochem, Darmstadt, Germany), por exemplo, a mensuração dos níveis de fatores de crescimento presentes na amostra acusará altas doses, porém estes fatores não se encontrarão em um estado bioativo (YAZAWA et al., 2004b).

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).

Marx et al. (1998) preconizaram a formação do gel de PRP pela adição de trombina bovina (10.000 unidades) dissolvida em 10 ml de cloreto de cálcio a 10%. A preocupação com a possibilidade de desenvolvimento de coagulopatias a partir do uso da trombina bovina fez com que Landesberg (1998) questionasse a segurança do uso desta substância. Segundo a autora, as preparações de trombina bovina têm restos de fator V da coagulação que podem estimular negativamente o sistema imune humano a combaterem o próprio fator V do organismo. Este fenômeno parece não ser dose dependente, fazendo com que muitos cirurgiões evitem o uso da trombina em cirurgias neurais e cardíacas.

Sonnleitner et al. (2000) propuseram o uso do adesivo de fibrina TisseI[®] (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, USA) para a produção do gel de PRP. Este adesivo é

formado por 2 compostos: um concentrado de fibrinogênio, enriquecido com fator XIIIa, e trombina humana associada ao cloreto de cálcio.

Já Anitua (1999), com o mesmo objetivo, 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. 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).

Em relação à controvérsia sobre a utilização da trombina bovina no gel de PRP, Marx (2000, 2004) esclareceu que todos os relatos de aparecimento de coagulopatias após exposição cirúrgica à trombina bovina tópica ocorreram em uma época em que a trombina era processada com alto teor de contaminação do fator V bovino. A concentração deste contaminante, que se situava em torno de 50 a 100 µl/ml em 1993 e 1994, foi reduzida pela adição de etapas de purificação, sendo atualmente menor que 0,2 µl/ml. Além disso, nos casos onde ocorreu o desenvolvimento de coagulopatias, os preparados de trombina bovina foram usados em altas doses (maior que 10.000 unidades) e aplicados diretamente em feridas abertas onde ocorria a absorção pela circulação sistêmica. Já no PRP, doses muito menores são empregadas (menor do que 200 unidades de trombina bovina) e o composto entra em contato com os tecidos humanos no estado coagulado, descartando qualquer possibilidade de absorção pela circulação sistêmica. Todas as substâncias remanescentes são digeridas por macrófagos, assim como o próprio coágulo.

Marx (2000) relatou, ainda, ter utilizado a trombina bovina tópica para formar o gel de PRP em 312 pacientes, que não apresentaram nenhum tipo de desenvolvimento de coagulopatias. Destes pacientes, 136 tiveram, inclusive, TP monitorados nas primeiras duas semanas e 16 deles foram avaliados quanto à presença de anticorpos do fator V anti-humano pré e pós-tratamento com PRP. O autor ratificou, portanto, a indicação e a validade do uso da trombina bovina tópica associada ao PRP, uma vez que são remotos os riscos de antigenicidade, o coágulo de PRP obtido é de natureza mais consistente e o tempo de formação do gel é menor.

Apesar dos esclarecimentos de Marx, alguns autores ainda são relutantes quanto ao uso da trombina bovina e continuam buscando alternativas para este composto. Recentemente, Landesberg et al. (2005) estudaram a ação do TRAP na formação do gel de PRP. O PRP foi preparado pela centrifugação do sangue e coagulado com trombina bovina ou TRAP. Foram monitorados o tempo de coagulação das amostras e o nível de retração do coágulo. O TRAP causou uma menor retração do coágulo (15%) quando comparado à trombina bovina (43%).

O tempo de formação do coágulo também foi menor com o TRAP, fazendo deste composto uma alternativa eficaz para a substituição da trombina bovina.

Em relação à retração do coágulo deve-se salientar que uma menor retração evitará a rápida liberação dos fatores de crescimento presentes nas plaquetas, fazendo com que a biodisponibilidade destes polipeptídeos seja prolongada e 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).

Messora et al. (2008) analisaram histologicamente a influência do PRP coagulado com dois ativadores diferentes (cloreto de cálcio ou solução de tromboplastina) na cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos. O grupo tratado com PRP ativado com cloreto de cálcio apresentou uma quantidade de formação óssea estatisticamente maior e produziu uma menor retração do coágulo que o grupo tratado com PRP ativado com solução de tromboplastina. Portanto, mostrou-se que o tipo de ativador usado para iniciar a formação do coágulo do PRP pode influenciar seu efeito biológico na cicatrização óssea.

De Somer et al. (2005), também preocupados com a possibilidade de transmissão de doenças e desenvolvimento de anticorpos, afirmaram que o uso da trombina humana autógena é a única fonte segura para obtenção do gel de PRP. Porém, o preparo desta substância é incômodo e consome parte do PRP. Desse modo, alguns kits têm sido desenvolvidos para produzir trombina autógena a partir do PPP, entre eles o activAT[®] (Dideco, a Sorin Group company, Italy). Uma possível desvantagem desse sistema seria o resto de uma fração de etanol (1,18%) no PRP. De Somer et al. (2005) mostraram, entretanto, que o PRP preparado com este kit e usado para cicatrização de nervos ciáticos dissecados em porcos não causou nenhuma diferença significativa quanto ao infiltrado inflamatório ou necrose de fibras colágenas quando comparado com os grupos nos quais não foi usado PRP com remanescentes de etanol.

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

A reconstrução de defeitos de tecido duro do esqueleto maxilo-facial é um campo marcadamente evolutivo. Enquanto o foco das pesquisas sobre cicatrização em 1980 foi a coleta, manuseio e transplante de células osteocompetentes, o foco do século 21 gira ao redor do uso de fatores de crescimento capazes de estimular e dar suporte àquelas células (CARLSON, 2000).

Pesquisadores no campo da cirurgia buco-maxilo-facial buscam, continuamente, melhorar as técnicas de enxerto ósseo, bem como tentam encontrar meios para se obter 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 (quando envolve o mesmo indivíduo), aloenxertos (quando envolve indivíduos diferentes geneticamente, porém da mesma espécie), heteroenxertos ou xenoenxertos (quando envolve espécies diferentes) e materiais aloplásticos (materiais inertes, substitutos dos enxertos ósseos). O uso destes 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 uma 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. Formação e mineralização precoces de osso foram, do mesmo modo, relatadas por Robiony et al. (2002), quando o PRP foi combinado com enxertos ósseos autógenos em procedimentos de distração osteogênica para tratamento de mandíbulas atróficas.

Apesar dos bons resultados clínicos dos estudos anteriores (OYAMA et al., 2004; MAZOR et al., 2004; ROBIONY et al., 2002) a ausência de grupos controle não permitiu uma análise comparativa para uma avaliação apropriada dos verdadeiros benefícios do PRP. Estudos clínicos controlados são necessários para determinar se a adição de PRP aos enxertos ósseos aumenta significativamente ou não a maturação e formação ósseas, conforme demonstrado por Marx et al. (1998).

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 pode 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 (defeitos de tamanho crítico), 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.

Buscando não utilizar enxertos de osso endocondral, como nas investigações anteriores (JAKSE et al., 2003; BUTTERFIELD et al., 2005), Aghaloo et al. (2002) avaliaram o potencial do PRP no reparo ósseo de defeitos cirúrgicos, também de natureza não-crítica,

criados em crânio de coelhos e preenchidos com osso autógeno cortical intramembranoso. Semelhantemente aos outros estudos, as análises radiográfica e histométrica dos espécimes não revelaram nenhuma diferença significativa na formação óssea quando os enxertos foram misturados com PRP ou utilizados isoladamente.

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. Nas avaliações radiográficas, 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 calvária 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. No período de 12 semanas pós-operatórias, o grau médio de mineralização óssea observado no grupo do osso autógeno sozinho foi em torno de 50 a 60%. Essa média foi alcançada pelos enxertos ósseos com PRP duas semanas antes, ou seja, uma maturação mais rápida dos enxertos foi observada neste grupo, corroborando os achados de Marx et al. (1998).

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 fatores de crescimento presentes. Contrariamente, Choi et al. (2004), apesar de realizarem a contagem de plaquetas do PRP, não avaliaram os níveis de fatores de crescimento 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. Assim, o uso de pequenas quantidades de osso misturadas com um grande volume de PRP seria desfavorável para o reparo ósseo, pois inibiria a proliferação de osteoblastos. Portanto, a explicação para os diferentes resultados encontrados nos estudos envolvendo PRP e osso autógeno pode estar nos variados volumes e concentrações de PRP utilizados.

No estudo de Choi et al. (2004), no qual foi averiguada a influência do PRP na remodelação de enxertos ósseos autógenos em defeitos cirurgicamente criados em mandíbula de cães, um volume de 1 ml de 100% de PRP foi misturado com osso triturado a partir de um bloco de apenas 15 mm de extensão. Estes valores trouxeram efeitos negativos para o processo de reparo ósseo, uma vez que uma amostra de PRP, 100% concentrada, foi misturada com um pequeno volume de enxerto ósseo. Os valores utilizados no estudo de Marx et al. (1998), por exemplo, foram bastante diferentes. Estes pesquisadores relataram resultados positivos com o uso de um volume de 70 ml de PRP, produzido a partir de 400-450 ml de sangue, sendo esta quantidade misturada com osso autógeno para o tratamento de defeitos muito maiores, cerca de 50 mm de diâmetro ou mais.

Nagata et al. (2009) realizaram, então, um estudo imunoistoquímico para avaliar a influência da proporção de enxerto ósseo autógeno / PRP na cicatrização óssea em defeitos de

tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Os autores concluíram que essa proporção parece influenciar a cicatrização óssea.

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 materiais aloplásticos, xenoenxertos ou aloenxertos em procedimentos regenerativos (FÜERST et al. 2003).

A quantidade limitada, aumento da morbidade e necessidade de sítios doadores são algumas das desvantagens dos enxertos autógenos que levaram à busca por materiais substitutos. 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).

Para testar esta hipótese, Wiltfang et al. (2003) investigaram, em humanos, a ação do PRP na degradação dos grânulos de β -Fosfato de Tricálcio (β -TCP). Neste estudo randomizado e prospectivo, levantamentos de seios maxilares foram realizados e preenchidos com β -TCP, com ou sem a adição de PRP. Uma degradação mais rápida do material cerâmico associado ao PRP não foi constatada.

Quando esta metodologia foi empregada para avaliar o uso do vidro bioativo associado ou não ao PRP, também não se observou diferenças de resultados entre os grupos tratados com vidro bioativo 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).

Avaliando o enxerto xenógeno (Bio-Oss®) associado ao PRP, Froum et al. (2002) corroboraram os resultados do estudo de Danesh et al. (2001), não encontrando nenhuma diferença quanto à quantidade de formação óssea após levantamentos de seios maxilares de 3 pacientes. 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).

A utilização de terapias combinadas nos mais diferentes modelos experimentais também foi investigada em animais, trazendo resultados divergentes. Fuerst et al. (2003)

realizaram levantamentos bilaterais de seios maxilares em 12 mini-porcos, usando enxerto Bio-Oss® sozinho em um lado e Bio-Oss® misturado com PRP no outro lado. Simultaneamente, 2 implantes de titânio foram colocados juntamente com os enxertos. Ambos os grupos mostraram um aumento percentual, em função do tempo, no contato do osso cortical da parede facial do seio e do material enxertado com o implante. Na avaliação do contato enxerto-implante, o grupo PRP exibiu os melhores resultados já em 3 semanas pós-operatórias. Porém, na análise do contato osso cortical-implante, o grupo que recebeu o PRP somente superou o lado tratado com Bio-Oss® sozinho em 12 semanas pós-operatórias. A possibilidade de ocorrência de reações inflamatórias e diferenciação de osteoclastos pela adição de fatores de crescimento foram supostamente apontadas pelos autores como responsáveis pelo reduzido contato do osso cortical com os implantes nos períodos iniciais do processo de reparo ósseo.

Usando o modelo experimental semelhante ao de FÜRST et al. (2003), ROLDÁN et al. (2004b) avaliaram o potencial regenerativo do PRP ou da Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana-7 (rhBMP-7) associados a um enxerto de osso bovino (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. Como peculiaridade deste estudo, convém destacar que os autores adicionaram 15% de osso autógeno ao Bio-Oss® nos seios maxilares que receberam o PRP, diferentemente da investigação de FÜRST et al. (2003), com o intuito de garantir os efeitos mitogênicos do PRP sobre os osteoblastos. Os autores realizaram este procedimento devido aos resultados de um estudo prévio (ROLDÁN et al. 2004a), onde se observou que o PRP implantado com Bio-Oss® em um sítio extra-ósseo em ratos não foi osteoindutivo e, muito menos, permitiu o crescimento ósseo sobre a matriz bovina. Ainda neste mesmo estudo (ROLDÁN et al. 2004a), quando o PRP foi associado ao Bio-Oss® para aumentos mandibulares, a análise histomorfométrica não mostrou uma maior área de osso neoformado em relação às regiões tratadas apenas com Bio-Oss®. A microscopia de fluorescência, entretanto, evidenciou que o PRP acelerou a formação de osso cortical sobre a mandíbula e sobre os enxertos a partir de 2 semanas. Como a histometria foi realizada apenas após 6 semanas e os defeitos estudados não foram críticos, os autores concluíram que a análise de períodos mais precoces poderia ter demonstrado um efeito positivo do PRP.

É interessante observar que, apesar das semelhanças no modelo animal e nos critérios de análise histométrica em dois estudos descritos anteriormente (FÜRST et al, 2003;

ROLDÁN et al., 2004b), métodos diferentes para avaliar a validade terapêutica do PRP produzido foram utilizados, o que pode proporcionar maior ou menor valor científico aos resultados apresentados, assim como explicar algumas divergências. Fürst et al. (2003), por exemplo, validaram o protocolo de obtenção do PRP através do teste do mesmo em culturas de fibroblastos gengivais, observando um efeito mitótico dose-dependente do PRP sobre estas células em função da concentração de plaquetas. Já Roldán et al. (2004b) apenas realizaram a contagem de plaquetas do PRP. Estes pesquisadores ressaltaram, ainda, ter encontrado uma grande variação na quantidade de plaquetas presentes no sangue periférico dos animais estudados, o que pode ter contribuído para a produção de amostras de PRP com diferentes concentrações de fatores de crescimento, dificultando a padronização dos resultados.

Em relação à análise de outros sítios experimentais, há dois estudos que avaliaram o uso do PRP com enxerto de osso bovino (Bio-Oss®) em defeitos ósseos criados cirurgicamente em crânio de coelhos. A análise radiográfica e tomografia computadorizada em um destes estudos mostraram densidade óssea significativamente maior nos defeitos tratados com Bio-Oss® associado ao PRP do que nos defeitos tratados apenas com Bio-Oss® (KIM et al. 2001). Estes dados foram confirmados histomorfometricamente em um outro modelo (AGHALOO et al., 2002), no qual se constatou que a adição de PRP ao Bio-Oss® aumentou a porcentagem de formação óssea nos três períodos de observação (1, 2 e 4 meses).

Com o objetivo de analisar a associação do PRP com diversos substitutos ósseos, bem como a influência dos meios de obtenção do PRP no reparo ósseo, Wiltfang et al. (2004) realizaram um estudo em mini-porcos. Os autores avaliaram o efeito de duas diferentes concentrações plaquetárias (*ad modum* Curasan® e *ad modum* 3i®) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico, cirurgicamente criados em calvária e tratados com osso bovino (Bio-Oss®), esponja de colágeno bovina (Colloss®), β -Fosfato de Tricálcio (Cerasorb®) ou osso autógeno. Através de uma análise imunohistoquímica, na qual se determinou a expressão de proteínas da matriz óssea (BMP-2 e Osteocalcina), os autores puderam concluir que o PRP somente acelerou o reparo ósseo dos defeitos tratados com osso autógeno, sendo esta vantagem exclusiva dos compostos com maiores quantidades de plaquetas.

Contudo, alguns estudos mostraram resultados contrários ao de Wiltfang et al. (2004). 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). Conclusões semelhantes foram obtidas por Yazawa et al. (2004a) quando testaram este composto em calvária de coelhos.

O PRP tem sido, também, combinado com matrizes ósseas orgânicas, tais como osso mineralizado seco congelado (FDBA) ou osso desmineralizado seco e congelado (DFDBA). Os estudos nesta categoria apresentam, também, resultados conflitantes.

Em um estudo clínico, radiográfico e histológico, Kassolis et al. (2000) avaliaram levantamentos de seios maxilares e aumentos de rebordo alveolar realizados com FDBA e 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. Inclusive, Shanaman et al. (2001) reconheceram a necessidade de novos estudos controlados e chamaram a atenção para alguns detalhes que deveriam ser observados em futuras pesquisas, tais como a interferência da adição de enxertos autógenos aos compostos alogênicos, a influência da perfuração da cortical do leito receptor, o uso de diferentes materiais de barreira e variações na concentração de fatores de crescimento do PRP.

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, uma maior quantidade de osso vital presente no grupo com PRP. Quando esta metodologia foi transportada para animais, os resultados não foram animadores. A associação de PRP e enxertos alógenos não acelerou ou aumentou o reparo ósseo em levantamentos de seios maxilares em ovelhas (GRAGEDA et al., 2005). Porém, quando usado com implantes, associação de PRP e osso alógeno mostrou benefícios regenerativos. Kim et al. (2002a) colocaram implantes dentais na crista ilíaca de cães e criaram defeitos ósseos ao redor das roscas mais superficiais dos implantes. Estes defeitos foram preenchidos com osso humano desmineralizado seco e congelado em pó (DBP), associado ou não ao PRP. Um contato osso-implante mais direto foi visto no grupo com PRP. Quando uma mistura de dentina e sulfato de cálcio foi usada em substituição ao DBP em um outro estudo usando o mesmo modelo

experimental, a adição de PRP também pareceu aumentar o contato osso-implante (KIM et al. 2002b).

Os resultados dos estudos de Kim et al. (2002a, 2002b) não foram confirmados por Jensen et al. (2005). Estes autores inseriram implantes revestidos com hidroxiapatita em côndilos femorais de cães associados com osso alogênico fresco e congelado ou osso alogênico processado (calor-seco, irradiação e tratamento químico), ambos com ou sem a adição de PRP. Nenhuma influência na fixação dos implantes ou formação óssea foi observada pela adição do PRP aos enxertos ósseos ou pelos métodos de processamento dos enxertos alogênicos.

Três outros estudos usaram modelos experimentais em cães para investigar 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 um aumento significativo na densidade óssea ou na quantidade de novo osso formado obtidos com o uso dos enxertos ósseos somente.

Dos 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 um carreador para o PRP, retendo por mais tempo os fatores de crescimento 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.

Apesar dos resultados favoráveis com a associação de PRP a vários enxertos e materiais substitutos do osso autógeno, Pryor et al. (2005) alertaram que a interferência destes materiais no curso do processo regenerativo pode obscurecer os efeitos osteocondutores genuínos do PRP. Wiltfang et al. (2003) afirmaram ser, portanto, fundamental a realização de

novos estudos sobre a influência do PRP, usado isoladamente, no processo de reconstrução dos tecidos.

A literatura traz poucos estudos *in-vivo* sobre a ação isolada do PRP na reconstrução de tecidos duros. Um destes estudos foi realizado por Anitua (1999). O autor comparou o reparo alveolar pós-extração dentária de 20 pacientes divididos em dois grupos. Em um grupo, após as exodontias, os pacientes tiveram seus alvéolos dentários preenchidos com PRP e, no outro, apenas coágulo sangüíneo (controle). Transcorridas 10 a 16 semanas pós-operatórias, pôde-se notar que a epiteliação dos alvéolos do grupo PRP foi superior ao grupo coágulo. As biópsias ósseas realizadas nos sítios tratados mostraram que os espécimes do grupo PRP apresentavam osso maduro e compacto, com trabéculas ósseas organizadas e com morfologia normal. Já os espécimes do grupo controle exibiram tecido conjuntivo entremeando as novas trabéculas ósseas, o que caracterizou um atraso no processo de reparo ósseo quando comparado com ao grupo PRP.

Sammartino et al. (2005) também obtiveram bons resultados com a utilização do PRP em alvéolos de terceiros molares extraídos, tendo sido possível minimizar a ocorrência de complicações periodontais na raiz distal do segundo molar adjacente. Menor incidência de alveolite e dor pós-operatórias, bem como maior densidade radiográfica óssea com o uso do PRP em alvéolos foram relatadas por Mancuso et al. (2003).

Buscando melhor avaliação do PRP em modelos animais, Yazawa et al. (2004a) avaliaram o reparo ósseo de defeitos mandibulares bicorticais em coelhos, tratados com cola de fibrina e PRP ou apenas cola de fibrina como controle. A análise histológica mostrou, aos 7 dias pós-operatórios, a presença de matriz cartilaginosa no grupo com PRP, enquanto que no grupo controle ainda se via remanescentes da cola de fibrina, indicando que a adição de PRP realmente acelerou o reparo ósseo dos defeitos.

Embora Anitua (1999), Sammartino et al. (2005) e Yazawa et al., (2004a) tenham evidenciado bons resultados histológicos nos sítios tratados com PRP, a falta de uma análise histométrica do novo osso formado (ANITUA, 1999; SAMARTINO et al., 2005; YAZAWA et al., 2004a), de análise histológica dos sítios controle (SAMARTINO et al., 2005), bem como a não utilização de defeitos de tamanho crítico (ANITUA, 1999; SAMARTINO et al., 2005; YAZAWA et al., 2004a) ou associação do PRP com fibrina alógena (YAZAWA et al., 2004a) dificultaram o estabelecimento de conclusões mais objetivas e confiáveis sobre a capacidade do PRP em aumentar ou acelerar a formação óssea quando usado isoladamente.

Contornando estas limitações, Fontana et al. (2004) avaliaram histomorfometricamente o efeito do PRP aplicado ao redor de implantes laminares colocados

em tibia de ratos. Os resultados mostraram que o grupo no qual os implantes foram associados ao PRP ($30 \pm 7 \text{ cm}^2$) apresentou significativamente mais osso do que o grupo controle ($16 \pm 3 \text{ cm}^2$). Estes resultados também foram confirmados em estudos realizados em cães (YAMADA et al. 2004) ou mini-porcos (ZECHNER et al., 2003; SCHLEGEL et al., 2003).

Ainda preocupados em analisar o efeito isolado do PRP no processo de reparo ósseo, Pryor et al. (2005) aplicaram preparados de plaquetas em defeitos de tamanho crítico (6 mm) criados cirurgicamente em calvária de ratos, não observando nenhum benefício adicional na formação óssea em relação aos controles (sem PRP).

Apesar dos resultados insatisfatórios do estudo de Pryor et al. (2005), é preciso ressaltar que os autores utilizaram lisado de plaquetas e não PRP. Além disso, os concentrados de fatores de crescimento foram obtidos a partir de animais doadores e uma esponja de colágeno absorvível foi associada ao composto. Embora considere-se que esta esponja seja isenta de propriedades osteocondutoras ou osteoindutoras capazes de mascarar as potencialidades dos materiais testados. Independentemente destas variações e dos resultados apresentados, deve-se enfatizar que o sítio anatômico selecionado para o estudo do reparo ósseo foi adequado. Bastante louvável, também, foi a preocupação em se criar DTC (defeitos de tamanho crítico).

O DTC possibilita a padronização de controles para a avaliação de qualquer material com potencial de reparo ósseo maxilo-facial (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986), pois o defeito representa um desafio biológico e permite a observação do reparo ósseo tanto por osteocondução como por osteoindução (CHESMEL et al., 1998).

Encontram-se na literatura vários estudos avaliando defeitos ósseos realizados na calvária de ratos, medindo 8 mm de diâmetro e seguindo o modelo proposto por Takagi e Urist (1982) (HOLLINGER et al., 1989; WANG et al., 1998; LIM et al., 2000; SIKAVITSAS et al., 2003; SCHLIEPHAKE et al., 2004). Em todos estes estudos, os defeitos criados corresponderam aos padrões de um DTC. Estes defeitos em calvária são, segundo Schmitz e Hollinger (1986), bastante apropriados para o estudo de agentes particulados ou gelatinosos. Sendo assim, são bons candidatos para a análise das potencialidades do PRP na reconstrução de tecidos duros. O uso de DTC e atenção cuidadosa para com todos os detalhes técnicos envolvidos na produção do PRP são os primeiros passos na realização de pesquisas padronizadas que possam, realmente, esclarecer as dúvidas existentes em relação às propriedades deste material.

Grageda et al. (2004) sugeriram alguns pontos-chave que devem estar presentes nas investigações futuras, tais como a contagem manual de plaquetas do sangue periférico e das

amostras de PRP, a quantificação dos fatores de crescimento, a análise histométrica dos espécimes, a presença de grupos controle, a análise da correlação existente entre a histometria e o número de plaquetas e/ou fatores de crescimento, o uso de modelos animais que permitam a obtenção de um PRP autógeno e o ajuste da quantidade de plaquetas ideal para o PRP do modelo animal estudado, uma vez que existem variações entre as espécies na quantidade de plaquetas presentes no sangue periférico. Sem uma adequada padronização da metodologia dos estudos não será possível determinar se o PRP, realmente, auxilia no reparo ósseo quando usado de forma isolada ou associado a outros materiais (GRAGEDA et al., 2004).

Portanto, seguindo as recomendações de Grageda et al. (2004), Messoria et al. (2008) realizaram um estudo planejado para obter conclusões confiáveis a respeito do real efeito do uso isolado do PRP no reparo ósseo. Os autores concluíram que o PRP aumentou significativamente a cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico (8 mm) em calvárias de ratos.

Em uma revisão sistemática, Plachokova et al. (2008) analisaram os efeitos do PRP na regeneração óssea e concluíram que o PRP pode ter efeitos benéficos no tratamento de defeitos periodontais. Os autores relataram que existem poucas evidências sobre o efeito benéfico do PRP na elevação de seio. Afirmaram, ainda, que nenhuma conclusão pôde ser obtida a respeito de outras aplicações do PRP da Odontologia.

2.2. Laser de Baixa Intensidade

O primeiro aparelho de laser foi produzido por Maiman em 1960. Na área médica os lasers têm sido utilizados com sucesso desde o meio da década de 60 para a fotocoagulação precisa da retina. Assim, os oftalmologistas foram os pioneiros na aplicação do laser. Desde então, os lasers vem sendo utilizados em diversas aplicações industriais e científicas (ISHIKAWA et al., 2009).

O laser produz radiação eletromagnética coerente. A radiação laser é caracterizada por uma baixa divergência do feixe de radiação e, com poucas exceções, um comprimento de onda bem definido (ISHIKAWA et al., 2009).

São dois os tipos de lasers utilizados na medicina e na odontologia. O laser de baixa intensidade fornece uma baixa energia fria (não térmica) com comprimentos de ondas que parecem estimular a circulação e a atividade celular (MIDDA et al., 1991). Experimentalmente, esses lasers têm sido utilizados para promover cicatrização e reduzir a inflamação, o edema e a dor. Já o laser de alta intensidade é utilizado para aplicações cirúrgicas. Assim, diferentes tipos de lasers podem produzir diversos efeitos num mesmo tecido (MILLER et al., 1993).

Durante a década passada houve um aumento de pesquisas sobre a aplicação da terapia com laser de baixa intensidade (LBI) na prática odontológica em geral (BASFORD, 1995; WALSH, 2003). O LBI é utilizado há mais de 30 anos e nenhum efeito adverso foi relatado (GOLDMAN et al., 1987; QADRI et al., 2005). Tem sido estabelecido que a bioestimulação aumentada pelo laser induz mudanças metabólicas intracelulares, resultando em aumento da síntese de ATP (KARU et al., 1995), com uma divisão celular mais rápida, produção de matriz rápida e movimento celular (KHADRA et al., 2005). Os efeitos relatados do LBI incluem a aceleração da cicatrização de feridas (MESTER et al., 1971; HALL et al., 1994), aumento na remodelação e reparo ósseo (UEDA & SHIMIZU, 2001; KHADRA et al., 2004), supressão da dor (ECKERDAL & LEHMANN, 1996), funções antiinflamatórias (FREITAS et al., 2001), estimulação da liberação de endorfina e modulação do sistema imune (NANAMI et al., 1993), regeneração mais rápida de nervos (ROCHKIND et al., 1986) e aumento na formação de novos capilares através da liberação de fatores de crescimento (KOVACS et al., 1974).

O processo de cicatrização ocorre em 3 fases: uma fase de substrato, uma fase proliferativa e uma fase remodeladora. A maioria dos estudos sugerem que a bioestimulação do laser ocorre durante a fase proliferativa (DORTBUDAK et al., 2000). Contudo, o

mecanismo de ação do LBI no processo de cicatrização tecidual ainda não está totalmente compreendido. Acredita-se que o LBI atua na biomodulação tecidual (NICOLAU et al., 2003) através de um processo fotoquímico, no qual o feixe de luz é absorvido pelos componentes intracelulares e convertido em energia metabólica envolvendo o processo de respiração celular por intermédio do citocromo (BELKIN et al., 1988).

O uso do LBI como um agente biomodulador tecidual é bastante controverso, principalmente quando se trata de sua aplicação em tecidos mineralizados. De fato, o LBI é mais freqüentemente utilizado em tecidos moles, mas há um crescente interesse na sua aplicação em tecidos duros (WEBER et al., 2006). Vários estudos demonstraram que o LBI pode potencializar o reparo de defeitos ósseos e fraturas (LUGER et al., 1998; FREITAS et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003; MERLI et al., 2005; WEBER et al., 2006; PRETEL et al., 2007). No entanto, se o LBI pode ser útil como uma modalidade de tratamento na cicatrização de tecidos duros e como isso pode ser benéfico e efetivo, precisa ainda ser determinado. É necessário investigar, completamente, os efeitos do LBI nos tecidos em um nível celular, visto que os mecanismos de ação da terapia clínica com laser no osso não estão totalmente elucidados (COOMBE et al., 2001).

A ação do LBI no processo de regeneração óssea pode ser discutida sob dois aspectos. O primeiro deles refere-se às possíveis alterações nas propriedades dos canais de íons e ao aumento da atividade metabólica de osteoblastos, o que poderia acelerar o processo de reparo ósseo (LUGER et al., 1998; LIND & BUNGER, 2001). O segundo aspecto diz respeito à microcirculação tecidual, que está prejudicada ou ausente nos tecidos injuriados. A presença de vascularização é uma condição fundamental para a ocorrência de osteogênese, determinando os eventos iniciais do processo de reparo ósseo (TRELLES & MAYAYO, 1987). Vários estudos têm demonstrado que o LBI estimula a vascularização tecidual, o que poderia auxiliar o processo de osteogênese (KOVACS et al., 1974; BENEDICENTI et al., 1984; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003).

Vários estudos *in vitro* foram realizados para determinar os efeitos do LBI na cicatrização óssea. Khadra et al. (2005) avaliaram o efeito do LBI na fixação, proliferação, diferenciação e produção do fator de crescimento transformador β_1 (TGF β_1) de osso mandibular humano tratado com laser Gálio-Alumínio-Arsênio (Ga-Al-As) (1.5 J/cm² ou 3 J/cm²). Os resultados deste estudo demonstraram que, em resposta ao LBI, houve uma tendência de aumento na fixação, proliferação, diferenciação celular e produção de TGF β_1 , o que sugere que o LBI pode modular as atividades das células e tecidos ao redor de implantes.

Guzzardella et al. (2002) conduziram um estudo *in vitro* para determinar se a terapia com laser poderia acelerar a cicatrização de defeitos ósseos. Foram criados defeitos ósseos na epífise distal de doze fêmures retirados de seis ratos. Os fêmures foram, então, mantidos em meio de cultura por 21 dias. Seis fêmures foram irradiados diariamente durante 10 dias com o laser Ga-Al-As (300 J/cm^2 , com emissão pulsátil por 10 minutos), enquanto os outros seis fêmures permaneceram em meio de cultura sem nenhuma irradiação. Os níveis de fosfatase alcalina/proteína total, cálcio e óxido nítrico foram avaliados aos 7, 14 e 21 dias para monitorar o metabolismo da cultura óssea. O percentual de cicatrização dos defeitos ósseos foi determinado pela análise histomorfométrica. Após 21 dias, foram observados maiores níveis de fosfatase alcalina/proteína total, cálcio e óxido nítrico nas culturas de fêmures irradiados quando comparadas àquelas de fêmures não irradiados. A taxa de cicatrização na área do defeito também foi maior nos ossos que receberam terapia com laser.

Stein et al. (2008) investigaram os efeitos iniciais do LBI no crescimento e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos humanos *in vitro*. A terapia com o laser exerceu um efeito estimulatório nas células durante as primeiras 72h após a irradiação. Em outro estudo, Yamada et al. (1991) demonstraram que o laser Hélio-Neônio (He-Ne) propiciou efeitos positivos na proliferação, diferenciação e calcificação em uma cultura de células osteoblásticas. O LBI aumentou o acúmulo de cálcio e acelerou a calcificação *in vitro*.

Alguns estudos *in vivo* também confirmaram que o LBI pode promover uma cicatrização óssea mais rápida. Liu et al. (2007) investigaram a cicatrização de fraturas em tíbia de ratos irradiadas com LBI (830nm, modo contínuo, 40 J/cm^2 , 200 mW/cm^2 , 50s, uma vez ao dia por 4 semanas). Os autores sugeriram que o LBI pode acelerar o processo de reparo de fratura ou aumentar o volume do calo ósseo, especialmente em estágios iniciais da cicatrização óssea.

Um estudo realizado em fêmur de ratos avaliou a cicatrização de defeitos ósseos tratados com LBI associado ou não a enxertos ósseos autógenos. As aplicações de LBI foram realizadas durante o trans-operatório somente no leito cirúrgico, somente sobre os enxertos de osso autógeno ou em ambos. Os resultados demonstraram que os defeitos tratados apenas com LBI apresentaram um reparo ósseo melhor qualitativamente e quantitativamente quando comparados aos defeitos não irradiados (controle). Quando o LBI foi associado a enxertos de osso autógeno, o reparo ósseo foi influenciado pelo protocolo de aplicação do LBI. Uma melhor cicatrização foi observada nos defeitos ósseos nos quais o LBI foi aplicado no leito cirúrgico e, posteriormente, sobre os enxertos de osso autógeno (WEBER et al, 2006).

Quando o LBI foi aplicado no período pós-operatório, alguns estudos também demonstraram um melhor processo de reparo ósseo (DE SOUZA MERLI et al., 2005; NISSAN et al., 2006 GERBI et al., 2008). Gerbi et al. (2008) avaliaram o efeito do LBI no reparo de defeitos cirúrgicos criados em fêmures de ratos. O grupo irradiado recebeu sete aplicações a cada 48h, tendo início imediatamente após o procedimento cirúrgico. A terapia com o laser consistiu em $16\text{J}/\text{cm}^2$ por sessão, divididos igualmente sobre quatro pontos em torno do defeito. A eutanásia dos animais foi realizada aos 15, 21 ou 30 dias pós-operatórios. Os resultados histológicos mostraram maior deposição de fibras de colágeno (15 e 21 dias), bem como maior quantidade de osso trabeculado bem organizado nos animais irradiados quando comparados àqueles não irradiados aos 30 dias pós-operatórios, corroborando os achados de De Souza Merli et al. (2005) e Nicolau et al. (2003). Resultados semelhantes também foram observados em defeitos ósseos criados cirurgicamente em mandíbulas de ratos (NISSAN et al., 2006). Neste estudo, o tratamento foi iniciado imediatamente após o fechamento das bordas da ferida com uma aplicação de 3 minutos. Posteriormente, os animais foram irradiados diariamente por 1, 2 ou 4 semanas. (pag 5) O LBI influenciou o processo de cicatrização, aumentando a taxa de calcificação óssea.

A influência de diferentes doses do laser He-Ne (0,03, 0,3 e 0,9 J) na cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em tíbias de ratos foi investigada por Garavello-Freitas et al. (2003). O tratamento com o laser iniciou-se 24 h após a criação dos defeitos cirúrgicos, sendo as aplicações realizadas diariamente por 7 ou 14 dias. Os resultados deste estudo demonstraram que o LBI estimulou o crescimento da área trabecular e a invasão de osteoclastos durante a primeira semana, bem como acelerou a organização da matriz de colágeno na segunda semana quando comparado com os defeitos não irradiados (controle). Em outro estudo, realizado também em tíbias de ratos, Garavello et al. (2004) avaliaram a influência de diferentes doses do laser He-Ne (31,5 e 94,5 J) na formação de novos vasos sanguíneos. Os autores concluíram que a terapia com laser aumentou significativamente o número de vasos sanguíneos nos defeitos ósseos aos 7 dias pós-operatórios quando foi utilizada a densidade de 94,5 J. Já aos 14 dias pós-operatórios, foi observada uma diminuição no número de vasos independentemente da dose de LBI utilizada.

Lirani-Galvão et al. (2006) realizaram um estudo para avaliar os efeitos do LBI no reparo ósseo em tíbias de ratos. Um grupo de animais foi tratado com laser Ga-Al-As ($112,5\text{J}/\text{cm}^2$) com 12 sessões de 2,5 minutos cada, cinco vezes por semana, começando no terceiro dia após a injúria. Foi demonstrado que, nos animais tratados com LBI, a resistência do osso neoformado a cargas foi maior que no grupo de animais não irradiados. Contudo, ainda é

necessário confirmar a fase exata do reparo ósseo em que essa modalidade terapêutica pode ter máxima efetividade.

Khadra et al. (2004) avaliaram o efeito da LBI na cicatrização de implantes de titânio em tíbias de ratos. O laser foi aplicado imediatamente após a cirurgia e por 10 dias consecutivos. O tratamento foi realizado em 6 pontos (20s por ponto, $23\text{J}/\text{cm}^2$) laterais do implante e 3 pontos abaixo dele. A análise histomorfométrica mostrou um maior contato osso-implante no grupo de animais irradiados quando comparados àqueles não irradiados. Este resultado foi corroborado por Jakse et al. (2007), os quais também observaram um maior contato osso-implante em ovelhas.

É importante ressaltar que outros estudos demonstraram efeitos negativos ou ausência de benefícios do LBI na regeneração óssea. David et al. (1996) avaliaram os efeitos do laser He-Ne na cicatrização de fraturas em ratos. As análises radiográficas e histológicas não mostraram qualquer benefício do uso do laser no processo de cicatrização óssea. Biomecanicamente, os ossos irradiados foram significativamente mais fracos do que aqueles não irradiados (controles). Saito & Shimizu (1997) avaliaram o efeito do LBI na regeneração óssea da sutura palatina de ratos durante a expansão ortodôntica. Nenhum efeito foi observado na regeneração óssea quando uma única irradiação foi realizada. Gordjestani et al. (1994), em um estudo piloto em ratos, não encontraram diferenças metabólicas entre o grupo tratado com laser o grupo controle.

As controvérsias em relação ao efeito do LBI na cicatrização tecidual devem-se às múltiplas variáveis que envolvem essa terapia, tais como o comprimento de onda, potência, energia, densidade da energia, duração do tratamento e o método de aplicação. A densidade da energia parece ser o único parâmetro de tratamento com efeito doses-dependentes previsíveis (WOODRUFF et al., 2004).

Segundo Khadra et al. (2004), um dos fatores que podem explicar os resultados controversos dos efeitos do LBI em estudos que usam controles internos (o lado contralateral do mesmo animal/paciente) é que o LBI pode estimular a liberação de substâncias, como fatores de crescimento e citocinas no sistema circulatório, podendo afetar também o lado não tratado de um animal experimental ou indivíduo.

Deve-se ressaltar também que baixas dosagens do LBI não possuem nenhum efeito. Já dosagens muito altas pode apresentar pequenos ou até mesmo nenhum efeito, enquanto dosagens excessivas podem resultar em efeitos inibitórios. (GROSS & JELKMANN, 1990; WALSH 1997).

3. Associação Plasma Rico em Plaquetas/Laser de Baixa Intensidade

O desenvolvimento da tecnologia do laser representa talvez uma das modalidades mais promissoras de tratamento para melhorar biomateriais através do aumento da adesão osteoblástica e migração de vasos, proporcionando um sítio adequado para minimizar os danos aos tecidos (LEWANDROWSKI et al., 1996; ROMANOS et al., 2000; artigo radmila 2009 pag 449).

Sabe-se que o LBI contribui para aumentar a formação de novos capilares através da liberação de fatores de crescimento (KOVACS et al., 1974). Os fatores de crescimento representam um papel no controle da degradação do colágeno, recrutamento e formação de novos fibroblastos, formação de novo colágeno, componentes da matriz e novos vasos sanguíneos. (WAHL & CATELY, 1983).

Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado o potencial da associação do PRP e do laser. Arora et al. (1993) observaram que a exposição do PRP à irradiação laser a 3.5 W por 30 segundos reduziu as concentrações limite da adenosina difosfato e L-epinefrina necessárias da agregação completa da plaquetas por 20% a 60% e por 30% a 50%, respectivamente. A irradiação do PRP com laser também aumentou o nível basal de tromboxana A₂ de menos que 0.5 pmol/10⁸ plaquetas por cada segundo de exposição. Estudos de microscopia eletrônica indicaram que a estimulação induzida pelo laser da produção de tromboxana A₂ na plaqueta pode ocorrer sem qualquer dano notável na estrutura celular.

Doerger et al. (1988) realizaram um estudo onde várias preparações de plaquetas no PRP e no sangue periférico, com ou sem aspirina, foram testados com os agentes agregadores Adenosina Difosfato, colágeno, trombina e epinefrina. Liberação simultânea de Adenosina Trifosfato (ATP) foi também medida no PRP. Em níveis relativamente baixos de irradiação, a agregação plaquetária foi potencializada. A potencialização foi evidenciada por um aumento na porcentagem de agregação, início mais precoce da reação e redução na quantidade requerida de agente agregador. No PRP, o mecanismo de potencialização do laser pareceu ser a liberação de ATP endógena das plaquetas. Em níveis relativamente altos de irradiação, as plaquetas foram destruídas e a agregação abolida. A ingestão de aspirina inibiu os efeitos do laser no PRP mas não no sangue periférico.

Olban et al. (1998), avaliaram o efeito bioestimulatório da irradiação de laser vermelho na função de plaquetas em porcos. Os resultados indicaram que esta irradiação

induz: 1) o processo secretório da plaqueta e a liberação de substâncias estocadas nos grânulos específicos; e 2) peroxidação lipídica, parcialmente devido à estimulação do araquidonato e produção de seus metabólitos reagindo com o ácido tiobarbitúrico.

Portanto, estudos *in vivo* são necessários para avaliar o verdadeiro potencial da associação de LBI e PRP.

4. Conclusão

A utilização do PRP como substituto ou potencializador dos procedimentos de enxertia e otimizador do processo de reconstrução tecidual abre, sem dúvidas, novos horizontes para futuras pesquisas, sendo um campo promissor para alcançar o verdadeiro objetivo da engenharia tecidual, isto é, proporcionar ao paciente a recuperação total e funcional dos seus tecidos perdidos com rapidez e menor morbidade (MESSORA, 2005).

Encontram-se na literatura vários estudos com resultados conflitantes sobre a associação do PRP com diversos materiais e enxertos ósseos. Essas discrepâncias são provavelmente relacionadas à falta de padronização adequada e definição dos protocolos de preparo do PRP (ANITUA et al., 2006). Os protocolos e técnicas cirúrgicas usados no preparo e administração do PRP diferem largamente (WEIBRICH et al., 2005; SÁNCHEZ et al., 2003). Essas variações podem influenciar consideravelmente os efeitos biológicos do PRP (ANITUA et al., 2006). Recentes estudos também têm observado diferenças nos níveis de fatores de crescimento em amostras de PRP com a mesma concentração de plaquetas (MARTINEAU et al., 2004; FRÉCHETTE et al., 2005). Além disso, há poucos estudos que tenham analisado o uso isolado do PRP na reconstrução dos tecidos duros e estes apresentam resultados contraditórios. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de novos estudos padronizados para avaliar o uso isolado do PRP no reparo ósseo. Somente então, fundamentado em bases científicas confiáveis, é que o PRP poderia ser integrado na rotina dos procedimentos cirúrgicos odontológicos (Messora et al, 2006).

O LBI tem sido indicado para diferentes tratamentos clínicos. As finalidades de sua aplicação variam desde o controle da dor até o estímulo de complexos mecanismos envolvidos na cicatrização tecidual. (PRETEL et al., 2007). Encontram-se na literatura vários estudos com resultados conflitantes sobre os efeitos do LBI na regeneração de tecidos duros e moles. As controvérsias em relação ao efeito do LBI na cicatrização tecidual devem-se às múltiplas variáveis que envolvem esta terapia, tais como o comprimento de onda, potência, energia, densidade da energia, duração do tratamento e o método de aplicação. Se a LBI pode ser útil como uma modalidade de tratamento na cicatrização de tecidos duros e como isso pode ser benéfico e efetivo, precisa ainda ser determinado.

Existem algumas evidências científicas derivadas de estudos *in vitro* que suportam o possível benefício da associação LBI e PRP na regeneração tecidual. Contudo, estudos *in vivo* são necessários para avaliar a real influência dessa combinação de tratamentos no processo regenerativo.

5. Referências Bibliográficas

- AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Investigation of platelet rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 60, n. 10, p. 1176-1181, Out. 2002.
- AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 19, n. 1, p. 59-65, Jan./Fev. 2004.
- 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, Abr. 2005.
- AMORIM J.C. et al. Clinical study of the gingiva healing after gingivectomy and low-level laser therapy. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, p. 588-594, 2006.
- 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.
- ARORA, R. R.; MUELLER, H. S.; SINHA, A. K. Laser-induced stimulation of thromboxane B2 synthesis in human blood platelets: Role of superoxide radicals. **Am. Heart J.**, v.125, p.347-362, 1993.
- 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.
- BASFORD J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med.**, v. 16, p. 331-342, 1995.
- 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.
- BELKIN M, ZATURUNSKY B, SCHWARTZ M. A critical review of low energy laser bioeffects. **Laser Light Ophthalmol.**, v. 2, p. 63-71, 1988.
- BENEDICENTI, A. et al. The argon laser in dentistry. **Parodontol Stomatol (Nuova)**, v. 23, n. 3 (Suppl 3), p.127-138, Sep-Dec 1984.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. O sistema cardiovascular. In: **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 303-308.

BRAEKT M.M. et al. Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. **Laser Surg Med** v. 11, p. 462–470, 1991.

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.

CAMARGO, P. M. et al. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **J. Periodontal Res.**, v. 37, n. 4, p. 300-306, Aug. 2002.

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

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.

CHESMEL, K. D. et al. Healing response to various forms of human demineralized matrix in athymic rat cranial defects. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 7, p. 857-863, July 1998.

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.

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.

COOMBE, A.R. et al. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin Ohthod Res.**, v. 4, n. 1, p. 3-14, Feb 2001.

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.

DAVI R. et al. Effect of low-power (He-Ne) laser on fracture healing in rats. **Laser Surg Med.**, v. 19, p. 458–464, 1996.

DAVID, R. et al. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. **Lasers Sur Med.**, v. 19, n. 4, p. 458-464, 1996.

DE ALMEIDA, J.M. et al. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 78, n. 3, p. 566-575, Mar 2007.

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.

DE SOUZA MERLI, L.A. et al. Effect of Low-Intensity Laser Irradiation on the Process of Bone Repair. **Photomedic and Las Surg.**, v. 23, n. 2, p. 212-215, 2005.

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.

DORTBUDAK, O; HAAS, R; MALLATH-POKORNY G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Implants Res.**, v. 11, n. 6, p. 540-545, Dec 200.

DOERGER PT, GLUECK HI, MCGILL M. The effects of argon laser on in vitro aggregation of platelets in platelet rich plasma and whole blood. **Thromb Res.**, v. 50, n. 5, p. 657-667, Jun 1 1988.

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)

ECKERDAL, A.; LEHMANN, B. H. Can low reactive level laser therapy be used in the treatment of neurogenic facial pain? A Double blind placebo controlled investigation of patients with trigeminal neuralgia. **Laser Ther.**, v.8, p. 247-252, 1996.

EFGOGLU, 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.

ENWEMEKA C.S. et al. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomed. Laser Surg.**, v. 22, p. 323-329, 2004.

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.

FONTANA S. et al. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. **Implant Dent.**, v. 13, n. 1, p. 73-78, Mar. 2004.

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.

FREITAS I.G.F., BARANAUSKAS V, CRUZ-HOLING MA. Laser effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci.**, v. 154/155, p. 548-554, 2000.

FRECHETTE JP, 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

FREYMLER, 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.

FUERST, G. et al. 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.**, v. 15, n. 3, p. 301-307, June 2004b.

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.

GERBI, M.E.M. et al. Infrared Laser Light Further Improves Bone Healing When Associated with Bone Morphogenic Proteins: An in vivo Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 55-60, 2008.

GARAVELLO, I; BARANAUSKAS, V; CRUZ-HOFLING, M.A. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. **Histology and Histopathology**, v. 19, p. 43-48, 2004.

GARAVELLO-FREITAS, I. et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J. of Photochem. and Photobiol. B: Biol.**, v. 70, p. 81-89, 2003.

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.

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.

GOLDMAN, L; GOLDMAN, B; VAN LIEU, N. Current laser dentistry. **Lasers Surg Med.**, v. 6, p. 559-562, 1987.

GRAGEDA, E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. **Implant Dent.**, v. 13, n. 4, p. 301-309, Dec. 2004.

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.

GRESNER P, WATAŁA C, SIKUROV • L. The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets. **J Photochem. Photobiol. B.**, v. 4/79, p. 43-50, 2005.

GROSS, A.J.; JELKMANN, W. Helium-neon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture. **Lasers Surg. Med.**, v. 10, n. 1, p. 40-44, 1990.

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

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. (Abstract)

HOLLINGER, J. O. et al. An evaluation of two configurations of tricalcium phosphate for treating craniotomies. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 23, n. 1, p. 17-29, Jan. 1989.

ISHIKAWA, I. et AL. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? **Periodontology 2000**, v. 50, p. 90-126, 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 low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. **Clin. Oral Impl. Resear.**, v. 18, p. 517-524, 2007.

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.

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, 1999. p. 428-462.

KARU, T. Mechanism of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proceedings of the Int Soc for Opt Eng**, v. 2630, p. 2-9, 1995

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.

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.

KHADRA, M. et al. Enhancement of bone formation in rat Calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral surg. oral med. oral pathol.**, v. 97, n. 6, p. 693-700, Jun 2004.

- KHADRA, M. et al. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.73, p. 55-62, 2005.
- KIM, E. S.; PARK, E. J.; CHOUNG, P. H. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. **J. Prosthet. Dent.**, v. 86, n. 4, p. 428-433, Oct. 2001.
- 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.
- KOVACS, I.B. et al. Laser-induced stimulation of the vascularization of the healing wound. An ear chamber experiment. **Experientia**, v. 30, n. 4, p. 341-343, Apr 1974.
- 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.
- LANDESBURG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risks of using platelet rich plasma gel. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 9, p. 1116-1117, Sep. 1998.
- LANDESBURG, 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.
- LANDESBURG, 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.
- LEKOVIC, V. et al. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 2, p. 198-205, Feb. 2002.
- LEWANDROWSKI, K.U. et al. Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery: comparison of bone healing in laser and drill osteotomies. **Lasers Surg Med.**, v. 19, n. 1, p. 40-45, 1996.

- 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.
- LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathol. Int.**, v. 50, n. 8, p. 594-602, Aug. 2000.
- 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.
- LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. Effect on osteoblasts, osteotomies, and implant fixation. **Acta Orthop. Scand. Suppl.**, v. 283, p. 2-37, Oct. 1998.
- LIND M, BÜNGER C. Factors stimulating bone formation. **Eur Spine J.**, v. 10, Suppl 2, p. 102-109, Oct 2001.
- 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.
- LIU, X. et al. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. **Photomed Laser Surg.**, v. 25, n. 6, p. 487-494, Dec 2007.
- LIRANI-GALVÃO, A.P; JORGETTI, V; DA SILVA, O.L. Comparative Study of How Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasound Affect Bone Repair in Rats. **Photomed. and Laser Surg.**, v. 24, n. 6, p. 735-740, 2006.
- LOZADA, J. L. et al. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I – Background and processing techniques. **J. Oral Implantol.**, v. 27, n. 1, p. 38-42, 2001.
- LUGER, E.J. et al. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med.**, v. 22, p. 97-102, 1998.
- 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.
- LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. Tissue Engineering. Chicago: **Quintessence**, 297, 1999.
- MANCUSO, J. D. et al. Platelet-rich plasma: a preliminary report in routine impacted mandibular third molar surgery and the prevention of alveolar osteitis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, suppl, p. 40, 2003. (Abstract)

MARTINEAU, I.; LACOSTE, E.; GAGNON, G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. **Biomaterials**, v.25, p.4489-4502, 2004.

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.; 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, 1999. p.183-189.

MARX, R. E. Discussion: Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, n. 3, p. 300-3001, Mar. 2000.

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.

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.

MERLI, L.A.S. et al. Effect of Low-Intensity Laser Irradiation on the Processo f Bone Repair. **Photomed. and Laser Surg.**, v. 23, n. 2. p. 212-215, 2005.

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, 2008.

MESSORA, M.R. **Influência do Plasma Rico em Plaquetas no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos. Estudo histológico e histométrico**. 2005. 134. Mestre em Odontologia (Área de Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araçatuba, 2005.

- MESTER, E. et al. Effects of the laser in wound healing. **Lyon Chir.**, v. 67, n. 6, p. 416-419, Nov-Dec 1971.
- MIDDA, M; RENTON-HARPER, P. Lasers in dentistry. **Br Dent J.**, v. 170, n. 9, p. 343-346, 1991.
- MILLER, M; TRUHE, T. Lasers in Denstistry: an overview. **JADA**, v. 124. p. 32-35, Feb. 1993.
- 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, 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
- NANAMI, T. et al. Clinical applications and basic studies of laser in dentistry and oral surgery. **Keio J Med.**, v. 42, p. 199-201, 1993.
- NEMZEK J. A. et al. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. **Lab. Anim.**, v. 35, n. 2, p. 147-52, Apr. 2001.
- NICOLAU RA, JORGETTI V, RIGAU J, ET AL. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci.**, v. 18, p. 89-94, 2003.
- 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.
- NISSAN, J. et al. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **J. of Oral Rehabil.**, v. 33, p. 619-624, 2006.
- NODA, M.; CAMILLIERE, J. J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. **Endocrinology**, v. 124, p. 2991–2994, June 1989.
- OBRADOVIĆ, R. R.; KESIĆ, L. G.; PEŠEVSKA, S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. **Lasers Med. Sci.**, v.24, p.447-451, 2009.
- OLBAN M. et al. The biostimulatory effect of red laser irradiation on pig blood platelet function. **Cell Biol Int.**, v. 22, p. 245-248, 1998.

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.

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.

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)

PFEILSCHIFTER, J. et al. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: A comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. **Endocrinology**, v. 127, p. 69-75, July 1990.

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.

PINHEIRO ALB, LIMEIRA JUNIOR FA, GERBI MEM, ET AL. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J. Clin. Med. Surg.**, v. 21, p. 383-388, 2003.

PLACHOKOVA, A.S. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry. **Clin Oral Impl Res.**, v. 19, p. 539-454, 2008.

PRETEL H, LIZARELLI RF, RAMALHO LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. **Lasers Surg Med.**, v. 39, p. 788-7, 2007.

PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 9, p. 966-972, Sep. 2005.

QADRI T. et al. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. **J Clin Periodontol.**, v. 32, p. 714-719, 2005.

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.

ROMANOS, G. E.; EVERTS, H.; NENTWIG, G.H. Effects of diodo and Nd: YAG laser irradiation on titanium discs: a scanning electron microscope examination. **J. Periodontol.**, v.71, p.810-815, 2000.

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.

ROCHKIND, S. et al. Electrophysiological effect of HeNe laser on normal and injured sciatic nerve in the rat. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 83, n. 3-4, 125-130, 1986.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. 1: **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v. 111, n. 5, p. 525-532, May 1997.

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

SAMMARTINO, G. et al. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 63, n. 6, p. 766-770, June 2005.

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, 2004. p. 3-44.

SCHLEGEL, K. A. et al. Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. **Int. J. Oral Maxillofac. Impl.**, v. 18, n. 4, p. 505-511, July/Aug. 2003.

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

SCHLIEPHAKE, H. et al. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 15, n. 1, p. 112-118, Feb. 2004.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop.**, v. 205, p. 299-308, Apr. 1986.

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.

SIMON, D. et al. Potential for osseous regeneration of platelet-rich plasma--a comparative study in mandibular third molar sockets. **Indian Dental J Res.**, v. 15, n. 4, p. 133-136, Oct-Dec 2004.

SIKAVITSAS, V. I. et al. Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 67, n. 3, p. 944-951, Dec.1 2003.

SMITH, C. N.; NEPTUN, D. A.; IRONS, R. D. Effect of sampling site and collection method on variations in baseline clinical pathology parameters in Fischer-344 rats. II. **Clinical hematology. Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 7, n. 4, p. 658-663, Nov. 1986.

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.

STEIN, E. et al. Initial Effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. **Wiener Klin Wochens.**, v. 120, n. 3-4, p. 112-117, 2008.

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. Impl.**, v. 19, n. 6, p. 832-838, Nov./Dec. 2004.

SUBER, R. L.; KODELL, R. L. The effect of three phlebotomy techniques on hematological and clinical chemical evaluation in sprague-dawley rats. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 14, n. 1, p. 23-30, 1985.

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.

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann. Surg.**, v. 196, n. 1, p. 100-109, July 1982.

TAM G. Low power laser therapy and analgesic action. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 17, p. 29-33, 1999.

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.

TRELLES, M.A; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Sur Med.**, v. 7, p. 36-45, 1987.

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.

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.

UEDA, Y; SHIMIZU, N. Pulse irradiation of low-power stimulates bone nodule formation. **J Oral Sci.**, v. 43, p. 55-60, 2001.

VANDER, A. J. et al. Circulação. In: _____. **Fisiología Humana: os mecanismos da função de órgãos e sistemas**. São Paulo: MCGraw-Hill, 1981. p. 368-377.

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 Scienc.**, v. 105, n. 1, p. 59-66, Feb.1997.

YAMADA, K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). **Nippon Siekeigeka Gakkai Zasshi**, v.65, p. 787-799, 1991.

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.

YAZAWA, M. et al. Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. **J. Craniofac. Surg.**, v. 15, n. 3, p. 439-446, May 2004a.

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.

WAHL, S. M.; CATELY, C. L. Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T-cell and continuous T cell line origin. **J. Immunol.**, v.130, p. 1226-1230, 1983.

WALSH, L.J. The current status of laser applications in dentistry. **Aust Dent J.**, v. 48, n. 3, p. 146-155, quiz 198, Sep 2003.

WALSH L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Aust Dent J.**, v. 42, p. 247-254, 1997.

WANG, J. et al. Expression of bone microsomal casein kinase II, bone sialoprotein, and osteopontin during the repair of calvarial defects. **Bone**, v. 22, n. 6, p. 621-628, June 1998.

WEBER J.B. et AL. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. **Photomed Laser Sur.**, v. 24, p. 38-44, 2006.

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.

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

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. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 20, n. 1, p. 118-123, Jan./Feb. 2005.

WEDLOCK P. et al. Analgesic effects of cranial laser. treatment in two rat nociception models. **Physiol Behav.**, v. 59, p. 445-448, 1996.

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. 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.

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.

WOODRUFF, L.D. et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed Laser Surg.**, v. 22, n. 3, p. 241-247, Jun 2004.

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