

José Henrique Rodrigues Ortega

O uso de Fatores de Crescimento em implantologia: revisão bibliográfica

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Porto, 2014

José Henrique Rodrigues Ortega

O uso de Fatores de Crescimento em implantologia: revisão bibliográfica

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Porto, 2014

José Henrique Rodrigues Ortega

O uso de Fatores de Crescimento em implantologia: revisão bibliográfica

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Medicina Dentária

Resumo:

Nos últimos anos têm sido alvo de estudo, as potencialidades do uso de fatores de crescimento na área da medicina, e da implantologia em particular.

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos que regulam eventos celulares no processo de cura e reparação tecidual, tais como quimiotaxia, mitogenese, osteogenese, osteoindução, etc.

Contudo, a falta de standardização dos métodos de obtenção e aplicação levam a conclusões controversas quanto à sua eficácia e benefícios terapêuticos.

Estão disponíveis no mercado vários tipos de fatores de crescimento, como por exemplo PDGF, BMP, IGF, FGF, TGF, PRGF Endoret, etc., todos eles com aplicabilidades semelhantes mas com potenciais efeitos diferentes.

Sendo certo que mediante os estudos efetuados seja “*in vitro*”, em animais ou em humanos, mais testes terão que ser feitos para serem apresentados resultados inequívocos dos benefícios dos fatores de crescimento.

O objetivo deste trabalho é analisar diferenças entre vários fatores de crescimento e sua preparação, para serem usados na área da implantologia.

Palavras chave: growth factors, bone regeneration, PRGF, periodontal regeneration.

Abstract:

In the last years have been studied, the potential use of growth factors in medicine and implantology in particular.

These proteins are biological mediators that regulate cellular events in healing and tissue repair, such as chemotaxis , mitogenesis , osteogenesis , osteoinduction , etc. process.

However, the lack of standardization of methods of obtaining and applying lead to controversial conclusions as to its efficacy and therapeutic benefits.

There are several kinds of growth factors such as PDGF, BMP , IGF , FGF , TGF , PRGF Endoret, etc., all of them with similar potential applicability but with different potential effects .

Given that, more studies carried out "in vitro " , in animals or humans, will have to be made to appear unambiguous results of the benefits of growth factors.

The objective of this work is to analyze the differences between various growth factors and its preparation, for use in the field of implantology.

Key words: growth factors, bone regeneration, PRGF, periodontal regeneration.

Dedico esta tese,

Aos meus filhos, Henrique e Dinis por serem
minha inspiração e felicidade.

À minha esposa por todo o carinho e compreensão

E à minha mãe em especial por todo o apoio
incondicional

Agradecimentos

À Dra. Ana Rita Nóbrega docente do curso de Medicina Dentária da faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa por todo o ensinamento e pela orientação de esta tese.

A todos os professores que tive durante este período da minha vida e que contribuíram para o enriquecimento da minha sabedoria.

Ao Prof. Dr. Frias Bulhosa pela ajuda na organização das referências bibliográficas.

À Prof. Dra. Sandra Gavinha pelas orientações dadas quando necessitei delas.

A todos os colegas de turma pelos agradáveis momentos que proporcionaram ao longo destes anos.

Às duas binómias que tive na clínica, a Sara e a Cláudia pelo apoio e confiança.

À D. Ana Galvão pela excelente ajuda na obtenção de inúmeros artigos científicos para apoio na elaboração desta tese.

A todos os funcionários, sempre presentes quando necessários

Aos pacientes que atendi, pois sem eles a minha formação não teria sido completa.

E a todos que de uma forma direta ou indireta participaram neste meu percurso académico.

INDÍCE

| | |
|--|-----|
| Índice de Imagens, | ii |
| Índice de Abreviaturas, | iii |
| Índice de Quadros, | iv |
| I – Introdução , | 1 |
| II – Materiais e Métodos,..... | 2 |
| III – Fatores de crescimento ,..... | 3 |
| 1 – PDGF ,..... | 6 |
| 1.1 – Preparação de PDGF-BB,..... | 9 |
| 2 – IGF , | 10 |
| 2.1– Preparação do IGF, | 11 |
| 3 – TGF- β , | 12 |
| 3.1 – Preparação de TGF- β , | 13 |
| 4 – BMP _s ,..... | 14 |
| 4.1 - Origem e obtenção , | 16 |
| 5 – VEGF , | 17 |
| 5.1 – Preparação do VEGF , | 18 |
| 6 – EGF , | 19 |
| 6.1 – Preparação de EGF , | 21 |
| 7 – PRGF , | 22 |
| 8 – PRGF-Endoret [®] , | 24 |
| 9 – Protocolo de preparação de PRGF-Endoret [®] ,..... | 25 |
| 10 – Segurança clínica da aplicação de Fatores de Crescimento ,..... | 31 |

| | |
|--------------------------|----|
| IV – Conclusão , | 37 |
| V – Bibliografia , | 38 |

ÍNDICE DE IMAGEM

| | |
|---|----|
| Figura 1: Processo de produção de fatores de crescimento, | 4 |
| Figura 2: Mecanismo de VEGF na pele, | 18 |
| Figura 3: O epitélio estratificado pavimentoso gengival (EG) justapõem-se com espessura normal logo após a aplicação do cicatrizador ou do intermediário e coroa. O EGF (setas) das próprias células epiteliais estimula a proliferação epitelial peri-implantar e inicia a formação do epitélio juncional peri-implantar. O EGF da saliva (S) participa neste processo, pois aumenta muito quando ocorrem cirurgias orais, | 20 |
| Figura 4: O epitélio juncional peri-implantar (EJ) ganha mais camadas de células e assume uma conformação semelhante à do epitélio juncional dos dentes naturais, | 21 |
| Figura 5: Recolha de 10 ml de sangue venoso do paciente, | 26 |
| Figura 6: Tipo de tubos de ensaio para colocação do sangue do paciente, | 27 |
| Figura 7: Centrifugação dos tubos de ensaio para separação das fases, | 27 |
| Figura 8: Tubo com as fases separadas, | 28 |
| Figura 9: the plasma transfer device ,PTD., | 28 |
| Figura 10: Esquema geral da obtenção de PRGF Endoret®,..... | 29 |
| Figura 11: Algumas das aplicabilidades do PRGF-Endoret., | 30 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg – Micrograma

µl –Microlitro

BMP –Bone morphogenetic protein

BSA – Bovine serum albumin

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Deoxyribonucleic acid

EGF – Epidermal growth factor

FBS - Fetal bovine sérum

FC – Fator de crescimento

FDA – Food and Drug Administration

FGF – fibroblast growth factor

HCl – Ácido Clorídrico

IGF – Insulin growth factor

KGF –Keratinocit growth factor

mM – Milímol

PDGF – Platelet-derived growth factor

PRGF – plasma rich in growth factors

PRGF Endoret® - plasma rich in growth factors By BTI®

RNA – Ribonucleic acid

RTC – Estudo clínico multicêntrico, randomizado, triplo cego

TGF – Transforming growth factor

VEGF – Vascular endothelial growth factor

INDÍCE DE QUADROS

| | |
|---|---|
| Quadro adaptado do livro Tratado de Periodontia clínica e Implantologia Oral de Jan Lindhe, | 5 |
|---|---|

I - INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, acompanhando a necessidade de novas terapias na área da medicina, têm-se desenvolvido novos meios de possibilitar regeneração tecidual, diminuição da inflamação, efeito anti microbiano, mais rápido e se possível sem efeitos adversos.

Com o estudo dos fatores de crescimento, tem sido possível otimizar tais propriedades.

Na área da implantologia, onde regeneração tecidual, seja óssea seja ao nível de tecidos moles, tem um papel fundamental, impõe-se um estudo aprofundado da potencial utilização de fatores de crescimento, tendo a possibilidade de serem obtidos de maneira rápida, relativamente barata, e sendo o paciente o seu dador.

A utilização de biomateriais em implantologia, tem vindo a evoluir e a tornar-se cada vez mais importante, para poderem ser usados como material reparador e de preenchimento, como por exemplo na falta de osso para a colocação de implante, para melhor estabilidade.

Existem várias complicações na recolha de enxertos autógenos devido à escassez de sítios dadores, dificuldade na coleta e correta utilização, nomeadamente obtenção de uma boa revascularização do osso, podendo dessa maneira comprometer todo o processo (Schimming, *et al.*, 2004)

Na maior parte das vezes o osso disponível, seja pelo fator idade ou devido a perda dentária, em que há grande reabsorção óssea, é reduzido, sendo então necessário recorrer-se a enxertos.

Os enxertos ósseos podem-se classificar segundo a sua origem, podendo ser autoenxertos, aloenxertos, ou xenoenxertos.

A estrutura óssea pode ser de três tipos, cortical, esponjoso e corticoesponjoso.

Finalmente quanto à técnica de implantação dos diferentes enxertos, pode ser *onlay*, *inlay*, enxertos pediculados e enxertos livres (Raspal, *et al.*, 1997).

Com a utilização de FC, foi possível em conjunto com biomateriais ou em separado, potencializar e melhorar a regeneração tecidual, proporcionando melhores taxas de sucesso em colocação de implantes (Rodriguez, *et al.*, 2003).

“ O uso de fatores de Crescimento em implantologia”, é o tema abordado neste trabalho, por ser atual, estar em franco desenvolvimento e estudo.

Pretende-se efetuar uma revisão bibliográfica, para poder comparar os diferentes fatores de crescimento, suas propriedades, aplicabilidades, meios de obtenção, e comparar as diferentes opiniões formadas de diferentes autores quanto à utilização de fatores de crescimento.

Por fim tentar-se-á concluir sobre a eficácia do seu uso na área da implantologia, obtendo resposta a questões como:

1. Terão os fatores de crescimento influência na resposta inflamatória de modo a diminuí-la?
2. Serão responsáveis pela quantidade e rapidez na regeneração tecidual?
3. Os resultados da aplicação dos fatores de crescimento serão dependentes da sua concentração, preparação e aplicação?
4. E teremos já atingido o conhecimento da sua correta utilização?

II- Materiais e Métodos:

Para o estudo realizado foi feita busca de artigos científicos on-line, na base de dados da Pubmed, Scielo, b-on, assim como em livros.

Não se balizaram datas dada a importância na recolha de artigos, tentando utilizar os mais recentes como base de informação.

Foram utilizados como termos de pesquisa “ growth factors, bone regeneration, PRGF, periodontal regeneration “.

Como critérios de inclusão foram usados estudos clínicos em animais, em humanos e “*in vitro*”. Como critérios de exclusão, todos os artigos que não estivessem escritos em Inglês, Espanhol e Português.

Depois de analisados segundo os critérios referidos, dum total de 224 artigos foram utilizados como referência para estudo 156.

Foram também utilizados livros para pesquisa neste estudo, sendo estes referenciados.

III- Fatores de crescimento

Fatores de crescimento (FC), são proteínas produzidas por células do próprio tecido, mediando os fenómenos de comunicação celular, responsáveis pelos processos de reparação tecidular e sua regeneração.

Estão presentes em maior concentração quando há necessidade de remodelação ou reparação, desempenhando papéis importantes nos processos de proliferação celular, diferenciação, quimiotaxia, formação de matriz, angiogênese, mitogênese, entre outros. (Howell, *et al.*, 1997)

Conhecendo as suas características genéticas, foi possível classifica-los mediante características comuns, resultando vários grupos de FC, (Arnás, *et al.*, 2002), tais como os derivados de plaquetas, como os PDGF, TGF- β , VEGF, EGF, os derivados de células de origem de macrófagos, FGF-2, PDGF, IGF-II, os derivados de queratinocitos, KGF, os resultantes de osteoblastos, BMP 2-4, BMP-7, etc.

A maior parte dos fatores de crescimento e os seus péptidos são obtidos por biotecnologia, pela técnica de produção de proteínas recombinantes, a mesma técnica adotada na produção de vacinas e antibióticos.

Um sequenciamento de aminoácidos obtidos do DNA humano é inoculado na bactéria *E.coli* que por processo fermentativo produz os fatores de crescimento.

Após o processo de isolamento e purificação, os FC são nanocapsulados para viabilizar a permeabilidade cutânea e proteção contra proteases endógenas.

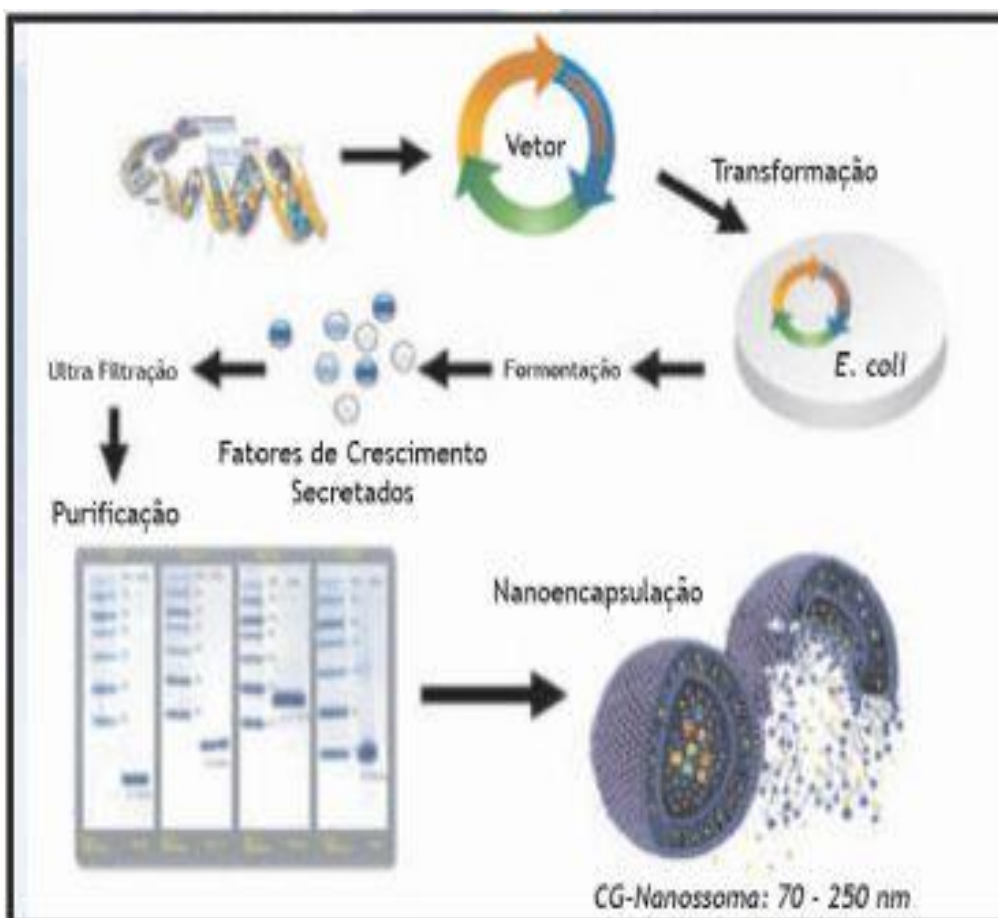


Figura 1- Processo de produção de fatores de crescimento . (Home Page da PharmaSpecial)

| Fator de crescimento | Células de origem | Funções |
|-----------------------------|---|--|
| PDGF | Plaquetas | Aumenta a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos |
| TGF-β | Plaquetas, leucócitos, fibroblastos | Aumenta a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, Libertação autocrina, geração de citocinas adicionais e quimiocinas |
| VEGF | Plaquetas, leucócitos, fibroblastos | Aumenta a permeabilidade vascular |
| EGF | Macrófagos, células mesenquimais, plaquetas | Estimula a proliferação epitelial e a migração |
| KGF | Queratinocitos, fibroblastos | Estimula a proliferação e a migração epitelial |
| PDGF | Macrófagos, células endoteliais | Estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de ECM, aumenta a quimiotaxia, a proliferação e a diferenciação das células endoteliais |
| TGF-β | Macrófagos, leucócitos, fibroblastos | Estimula a proliferação e a migração epitelial, Estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de ECM, inibe a protease e aumenta a produção de inibidores |
| VEGF | Macrófagos | Aumenta a quimiotaxia de células progenitoras endoteliais, estimula a proliferação de células endoteliais |
| BMP 2-4 | Osteoblastos | Estimula a migração de células progenitoras mesenquimais |
| BMP-7 | Osteoblastos | Estimula a diferenciação osteoblastica e condroblastica |
| FGF-2 | Macrófagos, células endoteliais | Estimula a migração de células progenitoras mesenquimais |
| IGF-II | Macrófagos, fibroblastos | Estimula a proliferação de osteoblastos e a síntese de matriz óssea |
| PDGF | Macrófagos, osteoblastos | Estimula a diferenciação de fibroblastos dentro de miofibroblastos, estimula a proliferação de células mesenquimais progenitoras |
| TGF-β | Fibroblastos, osteoblastos | Induz células endoteliais e apoptose fibroblastica, induz diferenciação de fibroblastos dentro de miofibroblastos, osteoblastos estimula a quimiotaxia e a sobrevivência de osteoblastos |
| VEGF | Macrófagos | Quimiotaxia de células-tronco mesenquimais, efeito de antiapoptose sobre as células que forma osso, promoção de angiogenese |

Quadro 2 : Quadro adaptado do livro Tratado de Periodontia clínica e Implantologia Oral de Jan Lindhe.

1. PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas.

Este fator de crescimento é uma proteína catiónica dimérica existente maioritariamente em granulos α -plaquetários, (Lynch, *et al.*, 1991) sendo libertados durante a cascata de coagulação. Existem também em menor quantidade em monócitos, macrófagos, células endoteliais, em fibroblastos e na própria matriz ossea, (Anitua, *et al.*, 1999).

Foi primeiramente identificado, (Roos, *et al.*, 1974), (Kohler, *et al.*, 1974), como um potente agente mitogénico e quimiotático para osteoblastos.

Foi verificado, (Sant'Ana, 2001), também o aumento de células produtoras de colagénio, um período de tempo maior na secreção da quantidade total de colagénio, o estímulo da resposta ossea indutora em enxertos de osso desmineralizado. Também foi verificada estimulação de síntese de DNA.

O PDGF atua sobre a célula alvo ativando os recetores α e β , (Hart, *et al.*, 1988), (Heldin, *et al.*, 1988), que estão relacionados estruturalmente à proteína tirosina quinase. Esta ativação ocorre por homodimerização ou heterodimerização, formando cadeias polipeptídicas A ou B, podendo apresentarem-se em três formas, a AA, a BB e a AB, sendo elas todas biologicamente ativas.

O PDGF-BB tem igual afinidade para os recetores α e β , enquanto que o PDGF-AA tem afinidade exclusiva ao recetor α . Estes dois recetores induzem resposta mitogénica, mas só o β tem capacidade de estimulação quimiotática, (Anitua, *et al.*, 1999).

Por isso, para que exista uma maior resposta, é necessário a ativação de ambos os recetores (Lalani, 2003), sendo os efeitos do PDGF exercidos após união aos mesmos. (Arnás, 2002).

O (FC) PDGF-AA, é secretado maioritariamente pelos fibroblastos, células musculares lisas e osteoblastos. A forma –BB parece estar mais associada a macrófagos.

As plaquetas produzem as formas A e B, sendo que as suas proporções são 23% BB, 65% AB e 12% AA. Vai depender dos RNA mensageiros produzidos e da eficácia da tradução o tipo de PDGF a ser produzido, (Anitua, 2000).

Foram recentemente identificadas duas novas formas, PDGF-C e PDGF-D , (Laila, *et al.*, 2005).

A atuação e o efeito do PDGF está dependente da presença ou não de outros FC, tendo propriedades quimiotáticas para fibroblastos, macrófagos e leucócitos.

Sánchez *et al.*, em 2003 demonstraram *in vivo* que o PDGF tem potencial angiogénico e capacidade estimulativa do colagénio e formação de matriz , (Sanchez, 2003).

Bartol, *et al.*, em 1996 com o intuito de estudarem os efeitos das várias concentrações de PDGF na proliferação , migração celular e na síntese de matriz extracelular, propuseram um modelo *in vitro* de ferida cirúrgica com lesões discoides, contendo camada confluyente de fibroblastos do ligamento periodontal.

Os resultados obtidos mostraram que com a quantidade de 10µg/ml de PDGF e 0,2% de soro bovino fetal, houve um aumento na migração e proliferação celular.

Foi também demonstrado *in vitro* que a incorporação de PDGF-BB em materiais aloplásticos e enxertos xenogénicos, melhora a resposta biológica regenerativa desses mesmos materiais, (Lee, *et al.*, 2000) , (Bateman, *et al.*, 2005).

Quando ocorre remodelação óssea existe mobilização dos osteoblastos nas zonas onde é necessário a sua reconstrução, sendo que o PDGF-BB secretado por osteoclastos, regula a quimiotaxia dos osteoblastos, mostrando assim a importância que estes têm no processo de remodelação e manutenção do tecido ósseo ,(Sanchez, *et al.*, 2008) .

O uso de fator de crescimento derivado de plaquetas recombinante humano (rhPDGF) para preparação do local do implante, (Nevins, *et al.*, 2009), para aumento de osso horizontal, (Simion, *et al.*, 2007), e preservação de crista óssea (Nevins, *et al.*, 2009), tem sido investigado em humanos, contudo os primeiros estudos foram relativamente a regeneração periodontal ,(McAllister, *et al.*, 2010).

Foi verificado que tanto em células ósseas humanas adultas como em células ósseas fetais, associadas em suporte ósseo, podem induzir formação óssea na presença de rhPDGF-BB, sendo que estas células apresentam grande capacidade proliferativa quando este FC está presente , (Krattinger, *et al.*, 2011) , (Abed, *et al.*, 2009)

Existem vários estudos que mostraram em animais evidências histológicas na regeneração de tecidos periodontais e neoformação de osso, cemento e ligamento periodontal, (Lynch, *et al.*, 1991), (Park, *et al.*, 1995).

Contudo, alguns autores realizaram estudos para testar se no caso de ocorrer inflamação gengival o PDGF estaria presente em valores elevados. Verificaram que dependendo da sua concentração e de exposição aos tecidos os resultados poderiam ser bastante diferentes, (Pinheiro, 2003).

A acção catabólica do PDGF no osso em culturas de ratos promoveu um aumento da síntese de prostoglandinas E₂, que foram identificadas como importantes mediadores na perda de osso periodontal.

Verificaram ainda que a expressão excessiva de PDGF pode promover alterações inflamatórias existentes em doenças periodontais, mostrando a melhor proporção de dose terapêutica conseguindo assim obter uma melhor resposta clínica de 150 µg/ml de cada fator.

Num estudo clínico multicêntrico, randomizado, triplo cego (RTC) que envolveu 180 pacientes, avaliou a segurança e eficácia da associação de rhPDGF-BB e βTCP em defeitos periodontais, demonstrando que estes pacientes apresentaram maior redução de profundidade de sondagem, maior ganho de inserção clínica e maior preenchimento ósseo, (Nevins, *et al.*, 2005).

A partir destes estudos, o rhPDGF-BB foi aprovado pelo FDA para comercialização.

Após estes resultados clínicos e histológicos em defeitos periodontais, fizeram-se estudos em implantologia, avaliando os efeitos do rhPDGF-BB em reconstrução óssea, sendo observada regeneração de tecido ósseo em defeito de rebordo alveolar, (Simion, *et al.*, 2007).

Alguns resultados clínicos e histológicos demonstraram uma boa regeneração dos tecidos moles e duros após a combinação de rhPDGF e matriz óssea bovina.

Sendo que a análise histológica mostrou intensa neoformação óssea ao redor da matriz óssea bovina, (Simion, *et al.*, 2007).

Foi também utilizado rhPDGF-BB combinado com excerto de osso sintético (βTCP) e membrana de colagénio, com intuito de reconstrução e redução de defeito ósseo maxilar, com simultânea instalação de implante osteointegrado, verificando-se após 5 meses o completo preenchimento da discência óssea local, (Byun, *et al.*, 2008).

Um estudo piloto com 8 amostras para avaliar se a combinação de matriz óssea colagenosa e rhPDGF-BB sem a utilização de barreiras biológicas, demonstrou que se podia aumentar o volume em defeitos ósseos vestibulares pós-exodontias para posterior aplicação de implantes, permitindo estabilidade primária no momento da inserção dos implantes, (Nevins, *et al.*, 2009).

Apesar de alguns estudos realizados em Humanos, não existe nenhum que seja randomizado sobre a utilização de rhPDGF-BB na reconstrução óssea alveolar.

Estes estudos realizados são relatos de casos isolados sem expressão clínica, e em baixo número de pacientes, baixando assim alguma credibilidade de produção de evidência científica.

1.1 Preparação de PDGF-BB

Os fatores de crescimento descrito neste trabalho, são de acordo com determinadas marcas, sendo por isso sujeitos a possíveis variações consoante o fabricante.

A marca usada como referencia foi a “Sigma (Saint Louis, Missouri, USA)” . (Home Page da sigmaaldrich).

Cada frasco de PDGF-BB contém 10 µg do produto em pó de coloração branca e 97% de pureza.

O fabricante recomenda a reconstituição do frasco utilizando 1 ml de HCl₄ mM contendo albumina bovina ou humana a 0,1% imediatamente antes do uso de acordo com a aplicação planeada. O HCl é depois preparado com BSA “Bovine serum albumin” a 0,1 % e esterilizado através de filtração por filtro com poros de 0,22 µm. Em seguida, o material é diluído com 1ml desta solução.

A seguir fazem-se 10 aliquotas de 100 µl cada uma na concentração de 1 µg/ml, mantidas em nitrogênio líquido a -70° C, com exceção de aliquota que é mantida no frio (2-8°C) para uso imediato, constituindo-se nas soluções estoque do produto.

A solução de trabalho na concentração de 50 µg/ml é conseguida diluindo-se a solução de estoque em 20 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) , suplementado com soro bovino fetal (FBS) a 10% e solução de antibiotico a 1% dos quais são removidos 100 µl que são substituídos pelos 100 µl da solução de estoque.

2. IGF - Fator de crescimento Insulínico

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina, também conhecidos como somatomedinas ou IGF, são polipeptídeos com sequências altamente similares à da insulina.

Estes fatores de crescimento são parte de um complexo sistema que as células usam para se comunicação com o seu ambiente fisiológico. Este sistema complexo, muitas vezes referido como o "eixo IGF", consiste em dois recetores de superfície (IGF1R e IGF2R), dois ligantes (IGF-1 e IGF-2), uma família de seis proteínas de ligação de IGF de alta afinidade (IGFBP 1-6), bem como associadas enzimas degradantes IGFBP, referidas coletivamente como proteases.

Canalis, em 1980 descreveu pela primeira vez em literatura o fator de crescimento insulínico (IGF), demonstrando a homologia de dois polipeptídeos derivados do plasma humano com cadeia de insulina.

Este FC foi descrito como uma cadeia polipeptídica simples de 70 aminoácidos ligados por três pontes dissulfídicas.

Os mesmos autores dois anos depois mostraram a semelhança estrutural e funcional do IGF com a pró-insulina.

O fator de crescimento insulínico é sintetizado por quase todos os tecidos, mas em especial pelo fígado, músculo liso e placenta, encontrando-se em grandes quantidades no osso, sendo um importante mediador do crescimento celular, sua diferenciação e transformação.

Canalis, em 1980, também mostrou que em cultura de células ósseas com periósteo, houve aumento do número de mitoses conforme observado em cortes histológicos de espécies cultivadas na presença de IGF-1, sugerindo que houve a estimulação da síntese do DNA e de proteínas colagênicas e não colagênicas ósseas.

McCarthy, *et al.*, em 1989, demonstraram os efeitos regulatórios exercidos pelos IGF-1e-2 na síntese de colágeno ósseo por estes FC e nos níveis de transcrição de colágeno tipo I em cultura de células enriquecidas com osteoblastos de osso parietal de ratos fetais.

Foi verificado que o FC mais abundante na matriz óssea é o IGF-1, estimulando a formação de osso, induzindo a proliferação celular, diferenciação e biosíntese de colágeno tipo I.

No osso são sintetizados níveis altos de IGF-1, que é secretado por osteoblastos, regulando a formação de osso de forma autócrina e aumenta o nº de células multinucleadas osteoclasticas ,(Anitua, 2000).

(Cho *et al.*, 1994; cit in Arnás, *et al.*, 2002), concluíram que o IGF-1 por si só não é capaz de estimular a reparação óssea, tendo um efeito mitogénico sobre os fibroblastos, sendo um potente quimiotático para os mesmos.

Já Mochizuki *et al.*, em 1992, observaram em cultura de células ósseas sobre fragmentos de dentina ação indutora da atividade de osteoclastos influenciada pelo IGF-1, mas não pelo IGF-2.

2.1 Preparação do IGF-1

A marca usada como referência foi a “Sigma (Saint Louis, Missouri, USA)”. (Home Page da sigmaaldrich).

Para reconstituição do IGF-1, o fabricante recomenda a utilização de ácido acético 0,1 M ou HCl 10 mM filtrados com filtro com poros de 0,2 µm, atingindo a concentração de 0,5-2,0 mg/ml. A solução de ácido clorídrico a 10 mM é preparada e desta 100 µl são acrescentados ao frasco, obtendo-se a solução de estoque na concentração de 500 µg/ml.

Esta solução é fracionada em alíquotas de 10 µl cada uma e mantidas em nitrogénio líquido, com exceção de uma alíquota destinada à reconstituição para obtenção da solução de trabalho de uso imediato.

A solução de trabalho com concentração de 25 µg/ml é obtida acrescentando-se à alíquota 990 µl de DMEM suplementado com FBS (Fetal bovine sérum) a 10 % e solução de antibiótico a 1%, atingindo-se a concentração de 5 µg/ml. Para finalmente se obter 20 ml do meio contendo IGF-1 a 25 µg/ml é necessário acrescentar a esta solução 100 µl da solução obtida após a remoção da mesma quantidade do meio de cultura do tubo de ensaio.

3. TGF-β Fator de crescimento Transformado

Este FC tem o nome derivado do fato de pertencer a um grupo de reguladores de crescimento, que foram inicialmente detetados em extratos tumorais e devido à indução de tipos de células neoplásicas ou transformadas, (Centrella, *et al.*, 1985).

TGF-β é uma citocina multifuncional que tem um papel regulador no crescimento, proliferação, adesão e apoptose de vários tipos celulares, (Miyazono, 2000) sendo fundamental no processo de imunidade. Atua também como fator anti proliferativo em células epiteliais normais e em estágios iniciais da oncogénese.

TGF-β é uma proteína secretada que existe em cinco isoformas, TGF-β1 a TGF-β5.

TGF-β influencia a ampla cadeia de atividade celular, incluindo crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular , (Lieberman, *et al.*, 2002)

O TGF-β é quimiotático e mitogénico, atraindo células indiferenciadas para o local do defeito a reparar, induzindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e condroblastos , (Lalani, 2003).

Assoian *et al.*, em 1983, demonstraram que as plaquetas humanas continham outros fatores de crescimento, além do derivado de plaquetas, propuseram assim utilizando testes de purificação e caracterização, que as plaquetas seriam a principal fonte de fatores de crescimento transformado.

TGF- β é encontrado particularmente no osso, plaquetas, e em cartilagem. É libertado pelas plaquetas depois do coágulo ser formado, no momento da fratura, (Robey, *et al.*, 1987). É produzido por osteoblastos e estimula a expressão de proteínas da matriz óssea, (Wrana, *et al.*, 1988).

Sendo que a formação óssea é favorecida pelas capacidades inibitórias na formação de osteoclastos e na reabsorção, (Sanchez, 2003).

Alguns autores, (Sodek, *et al.*, 1988) demonstraram que o TGF- β estava presente no tecido ósseo e apresentava estrutura molecular, química, biológica e estruturalmente compatível com fatores indutores de cartilagem (A e B).

Foi afirmado também que o TGF- β induz a diferenciação ou proliferação de células osteoblásticas enquanto inibe a formação de precursores de osteoclastos e em concentrações maiores pode exercer um efeito inibitório em osteoclastos maduros, (Bonewald, *et al.*, 1990).

Mailhot et al em 1995 adicionaram TGF em concentrações de 10^{-9} a 10^{-21} M, a culturas de ligamento periodontal e fibroblastos gengivais, até 60 horas, para avaliar a síntese de RNA e proteína.

Obtiveram como resultado aumento da síntese de RNA, comparativamente ao controle, mas apenas as culturas de ligamento periodontal mostraram aumento de síntese proteica com o tempo.

Concluíram então que os efeitos de TGF sobre as células eram dose e tempo-dependentes, (Mailhot, *et al.*, 1995)

Outros autores concluíram ainda que todas as ações do TGF- β são altamente relevantes para controlar inflamação do sítio lesionado e promover reparo tecidual em resposta à injúria, (Sporn, *et al.*, 1987), (Reinholz, *et al.*, 2009), (Blumenfeld, *et al.*, 1997).

3.1 Preparação do TGF- β 1

A marca usada como referencia foi a “Sigma (Saint Louis, Missouri, USA). (Home Page da sigmaaldrich)

Para reconstituição do TGF- β 1, o fabricante recomenda a utilização do produto em pó liofilizado com pelo menos 97% de pureza com solução de HCl 4 mM microfiltrado contendo BSA a 0,1 % para uma concentração mínima de 1 μ g/ml. Como a quantidade do produto no frasco é de 2 μ g, para a obtenção da solução de estoque, são acrescentados 2 ml de ácido clorídrico a 4 mM, atingindo a concentração de 1 μ g/ml.

Posteriormente a solução é distribuída em 10 alíquotas de 200 μ l cada uma, também mantidas em nitrogênio líquido até se usar.

4- BMPs Proteínas morfogenéticas do osso.

As BMPs pertencem à super família dos TGF- β , induzindo as células multipotentes a uma linhagem osteogênica, e promovendo a formação de uma matriz extra celular através de fatores sinalizadores , (Chen, *et al.*, 2004).

Entre todas as isoformas de BMPs, as formas BMP-2 e BMP-7 são as mais investigadas, sendo que alguns subtipos de BMPs, mais notavelmente as BMP-2, -4, -7 e-9, tem atividade osteoindutiva, a propriedade de induzir formação óssea de novo por eles mesmos , (Cheng, *et al.*, 2003).

Os osteoblastos sintetizam BMP-4, estimulando a ativação de fosfatase alcalina e a expressão de osteocalcina , (Kozawa, *et al.*, 2002). BMP-4 é conhecida por estimular a síntese de osteocalcina, um biomarcador no processo de formação óssea (Kozawa, *et al.*, 2002) , (Yamazaki, *et al.*, . 1988).

Chang, *et al.*, em 2007, concluíram que a BMP pode induzir formação óssea ectópica e periosteal *in vivo* ,

Já Urist em 1965, reconheceu a hipótese da existência de uma substância no osso capaz de induzir nova formação óssea, quando observou que um novo ossículo se tinha formado depois da implantação de matriz óssea desmineralizada em músculos de ratos.

AS BMPs são pleiotrópicos, controlam diversas características, e influenciam várias funções, incluindo a iniciação e promoção da formação óssea e cartilaginosa *in vivo* e a estimulação de células da polpa dentária num fenótipo odontoblásticos , (Reddi, 1994).

Após aplicação de BMPs a resposta obtida em tecidos ectópicos, consiste na quimiotaxia, promovendo a migração de células mesenquimais indiferenciadas e monócitos para o local de implante; proliferação celular e diferenciação em condroblastos e osteoblastos, síntese dos componentes da matriz, maturação, mineralização e remodelação, resultando na formação de um ossículo , (Alper, 1994) , (Reddi, 1994), ,(Ripamouti, *et al.*, 1993) , (Urist, 1965).

A ação das BMPs na formação de tecido mineralizado sugere que podem ser bons candidatos para o uso na estimulação de regeneração periodontal. Isto é suportado por estudos animais indicando que BMPs podem ter considerável potencial clínico para o uso em tratamentos de regeneração periodontal , (Giannobile, *et al.*, 1998) , (Ripamouti , *et al.*, 1994) , (Sigurdsson, *et al.*, 1995).

Podem também estimular a síntese e secreção de outros fatores de crescimento ósseo e angiogénico, tais como fator de crescimento semelhante-insulina (IGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) , (Deckers, *et al.*, 2002).

Por serem rapidamente difusíveis e solúveis em água, necessitam de uma matriz apropriada, como por exemplo: colagénio fibronectina, glicosaminoglicanos, hidróxido de cálcio e fosfato de cálcio , (Rutherford, *et al.*, 1994).

Foram estudados determinados materiais para servirem de substratos na implantação das BMPs, alguns com resultados promissores como por exemplo: composto de BMP bovina com gesso Paris e água , (Yamazaki, *et al.*,1988), discos de hidroxiapatita reabsorvíveis e não reabsorvíveis, tratados com osteogenina ,(Ripamonti, *et al.*, 1992), copolímero de ácido poliácetico-poliétilenoglicol combinado com BMP parcialmente purificada proveniente de osteossarcoma , entre outros.

Cole *et al* em 1997, testaram implantes com e sem hidroxiapatita, para poderem comparar a influência na formação óssea. Os resultados sugeriram que nos implantes tratados com BMP-2 obtiveram formação de mais osso do que nos controles, independentemente da dose ou presença de hidroxiapatita, mostrando que a rhBMP-2 permanece biologicamente ativa após a sua aplicação em implantes de titânio, podendo

ser utilizada para aumentar a formação óssea na superfície dos mesmos , (Cole, *et al.*, 1997).

A disponibilidade de BMPs recombinantes humanas, obtidas por meio de técnicas de clonagem molecular, poderá permitir a busca de fatores responsáveis pela programação do DNA, e direcionar as células à produção de novos tecidos, foi a conclusão a que chegaram Gonçalves, *et al.*, em 1998.

Embora a função exata e a inter-relação de cada BMP não esteja ainda completamente esclarecida, existem evidências que a sua atuação como parte integrante de uma cascata complexa de fatores reguladores de diferenciação celular, aumenta a expressão de condroblastos e osteoblastos em lesões ósseas , (Ripamonti, *et al.*, 1994).

A possível conservação evolucionária estrutural e funcional dos genes de BMPs sugere funções regulatórias no processo de diferenciação durante o desenvolvimento (Ripamonti, *et al.*, 1994).

4.1 Origem e obtenção

As BMPs são produto do metabolismo dos osteoclastos, dos odontoblastos e de várias células tumorais. São armazenadas no osso, dentina e em células neoplásicas do osteossarcoma , (Ripamonti, *et al.*, 1992).

A extração de BMPs foi conseguida a partir de diversos animais, bois, porcos, ratos, coelhos, cães, assim como em humanos , (Bessho, et al., 1992) , (Bessho, *et al.*, 1990) , (Nakashima, 1992) , (Rosen, *et al.*, 1995) , (Urist, 1965).

Independentemente da espécie animal utilizada como dadora, houve sempre promoção de osteoindução.

O uso de BMP bovina (bBMP), tem sido a mais usada em pesquisas, devido à sua maior disponibilidade de ossos destes animais, possibilitando grandes quantidades de matriz óssea e conseqüentemente de BMPs ,(Hotz, *et al.*,1994). Em humanos , (Wozney, *et al.*,

1988), foi descrito pela primeira vez e foram caracterizadas várias espécies de BMPs (hBMP).

Os principais fatores impeditivos de testes em grande escala de implantes de hBMP, são a quantidade limitada deste material, e a dificuldade para extrai-lo, sendo o processo muito dispendioso.

5- VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

Este fator de crescimento tem sido referenciado como uma proteína sinalizadora que estimula o crescimento angiogénico com grande especificidade para as células do endotélio vascular (Ferrara, *et al.*, 1989), (Gospodarowicz, *et al.*, 1989), fazendo

parte de um sistema que restaura o suprimento de oxigénio aos tecidos quando existe circulação sanguínea inadequada.

O fato do VEGF ser relativamente específico para células endoteliais vasculares, permite uma resposta angiogénica pronunciada. O VEGF estimula as células endoteliais na degradação da matriz extra celular, migração e formação de túbulos. Este FC também funciona como regulador de permeabilidade vascular, que é considerada importante para o início da angiogénese. A sobrevivência das células endoteliais nos vasos recém-formados à VEGF-dependente. O VEGF induz a expressão de proteínas antiapoptóticas nas células endoteliais, (Ferrara, 1999), (Nor, *et al.* 1999), (Nor, *et al.*, 2001).

VEGF foi caracterizado como uma proteína que promove o extravasamento de proteínas a partir de vasos sanguíneos associados a tumores, (Senger, *et al.*, 1983).

Posteriormente tomou-se consciência que o fator indutor de permeabilidade e o fator de crescimento de células endoteliais, são codificados a partir de um único gene de VEGF, e que várias isoformas de VEGF são produzidas a partir dele por *splicing* alternativo, para formar homodímeros ativos. (Keck, *et al.*, 1989), (Leung, *et al.*, 1989), (Tischer, *et al.*, 1989).

Seguiu-se a identificação dos recetores do VEGF, o VEGF-1, -2, que codificam para os recetores específicos da tirosina-quinase. (Vaisman, *et al.*, 1990) , (Plouet, *et al.*, 1990).

Quando o VEGF é expresso em valores muito elevados, pode ser um iniciador de angiogenese tumoral. Cancros que expressem VEGF podem crescer e metastizar . (Kim ,*et al.*, 1993) , (Millauer, 1994).

Assim sendo este FC terá um papel importante no suprimento sanguíneo para a regeneração tecidual, para aplicação de implantes. (Di Alberti ,*et al* 2013).



1- Figura 2: Mecanismo de VEGF na pele . (Home Page da PharmaSpecial)

5.1 Preparação de VEGF

Esta preparação é preconizada pela Bio Site . (Home Page da nordic biosite).

Diluição e uso de VEGF humano.

Solução *standard* de VEGF humano deve ser preparada com duas horas de antecedência.

O kit fornece dois tubos de VEGF, contendo 10 µg por tubo.

Para preparar 10,00 µg/ml de VEGF humano, adicionar 1 ml de solução tampão ao tubo contendo 10 µg de VEGF e deixar a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos, e mexer de vez em quando. Isto vai produzir uma solução de VEGF com uma concentração de 10 µg/ml.

6- EGF fator de crescimento epidérmico

Fator de crescimento epidérmico é um polipeptídeo que estimula a proliferação de uma grande variedade de células epidermais.

EGF é uma proteína com peso molecular de 6,2 kDa, contendo 53 resíduos de aminoácidos.

EFG atua ligando-se ao seu receptor EFGR na superfície da célula e estimula a atividade intrínseca da proteína tirosina-cinase do receptor. A atividade da tirosina-cinase inicia uma cascata de sinais de tradução, resultando numa variedade de alterações bioquímicas na célula, levando à síntese de DNA e proliferação celular. (Fallon, *et al.*, 1984).

O EGF pode ser encontrado em plaquetas humanas, macrófagos, urina, saliva, leite e plasma. (Cotran, *et al.*, 2005).

Os efeitos biológicos do EGF da saliva incluem o poder de cura de úlceras orais do estômago e do esôfago, inibição da secreção de ácido gástrico, estimulação da síntese do DNA, assim como proteção da mucosa oral de agressões como ácido gástrico, ácido biliar, pepsina, tripsina assim como agressões físicas, químicas e bacteriológicas. (Venturi, *et al.*, 2009).

O epitélio juncional peri-implantar ganha mais camadas de células e assume uma conformação semelhante à do epitélio juncional dos dentes naturais. Essa nova conformação do epitélio juncional peri-implantar aproxima-o da superfície osseointegrada, aumentando a concentração local de EGF. (Consolaro, *et al.*, 2010)

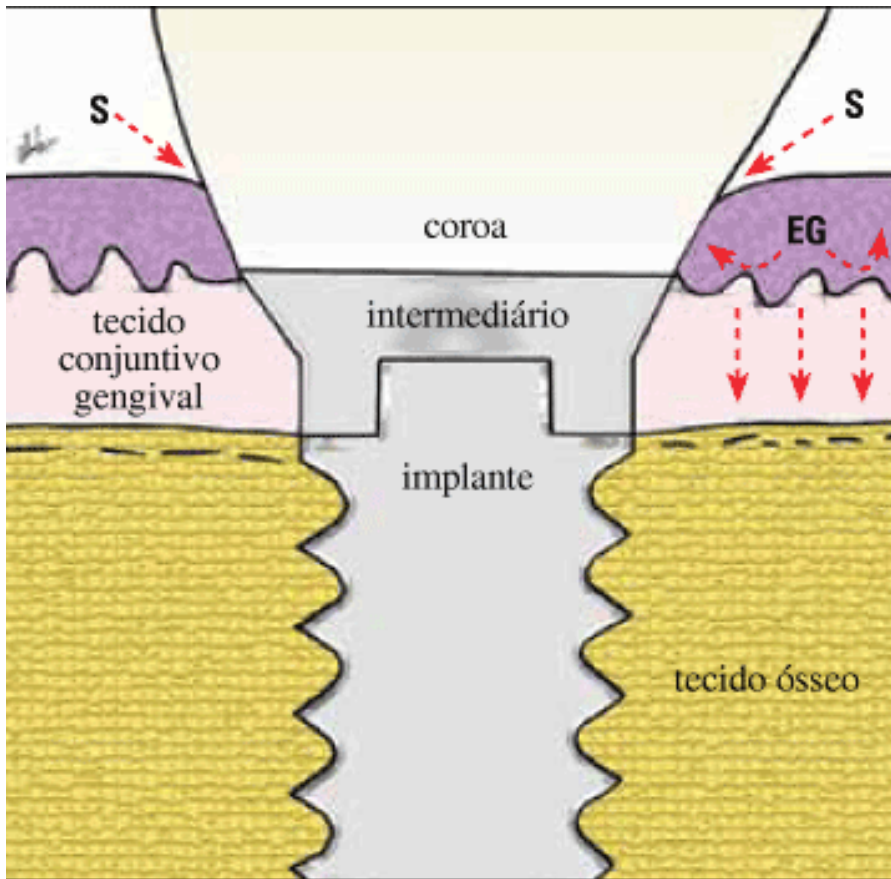


Figura 3: O epitélio estratificado pavimentoso gengival (EG) justapõem-se com espessura normal logo após a aplicação do cicatrizador ou do intermediário e coroa. O EGF (setas) das próprias células epiteliais estimula a proliferação epitelial peri-implantar e inicia a formação do epitélio juncional peri-implantar. O EGF da saliva (S) participa neste processo, pois aumenta muito quando ocorrem cirurgias orais. (Alberto, *et al.*, 2010)

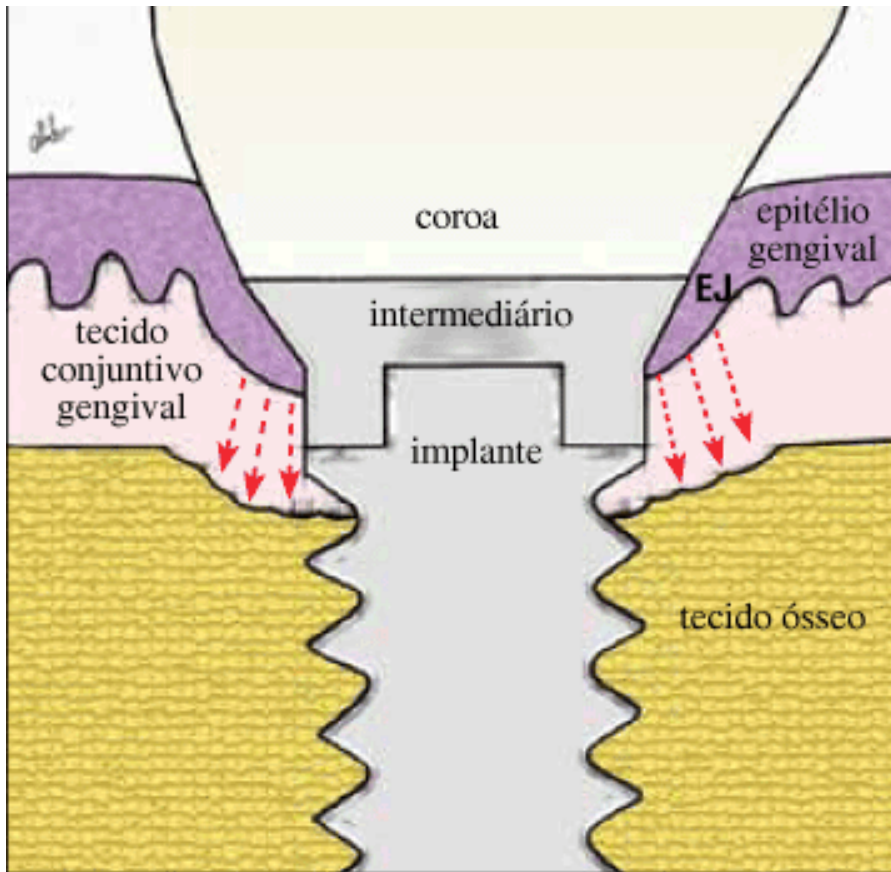


Figura 4: O epitélio juncional peri-implantar (EJ) ganha mais camadas de células e assume uma conformação semelhante à do epitélio juncional dos dentes naturais. (Alberto, *et al.*, 2010)

6.1 Preparação de EGF

Esta preparação é preconizada pela “Upstae biotechnology” Home Page da emdmillipore.

Um dia antes do ensaio de manter células em 2% de FBS. Prepara-se uma suspensão de células em 2% de soro para uma concentração final de 10^4 células/ml. Alíquota de 4,5 ml/tubo para semear poços quadruplicados (1ml/well) .

Preparar EGF seguindo as instruções acima para reidratação para uma concentração de $1\mu\text{g/ml}$.

Para cada concentração de EGF a ser testado, adiciona amostra de EGF para cada tubo representando a sua diluição final, aproximadamente 0-10ng/ml.

Misturar o conteúdo e adicionar 1 ml de suspensão de células para uma placa de 24 poços em quadruplicado. A concentração final será 1×10^4 células/ml em DMEM / FBS a 2% \pm EGF, ao 3º dia , aspirar a media das células e adicionar EGF recém diluído. Contar e registrar o número de células no dia 5-7. Calcular o fator de estimulação sobre os resultados do controlo negativo.

7- PRGF Plasma rico em fatores de crescimento

O plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) tem sido proposto recentemente como uma ajuda para se conseguir regeneração óssea e epitelial na área da cirurgia oral. (Anitua, 2001). As propriedades biológicas do PRGF exploram o potencial de vários FC derivados de plaquetas, tais como (PDGF, TGF- β , EGF, VEGF, IGF-I, HGF), obtido através de centrifugação, para serem induzidas várias funções como por exemplo a quimiotaxia, angiogenese, proliferação, diferenciação, modelação, etc., representando assim uma mais valia na terapêutica para uma mais rápida e mais efetiva regeneração dos tecidos duros e moles . (Anitua, *et al.*, 2004) , (Anitua, *et al.*, 2006).

O PRGF representa uma fonte autógena e altamente especializada de fatores de crescimento, seus principais fatores apresentam um importante papel na mitogenese das células mesenquimais indiferenciadas nos espaços medulares, na estimulação dos osteoblastos pra produção da matriz de colagéneo, na angiogenese e na ativação dos macrófagos. (Beltrão, *et al.*, 2001), (Sanchez, 2003).

Vários estudos *in vitro*, em animais e em ensaios clínicos, sugeriram que o PRGE podia efetivamente despoletar regeneração dos tecidos duros e moles, assim como diminuir a inflamação, dor e efeitos secundários indesejáveis. (Giannobile, 1996) , (Weibrich, *et al.*, 2002).

As plaquetas do plasma rico em plaquetas são ativadas pela adição de trombina, começando assim a liberar fatores de crescimento (PDGF, TGF β -1, β 2, proteínas plasmáticas), para acelerarem o processo de cicatrização. Dessa forma, o plasma rico

em plaquetas serve tanto para hemostasia como para adesão do material de enxerto, contribuindo fisiologicamente para a cicatrização mais rápida do sítio cirúrgico. (Carlson., *et al.*, 2002).

O uso de PRGF em implantes dentários trás certos benefícios que podem aumentar a regeneração óssea, aumentando a formação de osso e acelerando a sua maturação. (Dias, *et al.*, 2002)

Alguns autores afirmaram que a utilização de PRGF com auto ou aloenxertos, torna a epitelização mais rápida, bem como a formação de osso mais denso, com maior maturação e com trabeculado melhor organizado. (Sanchez, 2003)

Foi efetuado um estudo *in vivo* que tinha como intuito avaliar os efeitos biológicos do PRGF na proliferação e diferenciação de osteoblastos. Concluiu-se que este plasma funciona como ativador aumentando e acentuando a regeneração óssea. (Safadi, *et al.*, 2003).

Ferreira, *et al.*, em 2005. afirmaram que o PRGF é um material autologo, e por isso atóxico, não causando reações imunológicas quando aplicado ao seu dador original, promovendo assim angiogenese, colagénio por parte dos fibroblastos, proliferação de osteoblastos e produção de suportes celulares formados a partir de partículas ósseas. Outras vantagens foram apontadas, como a sua disponibilidade no pré operatório, a sua histocompatibilidade, diminuindo assim a possibilidade de acontecerem infeções.

Mas a utilização unicamente do PRGF sozinho, sem enxerto poderá reduzir os remanescentes resultantes da aplicação do enxerto. Foi demonstrado através de estudos comparativos que com PRGF na presença de enxerto e na sua ausência e em que os procedimentos eram conduzidos com perícia e cuidado, podia sozinho o PRGF promover o crescimento ósseo. (Steigman, *et al.*, 2005). Sendo que estas propriedades só se mostraram no caso de haver células ósseas disponíveis para as atividades mitóticas. (Casati, *et al.*, 2006).

8- PRGF- Endoret®

Dado que existem variadas formas de aplicação de FC, grande parte delas com diferentes concentrações, protocolos de utilização, ativadores, utilização ou não de leucócitos nos preparados, entre outras, surge a necessidade de standardizar procedimentos, protocolos, preparações de FC e procedimentos cirúrgicos, fazendo com que determinadas entidades levassem a cabo estudos de forma a tentar otimizar tais variáveis, tentando minimizar os efeitos indesejáveis, conseguindo efeitos terapêuticos cada vez mais controlados.

O PRGF- Endoret® segundo os autores, veio colmatar algumas dessas falhas, otimizando e tornando mais segura a utilização deste plasma, eliminando assim algumas limitações de outros preparados, (Anitua, 1999), como por exemplo: o uso de citrato de sódio e cloreto de cálcio como anticoagulante e ativador de coagulação respetivamente, a adição de cloreto de cálcio promove a formação de trombina, promovendo assim o processo fisiológico de coagulação e promovendo uma libertação de FC mais regular, sendo este parâmetro crucial para uma reparação tecidual correta. (Tsay, *et al.*, 2005). Este processo elimina reações imunológicas e o risco de transmissões de doenças associado ao uso de trombina exógena bovina. (Lanesberg, *et al.*, 1998).

O PRGF liberta vários FC e fatores de diferenciação, através da ativação plaquetária, sendo estes fatores importantes na regulação e estimulação dos processos de regeneração. Têm também um papel importante nos processos de regulação celular, como a angiogénese, mitogénese, quimiotaxia e metabolismo. (Sanchez., *et al.*, 2003).

Estes autores também afirmam este plasma autólogo rico em FC proporciona um aglomerado de fatores de crescimento e citocinas em que a sua utilização conjuntamente com auto ou mesmo aloenxertos induzem uma epitelização mais rápida, bem como formação de osso mais maduro e com trabeculado mais organizado.

PRGF- Endoret® contém uma concentração de plaquetas na ordem das 6×10^5 plaquetas / μ l, tendo sido descrito como sendo a concentração ideal para indução biológica, sendo que concentrações baixas induzem efeitos aquém do esperado, enquanto concentrações altas demais podem ter um efeito inibitório. (Weibrich, *et al.*, 2005).

Este produto não contém leucócitos, tornando-o mais seguro e efetivo, aumentando a homogeneidade do produto e reduzindo os fatores variáveis de outros possíveis dadores. (Anitua, *et al.*, 2010).

A existência de neutrófilos é de particular importância pois exprimem enzimas degradantes de matriz como as metaloproteinases-8 e MMP-9 e libertam oxigénio reativo que destroem células circundantes danificadas ou saudáveis. (Marx, 2004).

O PRGF atua através da desgranulação dos grânulos α das plaquetas que contêm os FC armazenados, a secreção destes FC é iniciada com o processo de coagulação do sangue e começa cerca de 10 minutos após o início da hemóstase, onde mais de 95% dos FC pré sintetizados são secretados em menos de uma hora.

Assim sendo este plasma deve ser desenvolvido num meio anticoagulante e usado num período de aproximadamente 10 minutos após a formação do coágulo, sendo que o PRGF mantém-se estável num ambiente estéril e com uma concentração de plaquetas viável por um período de 8 horas após desenvolvido em meio anticoagulante.

9- Protocolo de preparação do PRGF- Endoret[®]

É colhido sangue venoso do paciente, (figura 5), sendo este colocado em dois tubos de centrifugação de 5 ml contendo 3,8 % de citrato de trisódio como anticoagulante, preservando assim as plaquetas. (figura 6).

Os tubos são centrifugados a 460 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente, numa centrifugadora desenhada para esta técnica (PRGF System[®] IV, BTI Biotechnology Institute, Vitoria Alava Spain), (figura 7), que tem como objetivo preservar as plaquetas e manter o plasma livre de leucócitos.

Para se pipetar a camada pretendida, foi desenvolvida um mecanismo intitulado transferidor de plasma (the plasma transfer device ,PTD), que permite separar as diferentes frações obtidas por aspiração. (figura: 9)

Depois desta centrifugação o componente plasmático é separado em três frações, (figura 8), uma contendo células vermelhas no fundo do tubo, uma segunda fase intermédia

onde existem leucócitos e a fase superior de cor amarelada é a que contem a maior concentração de plaquetas, e de fatores de crescimento.

O PRGHF é ativado usando 50 μ l a 10 % de cloreto de cálcio e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos até se formar uma espécie de gelatina fácil de manusear. (Anitua, *et al.*, 2012).



Figura 5 : Recolha de sangue venoso do paciente



Figura 6: Tipo de tubos de ensaio para colocação do sangue do paciente



Figura 7: Centrifugação dos tubos de ensaio para separação das fases.



Figura 8: Tubo com as fases separadas



Figura: 9 the plasma transfer device ,PTD

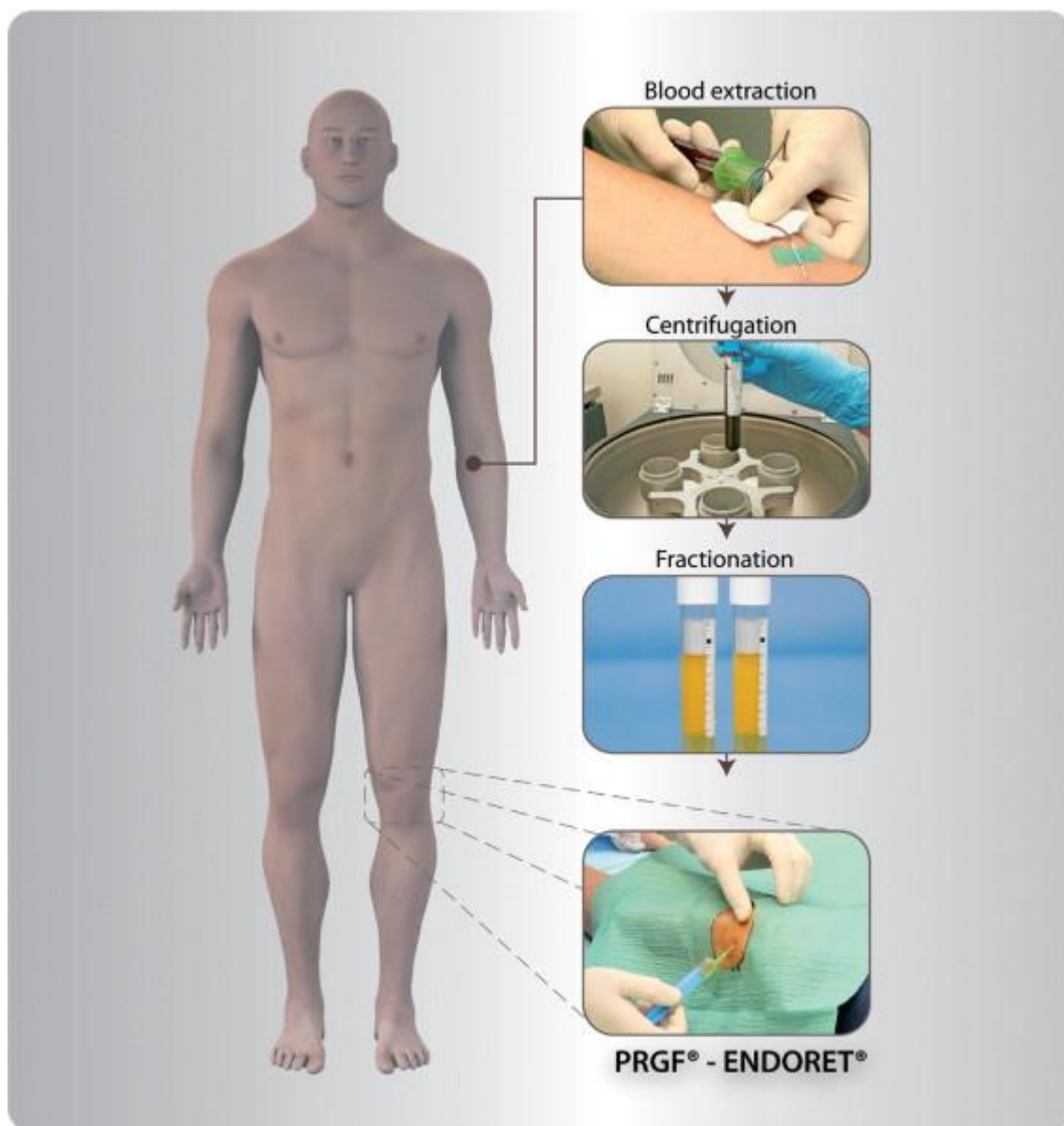


Figura 10: Esquema geral da obtenção de PRGF Endoret®.

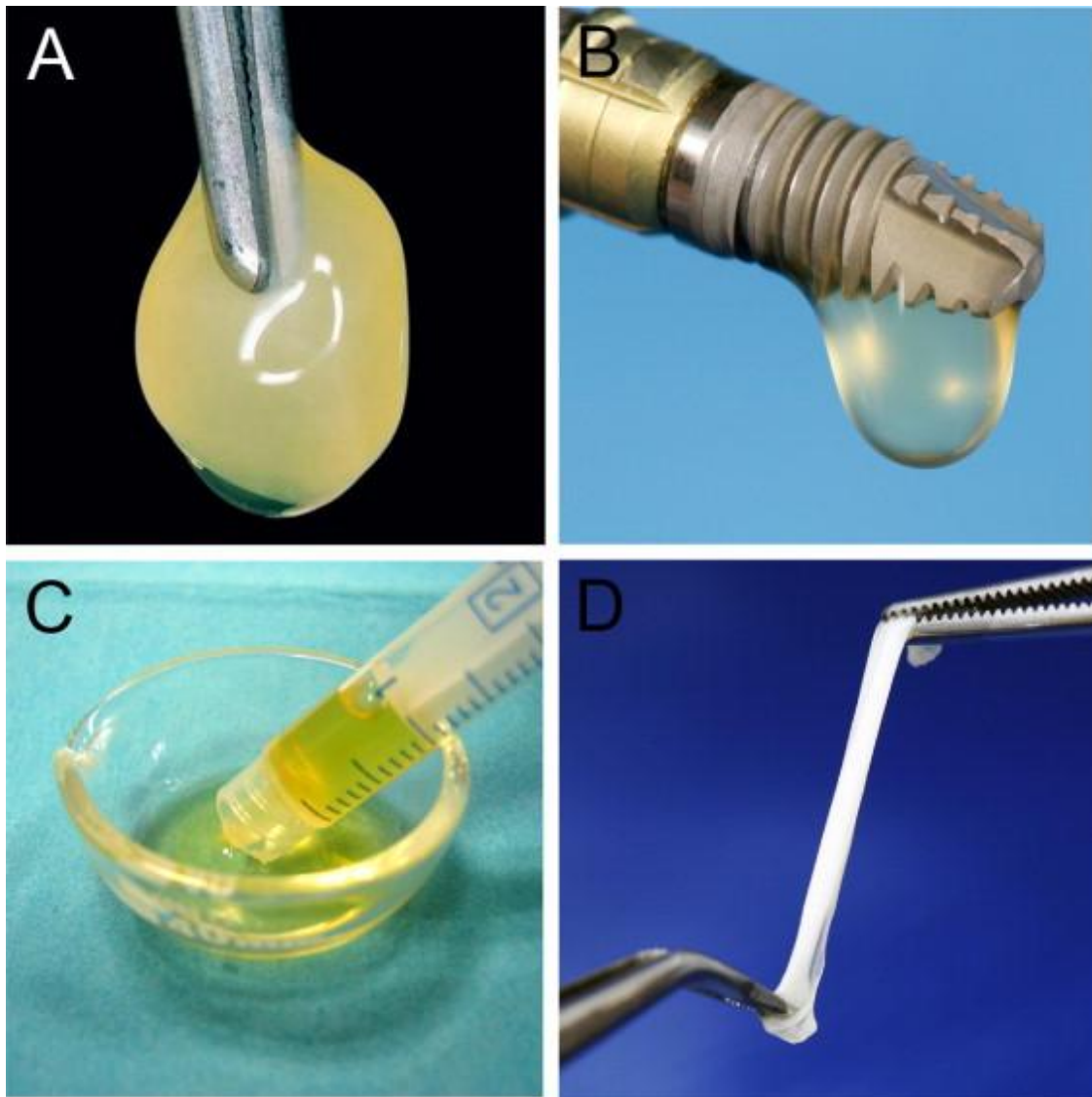


Figura 11: Algumas das aplicabilidades do PRGF-Endoret

- A- Como membrana de fibrina para colocação em sitio cirúrgico
- B- Para molhabilidade em implantes
- C- Para injeção em sítios que necessitem regeneração
- D- Como rede de fibrina

10- Aplicabilidade e segurança clínica de fatores de crescimento

Várias são as aplicações dos Fatores de crescimento (FC), com resultados por vezes contraditórios ou insatisfatórios, mas também com bons resultados mostrados.

A aplicabilidade clínica é diversa, e com o avançar do tempo melhores resultados estão a ser conseguidos, em parte por se conhecer cada vez melhor as suas corretas aplicações, dosagens e efeitos, como veremos pelas referências seguintes.

Existem até à data vários protocolos de obtenção de determinados FC, e diferentes aplicações clínicas.

Assim sendo, a eficácia do PDGF-BB foi observada sobre osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal, com promoção de angiogénese, com aumento de mitogénese e quimiotaxia celular, (Dennison, *et al.*, 1994), (Boyan, *et al.*, 1994) tendo sido por isso a terapia mais usada para reconstrução tecidual de tecidos ósseo e mucoso, (Boyan, *et al.*, 1994), (Jiang, *et al.*, 1999), sendo que a resposta máxima foi obtida com concentrações de 10 µg/ml.

Também Lynch, *et al.*, em 1989 verificaram que houve aumento da regeneração de tecidos periodontais, através de um mecanismo de acção em que o PDGF promove a neoformação tecidual, estimulando efeitos na replicação de DNA celular e quimiotaxia celular. Este mecanismo poderá ser explicado pela ligação do PDGF aos recetores específicos β , (Mumford, *et al.*, 2001).

Foi referido por (Stefani, *et al.*, 2000), (Meraw, *et al.*, 2000) que quando existe uma associação de FC (PDGF-BB e IGF-1) e se faz uma aplicação na superfície dos implantes previamente à sua aplicação, leva a que haja um maior contacto osso-implante, com maior grau de mineralização óssea

Examinaram também os efeitos da combinação de PDGF-BB e IGF-1 na displasia epitelial induzida na mucosa de revestimento bucal em hamsters, concluindo que a exposição aos fatores de crescimento (FC) referidos não provocou qualquer alteração na displasia epitelial. (Schnitman, *et al.*, 1990).

Relativamente à segurança clínica, Shih, *et al.*, em 1996, avaliaram essa mesma segurança em seres humanos da aplicação de doses altas de rhPDGF-BB e rhIGF-1 (50

e 150 mg/ml), em defeitos ósseos, sendo que a análise incluiu exame físico, hematológico, química serológica, exame à urina, presença de anti corpos e avaliação radiológica de alterações ósseas, verificando que nenhuma alteração aos requisitos de segurança foi observada em função da aplicação dos FC.

Não houve efeitos adversos sérios, mortes atribuídas aos fármacos utilizadas, nem sinais de formação descontrolada.

Nenhum dos voluntários usados desenvolveu anticorpos para os FC usados.

A segurança no uso de rhPDGF-BB tem sido demonstrada, em vários testes *in vivo* e *in vitro*. Os FC usados nos testes foram considerados não mutagênicos, hemolíticos, citotóxicos ou alérgicos e não houve evidência de toxicidade local ou sistêmica. (Young, *et al.*, 2011) , (Young, *et al.*, 2009).

Após um ano de estudos toxicológicos, demonstraram que o uso de rhPDGF-BB em combinação com β -tricalcium phosphate (β -TCP), não provocaram efeitos adversos, formação de tumores ou reações imunológicas contra os materiais usados.

Tem havido alguma apreensão relativamente à formação de tumores com o uso de FC, mas dados de investigações clínicas não suportam essa preocupação, pois após a análise de um número alargado de pacientes tratados com gel tópico contendo rhPDGF-BB, não houve evidência clínica de aumento de incidência de risco de mortalidade por cancro. (Ziyadeh, *et al.*, 2011).

Sendo que a atividade biológica do rhPDGF-BB é regulada por uma α -macroglobulina, resultando numa breve exposição sistêmica e de uma rápida eliminação da proteína pelos meios metabólicos normais. (Luís, *et al.*, 2012).

Os vários estudos pré-clínicos em culturas de células e em animais tiveram a sua confirmação a nível de resultados no primeiro estudo em humanos onde foi avaliada a eficácia e segurança da associação de PDGF-BB e IGF-1 , (Howell, *et al.*, 1997).

O rhPDGF-BB foi aprovado pelo FDA para comercialização, demonstrando assim a sua biosegurança.

(Lynch *et al.*, 1991) ,(Koch, *et al.*, 1998; cit in Arnás *et al.*, 2002) demonstraram que o IGF estimula a formação de matriz óssea, mostrando também que IGF associado com

PDGF aumenta a qualidade e quantidade da reparação de defeitos, acelerando a regeneração peri-implantar.

Em 1995, Sirgurdsson *et al.*, afirmaram que a implantação de rhBMP-2, além de regenerar o osso alveolar original, tem também função regenerativa do ligamento periodontal, sendo útil no caso de implantes dentários promovendo o aumento da crista óssea, ou elevação do seio para fornecer *á posteriori* um osso adequado para o implante , (Sigurdsson, *et al.*, 1995)

Em associação com outros FC, o uso de BMP-2 na regeneração óssea guiada ao redor de implantes dentários, promove um aumento de área de contacto entre o osso e o implante e da quantidade de osso por superfície, melhorando assim a osseointegração e a quantidade de osso neoformado nos defeitos ósseos peri-implantares , (Meraw, *et al.*, 2000).

Existem assim novos estudos a serem feitos testando várias formas de titânio como substrato para as BMPs, tendo em vista a possível utilização em caso de implantes, mostrando a estimulação de formação óssea em volta do titânio, promovendo assim uma melhor aderência e uma aceleração na maturação deste novo osso na superfície e no interior dos poros dos implantes de titânio , (Kawai, *et al.*, 1993) , (Xiang, *et al.*, 1993).

Estudos pré clínicos com VEGF (Vascular endothelial growth factor), demonstraram segurança na sua utilização, sem toxicidade notada com limites de dose entre os 0,1 e os 10 mg/Kg.

Alguns efeitos adversos foram notados para doses entre os 3 e os 10 mg/Kg, tais como aumento de pressão sanguínea (10 a 15 mmHg). (Gordon, *et al.*, 2001)

Tem havido modelos pré clínicos que demonstram um aumento de risco de sangramento ou trombose, associado à inibição do VEGF. (Devore, *et al.*, 2000).

Ainda se encontra desconhecido o verdadeiro mecanismo e o seu potencial relacionamento com a inibição do VEGF. (Kubo, *et al.*, 2000).

Estes autores, publicaram dados demonstrando que VEGF está envolvido na manutenção da integridade endotelial de células tumorais. Logo bloqueando os

recetores do VEGF proporciona um aumento de apoptose celular, levando assim ao despoletar da cascata de coagulação.

Como têm havido resultados contraditórios nos resultados clínicos da aplicação de FC, pelas razões já apresentadas anteriormente, alguns autores sentiram a necessidade de standardizar determinados procedimentos, para tentar encontrar uma melhor aplicabilidade dos FC.

Segundo Anitua, 1999, o surgimento do PRGF, enquanto plasma que contem vários FC, veio desta maneira otimizar algumas falhas sentidas.

O PRGF tem sido usado no campo da cirurgia oral, nomeadamente em aplicação de implantes após extração imediata, para colocação de enxerto de osso, para posterior regeneração à volta do implante, assim como para preparação de sítios para aplicação futura de implantes, sem ser com carga imediata. (Anitua, 1999) , (Anitua, *et al.*, 2004).

Del Fabbro, *et al.*, em 2009, conduziram um estudo onde a colocação de implante após extração imediata, combinada com a aplicação de PRGF, conduziu a excelentes resultados. Devido à alta taxa de sucesso, com preservação de tecidos duro e mole, com resultados estéticos e funcionais, mostraram que este procedimento além de seguro é efetivo e um tratamento previsível para reabilitação.

Mais dados permitem concluir que o uso deste composto permite a inserção do Implante num espaço de tempo mais curto, pois reduz o período de recuperação pós-enxerto para perto de seis meses, quando normalmente é de nove meses. As percentagens de implantes bem-sucedidos serão as mesmas, apenas reduzindo o tempo de maturação óssea em cerca de 33%. (Mazor, *et al.*, 2004)

Alguns autores afirmam ser possível associar osso bovino desproteinado com PRGF apresentando uma taxa de sucesso até 92,9 % em implantes de carga imediata. (Rodriguez, *et al.*, 2003).

Anitua, *et al.*, em 2012 conduziram experiências a fim de relacionar o PRGF- Endoret, com o efeito antimicrobiótico. Concluíram que este plasma tem atividade antimicrobiótica para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp* e *staphilococcuscoagulase-negativos*.

Concluíram ainda que este composto apenas demonstra esta atividade nas primeiras horas de aplicação, por isso terá aqui um papel de profilaxia em vez de tratamento.

Defendem a aplicação profilática na humidificação de implantes e próteses antes da sua inserção.

Anitua, *et al.*, em 2010, afirmaram que no uso de PRGF- Endoret®, as células voltam ao ritmo normal de proliferação depois deste composto ter sido gasto, o que é um requisito de biossegurança para se usar este produto em humanos.

Existem atualmente várias formas de preparação do PRGF, sendo que até à data Anitua e seus colaboradores são os que possuem maior número de experiências em humanos, tendo assim resultados clínicos comprovados.

Podemos assim concluir que o método usado por eles será o mais credível, pois é o mais fácil de utilizar, tem apenas uma centrifugação, a ativação com cloreto de cálcio evita o uso de trombina bovina (substância proibida na Europa pelo seu potencial imunogénico), não produz dano nas plaquetas, em oposição ao EDTA, nem é responsável por reações imunológicas.

Atualmente os autores descrevem este produto como possuindo certificações sanitárias CE e FDA.

Mas apesar destas taxas de sucesso encontradas, há autores que devido à grande variedade de fatores intervenientes na utilização das técnicas com PRGF, afirmam haver uma sobredeterminação muito grande, para que os efeitos observados possam ser isolados e estudados individualmente. (Weibrich, *et al.*, 2004).

Também You *et al.*, em 2007 afirmou que elevadas concentrações de fatores de crescimento podiam levar a um processo inverso ao esperado, resultando assim na falha do enxerto ósseo, concluindo que a contribuição do PRGF na formação óssea era inexistente.

Estes autores também afirmam haver resultados controversos relativamente ao efeito deste plasma rico em plaquetas na regeneração óssea, Alguns autores referem efeitos positivos na osteogenese, (Merkx, *et al.*, 2004) , (Ferreira, *et al.*, 2005) , (Hibi, *et al.*,

2006) , (Graziani, *et al.*, 2006) , (Gerard, *et al.*, 2006) , enquanto outros não observam qualquer efeito. (Sarkar, *et al.*, 2006) , (Mooren, *et al.*, 2007) , (Roussy, *et al.*, 2007).

Além disso também foi observada inibição da indução óssea quando se utilizam FC. (Gruber, *et al.*, 2006) , (Thorwarth, *et al.*, 2006) , (Ranly, *et al.*, 2007).

Esta diversidade de resultados são na verdade atribuídos a diferentes aspetos, tais como variações intra e inter-espécies na produção relativa dos componentes, (Van der Dolder, *et al.*, 2006) , (Roussy, *et al.*, 2007) , (Ranly, *et al.*, 2007), diferenças nos protocolos de preparação, (Anitua, *et al.*, 2007) , variações nas concentrações e nas densidades das plaquetas. (Tomoyasu, *et al.*, 2007) , (Choi, *et al.*, 2005) , (Ranly, *et al.*, 2007) .

Assim sendo é mais do que justificado a evolução em novos modelos experimentais, novos protocolos, com vista a minimizar erros relativos aos FC, para isso será necessário controlar o meio de trabalho, os seus componentes, a maneira de serem formulados, podendo assim avaliar os efeitos na osteogênese por exemplo sobre superfícies de titânio.

Mesmo com toda esta controvérsia em torno do uso do PRGF, certo é que este plasma atua como adesivo biológico, que quando misturado com outros biomateriais torna a manipulação dos mesmos muito mais fácil, evitando colapsos, melhorando a consolidação dos enxertos, assim como ser um fator importante no aumento da rapidez da regeneração tecidual. (Freymler, 2004)

IV- CONCLUSÃO

É atualmente uma possibilidade real a utilização de fatores de crescimento para diminuição de tempo de osteointegração em implantes de titânio, na estimulação de formação óssea e na diminuição da inflamação de tecidos.

Vimos por vários estudos efetuados que a resposta inflamatória pode ser diminuída, acelerando assim o tempo de cura.

Há uma clara evidência entra a maneira como os fatores de crescimento (FC) são preparados e utilizados com os resultados obtidos.

Será necessário comparar os diferentes produtos disponíveis no mercado e determinar a sua eficiência final. Será necessário estandardização dos procedimentos, e estruturar bem os estudos de modo a evoluir o potencial no efeito terapêutico tão desejado.

Quanto à utilização do plasma rico em fatores de crescimento (PRGF), pode concluir-se que provoca estimulação e regeneração tecidual, aumento da rapidez e qualidade de osso formado e aumento da previsibilidade de resultados, sendo a técnica de preparação de fácil execução.

Conclui-se que apesar de determinadas técnicas serem relativamente fáceis de utilizar, sabe-se também que falta preparação ao médico dentista para as executar.

Dependendo dum bom conhecimento destes produtos autologos, talvez se possa otimizar as superfícies dos implantes de modo a potencializar os efeitos desejados.

O papel que estes FC desempenham, na regeneração ainda está parcialmente elucidada, os efeitos biológicos em muitos deles já foram entendidos durante os últimos anos, abrindo assim a porta para o potencial desenvolvimento de diferentes citoquinas e FC.

Serão necessários sem dúvida mais estudos, principalmente em humanos para melhoria de segurança, otimização de protocolos para a utilização dos FC, tirando assim todo o potencial que se espera.

V- BIBLIOGRAFIA:

Abed E., Moreau R. (2009). Importance of melastatin-like transient receptor potential-7 and magnesium in the stimulation of osteoblast proliferation and migration by platelet-derived growth factor. *Am. J Physiol cell Physiol*, 297, pp.360-8.

Alberto C. *et al.*, (2010). Saucerização de implantes osseointegrados e o planejamento de casos clínicos ortodônticos simultâneos. *Dent. Press J Orthod*, 5(3), pp.19-30.

Alper, J.(1994) Boning up: newly isolated proteins heal bad breaks. *Science*, 263(5145), pp.324-325.

Anitua E. Sanchez M. Nurden At Nurden P. Orive G. Andia I (2006) New insights into and novel applications for platelets-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*, 24, pp.227-234.

Anitua E, Sanchez M, Orive G. (2010).Potential of endogenous regenerative technology for insitu regeneration medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, pp.741-752.

Anitua E. (2001) The use of plasma-rich in growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent*, 13,pp.487-493.

Anitua E. Andia I. Ardanza B. Nurden P. Nurden AT. (2004) Autologous platelets as a source for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91,pp.4-15.

Anitua E. Prado R. Sánchez M.Orive G.(2012) Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Science Direct*, 22,pp.25-32.

Anitua E.(1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of the use in the preparation of sites for implants. *J Oral Maxillofac Implants*, 14,pp.529-535.

Anitua, E. (2000), Fatores de Crescimento: estado del conocimiento actual. *Rev Esp. Odonto Implant*, 10(4),pp. 202-208.

Anitua, E., R. Alonso, C. Girbau, J. J. Aguirre, F. Muruzabal and G. Orive (2012). Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF[®]-Endoret[®]) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *CED*, 37(6),pp.652–657.

Anitua, E.; Sanchez, M.; Orive, G.; Andía, I.(2007) .The potential impact of the preparation rich in growth factors in different medical fields. *Biomaterials*, 28,pp.4551-60.

Arnás, M . (2002). Factores de crecimiento: estado del conocimiento actual. *Rev. Esp. Odonto Implant*, (1074),pp.202-208.

Arnás. M. (2002). Fatores de Crescimento: estado del conocimiento actual. *Rev Esp Odonto. Implant*, 12(1),pp. 6-13.

Assoian, R. K. *et al.* (1983).Transformation growth factor- β in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterization. *J. Biol. Chem* , 258(11),pp.7155-60.

Bartol, P. M; Raben, A. (1996). Growth factor modulation of fibroblast in simulated wound healing. *J. Periodont. Res*, 31 (3),pp.205-16.

BatemanJ, Intini G, Margaron J, Goodloe S, Bush P, Lynch SE, et al.(2005) Platelet-derived grow factor enhancement of two alloplastic bone matrices. *J Periodont*, 76,pp.1833-41.

Beltrão, G. C.; Andrade, M. G. S. (2001). Aspectos biológicos da utilização do gel de plasma rico em plaquetas nas reconstruções maxilares com enxerto. *Rev. Cirur. Implant*; 32(8),pp.324-28.

Bessho, K.; Tagawa, T.;Murata, M.(1992). Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. *J Oral Maxillofac Surg*, 50,pp.496-501.

Bessho, K.; Tagawa, T.;Murata, M. (1990). Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg*, 48(2),pp.162-169

Blumenfeld I, Laufer D, Livne E. (1997). Effects of transforming growth factor-b1 and IL-1a on matrix synthesis in osteoarthritis cartilage of the temporo-mandibular joint in aged mice. *Mech Ageing Dev*, 95,pp.101–111.

Bonewald LF, Mundy GR. (1990). Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*, 60,pp.261-276.

Boyan LA, Bhargava G, Nishimura F, Orman R, Price R, Terranova VP. (1994).Mitogenic and Chemotactic Responses of Human Periodontal Ligament Cells to the Different Isoforms of Platelet-derived Growth Factor. *J Dent Res*, 73,pp.1593-600.

Boyan, L.A. *et al.* (1994). Mitogenic and chemotatic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of platelet-derived grow-factor. *J. Dent Res*, 73(10),pp.1593-600

Byun HY, Wang HL . (2008). Sandwich bone augmentation using recombinant human platelet-derived growth factor and beta-tricalcium phosphate alloplast: case report. *J Dent Res*, 28,pp.83-7.

Canalis, E. (1980).Effect of insulin like growth factor-1 on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest*; 66 (4), pp.709-19.

Carlson, N.; Roach JR., R. (2002). Platelet- Rich Plasma: clinical applications in dentistry. *JADA*, 133,pp.1383-385.

Casati, M. Z. Gurgel B. C. V. Gonçalves, P. F. Pimentel, S. P. Nogueira Filho, G. R. Nociti F.H. Sallum E.A.(2006). Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around Peri-implant bone defects. A pilot study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, 36,pp.132-136.

Centrella M, Canalis E. (1985). Transforming and non transforming growth factor are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82,pp.7335-7339.

Chang PC, Liu BY , Liu CM, Chou HH, Ho MH, Liu HC, Wang DM, Hou LT.(2004). Bone tissue engineering with novel rhBMP2-PLLA composite scaffolds. *J. Biomedic. Mat. Res. A*, 81,pp.771-780.

Chen D, Zhao M, Mundy GR.(2004), Bone morphogenetic proteins, Growth Factors, 22,pp.233-241.

Cheng H, Jiang W, Philips FM, et al. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg*, 85(8),pp.1544-1552.

Choi, B.H.; Zhu, S.J.; Kim, B.Y.; Huh, J.Y.; Lee, S.H.; Jung, J.H. (2005).Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *J Oral Maxillofac Surg*, 34(4),pp.420-4.

Cole BJ, Bostrom MP, Pritchard TL, Sumner DR, Tomin E, Lane JM, et al.(1997). Use of bone morphogenetic protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. *Clin Orthop*, 345,pp.219-28.

Consolaro, A., et al. (2010).Saucerização de implantes osseointegrados e o planejamento de casos clínicos ortodônticos simultâneos. *Dent Press J. Orthod*, 15(3), pp.19-30

Cotran, Ramzi S.; Kumar, Vinay; Fausto, Nelson; Nelso Fausto; Robbins, Stanley L.; Abbas, Abul K. (2005). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. *Elsevier Saunders*. St. Louis

Deckers MM, van Bezooijen RL, van Der Horst G, et al. (2002). Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*, 143,pp.1545-1553.

Del Fabbro M., *et al.*, (2009), Immediate implant placement into fresh extraction sites with chronic periapical pathologic features combined with plasma rich in growth factors: preliminary results of single-cohort study. *J Oral Maxillofac Surg*, 67,pp.2476-2484.

Dennison Dk, Vallone Dr, Pinero Gj, Rittman B, Caffesse Rg. (1994).Differential effect of TGF-beta 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodont*, 65,pp.641-8

DeVore R, Fehrenbacher L, Herbst R, et al. (2000). A randomized phase II trial comparing Rhumab VEGF (recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) plus carboplatin/paclitaxel (CP) to CP alone in patients with stage IIIB/IV NSCLC. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 19,p.485

Di Alberti L, Rossetto A, Albanese M, D'Agostino A, De Santis D, Bertossi D, Nocini PF. (2013).Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA in healthy bone tissue around implants and in peri-implantitis. *Minerva Stomatol*. PMID:23756839

Dias, E.; Barros M.; Andrade, R. (2002). Plasma rico em plaquetas. *Rev. Bras. Implant*, pp. 36-8.

Fallon JH, Seroogy KB, Loughlin SE, Morrison RS, Bradshaw RA, Knaver DJ, Cunningham DD (1984). "Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: location and development". *Science*, 224 (4653),pp. 1107-9.

Ferrara, N. (1999).Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor, *J Mol Med*, 77(7),pp.527-543.

Ferrara, N., and Henzel, W. J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 161,pp.851-858

Ferreira, C. F. Carriel Gomes, M. C. Filho, J. S.; Granjeiro, J. M. Oliveria Simões, C. M. Magini, R. S. (2005). Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clinic Oral Implants Res*, 16(4), pp.456-60.

Ferreira, C.F.; Gomes, M.C.C.; Filho, J.S.; Granjeiro, J.M.; Simões, C.M.O.; MAGINI, R.S. (2005). Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res*, 16(4), pp.456-60.

Freymler E.G. (2004), Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg*, 62, p.1046

Gerard, D.; Carlson, E.R.; Gotcher, J.E.; Jacobs, M. (2006). Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, 64(3), pp.443-51.

Giannobile WV (1996) Periodontal tissue engineering growth factors. *Bone*, 19(1 Suppl), pp. 23S37S.

Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. (1998). Recombinant human osteogenic protein-1(OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodont*, 69, pp.129-137.

Gonçalves, E.A.L.; Guimarães, S.A.C.; Garcia, R.B. (1998). Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. *Rev. Odontol Univ. São Paulo*, 12(3), pp. 299-304.

Gospodarowicz, D., Abraham, J. A., and Schilling, J. (1989) Iso-lation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo satellite cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 86, pp.7311–7315.

Graziani, F.; Ivanovszki, S.; Cei, S.; Ducci, F.; Tonetti, M.; Gabriel, M. (2006). The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*, 17(2), pp.212-9.

Gruber, R.; Kandler, B.; Fischer, M.B.; Watzek, G.(2006). Osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic proteins can be suppressed by platelet-released supernatant in vitro. *Clin Oral Implants Res*, 17(2),pp.188-93.

Hart, C. E *et al.*(1988). Two classes of PDGF receptors recognize different isoforms of PDGF. *Science*, 240(4858),pp.1529-31.

Heldin , C. H *et al.* (1988). Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. *Embo J*, 7, pp.1387-93.

Hibi, H.; Yamada, Y.; Ueda, M.; Endo ,Y.(2006). Alveolar cleft osteoplasty using tissue engineered osteogenic material. *J Oral Maxillofac Surg*, 35(6),pp.551-5.

Hotz, G.; Herr, G. (1994).Bone substitute with osteoindutive biomaterials: current and future clinical applications. *J Oral Maxillofac Surg*, 23(6),pp.413-417.

Home Page da emdmillipore . Disponível em: <<http://www.emdmillipore.com>>. [Consultado em 02/06/2014]

Home Page da nordic biosite. Disponível em <http://www.nordicbiosite.com/pdf/ProductPdfFiles/0a6d4_KBB-196.pdf>. [Consultado em 02/06/2014].

Home Page da PharmaSpecial. Disponível em <www.pharmaspecial.com.br>. [Consultado em 02/06/2014].

Home Page da Sigmaaldrich, Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>>. [Consulado em 02/06/2014].

Howell Th, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. (1997).A fase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-1 in patients with periodontal disease. *J Periodont*, 68,pp.1186-93.

Jiang D, Dziak R, Lynch Se, Stephan EB. (1999).Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factor. *J Periodont*, 70,pp. 834-9

Kawai T, Miki A, Ohno Y, Umemura M, Kataoka H, Kurita S, et al.(1993). osteoinductive of composites of bone morphogenetic protein and pure titanium. *Clin. Ortop Relat Res*, (290),pp.296-305.

Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder,J., and Connolly, D. T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246,pp.1309–1312.

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips,H. S., and Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature (London)*, 362,pp. 841–844.

Kohler, N.; Lipton. (1974). A Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity.*Exp. Cell. Res*, 87,pp.297-301.

Kozawa O. Hatakeyama D, Tokuda H, Oiso Y, Matsuno H, Uematsu T. (2002). Sphingomyelinase amplifies BMP-4-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts: role of ceramide, *Cell. Signal*, 14,pp. 999–1004

Krattinger N, Applegate LA, Biver E,Pioletti DP, Caverzasio J. (2011). Regulation of proliferation and differentiation of human fetal bone cells. *Eur Cell Mater*, 21,pp.46-58.

Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, et al. (2000). Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood*, 96,pp. 546-553

Laila J *et al.* (2005).Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *The FEBS Journal* ,272,pp.5723–5741

Lalani , Z (2003): Spatial and Temporal Localization of transforming Growth Factor- β 1, Bone Morphogenetic Protein-2, and Platelet-Derived Growth factor-A in Healing tooth Extraction Sockets in a Rabbit Model. *J Oral Maxillofac Surg*, 61,pp.1061-1072.

Landesberg R, Moses M, Karpatkin M.(1998). Risk of using platelet-rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg*, 56,pp. 1116-1117.

Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, klokkevold PR, et al . (2000).The bone regenerative effect of platelets-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier . *J Periodont*, 71,pp.418-24.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246,pp.1306–1309

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. (2002). The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg. American*, 84,pp.1032-1044.

Luis A Solchaga, *et al.*, (2012). Safety of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in Augment Bone Graft. *J Tissue Eng*. Disponível em <http://tej.sagepub.com/content/3/1/2041731412442668>. Consultado em [02/06/2014].

Lynch SE Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox Chet Al. (1991).Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants, Results of a pilot study in beagle dogs. *J periodont*, 62,pp.710-6

Lynch SE, Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, et-al. (1991).The Effects of Short-Term Application of a Combination of Platelet-Derived and Insulin-Like Growth Factors on Periodontal Wound Healing. *J Periodont*, 62,pp.458-67.

Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, et al. (1989). A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J. Clin Periodont*, 16,pp.545-8.

M. S. Gordon, K. Margolin, M. Talpaz, G. W. Sledge Jr, E. Holmgren, R. Benjamin, S. Stalter, S. Shak and D. C. Adelman (2001). Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Recombinant Human Anti-Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Advanced Cancer. *J Clin. Onc*, 19,pp.843-850.

Mailhot, J.M. et al . (1995). Human periodontal ligament and gingival fibroblaste response to TGF- β stimulation. *J Clin. Periodont*, 22(9),pp.679-85

Marx RE . (2004). Platelet rich plasma : evidence to support its use. *J Oral maxillofac Surg*, 62,pp.489-496.

Mazor, Z.; Peleg, M.; grag, A.K.; Luboshitz, J. (2004). Platelet-rich plasma for bone greaft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implante placement patient series study. *Implant Dent*, 13(1),pp.65-72.

McAllister, et al.(2010). Histologic Evaluation of Extraction Sockets Grafted with Platelet-Derived Growth factor. *J Periodont Rest Dent*, 30,pp.365-73.

McCarthy, T. K.L.; Centrella, M; Canalis, E. (1989). Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology*, 124(1),pp.301-9.

Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM, Sioussat TM. (2000). Tratment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J Periodont*, 71(1),pp.8-13.

Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM, Sioussat TM. (2000). Treatment of peri-implante defects with combination growth factor cement. *J. Periodont*, 71,pp.8-13.

Merkx, M.A.; Fennis, J.P.; Verhagen, C.M.; Stoelinga, P.J. (2004). Reconstruction of the mandible using pre-shaped 2.3 mm titanium plates, autogenous particulate cortico-

cancellous bone grafts and platelet rich plasma: a report on eight patients. *J Oral Maxillofac Surg*, 33(8),pp.733-9.

Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., and Ullrich, A. (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant negative Flk-1 mutant. *Nature (London)*, 367,pp.576–579.

Miyazono K. (2000). Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J Cell SCI*, 113,pp.1101-1109.

Mochizuki, H. *et al.*(1992). Insulin-like growth factor-1 supports formation and activation of osteoclast. *Endocrinology*, 131(3),pp.1075-80.

Mooren, R.E.; Merckx, M.A.; Bronkhorst, E.M.; Jansen, J.A.; Stoelinga, P.J.(2007). The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *J Oral Maxillofac Surg*, 36(7),pp.626-31.

Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL, Oates TW. (2001).The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Periodontal Cells in an In Vitro Wound Model. *J Periodont*, 72,pp.331-40.

Nakashima, M.(1992). Mitogenic and dentin-inductive effects of crud bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Srug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 73(4),pp.484-489.

Nevins M, Garber D, Hanratty JJ, Mc Allister BS, Nevins ML, Salama M, et all. (2009).Human histologic evaluation of anorganic bovine bone mineral combined with recombinant human platelet-derived growth factor BB in maxillary sinus augmentation: case series study. *J Periodont Rest Dent*, 29(6),pp.583-91.

Nevins M, Giannobil WV, Mcguire MK, Kao RT, Mellonig JT, Hinrichs JE, et al. (2005).Platelet-Derived Growth Factor Stimulates Bone Fill and Rate of Attachment Level Gain:lates Bone Fill and Rate of Attachment Level Gain: esults of a Larg Multicenter Randomized Controlled Trial. *J Periodont*, 75,pp.2205-15.

Nevins ML, Camelo M, Schupbach P, Kim DM, Camelo JM, Nevins M. (2009). Human histologic evaluation of mineralized collagen bone substitute and recombinant platelet-derived growth factor-BB to create bone for implant placement in extraction socket defects at 4 and 6 months: a case series. *J Periodont Rest Dent*, 29,pp.129-39.

Nor, J. E. *et al.* (2001).Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intra-tumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer. Res, Chicago*, 61(5),pp.2183-2188.

Nor, J. E. *et al.* (1999).Vascular endothelial growth factor (VEGF) – mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *J. Pathol, Philadelphia*, 154(2),pp.375-384.

ParkJ, Matsuura M, Han K, Norderyd O, Lin W, Genco RJ, *et al.* (1995).Periodontal regeneration in Class III Furcation Defects of Beagle Dogs Using Guide Tissue regenerative Therapy With Platelet-Derived Growth Factor. *J. Periodont*, 66,pp.462-77.

Pinheiro, M. (2003). Quantification and Localization of Platelet-Derived Growth Factor in Gingiva of Periodontitis Patients. *J Periodont*, 74(3),pp.323-8.

Plouet, J., and Moukadiri, H. (1990). Characterization of the receptor to vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem*, 265,pp.22071–22074.

Ranly, D.M.; Lohmann, C.H.; Andreaccio, D.; Boyan, B.D.; Scswartz, Z. (2007). Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am*, 89(1),pp.139-47.

Raspal, D. (1997).*Cirurgia Maxilo facial*. Editora Médica Panamericana

Reddi, A.H. (1994).Extracelular matrix and bone morphogenetic proteins: molecular approaches to dentina and periodontal repair. In Genco, R. *et.al.* Molecular pathogenesis of periodontal disease. Washington: *Americ Soc Micro*, 35,pp.439-444.

Reinholz GG, Fitzsimmons JS, Casper ME, Ruesink TJ, Chung HW, Schagemann JC, O'Driscoll SW. (2009). Rejuvenation of periosteal chondrogenesis using local growth factor injection. *Osteoarthritis Cartilage*, 17,pp.723-734.

Ripamonti U, Heliotis M, van den Heever B, Reddi AH. (1994). Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in baboons (*Papio ursinus*). *J Periodont Res*, 29,pp.439-445.

Ripamonti U, Ma S, vanden Heever B, Reddi AH.(1992). Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrate, induces rapid bone differentiation in calvaria defects of adult primates. *Plast Reconstr. Surg*, 90(3),pp.382-42.

Ripamonti, U.; Reddi, A.H.(1994). Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodont Res*, 29(4),pp.225-235.

Ripamonti, U.; Shan, S.S.; Cunningham, N.S.; Yeats, L.; Reddi, A.H.(1993). Reconstruction of the bone-bone marrow organ by osteogenin, a bone morphogenetic protein, and demineralized bone matrix in calvarial defects of adult primates. *Plast Reconstr. Surg*, 91(1),pp.27-36.

Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB.(1987). Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. *J Cell Biol*, 105,pp.457-463.

Rodriguez, A.; Anastassov, G.E.; Lee, H.; Buchbinder, D.; Wettan, H.(2003). Maxillary sinus augmentation with deproteinized bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg*, 61(2),pp.157-63.

Rosen, V.; Thies, R.S. (1995). The cellular and molecular basis of bone formation and repair. *Ed. Springer, Heidelberg*, 8(3),pp.97-102

Ross, R, *et al.* (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial muscle cells in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, pp.1207-10.

Roussy, Y.; Bertrand Duchesne, M.P.; Gagnon, G. (2007). Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. *Clin Oral Implants Res*, 18(5), pp.639-48.

Rutherford, R.B.; Charette, M.; Rueger, D. (1994). Role of osteogenic (bonemorphogenetic) protein and platelet-derived growth factor in periodontal wound healing. In: Genco, R. et al. *Molecular basis of periodontal disease. Washington: American Soc Microb*, 34, pp.427-437.

Safadi, F.F.; Xu, J. Smock, S.L.; Kanaan, R.A.; Selim, A.H.; Odgren, P.R.; Marks Jr, S.C.; Owen, T.A.; Popoff, S.N. (2003). Expression of connective tissue growth factor in bone: its role in osteoblast proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Cell Physiol*, 196(1), pp.51-52.

Sánchez, A. (2003). Is Platelet Rich Plasma Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *J Oral Maxillofac Implants*, 18, pp.93-103.

Sanchez-Fernandes MA, Gallois A, Riedl T, Jurdic P, Hoflack B. (2008). Osteoclasts control osteoblast chemotaxis via PDGF-BB/PDGF receptor beta signaling. *PLoS One*, 3, p.3537

Sant'Ana, A.C.P. (2001). Efeitos da aplicação de diferentes fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-I e TGF- β 1) isolados ou combinados na taxa de proliferação e na adesão de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano a fragmentos radiculares tratados ou não com ácido cítrico e tetraciclina após raspagem. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25137/tde-07122004-112301/>>. [Consultado em 02/06/2014].

Sarkar, M.R.; Augat, P.; Shefelbine, S.J.; Schorlemmer, S.; Huberlang, M.; Claes, L.; Kinzl, L.; Ignatius, A. (2006). Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*, 27(9), pp.1817-23.

Schimming, R.; Schmelzeisen, R. (2004). Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J. Oral Maxillofac Surg*, 62(6), pp.724-9.

Schnitman, P.A.; Whole, P.S.; Rubenstein, J.E. (1990). Immediate fixed interim prosthesis supported by two-stage threaded implants. Methodology and results. *J Oral Implant*, 16, pp.96-105.

Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, pp.983–985

Shih, S.D. et al. (1996). The effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I on epithelial dysplasia. *J Periodont*, 67(11), pp. 1224-1232.

Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turker TJ, Wozney JM, Wikesjö UME. (1995). Periodontal repair in dogs. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodont*, 66, pp.131-8.

Simion M, Rocchietta I, Dellavia C. (2007). Three-dimensional ridge augmentation with xenograft and recombinant human platelet-derived growth factor-BB in humans: report of two cases. *J. Periodont Rest Dent*, 27, pp.109-15.

Sodek, J.; Berkman, F. A. (1987). Bone cell cultures. *Methods Enzymol*, 145, pp.303-24.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Crombrughe BD. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor –beta. *J Cell Biol*, 105, pp.1039-1045.

Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti Jr FH. (2000). Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implant placed into extraction sockets : a histometric study in dogs. *Implants Dent*, 9, pp.126-31.

Steigman M, Garg A. K. (2005). A Comparative study of bilateral sinus lifts performed with platelet-rich plasma alone versus alloplastic graft material reconstituted with blood. *Implant Dent*, 14(3), pp.261-6.

Stein GS, Lian JB. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation inter relationships during progressive development of the osteoblast phenotype, *Endocr. Rev*, 14, pp.424–442.

Thorwarth, M.; Wehran, F.; Schultze-Mosgau, S.; Wiltfang, J.; Schlegel, K.A. (2006). PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without longterm effects on bone formation. *Bone*, 38(1), pp.30-40

Tischer, E., Gospodarowicz, D., Mitchell, R., Silva, M., Schilling, J., Lau, K., Crisp, T., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A. (1989). Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 165, pp.1198–1206

Tomoyasu, A.; Higashio, K.; Kanomata, K.; Goto, M.; Kodaria, K.; Serizawa, H.; Suda, T.; Nakamura, A.; Nojima, J.; Fukuda, T.; Katagiri, T. (2007). Platelet-rich plasma stimulates osteoblastic differentiation in the presence of BMPs. *Biochem Biophys Res Commun*, 361(1), pp.62-7.

Tsay RC, Vo J, Burken A, Eising SB, Lu HH, Landesberg R. (2005). Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg*, 63, pp.521-528.

Urist MR. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150, pp.893-899

Vaisman, N., Gospodarowicz, D., and Neufeld, G. (1990) Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem*, 265, pp.19461–19466.

Van der Dolder, J.; Mooren, R.; Vloon, A.P.; Stoelinga, P.J.; Jansen, J.A. (2006). Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng*, 12, pp.3067-73.

Venturi S.; Venturi M. (2009). "Iodine in evolution of salivary glands and in oral health". *Nutrition and Health*, 20 (2),pp. 119–134.

Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G.(2005). Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *J Oral Maxillofac Implants*, 20,pp.18-123.

Weibrich G. Gnoth SH. Otto M. Reichert TE. Wagner (2002). Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombolytic concentrates in vitro. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 6,pp.168-174.

Weibrich, G. Hansel, T. Kleis, W. Buch, R. Hitzler, W. E. (2004).Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration, *Bone*, 34(4),pp.665-71.

Wozney, J.M.; Rosen, V.; Celeste, A.J.;Mitscock,L.M.Whitters,M.J.;Kriz, R.W.;Hewick,R.M.;Wang,E.A.(1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242(4885),pp.1528-1534

Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domenicucci C, Sodek J. (1988). Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol*, 106,pp.915-924.

Xiang W, Baolin L. Yan J, Yang X.(1993). The effect of BMP on osseointegration of titanium implants. *J Oral Maxillofac Surg*, 51:(6),pp.647-51.

Yamazaki Y, Oida S, Akimoto Y, Shioda S.(1988). Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morfogenetic protein and plaster of Paris. *Clin Orthop Relat Res*, 234,pp.240-9.

You, T.M.; Chouipi, B.H.;Li.J.;Jung,J.H.;Lee,H.J.; Lee, S.h.: Jeong, S.M. (2007).The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects

trated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1038(4),pp.8-12.

Young CS, *et al.*(2011) Preclinical toxicology studies of recombinant human platelet-derived growth factor-bb either alone or in combination with beta-tricalcium phosphate and type I collagen. *J Tissue Eng*, 2010,p. 246215.

Young CS, *et al.* (2009). Release, bio-logical potency, and biochemical integrity of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) combined with augment™ bone graft or GEM 21S beta-tricalcium phosphate (beta-TCP). *J Control Release*, 140,pp. 250–255.

Ziyadeh N, *et al.*(2011). A matched cohort study of the risk of cancer in users of becaplermin. *Adv Skin Wound Care*, 24,pp. 31–39