

Luis André Ferreira Lopes Rego

Plasma Rico em Plaquetas na Implantologia

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

Luis André Ferreira Lopes Rego

Plasma Rico em Plaquetas na Implantologia

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

Luis André Ferreira Lopes Rego

Plasma Rico em Plaquetas na Implantologia

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

(Luís André Ferreira Lopes Rego)

“Alegre-se quem aqui respira na luz rosada.”

Schiller

Resumo

As reabilitações orais implanto-suportadas resolveram grandes limitações das próteses removíveis convencionais. No entanto, o tempo de espera e o sucesso no tratamento com implantes trouxeram novos desafios, tal como o uso de concentrados autólogos de plaquetas para promoção da osteointegração. O plasma rico em plaquetas é definido como um volume de plasma autólogo que contém uma concentração plaquetária acima da concentração normal, presente no sangue, capaz de promover o processo de regeneração dos tecidos.

A presente monografia tem como objetivo observar, através de artigos (controlados randomizados), se existem benefícios da utilização do plasma rico em plaquetas, como modificador da superfície dos implantes dentários, principalmente, compreender se a sua aplicação representa um benefício clínico traduzido no processo de osteointegração e na estabilidade dos implantes. São abordados também os métodos de obtenção do PRP assim como as diferenças entre os seus diversos protocolos.

Abstract

Oral implant supported-rehabilitations resolved the major limitations of conventional dentures. However, the time and success of expected implant treatment brought new challenges, such as the use of autologous platelet concentrates for the promotion of osseointegration.

The platelet rich plasma is defined as an autologous volume of plasma that contains a concentration of platelets above those present in normal blood stream. These are known for promoting hard tissue regeneration as well as soft ones.

The purpose of the present work is to observe, through randomized controlled studies, if there are benefits from the use of platelet rich plasma as a surface modifier in dental implants, mainly, understand if it's application represents a clinical benefit in the osseointegration process and Implant stability. The present thesis also covers methods of obtaining PRP as well as differences among different protocols.

Índice Geral

Introdução	1
Material e Métodos	1
Enquadramento Teórico	2
I. Sangue	2
1. Plaquetas	3
2. Fatores de Crescimento.....	5
II. Conceito de Osteointegração	14
1. Estabilidade Primária:	15
2. Estabilidade Secundária:	15
3. Superfície dos implantes na Osteointegração	16
III. Osso	17
1. Estrutura Macroscópica	19
2. Estrutura Microscópica	19
3. Remodelação/Regeneração	21
IV. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	21
1. Preparação PRP.....	23
2. Plasma rico em fibrina (PRF).	31
3. Presença de Células Brancas no PRP	33
4. Classificações concentrados Plaquetários.....	34

V. Plasma rico em Planquetas na Implantologia	36
1. Elevação do seio Maxilar	37
2. Regeneração de defeitos peri-implantares	37
3. Modificação da superfície do implante com PRP	38
Resultados	38
1. Estudos <i>in vitro</i>	38
2. Estudos Histológicos Em Animais	39
3. Estudos Em Humanos	41
4. Estudo Radiográfico	43
Discussão de resultados	45
Conclusão	49
Referências bibliográficas	51

Dedico...

o meu Trabalho à natureza que o criou

o meu Conhecimento ao mar, ao sol e às flores

a minha Gratidão a Ti que constróis o que sou...

Índice de tabelas

Tabela 1: Os efeitos dos Fatores de crescimento produzidos pelas Plaquetas (Adaptado de Civinini <i>et al.</i> , 2011; Rozman e Bolta, 2007; Everts <i>et al.</i> , 2006).....	13
Tabela 2: Classificação PRP (Adaptado de Michra <i>et al.</i> , 2012).....	34
Tabela 3: Percentagem BIC para controlo e grupo teste (Adaptado de Garcia <i>et al.</i> , 2010).....	40
Tabela 4: Valores de Periotest® durante o período de controlo (Adaptado de Kundu e Rathee,2014).....	43

Índice de figuras

Figura 1: A estrutura da Plaqueta (Adaptado de Hoffbrand e Pettit, 2001).....	6
Figura 2: Ilustração sistemática da sequência da ação dos diferentes fatores de crescimento nas diferentes etapas do processo de regeneração (Adaptado de Everts <i>et al.</i> , 2006).....	7
Figura 3: Composição do tecido ósseo (Adaptado de Vasconcelos, 2001).....	18
Figura 4: Esquema representativo da distribuição e localização na matriz óssea das células da linha osteoblástica (Adaptado de Faloni, 2006).....	20
Figura 5: Esquema representativo da preparação geral do PRP (Adaptado de Perez <i>et al.</i> , 2014).....	25
Figura 6: 1ª Centrifugação (<i>soft-spin</i>) (Adaptado de Garcia <i>et al.</i> , 2010).....	26
Figura 7: Representação das diferentes camadas após a 1ª Centrifugação (Adaptado de Anitua <i>et al.</i> , 2004).....	27
Figura 8: Representação Protocolo de duas centrifugações para obtenção de diferentes tipos de PRP (Adaptado de Ehrenfest <i>et al.</i> , 2009).....	28
Figura 9: a) Composição do plasma rico em Fibrina segundo protocolo de Choukroun b) Membrana de PRF Depois da compressão (Adaptado de Ehrenfest <i>et al.</i> , 2009).....	32
Figura 10: Classificação de diversos sistemas de obtenção de concentrados disponíveis e respetiva ilustração da arquitetura da matriz e das células (Adaptado de Ehrenfest <i>et al.</i> , 2009).....	35

Figura 11: Implante imergido em PRP (Adaptado de Anil *et al.*, 2011).....38

Lista de Abreviaturas

FC – Fator de crescimento.

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas;

TGF – β - Fator de crescimento transformado – β ;

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular;

IGF - Fator de crescimento tipo insulínico;

FGF - Fator crescimento fibroblastos;

EGF - Fator de crescimento epidérmico;

CTGF - Fator de crescimento de tecido conjuntivo;

PPP - Plasma pobre em plaquetas;

P-PRP - Puro-PRP;

L-PRP - PRP rico em leucócitos.

Introdução

O Plasma rico em plaquetas (PRP) é definido como sendo um volume de plasma autólogo que contém uma concentração de plaquetas acima da concentração normal presente na corrente sanguínea. Além das plaquetas, o PRP também contém fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformado- β (TGF- β), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento tipo insulínico (IGF-I, IGF-II), o fator de crescimento fibroblastos (FGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF). Os fatores de crescimento referidos desempenham funções específicas no processo de regeneração de tecidos duros e tecidos moles. (Marx e Robert, 2001, Civinini *et al.*, 2011)

O plasma rico em plaquetas é um material obtido por meio da centrifugação de uma quantidade de sangue do próprio paciente, seguido do processo de centrifugação onde será selecionada a camada intermédia, contendo uma concentração 4 vezes superior à do sangue. Na prática cirúrgica, o seu uso tem, como objetivo, o aumento da velocidade e qualidade da regeneração de tecido ósseo e de tecido mole. Tornando as suas aplicação na área da implantologia muito promissoras e alvo de muita atenção por parte da comunidade científica .

A reabilitação oral implanto-suportada constitui uma opção terapêutica exequível, profícua para endentações parciais e totais. A osteointegração de implantes apresenta-se como uma modalidade de tratamento promissora, o que justifica o número crescente de pacientes reabilitados com implantes dentários e as suas elevadas taxas de sucesso.

O uso do plasma rico em plaquetas durante a colocação do implante dentário tem sido descrito e discutido por parte da comunidade científica como tratamento de superfície, para a estimulação e aceleração do processo de osteointegração e para se obter superior estabilidade primária.

Este trabalho pretende observar se existem benefícios da utilização do plasma rico em plaquetas, como modificador da superfície dos implantes dentários colocados em osso nativo, nomeadamente compreender se a aplicação do PRP representa um benefício clínico, traduzido no processo de osteointegração e na estabilidade dos implantes.

Foram seleccionados artigos controlados randomizados e revisões bibliográficas, com a disponibilidade de texto e com um espectro de 10 anos, recorrendo às seguintes palavras-chave: “Growth Factors”, ”PRP”, “ implant”, “osteointegration” sendo estas palavras conjugadas entre si mediante a necessidade de pesquisa.

Da análise da literatura científica constatamos que, embora ocorram benefícios da aplicação do PRP no momento da colocação dos implante, nomeadamente na estabilidade implantar primária, ainda há a necessidade de muitas pesquisas, uma vez que há diversas dúvidas sobre o real benefício do efeito do PRP na neoformação óssea em redor do implante, assim como na estabilidade implantar. Conforme destacado nas considerações finais.

Material e Métodos

De modo a atingir os objetivos definidos para este trabalho efetuou-se uma pesquisa bibliográfica, recorrendo às bases de dados Pubmed (Medline) e Scielo e B-on.

Foram selecionados no tipo de artigos "Clinical trial", "review" e "meta-analysis", com a disponibilidade de texto as palavras-chave foram: "PRP", "PRP implant", "PRP osteointegration", tendo-se obtido, respectivamente, 53, 28, 30 artigos, perfazendo um total de 95 artigos, dos quais, após restrições bibliográficas em português, espanhol, inglês e francês 14 foram utilizados e divididos em, estudos *in vitro*, estudos em animais, estudos em humanos e estudos radiográficos

As pesquisas foram realizadas nas bibliotecas da Universidade Fernando Pessoa e da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Enquadramento Teórico

I. Sangue

Considerado um tecido conjuntivo vivo, o sangue é um líquido complexo no qual estão suspensos diversos tipos de células. Constitui o principal sistema de transporte do corpo, sendo que todas as funções que lhe são atribuídas são inteiramente dependentes da circulação. Logo, as funções do sangue são restritamente ligadas às do sistema circulatório, que se incumbem de produzir a energia necessária para que o sangue circule e seja, assim, distribuído por todo o organismo (Bozzini e Molinas, 2004; Ivan e Drangov, 2005).

Dentre as funções do sangue, podemos destacar: função respiratória; função de nutrição; função de excreção; função de defesa; função de regulação e equilíbrio hídrico; função de regulação do valor do pH; função de regulação da pressão osmótica; função de transporte hormonal; função de distribuição do calor; função da pressão sanguínea (Kolbe *et al.*, 1984).

O sangue é composto por plasma e por células, nomeadamente: eritrócitos ou glóbulos vermelhos, leucócitos ou glóbulos brancos e plaquetas. Se os fatores de coagulação forem removidos, a solução passa a ser designada de soro (Guyton, 1984).

O plasma constitui um total de 55% do volume total sanguíneo e é composto por 90% de água, cerca de 2% de elementos inorgânicos, 7% de proteínas plasmáticas, em especial a albumina, imunoglobulinas e fibrinogênio, e 1% de elementos orgânicos não proteicos, materiais resultantes do metabolismo celular e hormonas. Além disto, o sangue é rico em Oxigénio (O₂) e Dióxido de Carbono (CO₂) (Dori *et al.*, 2007)

Em geral, o movimento do sangue mantém as células suficientemente espalhadas no plasma, contudo se uma amostra de sangue é preservada em repouso, impedindo que coagule mediante a adição de anticoagulante, de maneira a evitar a coagulação, os elementos celulares depositam-se no fundo do recipiente. (Bozzini e Molinas, 2004) Os

glóbulos sedimentam em duas camadas facilmente distinguíveis. A camada inferior representa 42 a 47% do volume total do sangue, apresentando uma cor avermelhada devido á presença de eritrócitos. A camada imediatamente superior (1% volume do sangue) tem cor acinzentada, pois contém leucócitos. Uma camada delgada de plaquetas deposita-se sobre os leucócitos. (Junqueira e Carneiro, 2008)

1. Plaquetas

As Plaquetas são fragmentos de megacariócitos e assemelham-se a um disco oblongo medindo 2-4µm no longo eixo. Estas contém algumas mitocôndrias para metabolismo aeróbico e armazenam glicogénio para metabolismo anaeróbico possuindo também, grânulos de grande importância na coagulação (20%) (Hillman, 2002)

O seu papel fisiológico primário é o reconhecimento do dano presente no endotélio do vaso sanguíneo, acumulando-se nesse local, onde iniciará a coagulação sanguínea (Everts *et al.*, 2006).

Existem aproximadamente um trilião de plaquetas no sangue de um humano adulto. Devido ao tempo de vida ser de apenas 8-10 dias, 100 bilhões de novas plaquetas têm de ser produzidas diariamente pelos megacariócitos para que seja mantido o número normal de plaquetas em circulação ($150-400 \times 10^9$ Plaquetas por litro de sangue) (Italiano e Hartwig, 2007)

Marques *et al.*, (2014), demonstraram uma diferença significativa na contagem de plaquetas em diferentes idades e géneros, tendo o género feminino e pessoas mais jovens apresentado quantidades significativamente mais elevadas de plaquetas.

Na cicatrização ocorrem uma série de eventos, sendo as plaquetas e as alterações na parede dos vasos os responsáveis pelas reações mais importantes no processo da coagulação sanguínea. A cicatrização inicia-se com a formação de um coágulo

plaquetário, seguidamente dá-se a ativação da cascata de coagulação e, por último, a desgranulação plaquetária (Everts *et al.*, 2006).

As plaquetas iniciam o processo hemostático, passando de um estado inerte para originar um processo de várias etapas, tais como:

Adesão: as plaquetas aderem-se especificamente ao endotélio que se torna exposto após rutura do vaso e interage com as fibras de colagénio situadas no interior da parede do vaso sanguíneo (Gottrup *et al.*, 2001). A adesão estável com o colagénio induz a libertação de mediadores solúveis por parte das plaquetas, levando ao recrutamento e ativação de outras plaquetas (Gawaz, 2005).

Ativação: As plaquetas são ativadas pela ligação com o substrato do colagénio ou outras proteínas que estejam expostas durante o dano vascular (Ex: trombina) passando de forma discoide para esférica emitindo pseudópodes que permitem contato interplaquetário. Após a ativação ocorre uma alteração nas glicoproteínas da membrana plaquetária que favorecem a tendência de união entre as plaquetas. (Gottrup *et al.*, 2001) (Gawaz, 2005)

Agregação: Após formação do trombo plaquetário, as plaquetas unidas dependem da ativação de recetores que aderem ao fibrinogénio iniciam a desgranulação, libertando o conteúdo presente nos grânulos pelo sistema canalicular. (Everts *et al.*, 2006)

A descoberta de que essas células metabolicamente ativas tem um papel para além da coagulação sanguínea, tal como reservatório de moléculas biologicamente ativas, surpreendeu a comunidade científica. Plaquetas contêm centenas de proteínas diferentes e fatores de crescimento com grande potencial de reparação dos tecidos lesados. (Leslie, 2010; Semple *et al.*, 2011)

Durante a desgranulação plaquetária, muitas substâncias biológicas ativas são libertadas, participando na hemostasia primária e auxiliando na reparação e regeneração de tecido duro e tecido mole. (Cochran e Rouse, 1993)

Os grânulos das plaquetas libertados após ativação essencialmente de pelo menos três tipos: grânulos α , grânulos de núcleo denso e lisossomas. (Zarbock, 2006)

2. Fatores de Crescimento

Fatores de crescimento são libertados pelas plaquetas e outras células para promover a proliferação e migração celular, resultando na formação de novos vasos sanguíneos e granulação de tecidos essenciais à reparação da lesão (Suzuki *et al.*, 2013).

Os fatores de crescimento ou sinalizadores moleculares estão presentes em diversos tecidos, maioritariamente, quando estão em fase de remodelação ou reparação, apresentando um papel fundamental nos processos de proliferação celular, diferenciação, quimiotaxia e formação de matriz (Howell e Fiorellini, 1997).

Quando libertados, após a ativação plaquetária, exibem a habilidade de formar tecido através da iniciação e modulação da ferida, tanto em tecido duro, como também, em tecido mole (Anitua *et al.*, 2004).

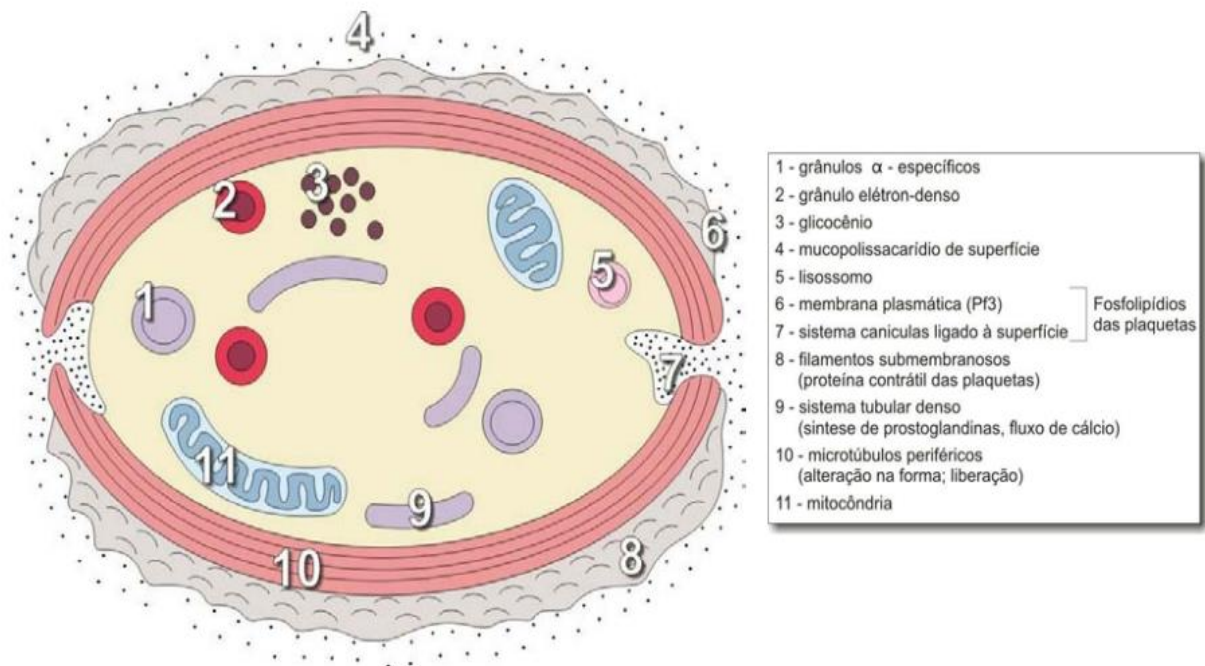


Figura 1 - A estrutura da Plaqueta (Adaptado de Hoffbrand e Pettit, 2001).

É nos grânulos- α das plaquetas que são identificados os fatores de crescimento: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) fator de crescimento transformado $-\beta$ (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento tipo insulínico (IGF-I, IGF-II), fator crescimento fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) (Bennett e Schultz, 1993).

Os fatores de crescimento atuam de localmente. A estimulação celular realiza-se por um sistema autócrino, ou seja, as células produzem e respondem aos mediadores biológicos ou por sistema parácrino onde a célula que produz o fator se encontra na proximidade das células que a própria afeta(Everts *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação dos fatores de crescimento começa com a sua união aos recetores específicos da membrana. Para cada classe de factores de crescimento, existe um recetor ou conjunto de recetores específicos. As células respondem a um FC apenas se tiverem á sua disposição a proteína recetora apropriada. Os fatores são um estímulo necessário para iniciar uma cadeia de eventos celulares que tem como resultado diferentes funções

(Fig.4). O processo está mediado por um sistema de segundos mensageiros, onde intervém uma proteína tirosina. Devido a este mecanismo a ação dos fatores crescimento no lugar da lesão prolonga-se, mesmo que tenham desaparecido estes mesmos do meio (Everts *et al.*, 2006).

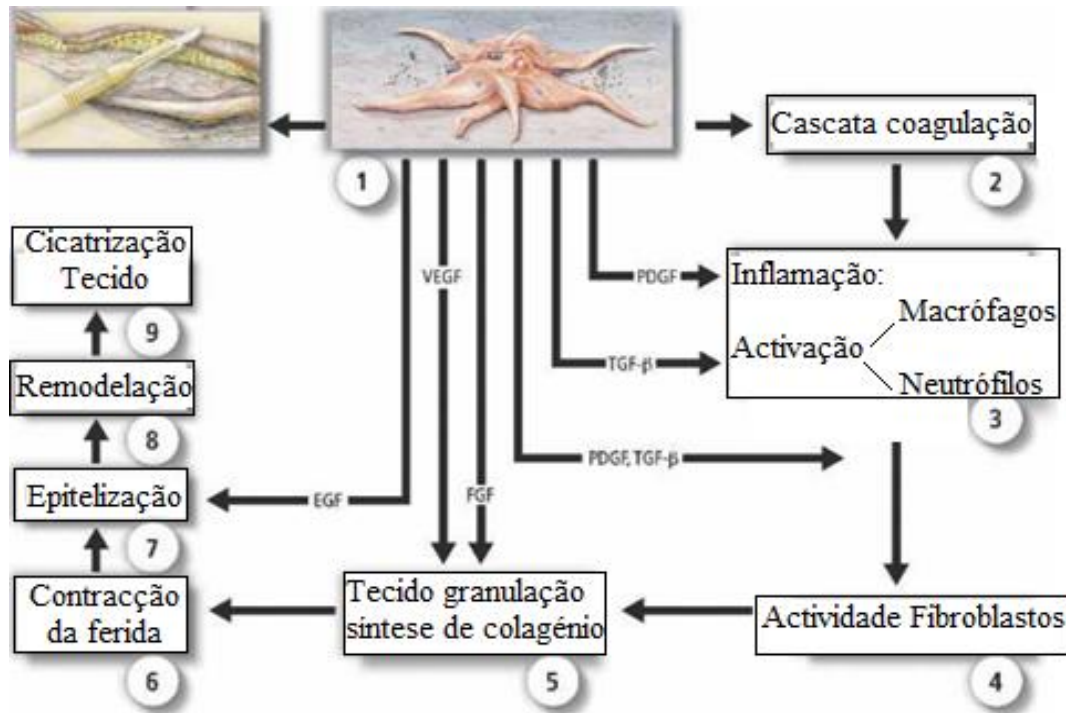


Figura 2 - Ilustração sistemática da sequência da ação dos diferentes fatores de crescimento nas diferentes etapas do processo de regeneração (Adaptado de Everts *et al.*, 2006).

A adição exógena de fatores de crescimento tem mostrado acelerar o normal processo de cicatrização (Suzuki *et al.*, 2013).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é uma proteína catiónica dimétrica, exerce seus efeitos sobre células alvo pela ativação dos recetores α e β , estruturalmente relacionados à proteína tirosina quinase, que expressam potentes sinais mitogénicos (Lynch *et al.*, 1991).

As atividades específicas mais importantes do PDGF incluem mitogénese, angiogénese e ativação de macrófagos (desbridamento do local da ferida e numa segunda fase, fonte de fatores de crescimento para a reparação contínua e regeneração óssea) (Robert *et al.*, 1998).

São glicoproteínas formadas por duas cadeias de aminoácidos A e B, que se encontram em 3 diferentes formas: PDGF- AB, PDGF-AA e PDGF-BB O recetor A interage com todas as formas de PDGF (PDGF-AB, PDGF-AA e PDGF-BB), enquanto o recetor B é específico para a forma PDGF-BB (Vale, 2002). Estudos «*in vitro*» têm demonstrado que, entre as diferentes isoformas de PDGF, a isoforma PDGF-BB mostrou ser a mais efetiva em todos os parâmetros celulares, como mitogénese e quimiotaxia celular, sendo assim considerada a forma mais indicada para terapia reconstrutiva dos tecidos craniofaciais (Vanessa e Marcus, 2012).

Segundo Mumford *et al.* (2001), o mecanismo de ação para o qual o PDGF promove neoformação tecidual, pode ser explicado pela ligação deste fator aos recetores específicos β presentes em células do ligamento periodontal e células ósseas, estimulando efeitos na replicação do DNA celular e quimiotaxia desta células.

Sarment *et al.*(2006), mostrou a importância do PDGF na expressão de piridinolina (moléculas interligadoras do colágeno tipo I), atuando como um importante modulador do *turn-over* ósseo.

TGF

O Factor de crescimento transformado (TGF) é um fator de crescimento multifuncional que demonstra ser um mediador normal da fisiologia celular e embriogénese dos tecidos (Millis, 1999).

TGF- β representa um mecanismo para a sustentar a longo prazo o reparo/regeneração óssea (Anitua *et al.*, 2012).

Os fatores de crescimento transformador β mais comuns no PRP são TGF- β 1 e TGF- β 2. São proteínas que quando libertadas pela desgranulação das plaquetas, participam nos processos inflamatórios e de reparação (Robert *et al.*, 1998).

Este fator de crescimento apresenta um efeito mitogénico para fibroblastos e é um potente estimulador de colágeno, fibronectina e produção de proteoglicanos pelos fibroblastos. São importantes no recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas para formação de calo ósseo (Millis, 1999).

As funções mais importantes do TGF- β são a quimiotaxia e a mitogênese dos osteoblastos. Apresenta a capacidade de estimular a deposição da matriz de colagénio pelos osteoblastos assim como inibir a formação osteoclastos e reabsorção do osso, favorecendo assim a formação óssea sobre a reabsorção por dois mecanismos diferentes (Millis, 1999; Robert *et al.*, 1998)

FGF

O fator de crescimento de fibroblastos induz a produção de colagénio pelos fibroblastos, assim como a remodelação e contração dos tecidos. As isoformas mais abundantes e estudadas são FGF-1 (FGF ácido) e FGF-2 (FGF básico.) Cada isoforma apresenta uma ampla gama de funções. (Rozman e Bolta, 2007), sendo ambas produzidas pelas células endoteliais, fibroblastos e macrófagos. Estas circulam ligadas à heparina e são abundantemente libertadas durante o dano tecidual de cirurgias e traumatismos. (Partanen *et al.*, 1992).

O FGF-1 participa na proliferação, diferenciação, angiogénese e migração celular. O FGF-2 estimula o crescimento de fibroblastos, mioblastos, osteoblastos, células neuronais, células endoteliais, queratinócitos e condrócitos. Estimula também a angiogénese, proliferação células endoteliais e síntese de colagénio (Rozman e Bolta, 2007).

VEGF

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), também denominado do fator de permeabilidade, é o mais potente dos promotores de crescimento vascular, apresentando 5 isoformas diferentes, sendo o VEGF-A o mais abundante nas plaquetas. (Kawase *et al.*, 2005)

O VEGF é um mitogénico muito específico para as células endoteliais. Este fator de crescimento induz a proliferação das células endoteliais, promove migração celular e inibe apoptose. In vivo induz angiogênese assim como a permeabilização dos vasos sanguíneos e tem um papel central na regulação da vasculogênese. Como tal desempenha um papel importante na regeneração do tecido ósseo (Neufeld *et al.*, 1999).

A Angiogênese desempenha um papel importante na cicatrização visto que este processo proporciona um mecanismo para novos fatores de crescimento chegarem ao local da ferida (Lindeboom *et al.*, 2007).

O VEGF permanece nos coágulos de fibrina onde mantém a habilidade de induzir a proliferação celular, migração monócitos (Pintucci *et al.*, 2002).

IGF

O factor de crescimento do tipo insulínico (IGF) é uma proteína angiogénica que estimula a proliferação das células endoteliais macro vasculares (Rozman e Bolta, 2007).

Não só estimula a replicação celular em tecidos de diferentes origens, como também, promove a diferenciação de células como condrócitos, mioblastos e osteoblastos (Rozman e Bolta, 2007).

Durante a formação óssea, o IGF é secretado pelos osteoblastos, com o objetivo de aumentar a osteogênese e acelerar o processo de deposição óssea (Bezerra e Lenharo, 2002).

EGF

O factor de crescimento epidérmico (EGF) estimula a síntese do colagénio pelos fibroblastos, a síntese da matriz pelas células ósseas e interage, sinergicamente, com o PDGF e o FGF para facilitar a proliferação dos mesmos (Rozman e Bolta, 2007; Civinini *et al.*, 2011) Promove a quimiotaxia e mitogénese das células mesenquimais e epiteliais, atuando na regeneração de múltiplos tecidos. Estimula a re-epitelização, angiogénese e influência a síntese e o “*turn-over*” da matriz extracelular (Civinini *et al.*, 2011).

Devido ao seu importante papel na regulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular EGF é um potente mitogénio específico, mas não exclusiva para células epiteliais. (Civinini *et al.*, 2011)

CTGF

O factor de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) é o fator de crescimento descrito mais recente, na literatura (Civinini *et al.*, 2011). Segundo Kubota, (2004), as plaquetas aderem ao CTGF no local da lesão, onde será expresso juntamente com o processo de coagulação das plaquetas. De acordo com um estudo realizado por este autor as plaquetas não ativadas contêm um número considerável de CTGF sendo este libertado pelo PRP activado.

Cicha (2004) demonstrou que o CTGF é expressado nas células da medula óssea, e não nos megacariócitos, sugerindo que a quantidade total de CTGF nas plaquetas, resulta de endocitose pelo meio extracelular na medula óssea.

O CTGF promove a atividade angiogénica, a regeneração da cartilagem e a fibrose, assim como, a proliferação, a migração e a formação das células do tubo endotelial vascular. Este FC é também um potente estimulador da proliferação e diferenciação dos osteoblastos e da mineralização da matriz (Rozman e Bolta, 2007; Civinini *et al.*, 2011)

PDGF	<ul style="list-style-type: none"> • Ativação macrófagos, neutrófilos • Angiogénese. • Quimiotaxia para fibroblastos, células mesenquimais • Síntese de colagénio. • Proliferação de células ósseas. • Activa TGF-β
TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta atividade proliferativa dos fibroblastos. • Estimula a biossíntese de colagénio tipo 1 e fibronectina. • Induz a deposição de matriz óssea. • Inibe a formação de osteoclastos e reabsorção óssea. • Estimula síntese de colagénio • Diminuí cicatrizes dérmicas
FGF	<ul style="list-style-type: none"> • Participa na proliferação, diferenciação, angiogénese e migração celular. • Produção de colagénio pelos fibroblastos. • Remodelação e contração dos tecidos. • Estimula o crescimento de fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais e queratinócitos. • Estimula a angiogénese, proliferação células endoteliais e síntese de colagénio. • Participa na contração da ferida, síntese da matriz e epitelização.
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Migração e mitose de células endoteliais. • Angiogénese. • Quimiotaxia para macrófagos e granulócitos. • Vasodilatação (pela libertação óxido nítrico).
IGF	<ul style="list-style-type: none"> • Quimiotaxia dos fibroblastos e estimulação da síntese proteica. • Aumenta formação óssea devido á proliferação e diferenciação dos osteoblastos. • Estimula a síntese de colagénio e da matriz pelas células ósseas.
EGF	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula a proliferação e diferenciação células epiteliais e epidérmicas. • Quimiotaxia para fibroblastos • Estimula a re-epitelização • Influencia a síntese e o “turn-over” da matriz extracelular
CTGF	<ul style="list-style-type: none"> • Induz a proliferação, migração e formação das células do tubo endotelial vascular • Angiogénese • Potente estimulador da proliferação e diferenciação dos osteoblastos • Estimula mineralização da matriz

Tabela 1- Os efeitos dos Fatores de crescimento produzidos pelas Plaquetas (Adaptado de Civinini et al., 2011; Rozman e Bolta, 2007; Everts et al., 2006).

II. Conceito de Osteointegração

A descoberta da osteointegração adveio dos estudos do professor sueco Per Ingvar Brånemark e seus colaboradores, publicados em 1969, que verificaram que a colocação de implantes de titânio no osso vital desencadeava um mecanismo fisiológico de ancoragem óssea, causada pelo contacto direto entre osso-implante, que posteriormente viria a ser designado de processo de osteointegração. Assim, estes investigadores utilizaram implantes de titânio ancorados no osso maxilar, permitindo mais tarde a sua utilização em reabilitações orais implanto-suportadas (Anitua, 2006).

A osteointegração define-se como uma união direta estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante submetido a carga que depende essencialmente da superfície dos implantes, da biocompatibilidade do material que constitui o implante, da densidade óssea e do desenho do implante (Albrektsson *et al.*, 1986).

A Osteointegração depende também da neoformação de tecido ósseo em torno do implante, resultante de um conjunto de fenómenos inerentes ao processo de remodelação óssea. Após o preparo do leito cirúrgico e instalação do implante, o primeiro tecido a entrar em contato com o implante é o coágulo sanguíneo, particularmente a fibrina e as plaquetas. Dependendo das propriedades indutoras e da morfologia da superfície dos implantes, no primeiro dia da implantação, osteoblastos e células mesenquimais aderem à superfície do implante com a finalidade de produzir fibras de colagénio. Após alguns dias, o osso imaturo e o osso trabecular reparador estão presentes no espaço entre o implante e o tecido ósseo. O osso trabecular é então progressivamente substituído por osso lamelar maduro, suportando algumas modificações através dos processos de osteogénese e reabsorção óssea, caracterizando assim a osteointegração (Elias *et al.*, 2010).

O potencial de osteointegração e da sua qualidade tem sido o centro de múltiplos esforços por parte de vários investigadores da atualidade, tendo estes como principal objetivo, procurar atingir a interface ideal entre o osso e o implante dentário, através do aumento da qualidade da superfície do implante (Renvert *et al.*, 2009).

1. Estabilidade Primária:

Pode definir-se como sendo a fixação primária adquirida no momento de inserção do implante no seu leito. A estabilidade primária é a ausência de mobilidade do implante no leito implantar após ter sido completamente inserido. A taxa de sucesso dos implantes osteointegráveis e a otimização do tratamento dependem da estabilidade primária. Os implantes instalados com alta estabilidade primária podem ser submetidos á carga imediata (Elias e Rocha, 2010).

Entre os fatores que influenciam a estabilidade primária destacam: a qualidade e quantidade óssea, a técnica cirúrgica, o desenho do implante e a superfície do implante. Entretanto, como cada um desses fatores exerce diferente influência, ainda é incerta a interação entre estes parâmetros, o que gera discussão entre a comunidade científica. A estabilidade do implante, alcançada após a sua inserção, é considerada como um acontecimento crítico para o prognóstico da osteointegração. Ramakrishna e Nayar (2007) defendem que durante a colocação do implante, o conhecimento da estabilidade primária pode também servir como um guia na tomada de decisão quanto à escolha do protocolo de tratamento a realizar: carga imediata, carga precoce ou carga tardia.

2. Estabilidade Secundária:

A estabilidade secundária pode definir-se como sendo a fixação secundária obtida durante o processo de cicatrização e remodelação óssea na interface osso-implante, resultante do processo de regeneração sofrido por esta e que se encontra também na dependência da estabilidade primária do implante (Elias *et al.*, 2010)

Os factores que podem condicionar todo o fenómeno da estabilidade secundária são os seguintes: o processo cirúrgico para a colocação do implante, a biocompatibilidade do material que constitui o implante, o desenho do implante, as propriedades da superfície implantar, a quantidade e a qualidade óssea local, assim como o tipo e intensidade das cargas aplicadas sobre o implante em carga (Wennerberg e Albrektsson, 2010).

3. Superfície dos implantes na Osteointegração

De modo a melhorar/aumentar a osteointegração e ancoragem óssea, as modificações na superfície são de ordem química e ou física. A modificação química do dióxido de titânio, como a impregnação com fosfato de cálcio ou flúor, pode melhorar a osteointegração através da aceleração da precipitação de iões minerais na superfície ou através da modulação direta da atividade celular na superfície. (Ramakrishna e Nayar, 2007)

Na análise da influência da forma do implante, consideram-se as dimensões do implante (comprimento, diâmetro, espessura das paredes), perfil (cilíndrico, cónico, híbrido, coniforme), tipo das roscas (triangular, quadrada, trapezoidal, arredondada, microroscas), altura e ângulo das roscas e tipo de conexão (conexão interna na forma de hexágono, hexágono externo e cone Morse). Por outro lado, quanto à morfologia da superfície devem-se analisar a macro e micro-estrutura, bem como a homogeneidade da superfície. Uma macrotopografia adequada pode aumentar a área desenvolvida a interface osso/superfície e assim melhorar a sua interligação biomecânica, enquanto uma microtopografia bem estruturada é capaz de aumentar a absorção de sangue e proteínas da matriz na superfície e também influenciar diretamente as células ósseas a proliferarem e diferenciarem-se (Elias e Rocha, 2010).

Assim, a qualidade da superfície dos implantes dentários vai influenciar diretamente toda a atividade celular próxima à superfície implantar. As propriedades químicas, físicas, mecânicas e topográficas da superfície dos implantes vão interagir com todo o tecido localizado em redor do implante, podendo assim desde logo condicionar ou otimizar todo o processo de osteointegração. Deste modo, a confecção de implantes com espiras desenhadas na sua superfície permitiram um aumento de toda a sua superfície de contacto com o osso, conferindo uma melhor estabilidade primária e fixação aos implantes dentários, durante o fenómeno de Osteointegração (Simonpieri *et al.*, 2012).

Actualmente, são utilizadas superfícies de implantes sujeitas a tratamentos de subtracção químicos e mecânicos, através da acção de ácidos e de procedimentos de jateamento abrasivo, permitindo a obtenção de uma porosidade benéfica para a fixação mecânica.

Segundo Wennerberg *et al.* (2009), os implantes que são sujeitos a jateamento obtêm melhores condições de integração óssea quando comparados com implantes de superfícies maquinadas (lisas).

A rugosidade altera a força de adesão celular na superfície e influenciam na formação de osteoblastos e osteoclastos. A distribuição das forças aplicadas ao implante em carga verificou-se mais eficaz em implantes de superfície rugosa do que em implantes de superfície (Wennerberg e Albrektsson, 2010).

Apesar da quantidade extensa de estudos que comparam implantes de superfícies lisas com superfícies porosas, ainda existe bastante controvérsia entre os autores quanto àquela que será a melhor superfície implantar (Wennerberg e Albrektsson, 2010).

3. Osso

O osso é um tecido vivo, adaptativo e conetivo que para além da função de suporte mecânico, é também um reservatório de cálcio para o organismo (Melissa e José, 2004).

Pode definir-se histologicamente o tecido ósseo como uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, formado por células e material extracelular calcificado denominado de matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 2008).

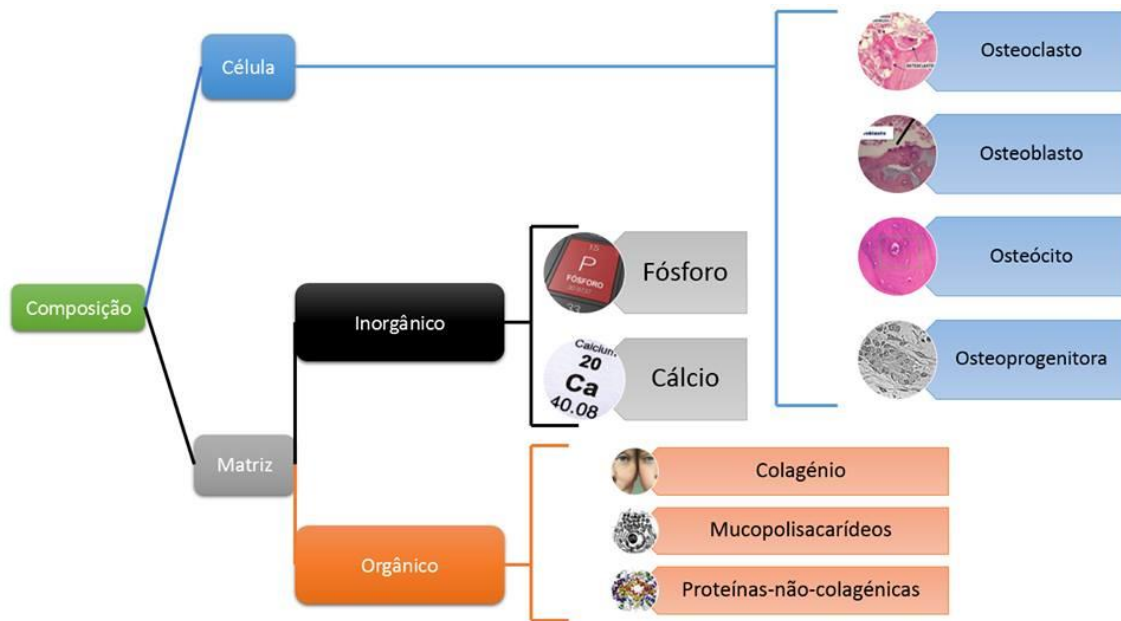


Figura 3 - Composição do tecido ósseo (Adaptado de Vasconcelos, 2001).

Matriz Óssea

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado, sendo a matriz constituída por uma componente inorgânica que é composta essencialmente por sais cristalinos, nomeadamente compostos de cálcio e fosfato, do qual a hidroxiapatite se destaca como o mais abundante. Representando 60% do seu peso, enquanto a componente orgânica corresponde a 30% do peso (em que 90% correspondem a colagénio e proteínas associadas ao colagénio e 10% correspondem a proteoglicanos e outras proteínas não colagenosas) e 10% é água (Vasconcelos, 2001).

O osso é revestido na sua face externa pelo perióstio, ou seja, por tecido conjuntivo denso. A ligação entre este tecido e o osso faz-se através de fibras de colagénio, denominadas de fibras de Sharpey. Estas, penetram no tecido ósseo permitindo a fixação do perióstio ao osso. Já na sua face interna existe tecido conjuntivo laxo que constitui o endóstio. Este revestimento externo e interno ocorre em todo o osso com exceção das cartilagens sinoviais (Gitirana, B. 2004).

1. Estrutura Macroscópica

Macroscopicamente o osso é classificado em tecido compacto (cortical) e por osso esponjoso (trabeculado) (Vasconcelos, 2001).

O osso compacto é um tecido denso, bem vascularizado e mineralizado, representando 80% da massa óssea, compondo o córtex dos ossos longos (Hall e Watt, 1989). É responsável pela resistência óssea, sendo que as lâminas encontram-se compactadas entre si, não havendo cavidades (Anitua, 1999).

O osso esponjoso representa 20% da massa óssea total. (Hall e Watt, 1989) Este confere uma resistência adicional ao osso, respondendo rapidamente às suas necessidades fisiológicas. Devido à sua grande área de superfície, a reabsorção e aposição óssea tornam-se relativamente fáceis (Gray, 1995).

2. Estrutura Microscópica

Existem quatro tipos de células no tecido ósseo: as células osteoprogenitoras, os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos (Ross, M. et al., 1993).

As células osteoprogenitoras são células indiferenciadas, capazes de se diferenciar em células ósseas.

Osteoblastos são células não mitóticas e diferenciadas, que surgem das células osteoprogenitoras. A sua principal atividade é sintetizar e secretar a matriz orgânica do osso (Gray, 1995). Estas células formam vesículas que acumulam íons de cálcio, íons de fosfato e várias enzimas, sendo o seu conteúdo libertado por exocitose e utilizado na formação dos cristais de hidroxiapatite. É em consequência deste processo que se forma a matriz óssea mineralizada. A formação de osso pelos osteoblastos designa-se osteogénese. A partir do momento em que o osteoblasto fica rodeado por matriz óssea,

torna-se uma célula madura-osteócito, produzindo os componentes necessários para manter a matriz óssea, ocupando espaços denominados lacunas (Seeley *et al.*, 2003).

Osteoclastos são células grandes com vários núcleos, desenvolvem-se a partir de monócitos, sendo responsáveis pela reabsorção ou destruição do osso, libertando enzimas que digerem os componentes protéticos da matriz. A estimulação dos osteoclastos para reabsorver o osso está dependente de múltiplos fatores, inclusive por osteoblastos como também macrófagos e linfócitos (Seeley *et al.*, 2003).

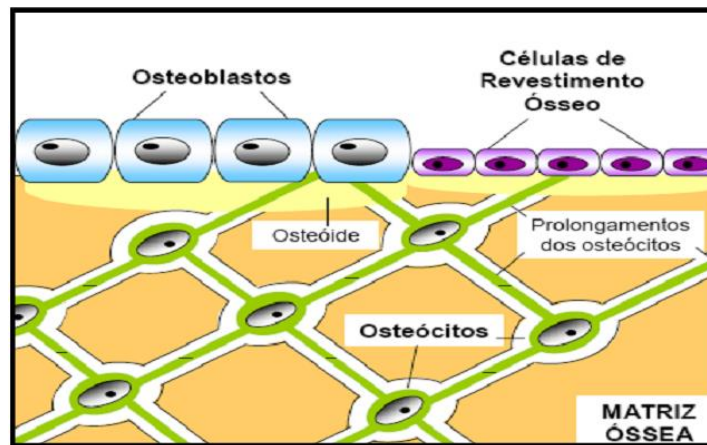


Figura 4 - Esquema representativo da distribuição e localização na matriz óssea das células da linha osteoblástica (Adaptado Faloni, 2006).

Conforme se verifica na Fig 2, os osteoblastos e as células de revestimento ósseo encontram-se dispostos numa camada contínua, à superfície da matriz. Os osteócitos encontram-se situados no interior de lacunas existentes na matriz óssea. Por sua vez, uma densa rede de microcanais interligam as lacunas entre si e alojam os prolongamentos dos osteócitos. Este conjunto (osteócitos e sistema lacuno-canalicular) forma uma complexa rede que permite a comunicação entre os osteoblastos, osteócitos e as células de revestimento ósseo (Faloni, 2006).

Quando ocorre reabsorção, os osteoclastos são ativados pelos osteoblastos, ao mesmo tempo que os osteoblastos degradam a fina camada osteoide que recobre o osso através

de enzimas proteolíticas. Posteriormente, os osteoblastos libertam-se da superfície óssea, deixando espaço para os osteoclastos se aderirem e começarem a reabsorção através da degradação ácida da matriz e minerais. Passadas três semanas os osteoclastos deslocam-se para o próximo local, enquanto que, os fatores de crescimento (TGF- β e IGF-I e II) são libertados estimulando os osteoblastos a depositar novo osso (Lerner, 2000).

3. Remodelação/Regeneração

O osso regenera sem deixar cicatriz, ao contrário de outros tecidos conectivos, sendo o objetivo, preencher o defeito ou restabelecer a continuidade do mesmo. A reparação óssea em situações de fraturas ou de contacto com biomaterial, como os implantes dentários, exhibe semelhanças óbvias (Davies e Hosseini, 2000).

Existem 3 mecanismos relacionados com a regeneração do tecido ósseo: a osteogénese é a criação de novo osso através das células, essencialmente osteoblastos. A osteoindução consiste na produção de sinais reguladores do metabolismo ósseo, tais como factores de crescimento que modificam a proporção de osso pré-existente, aumentam a mitose e a secreção de proteínas das células presentes, conferindo às células ósseas uma capacidade limitada de regeneração. A osteocondução é a capacidade de guia para o crescimento ósseo e permitir a aposição de novo osso, isolando o defeito e impedindo o crescimento do tecido conjuntivo para o interior do mesmo (Aldecoa, 2001).

IV. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Desde a década de 90, foram vários os estudos que proporcionaram o desenvolvimento de preparações ricas em plaquetas que melhorassem as capacidades de reparação de tecidos, aumentando a quantidade de fatores de crescimento e proteínas secretadas pelas plaquetas (Anitua, 1999).

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi inicialmente introduzido no campo da cirurgia oral e maxilofacial por Marx *et al.* (1998). Este autor relatou que o PRP promove a formação óssea em defeitos mandibulares, observando-se rápida maturação dos enxertos ósseos autólogos (*cit. in* Garcia et al., 2005; Lee et al., 2013).

Se se considerar que um determinado número de plaquetas já teria capacidade suficiente para interagir entre si e com as outras células para promoverem o processo de reparação, conseqüentemente, o aumento no número dessas, levaria a uma melhor e maior atividade do processo de cicatrização (Garcia et al., 2005).

O PRP é um produto orgânico, atóxico e não imunorreativo, que tem sido utilizado para acelerar o reparo das feridas cirúrgicas a partir dos vários fatores de crescimento que o constituem (Garcia et al., 2005). Segundo Civinini *et al.*, (2011), o PRP não é osteoindutivo, não tem a capacidade de induzir formação óssea de novo.

A principal vantagem do uso do PRP está no fato de o mesmo ser oriundo do próprio paciente, não sendo, dessa forma, tóxico ou capaz de gerar imunorreação, ou seja, livre de doenças transmissíveis (Suzuki et al., 2013).

Segundo Lynch (1991), o PRP é um produto derivado do processamento laboratorial do sangue autógeno, coletado no período pré-operatório, e rico em fatores de crescimento originários dos grânulos alfa-plaquetários, (*cit. in* Garcia et al., 2005).

Apesar das diversas variáveis que afectam a actividade biológica do PRP, (Mazzocca et al., 2012). Marx e Robert, (2001) Definem o PRP como sendo um volume de plasma autólogo que contém uma concentração plaquetária acima da concentração normal presente na corrente sanguínea (200,000/ μ l). A regeneração óssea e tecidual é promovida pela concentração de 1,000,000 plaquetas/ μ l presentes em 5 ml de plasma sendo esta a concentração de referência para o PRP. Concentrações inferiores não estão indicadas para melhorar a cicatrização e reconhece-se que concentrações superiores não potenciam a cicatrização.

Marx *et al.* (1998), Kim *et al.* (2002) , Zechner *et al.* (2003) e Weibrich *et al.* (2004) observaram nos seus estudos que concentrações de plaquetas de cerca de 400 a 500% em relação ao sangue periférico tinham um efeito positivo na cicatrização óssea em quatro espécies animais diferentes (porco, cão, humano e coelho) (*cit. in* Messoria *et al.*, 2010).

No PRP, as plaquetas estão suspensas num pequeno volume de plasma, que contém 3 proteínas sanguíneas (fibrina, fibronectina e vitronectina) capazes de atuar como matriz para a formação de osso, tecido conectivo e epitélio. No entanto, o PRP contém a mesma concentração destas proteínas que um coágulo sanguíneo (200 µg-400 µg/ml), (Marx e Robert, 2001) .

O PRP ajuda na obtenção de um efeito hemostático podendo ser utilizado após a extração dentária, evitando assim a contaminação do alvéolo em pacientes tratados com anticoagulantes, em pacientes que não possam receber transfusões de sangue, no caso de pacientes com fatores de risco associados, como é o caso dos fumadores (Garcia *et al.*, 2005). PRP pode ser utilizado para melhorar a osteointegração em pacientes com alterações na regeneração óssea como osteoporose, diabetes, entre outros (Monov *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, a falta de normas adequadas de definição dos produtos do PRP tem provocado o aparecimento de uma vasta gama de preparados biológicos e uma diversidade de termos facilmente confundíveis. (Simonpieri *et al.*, 2012).

Em geral, o termo “PRP” é usado para identificar todas essas preparações, mesmo que, sejam utilizados diferentes protocolos, difiram de uma forma qualitativa e quantitativa ou que demonstrem diferentes efeitos biológicos (Anitua, 2011).

1. Preparação PRP

O estudo do PRP, na área da medicina dentária, é caracterizado por um caminho científico peculiar, tendo sido primariamente iniciado em humanos, seguidamente em modelos animais e atualmente em estudos *in vitro*. Estes últimos, demonstraram que os resultados

controversos quanto à eficácia do PRP tinham possivelmente ocorrido devido à utilização de técnicas inapropriadas para a preparação do PRP (Messora *et al.*, 2011). Atualmente, existem vários protocolos para a preparação de PRP (Tabela em anexo) (Mazzocca *et al.*, 2012).

Recentemente têm sido propostos alguns protocolos simplificados para a produção de pequenas quantidades de PRP no consultório, através do uso de centrifugadoras. Tais protocolos representam uma evolução da técnica inicialmente apresentada, com menor custo de produção e com a possibilidade de execução em ambiente ambulatorio. Acresce ainda a vantagem desses métodos serem melhor aceites pelo paciente, uma vez que podem ser realizados em poucos minutos, em simultâneo com o ato cirúrgico. O emprego desses protocolos, no entanto, deve ser feito com cautela, e muitos detalhes precisam ser levados em consideração na sua elaboração (Messora *et al.*, 2010; Simonpieri *et al.*, 2012)

Assim, durante a preparação do PRP devem ser considerados vários fatores fundamentais, tais como o número de centrifugações utilizadas, a velocidade e o tempo de centrifugação, assim como outros protocolos que resultam em preparações com diversos volumes, o número de plaquetas, a quantidade de fatores de crescimento e concentração de leucócitos e eritrócitos, de forma a assegurar a qualidade e consecutivamente o seu efeito biológico (Messora *et al.*, 2011; Mazzocca *et al.*, 2012)

A grande variedade de protocolos relatados para a obtenção de PRP leva a preparações com diferentes composições que podem induzir diferentes respostas biológicas. Apesar destas variações todos os protocolos seguem uma sequência geral demonstrada na figura 5 (Perez *et al.*, 2014).

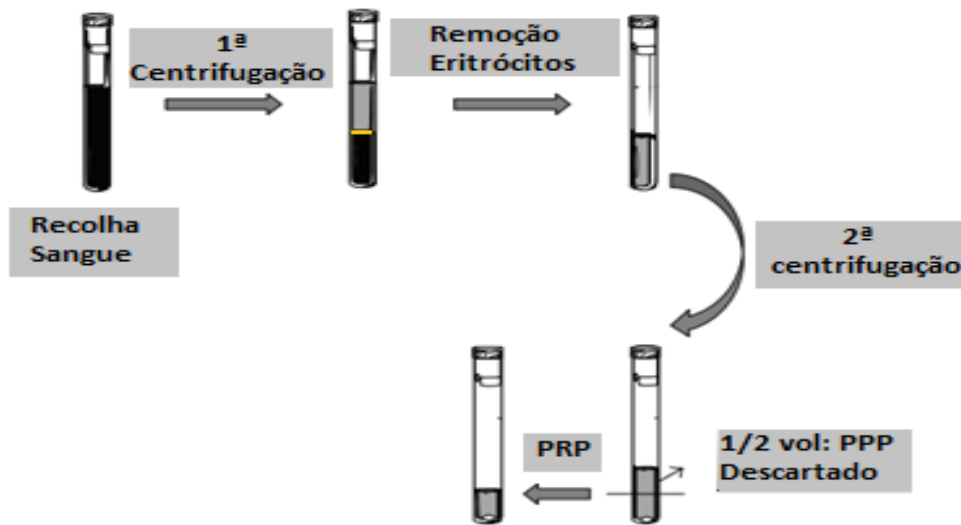


Figura 5 - Esquema representativo da preparação geral do PRP (Adaptado de Perez *et al.*, 2014).

1.1. Recolha de sangue

A recolha do sangue é realizada com uma agulha de calibre igual ou superior a 17G (1.3mm), na veia cubital mediana, para que seja evitado trauma das plaquetas, durante a colheita do sangue (Civinini *et al.*, 2011). Normalmente são recolhidos entre 10 a 60 ml, adequando-se a quantidade à extensão e tipo de cirurgia que se irá realizar. Após a recolha, o sangue é colocado em tubos contendo anticoagulante (citrato de sódio a 3.2%) (Marx e Robert, 2001).

1.2. Centrifugação

O processo de centrifugação para o preparo do PRP deve ser estéril, capaz de separar as plaquetas dos eritrócitos e promover o resgate das plaquetas sem nenhum tipo de dano ou lise que possa ativar a secreção antecipada dos fatores de crescimento (Perez *et al.*, 2014).

O processo de centrifugação baseia-se na aplicação de uma força centrífuga maior que a força gravítica, sendo a diferença no tamanho e na densidade das partículas responsável pela separação dos constituintes do sangue (Vendramin *et al.*, 2009).

Durante o processo de centrifugação, o movimento das partículas é resultado das seguintes forças: força centrífuga na direção radial; força gravitacional na direção vertical inferior e força de arrasto que atua na direção oposta do movimento das partículas (Vendramin *et al.*, 2009).



Figura 6 - 1ª Centrifugação (*soft-spin*) (Adaptado de Garcia *et al.*, 2010).

1º Centrifugação

Na primeira centrifugação, designada “*soft-spin*”, ocorre a separação do sangue em três camadas (Fig 6): a primeira camada é constituída por algumas plaquetas e plasma acelular, também denominado plasma pobre plaquetas (PPP) ou plasma pobre em fatores de crescimento. Na zona intermédia, nº2 e nº3, encontramos uma camada fina e esbranquiçada denominada de “zona de névoa”, constituída maioritariamente por plaquetas (2ª camada) e por leucócitos (3ª camada). Logo em baixo, na quarta camada, estão presentes os eritrócitos que devido ao seu peso, se depositam na parte inferior do tubo (Vendramin *et al.*, 2009).

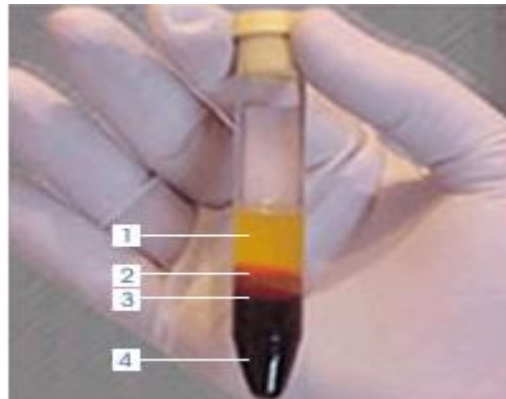


Figura 7 - Representação das diferentes camadas após a 1ª Centrifugação (Adaptado de Anitua *et al.*, 2004).

2ª Centrifugação

Nos protocolos de dupla centrifugação “*hard-spin*” são separadas as plaquetas e os glóbulos brancos do plasma. Esta segunda centrifugação resulta na deposição das plaquetas no fundo do tubo separando-as do plasma pobre em plaquetas (Vendramin *et al.*, 2009; Marx e Robert, 2001).

Segundo Ehrenfest *et al.* (2009), na etapa da 2ª centrifugação existem dois métodos distintos que devem ser considerados (Figura 9):

A- Para produzir Puro-PRP (P-PRP), após a 1ª centrifugação são transferidos, o plasma pobre em plaquetas (PPP) e zona de névoa superficial para outro tubo, o qual é de seguida centrifugado (“*hard-spin*”) com alta força centrífuga. Seguidamente, é descartada a parte mais superior do PPP criando assim PRP que contém um elevado número de plaquetas suspensas num plasma rico em fibrina sem a presença de leucócitos (P-PRP)

B- Para produzir PRP rico em leucócitos (L-PRP), o PPP, a totalidade da zona de névoa e parte residual da camada de eritrócitos do PPP, são transferidos para outro tubo, o qual é de seguida centrifugado (“*hard-spin*”) com alta força centrifugação, descartando depois a parte mais superior do PPP. Resultando assim em PRP contendo a maior parte de

plaquetas e leucócitos assim como alguns eritrócitos residuais suspensos num plasma rico em fibrina (L-PRP) (Ehrenfest *et al.*, 2009)

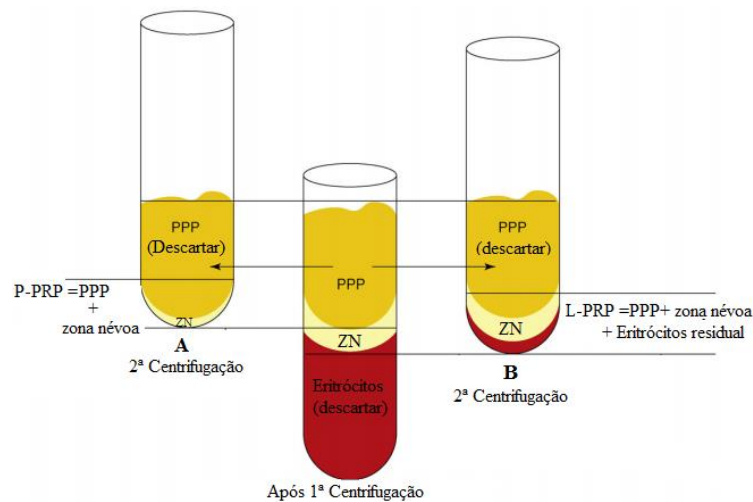


Figura 8 - Representação Protocolo de duas centrifugações para obtenção de diferentes tipos de PRP (Adaptado de Ehrenfest *et al.*, 2009).

De facto, alguns autores advogam inequivocamente a necessidade de realizar dupla centrifugação para a obtenção de PRP.

Marx e Robert, (2001) afirmam que a técnica de dupla-centrifugação é necessária para que seja produzido um verdadeiro concentrado de plaquetas a partir de sangue autólogo, declarando que a técnica de uma centrifugação produz, em vez disso, uma mistura de PRP com Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), resultando em concentrações plaquetárias baixas.

Outros autores obtiveram concentrações plaquetárias de 356% usando a técnica de uma única centrifugação (Messora *et al.*, 2010; Quesada-García *et al.*, 2012)

Anitua *et al.* (1999) descreveram a utilização de uma só centrifugação para a preparação de PRP tendo demonstrado aumento e aceleração da regeneração óssea e maior rapidez e

previsibilidade na regeneração de tecido mole em locais para posterior colocação de implantes.

Efetivamente, Weibrich *et al.*, (2004) referem que o aumento no número de plaquetas acima de 400%, em relação à quantidade de plaquetas do sangue periférico, e os resultados biológicos resultantes são diretamente dependentes do método de centrifugação.

Mazzocca (2012) estudou as diferenças entre diversos sistemas de obtenção e administração de PRP. O autor observou que todas as preparações de PRP resultaram num aumento significativo de plaquetas, quando comparado com as concentrações normais presentes na corrente sanguínea. Porém, comparando as diferentes concentrações obtidas com o método de centrifugação única e com o método de centrifugação dupla, o autor concluiu que o método de dupla centrifugação não revelou resultados significativamente superiores do nível de separação plaquetária comparativamente com o método de uma centrifugação. Estas conclusões suportam a eficácia do método de centrifugação única na produção de quantidade de plaquetas.

Os aspetos relevantes para a preparação e caracterização do PRP são a aceleração e o tempo da centrifugação, a distância entre as partículas, a quantidade de volume sangue processado, a prevenção da agregação plaquetária e a redução do volume plasmático (no caso da dupla centrifugação). A observação destes aspetos assegura a qualidade do PRP, permitindo que a variabilidade dos resultados fique restrita à natureza autóloga do produto (Perez *et al.*, 2014).

1.3. Ativação

A ativação do PRP requer a substituição do cálcio e a iniciação da cascata da coagulação sanguínea (Marx e Robert, 2001).

Para que ocorra a libertação dos factores de crescimento contidos nos grânulos α das plaquetas, é necessário que estas se activem através da adição de 1.000 unidades de trombinha ou 10% de cloreto de cálcio para antagonizar o efeito anticoagulante do citrato de sódio presente na amostra de sangue. A amostra é, então, misturada por 10 segundos para que seja iniciada a coagulação com o objectivo de aplicar o PRP (Civinini *et al.*, 2011).

Anitua e Andía (2000), Marx (2004) e Marx e Garg (2005) utilizaram cloreto de cálcio, sendo que Marx (2004) e Marx e Garg (2005) utilizaram conjuntamente trombinha bovina. Anitua y Andía (2000) não descreveram o uso deste último, visto que defendem a existência de desvantagens quanto ao seu uso (*cit. in* Simonpieri *et al.*, 2012)

Tornou-se evidente que o uso de trombinha bovina para ativar o mecanismo de coagulação e para induzir a ativação plaquetária pode originar complicações, associadas com a formação de anticorpos contra a trombinha bovina. Foi descrita por Civinini *et al.*, (2011) uma complicação rara que resulta numa coagulopatia imunomediada.

É importante acrescentar que 70% dos factores de crescimento são libertados em 10 minutos e 100% dos factores de crescimentos são libertados em 1 hora (Civinini *et al.*, 2011)

Diversos factores podem ativar prematuramente as plaquetas, tais como a força G usada na centrifugação, a pipetagem excessiva ou o tipo de anticoagulante usado durante a preparação do PRP. A ativação prematura leva a uma libertação antecipada de factores de crescimento, levando-os a deslocar para o topo do tubo após a centrifugação, resultando num PRP pobre em factores de crescimento. (Messora *et al.*, 2010)

No seu estudo, Messora *et al.* (2011) observou que a ativação do PRP apenas com cloreto de cálcio potencia a regeneração de defeitos críticos em crânios de rato. Os autores afirmam que a ativação do PRP apenas com cloreto de cálcio preserva a sua natureza autóloga, evitando o uso de trombinha bovina e os seus riscos de desenvolvimento de coagulopatias.

Lee *et al.* (2013) concluíram no seu estudo que a eficiência da obtenção do concentrado plaquetário foi consistente conforme sugerido por Marx *et al.* (2001), confirmando que a ativação com trombina e cloreto de cálcio não tem qualquer relação com a eficiência da concentração plaquetária. Os autores comprovaram que não existe influência da ativação do PRP, com o uso de trombinha e cloreto de cálcio, na secreção de fatores de crescimento e na quantidade de concentração de plaquetas no plasma. Logo, foi deduzido que a adição da trombina e cloreto de cálcio não são necessários para a preparação efetiva de PRP ou para a libertação de fatores de crescimento, concluindo que outras formas para a ativação das plaquetas devem ser tidas em consideração como a força centrífuga aplicada para a separação do PRP, leva a que as membranas das plaquetas sejam lesadas pelas velocidades elevadas da centrifugação originando a sua ativação prematura. O processo de incubação da preparação durante 1 hora a 37°C pode também ser tido em consideração como método alternativo de ativação do PRP.

Outros métodos de preparação do PRP tem vindo a desenvolver-se apresentando alternativas ao processo de ativação, aumentando assim as propriedades autólogas deste produto

2. Plasma rico em fibrina (PRF).

O plasma rico em fibrina (PRF) é considerado um biomaterial autólogo, desenvolvido em França por Choukroun *et al.* (1993). É um protocolo mais simples, menos dispendioso e mais fácil de realizar para a elaboração de um concentrado plaquetário. Incorporando numa matriz de fibrina, com uma arquitetura tridimensional, a maior parte dos leucócitos, plaquetas e fatores de crescimento (Figura 10).

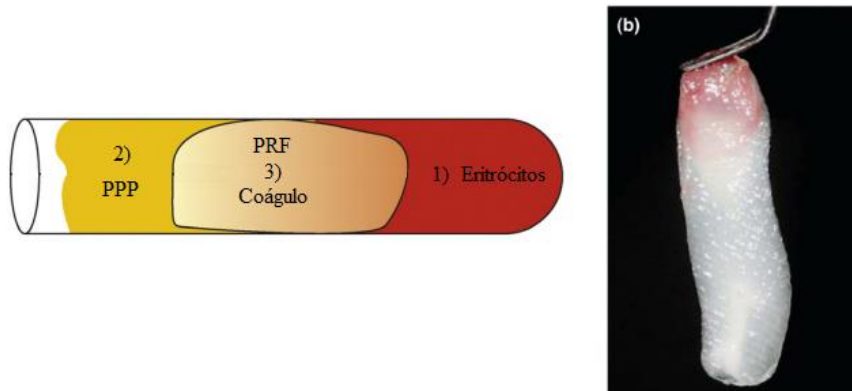


Figura 9 - a) Composição do plasma rico em Fibrina segundo protocolo de Choukroun
b) Membrana de PRF Depois da compressão (Adaptado de Ehrenfest *et al.*, 2009) .

Para a obtenção deste concentrado é realizada uma colheita de sangue do paciente para tubos (10mL) sem a presença de qualquer anticoagulante, sendo imediatamente colocados numa centrifugadora a 3,000rpm(800g)/10 min. Na ausência de anticoagulantes a ativação plaquetária e polimerização da fibrina são desencadeadas de imediato, através do contacto com as paredes do tubo durante a centrifugação (Kobayashia *et al.*, 2012).

Após a centrifugação não é utilizado qualquer ativador (cloreto de cálcio ou trombina) para ativar o PRF, ao contrário dos sistemas de produção de PRP. Tornam-se distintas três frações: no fundo do tubo estão concentrados os eritrócitos; a camada superficial constituída por PPP (plasma pobre em plaquetas); e a fração intermédia, um denso coágulo de PRF que pode ser usado clinicamente em forma de uma membrana, quando o mesmo for pressionado entre duas gazes (Figura anterior 10 (b)). A membrana de fibrina do PRF é mais elástica e consistente do que a obtida em alguns protocolos de PRP (Choukroun *et al.*, 2001; Ehrenfest *et al.*, 2009; Del Corso *et al.*, 2010).

Ao contrário do PRP, o PRF não se dissolve rapidamente após a sua aplicação, em vez disso a sua matriz de fibrina é lentamente remodelada comportando-se da mesma forma

que um coágulo sanguíneo normal (Ehrenfest *et al.*, 2009). Desta forma torna-se evidente que este método seja o mais divulgado atualmente.

As aplicações do PRF incluem membranas biodegradáveis, para proteção do enxerto, constituem um meio de reserva de fatores de crescimento em forma de gel (coágulo), sendo utilizado em conjunto com enxerto ósseo em alvéolos pós extração (Del Corso *et al.*, 2010).

3. Presença de Células Brancas no PRP

Alguns investigadores recomendam que se deverá prevenir a exposição de tecido perante os glóbulos brancos, pois sugerem que poderá ocorrer uma reação inflamatória. (Lopez-Vidriero *et al.*, 2010; Tidball, 1995).

Já (Moojen *et al.*, 2008; Ehrenfest *et al.*, 2009) descreveram efeitos benéficos devido ao aumento da resistência imunológica e antibacteriana, apesar de não haver evidência clínica que suporte o seu efeito. De acordo com o segundo autor, a alta concentração de leucócitos pode levar a uma elevada concentração do factor de crescimento PDGF, ao aumento da atividade antimicrobiana do PRP assim como analgesia.

O papel dos leucócitos nos diferentes mecanismos e aplicações do PRP necessita ainda de ser estudado em maior profundidade (Ehrenfest *et al.*, 2009).

4. Classificações concentrados Plaquetários

Mishra *et al.* (2012) desenvolveu uma classificação baseada na concentração de glóbulos brancos (aumentado ou mínimo/sem presença); o método de ativação (trombinha, cloreto de cálcio ou nenhum) e concentração plaquetária (> 5x ou <5x) (Tabela 2).

	<i>Glóbulos brancos</i>	<i>Ativação</i>	<i>Concentração plaquetária</i>
<i>Tipo 1</i>	Aumentado	Sem ativação	A, 5x ou> B, <5x
<i>Tipo 2</i>	Aumentado	Ativação	A, 5x ou> B, <5x
<i>Tipo 3</i>	Valores mínimos ou ausência de Glóbulos Brancos	Sem ativação	A, 5x ou> B, <5x
<i>Tipo 4</i>	Valores mínimos ou ausência de Glóbulos Brancos	Ativação	A, 5x ou> B, <5x

Tabela 2 - Classificação PRP (Adaptado de Michra *et al.*, 2012)

Ehrenfest *et al.*, (2009) categorizou os concentrados plaquetários baseando-se na concentração de leucócitos: Puro-PRP (P-PRP) e PRP rico em leucócitos (L-PRP) e baseando-se na concentração de fibrina: P-PRF e L-PRF (Figura xx). Esta categorização facilita a compreensão e distinção dos diversos protocolos de obtenção de PRP.

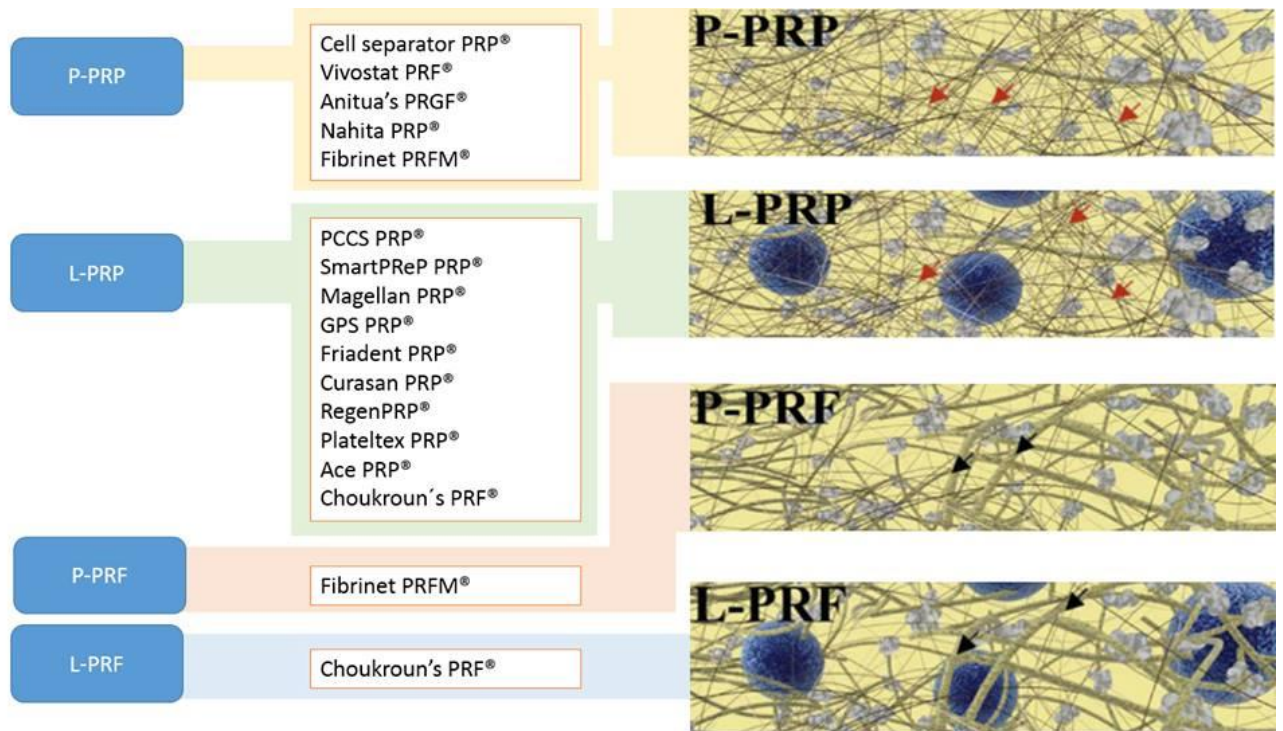


Figura 10- Classificação de diversos sistemas de obtenção de concentrados disponíveis e respectiva ilustração da arquitectura da matriz e das células (Adaptado de Ehrenfest *et al.*, 2009).

Recentemente, PRP tem sido aplicado em diversas áreas da cirurgia oral, tais como: procedimentos cirúrgicos ablativos, reconstrução mandibular, reparação cirúrgica das fendas alveolares, tratamento de defeitos periodontais intraósseos e em cirurgia plástica periodontal, como também em procedimentos relacionados com a colocação de implantes (Civinini *et al.*, 2011).

O PRP pode ser misturado com o enxerto ósseo, aplicado na superfície do tecido mole ou osso ou usado como membrana biológica, podendo ser aplicado com uma seringa ou em forma de um coágulo (Everts *et al.*, 2006)

V. Plasma rico em Plaquetas na Implantologia

O desenvolvimento de superfícies de implantes optimizadas é motivo de grandes pesquisas com o objectivo de acelerar o processo de osteointegração, levando à redução do período de espera antes de aplicada a carga, assim como, tornar mais segura a carga imediata do implante (Anil et al., 2011).

Lynch *et al.*, (1991) documentou pela primeira vez que a combinação de PDGF e IGF melhoravam significativamente a regeneração óssea na zona peri-implantar.

A colocação do implante com o uso simultâneo de PRP cria uma boa relação entre tecido duro e tecido mole além da vantagem da relação psicológica para o paciente. (Simonpieri et al., 2012).

Migração, adesão e proliferação celular na superfície dos implantes são pré-requisitos para iniciar o processo de regeneração de tecidos, enquanto que, as modificações na superfície dos implantes, incorporando mediadores biológicos de crescimento e diferenciação podem potenciar a regeneração dos tecidos na colocação do implante. O balanço entre formação de fibrina e a Activação das plaquetas são os responsáveis pelo processo e actuação do PRP (Tejero *et al.*, 2014).

O PRP tem diversas aplicações na implantologia (Simonpieri et al., 2012):

- durante a colocação de implantes como tratamento de superfície para estimular a osteointegração;
- levantamento do seio maxilar;
- tratamento dos defeitos ósseos peri-implantares (após peri-implantite durante a colocação de um implante com volume de osso insuficiente ou na colocação do implante após extração).

1. Elevação do seio Maxilar

O levantamento do seio maxilar, utilizando-se enxertos ósseos, tornou-se um dos procedimentos mais frequentes da implantologia e também o mais investigado por parte do uso de concentrados plaquetários. Outra razão reside no facto de ser um bom modelo da avaliação da remodelação do osso sendo uma cavidade fechada e protegida onde as interferências com o ambiente oral são mínimas. (Simonpieri *et al.*, 2012)

Muitos estudos declararam que a adição do PRP a um enxerto ósseo está associada a resultados clínicos positivos, sendo um bom método de manusear o enxerto ósseo durante a inserção nos seios maxilares e estimula a regeneração óssea em volta dos implantes colocados no enxerto. Porém é difícil salientar as conclusões dos estudos realizados devido às grande variáveis presentes nos modelos *in vivo* contudo, de uma forma geral os autores afirmam que a qualidade do osso formado e que a técnica cirúrgica usada não apresentam vantagens na terapêutica. (Tejero *et al.*, 2014; Simonpieri *et al.*, 2012; Roldán *et al.*, 2004)

2. Regeneração de defeitos peri-implantares

O uso de PRP sozinho ou em adição a um enxerto com o objectivo de preencher defeitos peri-implantares foi testado em diferentes situações e em associação com diferentes substitutos ósseos e técnicas. Como muitos dos artigos, os dados são discutíveis, visto não haver acesso ao conteúdo do PRP testado. Porém os estudos são bastante homogêneos, indicando não apresentar efeitos benéficos do PRP, independentemente do tipo de defeitos a considerar. Todavia, são necessárias mais observações da aplicação do PRP na regeneração de defeitos peri-implantares. (Torres *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2010).

3. Modificação da superfície do implante com PRP

No processo de reparação óssea, a osteointegração de implantes dentários pode ser melhorada e acelerada induzindo a capacidade regenerativa dos tecidos envolventes com o estímulo apropriado (Anitua, 2006).

A aplicação do PRP na superfície do implante pode criar uma nova superfície dinâmica, podendo demonstrar diferente atividade biológica (Figura 10) (Anil *et al.*, 2011) .



Figura 11 - Implante imergido em PRP (Adaptado de Anil *et al.*, 2011).

Resultados

1. Estudos *in vitro*

Park *et al.*, (2001) desenvolveram um estudo com o objetivo de compreender se a microtextura da superfície dos implantes poderá condicionar a activação plaquetária. Foram analisados 4 implantes de titânio com superfícies diferentes (“dual acid-etched” (DAE), maquinado, “320 gri abraded” e “p1200 polished”) através de microscópio electrónico. O autor demonstrou que o aumento da complexidade da microtextura da superfície incrementa a activação das plaquetas, sendo que a textura da superfície “dual acid-etched” (DAE) mais rugosa e complexa das que foram testadas. Neste estudo

concluiu-se que as superfícies de implantes rugosas potenciam a activação das plaquetas. O mesmo foi verificado por Hong *et al.* (1999) que analisaram a activação e adesão plaquetária de 11 implantes concluindo que a microtopografia da superfície do implante é a responsável pela activação das plaquetas.

2. Estudos Histológicos Em Animais

Anitua, (2006) desenvolveu um estudo em 23 implantes colocados na tíbia de 3 cabras. O grupo teste consistiu em 13 implantes, que foram mergulhados em PRP, e o grupo controlo composto por 10 implantes. Após 8 semanas foram analisadas as biópsias macro e microscopicamente e conclui-se que o contacto osso-implante foi significativamente maior no grupo onde era utilizado o PRP: BIC 51.3% vs. 21.9%.

Nikolidakis *et al.*, (2008) investigaram o efeito local da aplicação de PRP na velocidade de regeneração do osso cortical em implantes com diferentes tratamentos de superfície. Foram inseridos 36 implantes de superfície rugosa em 6 cabras, sendo constituídos 6 grupos: implantes revestidos (Ca-P); implantes revestidos (Ca-P) + PRP líquido; implantes revestidos (Ca-P) + PRP gel; implantes não revestidos (Ti); Implantes (Ti) não revestidos com (Ca-P) + PRP líquido; Implantes (Ti) não revestidos com (Ca-P) +PRP gel. Ambos os grupos apresentando a superfícies rugosas. O PRP gel (com activador: trombinha bovina e cloreto cálcio) foi colocado no alvéolo receptor do implante e o PRP líquido (sem activador) foi usado para mergulhar o implante antes da inserção no alvéolo. As análises histológicas foram realizadas 6 semanas após a colocação dos implantes, sendo avaliadas as seguintes variáveis: a percentagem de contacto entre a superfície do implante e osso e a percentagem de neoformação óssea e osso nativo peri-implantar. Os autores referem que, devido a consistência do gel de PRP no momento da colocação do implante, é exercida uma pressão aumentada nas paredes ósseas que origina espaços vazios (sem presença do material). Foi registado contacto osso-implante significativamente superior nos 3 grupos revestidos por Ca-P e no grupo Ti+PRP líquido, revelando percentagens similares de neoformação óssea e osso nativo peri-implantar. Conclui-se que a utilização adicional de PRP não teve qualquer efeito na regeneração do

osso cortical em implantes revestidos por Ca-P. No entanto, o PRP (em forma líquida) demonstrou aumento de aposição de osso em implantes (Ti).

Garcia *et al.*, (2010) avaliou o efeito do PRP na regeneração óssea utilizando 9 cães com total de 36 implantes (utilizando protocolo de Preparação de Anitua *et al.* (1999)) grupo teste de 18 implantes e grupo controlo de 18 implantes. Foram realizadas as biópsias e posteriormente as análises histológicas aos 15, 30 e 55 dias de cicatrização sendo registada a percentagem de contacto osso-implante (BIC) (Tabela 3). Observou-se que não existem diferenças significativas de contacto osso-implante entre os dois grupos, concluindo que o PRP não favoreceu a formação óssea peri-implantar.

Grupo/tempo	15ºdia	30ºdia	55ºdia
Controlo	35.7%	45.1%	54.9%
Teste	30.2%	39.7%	50.8%

Tabela 3 - Percentagem BIC para controlo e grupo teste (Adaptado de Garcia *et al.*, 2010).

Streckbein *et al.*, (2014) conduziu um estudo com o objectivo de avaliar o impacto de 4 diferentes superfícies de implantes, com e sem PRP, na regeneração óssea. Foram inseridos 4 implantes com diferentes superfícies em cada hemiarcada de 12 cães, sendo aleatória a posição do implante e a aplicação do PRP. À 6ª semana pós-operatória foram realizadas as biópsias de 5 cães e à 12ª semana de 6 cães. (grupos com e sem PRP separadamente), sendo ambas analisadas histologicamente. A única diferença significativa foi verificada entre as diferentes superfícies de implantes, não sendo registadas diferenças na formação óssea entre os grupos com PRP e sem PRP. Sendo

assim, conclui-se que o uso tópico de PRP para regeneração óssea em implantes não pode ser recomendado como método *standard* no tratamento com implantes. Os autores referem ainda que, durante a colocação do implante, uma grande parte do PRP colocado no alvéolo foi expelida.

O estudo de Ortolani *et al.*, (2014) foi realizado no fémur de ratos com o objectivo de avaliar a osteointegração e a capacidade de regeneração óssea peri-implantar. Os implantes do primeiro grupo foram tratados com PDGF/IGF; os implantes do segundo grupo foram submersos em PRP e o terceiro grupo funcionou como grupo de controlo. O estudo avaliou as características histológicas da osteointegração de implantes, com ou sem submersão em PRP e PDGF/IGF e os resultados demonstram uma maior aposição óssea nos implantes submergidos em PDGF/IGF, comparativamente com os implantes submergidos em PRP e com o grupo de controlo. Ao 4º dia os implantes tratados com PRP ou PDGF/IGF apresentavam quantidade abundante de tecido fibroblástico, bem como numerosas ilhas de cartilagem, levando à ossificação endocondral dos implantes. Ao 12º dia, o mesmo grupo apresentava uma quantidade substancial e bem formada de tecido ósseo, contrariamente aos implantes tratados com PRP e grupo controlo.

3. Estudos Em Humanos

Peev e Atanasov,(2007) conduziram um estudo com o objectivo de verificar o efeito do PRP na estabilidade de implantes com carga imediata. Foram colocados 86 implantes em 21 pacientes, tendo sido inseridos 44 implantes com PRP e 42 implantes sem PRP (grupo controlo). A estabilidade dos implantes foi avaliada de 2 em 2 semanas durante 12 semanas, com recurso ao aparelho “Osstell Mentor”® (Integration diagnostics-Gothenburg, Sweden). Verificou-se que o grupo de implantes tratado com PRP apresentou melhor estabilidade $ISQ \geq 50$ e no grupo sem PRP 3 implantes obtiveram valores de $ISQ < 50$. Concluindo que a aplicação de PRP é associada a uma melhoria na estabilidade implantar, no período, entre a 2ª e a 6ª semana após aplicada a carga.

El-marssafy *et al.*, (2011), com o seu estudo “*split-mouth*” pretendeu avaliar se o efeito da aplicação do PRP em implantes colocados em carga imediata acelera a osteointegração

ou se diminui a reabsorção da crista óssea, durante 12 meses de tempo de seguimento. O estudo foi conduzido em 12 pacientes, sendo colocados 24 implantes (2 implantes em cada paciente) e dividindo aleatoriamente entre o lado A (com PRP) e o lado B (sem PRP). Por um período de 12 meses foram realizadas avaliações clínicas e radiográficas, demonstrando não haver diferenças significativas entre os dois lados na velocidade da osteointegração nem na diminuição da reabsorção da crista óssea.

Quesada-García *et al.*,(2012) investigaram diversos factores que podem influenciar a estabilidade dos implantes. Relativamente à técnica cirúrgica, foi analisado o efeito da aplicação de PRP envolvendo o implante. Foram registados os valores de ISQ (implant stability quociente) do sistema “Osstell Mentor®” (Osstell, AB, Gotheburg, Sweden) 12 semanas após o procedimento cirúrgico. Neste estudo foram colocados 230 implantes: 177 implantes com conexão externa com superfície bioactiva (BTI-Biotechnology, Vitoria, Spain) e 58 implantes conexão interna (Zimmer Implants- Carlsbad, CA) em 93 pacientes. O estudo fez um grupo teste com PRP (119 implantes) e um grupo controlo sem PRP (116 implantes). Foi verificado que o grupo teste apresentou valores de ISQ significativamente mais elevados do que o grupo de controlo. ISQ 76.6 vs 74.1.

O estudo de Kundu e Rathee, (2014), duplamente cego, controlo randomizado, avaliou o efeito do PRP e da topografia do implante na estabilidade implantar, através do aparelho Periotest®. Foram colocados 30 implantes numa etapa cirúrgica e com carga imediata (após 2 semanas), formando 2 grupos de teste com PRP: constituídos por um total de 15 implantes; 2 grupos controlo sem PRP: constituídos por 15 implantes. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na estabilidade dos implantes no momento de inserção entre os grupos de teste e controlo, porém o mesmo não foi verificado no controlo de 1 e de 3 meses após a colocação dos implantes (Tabela 4).

Grupo/ Tempo	00	1 mês	3 meses
Controlo	1.0	-0.1	-1.7
Com PRP	-4.5	-2.1	-2.3

Tabela 4 - Valores de Periotest® durante o período de controlo (Adaptado de Kundu e Rathee,2014).

4. Estudo Radiográfico

Através da observação de radiografias panorâmicas, Georgakopoulos *et al.*, (2014) investigaram a diferenciação da textura, associada à formação óssea, em implantes submergidos em PRP. 30 pacientes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: grupo teste de 15 pacientes e o grupo controlo de 15 pacientes com um total de 76 implantes colocados. Os implantes do grupo teste foram submersos em PRP. No decurso do estudo foram analisadas 60 radiografias panorâmicas, 30 das quais realizadas imediatamente após a colocação dos implantes e as restantes 30 radiografias foram realizadas 8 meses após cirurgia. Através de um algoritmo de detecção onde é possível identificar a região de contacto osso-implante, avaliando a densidade óssea nessa região, os autores concluíram que a aplicação do PRP nos implantes favorece a formação de osso na região à volta do implante.

Monov *et al.*, (2005), no seu estudo “*split mouth*” avaliaram o efeito do PRP sobre a estabilidade dos implantes. Foram colocados 34 implantes na mandíbula de 10 pacientes:

o grupo teste com PRP (apenas no 3º quadrante) e o grupo controle sem PRP (no 4º quadrante) e a estabilidade dos implantes foi avaliada a cada 4 dias, desde a colocação até ao 40º dia através de análise radiográfica (ortopantomografia e TAC). Os autores verificaram que durante a primeira semana pós-operatória houve diferenças significativas na estabilidade implantar entre o grupo com PRP e o grupo de controle, porém os resultados não foram estatisticamente significativos durante o resto do controle, concluindo que o uso de PRP durante a colocação do implante não proporciona qualquer vantagem.

Discussão de resultados

A implantologia destaca-se como um método moderno de reabilitação oral para pacientes edêntulos totais ou parciais. Para que este método se desenvolva adequadamente é necessário que ocorra a osteointegração do implante no tecido ósseo receptor, já que a integração óssea é a chave do sucesso clínico cirúrgico que, posteriormente, será concluído após o fim da fase protética. (Anitua, 2006)

Para que melhorar a osteointegração e a ancoragem óssea, as modificações de superfície podem ser químicas como exemplo a impregnação com cálcio-fosfato (Ca-P) ou físicas estando relacionadas com a microtopografia do implante. (Tejero *et al.*, 2014)

A bioactivação da superfície do Implante dentário com PRP, tem sido descrita e discutida por parte da comunidade científica como tratamento de superfície para a estimulação e aceleração do processo de osteointegração, como também, para obter maior estabilidade primária implantar. (Anitua, 2011)

Diversas variáveis afectam a actividade biológica das preparações de PRP tais como o número de centrifugações utilizadas, a velocidade de centrifugação e outros protocolos que resultam em preparações com diversos volumes, número de plaquetas, quantidade de factores de crescimento e concentração de glóbulos brancos e eritrócitos fundamentais (Messora *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2014).

Alguns investigadores recomendam evitar a exposição de tecido perante PRP contendo leucócitos defendendo que pode ocorrer uma reacção inflamatória. (Lopez-Vidriero *et al.*, 2010; Tidball, 1995). Por outro lado, outros autores descreveram efeitos benéficos devido ao aumento da resistência imunológica e antibacteriana, apesar de não haver evidência clínica que suporte o seu efeito. (Moojen *et al.*, 2008; Ehrenfest *et al.*, 2009)

Dado o estudo realizado por Mazzocca *et al.*, (2012) onde concluiu não haver diferença significativa entre as concentrações plaquetárias de acordo com os diferentes métodos de preparação, nomeadamente quando comparada a realização de uma ou duas

centrifugações e o estudo de Lee *et al.*, (2013) verificou que a adição da trombina e cloreto de cálcio não são necessários para a preparação efectiva de PRP. O Plasma rico em Fibrina (PRF), tem ganho atenção por parte da comunidade científica visto que não necessita de adição de activador nem anticoagulante, tornando o produto mais autólogo, apresentando uma rede de fibrina que protege os factores de crescimento, mantendo-os durante mais tempo no local. Exibe também outras formas de aplicação tornando a sua utilização mais simples. (Ehrenfest *et al.*, 2009; Del Corso *et al.*, 2010).

De facto, a revisão da literatura disponível revela uma insuficiente estandardização do protocolo de preparação do PRP, podendo ser apontada como uma das causas dos resultados inconsistentes nas suas diversas aplicações. (Messora *et al.*, 2011; Civinini *et al.*, 2011). Porém, recentemente, tem sido propostas classificações por parte de Ehrenfest *et al.*, (2009); Michra *et al.*, (2012) de forma a organizar as preparações conforme a sua concentração de fibrina e de leucócitos, assim como o seu método de activação e concentração plaquetária.

A utilização de PRP associada a procedimentos na área da Implantologia tem sido amplamente descrita na literatura científica, nomeadamente na técnica cirúrgica de levantamento do seio maxilar, na regeneração dos defeitos peri-implantares e no momento de inserção do implante no alvéolo, para a acelerar a osteointegração e melhorar a estabilidade primária. (Tejero *et al.*, 2014) .

Estudos *in vitro* constataram que a activação plaquetária parece ser influenciada pela complexidade da topografia do implante conforme descrito por Park *et al.*, (2001) Hong *et al.*,(1999) concluindo que as superfícies rugosas são as que provocam maior activação e agregação plaquetária.

Na prática clínica interessa sobretudo compreender se a presença de PRP na superfície do implante potenciará a osteointegração.

Desta forma, foram desenvolvidos estudos histológicos em animais que possibilitam a avaliação da percentagem de contacto osso-implante e possibilitam a comprovação da osteointegração.

No estudo de Anitua, (2006) , foram observados benefícios do efeito da aplicação do PRP na superfície de implantes na velocidade do processo de osteointegração, favorecendo a formação de osso em redor dos implantes em animais.

Contudo, nos estudos de Garcia *et al.*, (2010), Streckbein *et al.*, (2014) e El-marssafy *et al.*, (2011) não se verificou efeito positivo do PRP na neoformação óssea nem no processo de osteointegração. Nikolidakis *et al.*, (2008) verificou que apenas o uso de PRP líquido (sem adição de activador) promoveu o aumento de osso em contacto com implantes.

Os estudos histológicos não são usualmente realizados em humanos, sendo que os investigadores optam por recorrer a métodos não invasivos quando pretendem estudar a estabilidade dos implantes em pacientes.

Melhor estabilidade implantar primária foi verificada nos estudos de Quesada-García *et al.*, (2012) e Anitua, (2006)

Monov *et al.*, (2005), Peev e Atanasov, (2007) e Kundu e Rathee, (2014) verificaram melhor estabilidade primária, porém, apenas na fase inicial (1^a/2^a semana) de osteointegração, não verificando qualquer benefício durante o tempo de seguimento dos estudos 3 meses, 12 semanas e 40 dias respectivamente.

Devido ao uso de diferentes métodos de avaliação da estabilidade implantar como (Perioteste® e Ostetell®) torna-se difícil comparar os resultados obtidos dos diferentes estudos.

Streckbein *et al.*, (2014), Garcia *et al.*, (2010) e Ortolani *et al.*, (2014) observaram que o sucesso do uso de PRP parece ser dependente do modelo animal utilizado e das características do PRP que dele resultam .

Após uma análise minuciosa dos estudos importa realizar uma reflexão crítica sobre os resultados que estes reportam.

Nikolidakis *et al.*, (2008) e Streckbein *et al.*, (2014) referem ainda que durante a colocação do implante uma grande parte do PRP colocado no alvéolo foi expelido para fora do mesmo, resultando em espaços sem a presença de PRP. Acrescentando que, devido ao sangramento no local cirúrgico, este pode diluir a concentração das plaquetas no PRP, levando à diminuição da sua eficácia.

Efetivamente, os estudos que utilizaram implantes de superfície bioactiva (BTI-Biotechnology®, Vitoria, Spain) foram os que apresentaram melhores resultados na neoformação óssea, assim como, na estabilidade dos implantes. (Anitua, 2006) (Quesada-García *et al.*, 2012), Não sendo esta evidência extensivamente reproduzível noutros estudos.

Conforme proposto no estudo de Nikolidakis *et al.*, (2008), o PRP parece potenciar a neoformação óssea inicial em implantes de titânio de superfícies rugosas sem modificações de superfície, porem as superfícies de implantes modificadas com Ca-P não demonstram superiores resultados de osteointegração quando utilizados juntamente com o PRP.

Os mecanismos celulares envolvidos nesta osteointegração têm de ser ainda determinados. Futuras pesquisas devem ser direccionadas para a exploração das bases biológicas da utilização do PRP em diferentes superfícies de implantes.

Conclusão

O objetivo do PRP é libertar alta concentração de fatores de crescimento no local aplicado para promover regeneração dos tecidos.

Sobre os métodos de preparação, ativação e classificação, existem uma grande variedade de preparações denominadas de Plasma rico em plaquetas ou com nomes semelhantes que são usadas indiferenciadamente. O termo Plasma rico em Plaquetas é usado para identificar estas preparações mesmo que sejam usados diferentes protocolos para a sua preparação ou que a sua qualidade difira.

A análise da literatura científica sobre o conhecimento atual da bioativação da superfície do implante dentário com PRP, necessita de ser examinada com cuidado devido á falta de uniformização da terminologia utilizada e falta de caracterização dos concentrados plaquetários testados, no que toca á presença de leucócitos e arquitetura da fibrina, concentração plaquetária método de ativação e centrifugação. Originando resultados contraditórios difíceis de interpretar.

É também importante perceber que estes produtos e estas preparações ricas em fatores de crescimento são dependentes da habilidade de cada Medico dentista, e na sua capacidade de entender, preparar, usar e combinar corretamente esta tecnologia. PRP e PRF estão no limite entre a engenharia de tecidos laboratorial e a prática clinica, por essa razão, o seu uso requer uma visão biológica alargada do produto.

Os aspetos relevantes para a preparação e caracterização do PRP, são a aceleração e o tempo da centrifugação, a distância entre as partículas, a quantidade de volume sangue processado, a prevenção da agregação plaquetária, a redução do volume plasmático (no caso da dupla centrifugação). A observação destes aspetos assegura a qualidade do PRP, permitindo que a variabilidade dos resultados fique restrita á natureza autóloga do produto (Perez *et al.*, 2014).

A colocação de implantes dentários de titânio em espaços edêntulos tornou-se um tratamento bem documentado e aceite pela comunidade devido á sua excelente biocompatibilidade e propriedades mecânicas. Sendo que a composição da superfície, a sua rugosidade e complexidade da topografia são factores determinantes para a integração com os tecidos envolventes.

Na sequência dos estudos *in vitro* que demonstram que a activação plaquetária parece ser influenciada pela topografia da superfície dos implantes, seriam necessários mais estudos controlados randomizados que avaliassem diferentes superfícies comercialmente disponíveis.

Dado ao grande desenvolvimento de novas superfícies de implantes baseados em modificações químicas e topográficas. Tendo também em conta que as taxas de sucesso de implantes encontram-se acima dos 96% com o procedimento *standard* (sem a aplicação de PRP). O uso de concentrados plaquetário para a promover a aceleração do processo de osteointegração não aparenta ser a abordagem mais lógica.

O potencial do PRP na promoção da regeneração de tecido duro e tecido mole é bem aceite devido ao efeito suas características biológicas dos factores de crescimento nos tecidos. Porém, torna-se óbvio, que mais estudos necessitam de ser feitos sobre as características físicas, biológicas e bioquímicas das plaquetas, a sua concentração no PRP, interação entre factores de crescimento, como também, descobrir qual a duração da atividade do efeito do PRP.

Assim sendo, a seleção de um sistema de implantes eficiente parece ser melhor solução do que a adição da preparação manual de PRP á superfície do implante para resultados a longo prazo.

Referências bibliográficas

Albrektsson, T., *et al.* (1986). The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 1, pp. 11-25.

Aldecoa, E. (2001). Basic Principles For Bone Regeneration. A New Approach To Bone Regeneration - Plasma Rich in Growth Factors (PRGF). *Puesta Al Dia Publicaciones*, 32, pp. 49-76.

Anil, S., *et al.* (2011). *Dental Implant Surface Enhancement and Osseointegration*. [Em linha]. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/implant-dentistry-a-rapidly-evolving-practice/dental-implant-surface-enhancement-and-osseointegration>>. [Consultado em 15/7/2014].

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

Anitua, E. (2006). Enhancement Of Osseointegration By Generating a Dynamic Implant Surface. *Journal of Oral Implantology*, 32, pp. 72-76.

Anitua, E. (2011). The importance of understanding what is platelet-rich growth factor (PRGF) and what is not. *Journal Shoulder Elbow Surgery*, 20, pp. 23-24.

Anitua, E., *et al.* (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 91, pp. 4-15.

Anitua, E., *et al.* (2012). Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 22, pp. 25-32.

Bennett, N. e Schultz, G. (1993). Growth Factors and wound healing. *The American Journal of Surgery*, 165(6), pp. 728-737.

Bezerra, F. e Lenharo, A. (2002). Terepia clinica avançada em implantologia. São Paulo, *Artes Médicas*.

Bozzini, C. e Molinas, F. (2004). *Fisiologia humana de houssay*, Porto Alegre, L Ateneo.

Choukroun, J., *et al.* (2001). Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*, 42, pp. 55-62.

Cicha, I., *et al.* (2004). Activated human platelets release connective tissue growth factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 91, pp. 755-760.

Civinini, R., *et al.* (2011). The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 8, pp. 25-31.

Cochran, D. e Rouse, C. (1993). Effect of platelet-derived growth factor isoform on release from neonatal mouse calvarine. *Bone* 14, pp. 53-58.

Davies, E. e Hosseini, M. (2000). *Histodynamics of endosseous wound healing*, Toronto, Squared incorporated.

Del Corso, M., Toffler, M. e Ehrenfest, D. (2010). Use of Autologous Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) Membrane in Post-Avulsion Sites: An Overview of Cjoukroun's PRF. *The Journal of Implant and Advanced Clinical Dentistry*, 1, pp. 27-35.

Dori, F., *et al.* (2007). Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *Clinical Periodontology*, 34, pp. 254-261.

Ehrenfest, D., Rasmusson, L. e Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Cell Press*, 27.

El-Marssafy, L., *et al.* (2011). Evaluation of immediately loaded dental implants placed in healed bony sites with or without addition of autologous platelet-rich plasma *Journal of American Science*, 7, pp. 633-643.

Elias, C. e Rocha, F. (2010). Influência da Técnica Cirúrgica e da Forma do Implante na Estabilidade Primária. *Revista de Odontologia do Brasil Central*, 18, pp. 26-29.

Everts, P., *et al.* (2006). Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel: A Review. *The Journal of The American Society of Extra-Corporeal Technology*, 38, pp. 174-187.

Faloni, S. (2006). *Morte celular de osteoclastos do osso alveolar de ratas tratadas com estrogênio*. Mestre, Universidade Federal de São Paulo.

Garcia, R., *et al.* (2005). Plasma rico em Plaquetas: Uma revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Implantologia e prótese sobre Implantes*, 12, pp. 216-219.

Garcia, R., *et al.* (2010). Effect of Platelet-Rich Plasma on Peri-Implant Bone Repair: A Histologic Study in Dogs. *Journal of Oral Implantology*, 36(4), pp. 281-290.

Gawaz, M. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, pp. 3378-3384.

Georgakopoulos, I., *et al.* (2014). The impact of Platelet Rich Plasma (PRP) in osseointegration of oral implants in dental panoramic radiography: texture based evaluation. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 11, pp. 59-66.

Gottrup, F., Andreasen, J. e Andreasen, M. (2001). *Texto e Atlas colorido de traumatismo dental*, São Paulo, Artmed.

Gray, H. (1995). *Gray Anatomia*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Guyton, A. C. (1984). *Physiology of the human body*, Londres, Saunders College.

Hall, A. e Watt, M. (1989). Stem Cells: The generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, 106, pp. 619-633

Hillman, R. S. 2002. *Hematology in clinical practice*, Boston, Lange.

Hoffbrand, V. e Pettit, J. (2001). Distúrbios vasculares e plaquetários de sangramento. *Hematologia clínica*, 15, pp. 267-278.

Hong, J., *et al.* (1999). Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, pp. 63-75.

Howell, H. e Fiorellini, J. (1997). A Phase I/II Clinical Trial to Evaluate a Combination of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB and Recombinant Human Insulin -Like Growth Factor-I in Patients with Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 68, pp. 1186-1193.

Italiano, J. e Hartwig, J. (2007). *In Platelets*, Amsterdam, Elsevier.

Ivan, C. e Drangov, M. (2005). The use of platelet rich plasma in the oral surgery. *Journal of International Medical Association of Bulgaria*, 11, pp. 27-30.

Junqueira, L. e Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Kawase, T., *et al.* (2005). In vitronevidence that the Biological Effects of Platelet-Rich Plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming factor-beta or platelet-derived growth factor. *Periodontology*, 76, pp. 760-767.

Kobayashia, M., *et al.* (2012). A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*, 40, pp. 323-329.

Kolbe, M., Gurtler, H. e Ketz, H. (1984). *Fisiologia veterinária*, Rio de Janeiro, Guanabara koogan.

Kubota, S., *et al.* (2004). Abundant retention and realease of conective tissue growth factor by platelets. *Journal of Biochemistry*. 17, pp. 279-282.

Kundu, R. e Rathee (2014). Effect of Platelet-Rich-Plasma (PRP) and Implant Surface Topography on Implant Stability and Bone. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(6), pp. 26-30.

Lee, J., *et al.* (2013). Platelet-Rich Plasma: Quantitative Assessment of Growth Factor Levels and Comparative Analysis of Activated and Inactivated Groups. *Archives of Plastic Surgery*, 40, pp. 530-535.

Lerner, H. (2000). Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biology*, pp. 107-120.

Leslie, M. (2010). Beyond clotting: the powers of platelets. *Science*, pp. 562-564.

Lindeboom, H., *et al.* (2007). Influence of the application of platelet enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clinical Oral Implants Research*, 18, pp. 133-139.

Lopez-Vidriero, E., *et al.* (2010). The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy*, 26, pp. 269-278.

Lynch, S., *et al.* (1991). The Effects of Short-Term Application of a Combination of Platelet-Derived and Insulin-Like Growth Factors on Periodontal Wound Healing. *Journal of Periodontology*, 62, pp. 458-467.

Marques, F., *et al.* (2014). A manual method to obtain platelet rich plasma. *Acta Ortopédica Brasileira*, 22, pp. 75-77.

Marx, S. e Robert, E. (2001). Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? *Implant dentistry*, 10, pp. 225-228.

Mazzocca, A., *et al.* (2012). Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 94, pp. 308-316.

Melissa, T. e Josée, A. (2004). The Osteocyte. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, pp. 1-8.

Messora, M., *et al.* (2010). Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo experimental em coelhos. *RSBO-Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 6, pp. 291-296.

Messora, M., *et al.* (2011). A standardized research protocol for plateletrich plasma (PRP) preparation in rats. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 8, pp. 299-304.

Michra, A., *et al.* (2012). Sports Medicine Applications of Platelet Rich Plasma *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, pp. 1873-4316.

Millis, D. (1999). Bone end non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 29, pp. 1221-1245.

Monov, G., *et al.* (2005). The effect of platelet-rich plasma upon implant stability measured by resonance frequency analysis in the lower anterior mandibles. *Clinical Oral Implant Research*, 16, pp. 461-465.

Moojen, D., *et al.* (2008). Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Orthopaedic Research*, 26, pp. 404-410.

Mumford, H., Carnes, L. e Oates, W. (2001). The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Periodontal Cells in an In Vitro Wound Model. *Journal of Periodontology*, 72, pp. 331-340.

Neufeld, G., *et al.* (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 13, pp. 15-26.

Nikolidakis, D., *et al.* (2008). Effect of platelet-rich plasma on the early bone formation around Ca-P-coated and non-coated oral implants in cortical bone. *Clinical Oral Implants Research*, 19, pp. 207-213.

Ortolani, E., *et al.* (2014). Effect of PDGF, IGF-1 and PRP on the implant osseointegration. An histological and immunohistochemical study in rabbits. *Annali di Stomatologia*, 2, pp. 66-68.

Park, J., Gemmell, C. e Davies, J. (2001). Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials*, 22, pp. 2671-2682.

Partanen, J., *et al.* (1992). Diverse receptors for fibroblast growth factors. *Progress in Growth Factor Research*, 4, pp. 69-83.

Peev, S. e Atanasov, D. (2007). PRP- An Accelerator of the secondary stability of immediate loaded implant. *Journal of International Medical Association Bulgaria*, 13, pp. 38-40.

Perez, M., *et al.* (2014). Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. *International Scholarly Research Notices of Hematology*, 8, pp. 1-8.

Pintucci, G., Froum, S. e Pinnell, J. (2002). Tophic effects of platelets on endothelial cells are mediated by platelet-associated fibroblast growth factor (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 88, pp. 834-842.

Quesada-García, M., *et al.* (2012). Dental Implant Stability Is Influenced by Implant Diameter and Localization and by the Use of Plasma Rich in Growth Factors. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 70, pp. 2761-2767.

Ramakrishna, R. e Nayar, S. (2007). Clinical assessment of primary stability of endosseous implants placed in the incisor region, using resonance frequency analysis methodology: an in vivo study. *Indian Journal of Dental Research*, 18, pp. 168-172.

Renvert, S., *et al.* (2009). Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. *Journal of Clinical Periodontology*, 36, pp. 604-609.

Robert, E., *et al.* (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 85, pp. 638-646.

Roldán, J., *et al.* (2004). Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein. *Clinical Oral Implant Research*, 15, pp. 716-723.

Rozman, P. e Bolta, Z. (2007). Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 16, pp. 156-165.

Sarment, P., *et al.* (2006). Effect of rhPDGF-BB on bone turnover during periodontal repair. *Journal of Clinical Periodontology*, 33, pp. 135-140.

Seeley, R., Stephens, T. e Tate, P. (2003). *Anatomia e Fisiologia*, São Francisco, Lusodidacta.

Semple, W., Freedman, J. e Italiano, E. (2011). Platelets and the immune continuum. *Immunology*, pp. 261-271.

Simonpieri, A., *et al.* (2012). Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, pp. 1231-1256.

Streckbein, P., *et al.* (2014). Bone Healing with or without Platelet-Rich Plasma around Four Different Dental Implant Surfaces in Beagle Dogs. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16, pp. 479-486.

Suzuki, S., Morimoto, N. e Ikada, Y. (2013). Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *Journal of Biomaterials Applications*, 28, pp. 15-18.

Tejero, R., Anitua, E. e Orive, G. (2014). Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration. *Journal of Progress in Polimeral Science*, 39, pp. 1406-1447.

Tidball, G. (1995). Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 27, pp. 1022-1032.

Torres, J., *et al.* (2010). Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone. *Journal of Clinical Periodontology*, 37, pp. 943-951.

Vale, B. (2002). *Plasma rico em plaquetas: Aplicação na odontologia*. Universidade São Paulo.

Vanessa, C. e Marcus, G. (2012). Fator de crescimento derivado de plaquetas na implantodontia. Novas perspectivas de tratamento para reconstrução óssea. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 1, pp. 60-66.

Vasconcelos, R. 2001. *Cerâmicos bioactivos na reconstrução do tecido ósseo*. Mestre, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Vendramin, F., Franco, D. e Franco, R. (2009). Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 24, pp. 212-218.

Weibrich, G., *et al.* (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34, pp. 665-671.

Wennerberg, A. e Albrektsson, T. (2010). On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Journal of Oral Rehabilitation*, 25, pp. 63-74.

Zarbock, A. (2006). Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Reviews*, 116(12), pp.1-12.