

9

ENGENHARIA TECIDUAL PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA: AGREGADOS PLAQUETÁRIOS, RHBMP-2 E ASPIRADO CONCENTRADO DA MEDULA ÓSSEA (ACMO)

Rubens Moreno de Freitas, Lélis Gustavo Nícoli, Suzane Cristina Pigossi, Ana Daisy Zacharias, Carlos Rossa Junior, Luís Antônio Violin Dias Pereira, Elcio Marcantonio Junior

O resultado estético é parte essencial do sucesso com tratamento de implantes dentários osseointegráveis, e quantidade/qualidade óssea adequada, arquitetura gengival, forma da estrutura óssea adjacente, presença de cristas ósseas interproximais e a relação dos dentes adjacentes são fatores importantes a serem avaliados e planejados, a fim de se obter sucesso com o tratamento. Porém, frequentemente necessitamos de procedimentos para a correção de pequenos ou grandes defeitos ósseos previamente ou concomitantemente a instalação dos implantes para posterior reabilitação protética¹.

Várias técnicas cirúrgicas podem ser utilizadas para reconstruir o rebordo alveolar atrófico, técnicas isoladas ou associadas com enxerto ósseo autógeno, xenógeno, alógeno e biomateriais sintéticos (aloplásticos)². O enxerto ósseo autógeno é o único capaz de apresentar três importantes propriedades biológicas (osteogênese, osteoindução e osteocondução) garantindo um alto potencial regenerativo, sendo considerado o padrão-ouro para a regeneração óssea². Todavia, como desvantagens ao enxerto ósseo autógeno destacam-se a necessidade de um segundo acesso anatômico na área doadora, resultando em maior tempo cirúrgico, morbidade e uma consequente maior resistência do paciente ao tratamento proposto.

Nesse contexto, os enxertos ósseos alógenos, xenógenos e aloplásticos apresentam-se como uma alternativa para o tratamento de deficiências ósseas nos maxilares, uma vez que evitam a necessidade de um segundo acesso cirúrgico. Todavia, devido à necessidade de processamento para eliminação de componentes antigênicos, estes enxertos ósseos são unicamente osteocondutores com um potencial de formação óssea inferior em comparação com o enxerto ósseo autógeno. Com o objetivo de aumentar o potencial de formação óssea desses enxertos, combinações de diferentes enxertos não autógenos (biomateriais) vêm sendo propostas para a obtenção de melhores condições regenerativas através da preservação do volume (osteocondução) e da indução de diferenciação/migração celular (osteoindução)³.

O objetivo deste capítulo foi apresentar a aplicabilidade clínica dos agregados plaquetários, rhBMP-2 e BMAC na engenharia tecidual.

1. AGREGADOS PLAQUETÁRIOS

Nos últimos 20 anos, os concentrados de plaquetas foram propostos como materiais regenerativos em procedimentos de regeneração tecidual. São obtidos a partir da centrifugação do sangue que é um tecido conjuntivo líquido composto por plasma e elementos figurados (leucócitos, plaquetas e hemácias). Os leucócitos e plaquetas sintetizam e liberam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que atuam na quimiotaxia, angiogênese, diferenciação e inibição celular. Por outro lado, as hemácias possuem a função transportadora de oxigênio e não corroboram com a liberação de citocinas/fatores de crescimento. As principais citocinas plaquetárias incluem o fator transformador de crescimento β (TGF- β), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento insulínico (IGF) que atuam na migração, proliferação e inibição celular. Além disso, o TGF- β 1 estimula a síntese do colágeno tipo 1 e da fibronectina produzida pelos osteoblastos e fibroblastos. Os leucócitos, por sua vez, são os responsáveis pela secreção de interleucina (IL) IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator de crescimento endotélio vascular (VEGF) que estimulam a quimiotaxia e angiogênese⁴⁻⁵.

Dentre os concentrados de plaquetas propostos na literatura encontra-se o plasma rico em plaquetas (PRP) e a fibrina rica em plaqueta (PRF) que atuam como agregados plaquetários autógenos com propriedades osteoindutoras. Estes biomateriais, devido à baixa morbidade e possível potencial regenerativo, têm sido indicados para uso em combinação com outros biomateriais ou até mesmo sozinhos. O sangue do paciente, após coletado, é submetido a uma força de centrifugação específica, e assim, os elementos figurados são separados de acordo com sua densidade (Figura 1). A partir disto, a parte correspondente às hemácias é descartada e o concentrado plaquetário resultante é utilizado com objetivo regenerativo⁶.

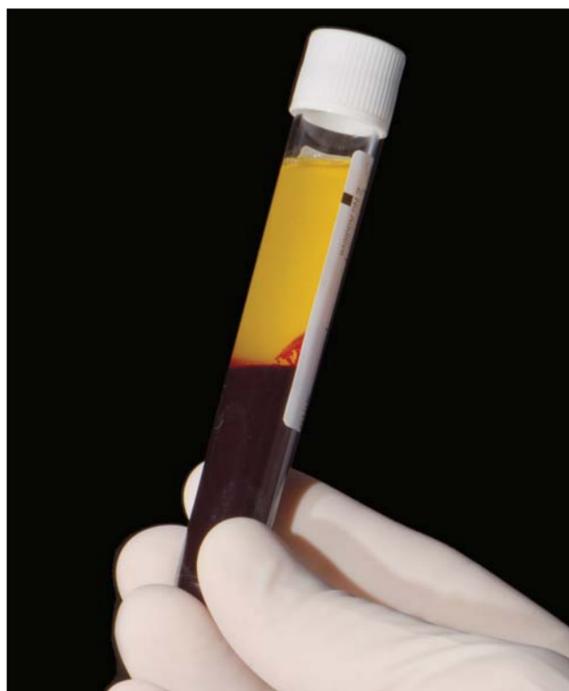


Figura 1
PRF após centrifugação. Parte vermelha correspondente às hemácias que será descartada.

Protocolos de obtenção

Centrifugação

A centrifugação é um processo realizado com o objetivo de separar substâncias de diferentes densidades através de sedimentação. Para este processo, o aparelho centrifugador é programado para executar a rotação em um tempo e velocidade determinados (Figura 2). A separação das substâncias de diferentes densidades ocorre devido à força centrífuga relativa (RCF) oferecida pela rotação exercida pelo rotor do aparelho centrifugador de maneira que as substâncias de maior densidade da mistura são depositadas na porção inferior do tubo seguida pelas substâncias de menor densidade depositadas nas regiões intermediária e superior do tubo em ordem decrescente de densidade, respectivamente⁶. Para melhor entendimento da força centrífuga é fundamental o conhecimento da relação dos vetores de força e raio existentes no movimento de rotação. A força de centrifugação pode ser representada pela fórmula:

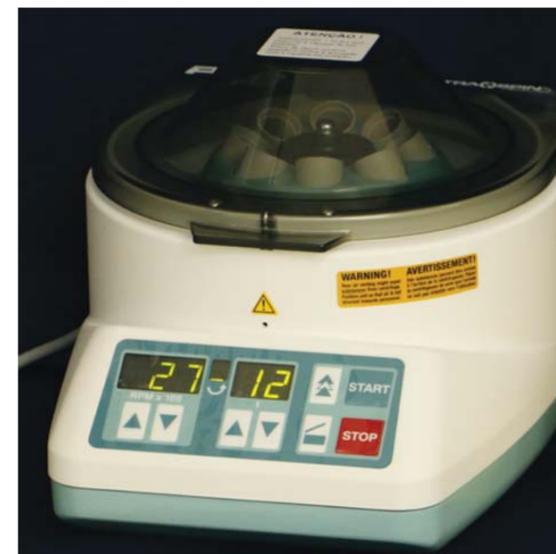


Figura 2
Aparelho centrifugador utilizado para protocolos de centrifugação.

$$RCF \text{ ou Força } G (G) = 1,12 \times r \times (RPM/1000)^2$$

A partir dessa fórmula, compreende-se que a força centrífuga tem relação direta com a velocidade (RPM – rotações por minuto) e o raio (r) do aparelho centrifugador. Desta forma, o raio e a velocidade de centrifugação (RPM) são diretamente proporcionais à força centrífuga (RCF). O raio máximo de um aparelho de centrifugação corresponde à distância entre o centro do rotor e o fundo do tubo de centrifugação em posição horizontal (Figura 3). Assim, em um mesmo RPM, um aparelho centrifugador que apresenta um maior raio do rotor promoverá maior força de centrifugação quando comparado com um aparelho de menor raio do rotor. Por este motivo, para a reprodutibilidade exata dos protocolos de aquisição dos agregados plaquetários, o raio do rotor da centrífuga deve ser conhecido para que os cálculos sejam realizados e a velocidade estabelecida de maneira que a centrifugação ofereça a RCF correta para a obtenção do agregado desejado.



Figura 3
Raio (r) máximo do rotor
representado pela linha vermelha.

Tipos de agregados plaquetários

Plasma rico em plaquetas (PRP)

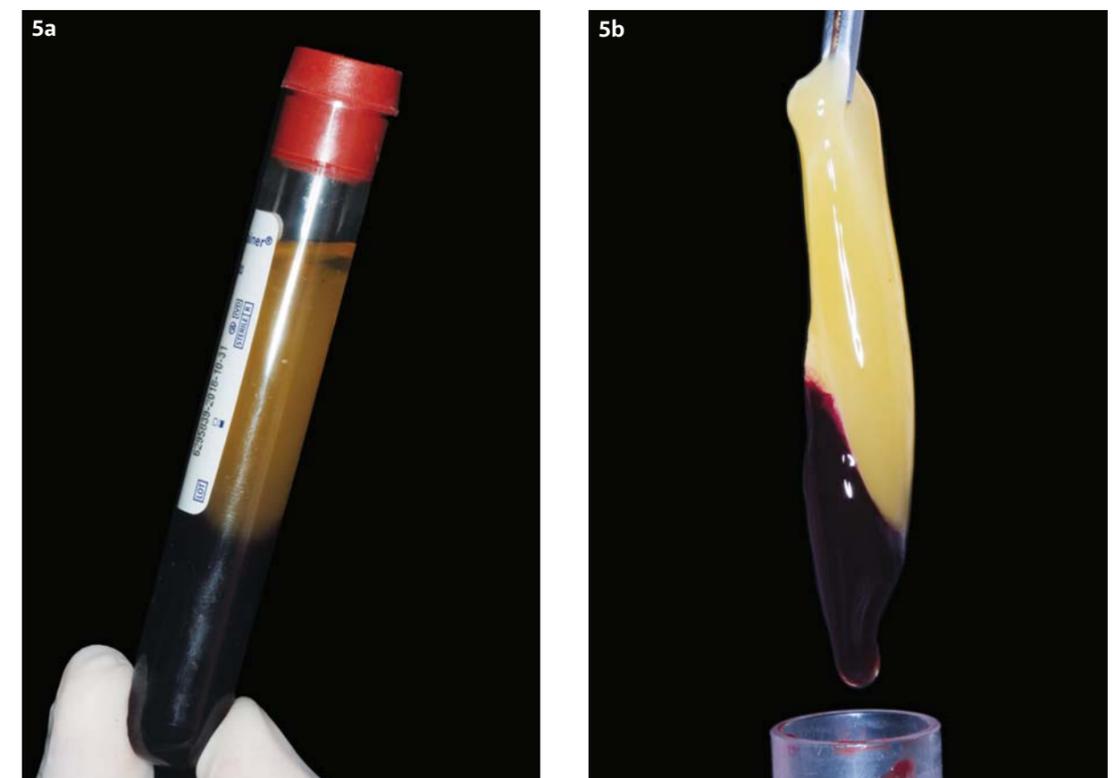
O PRP é um concentrado plaquetário de primeira geração desenvolvido previamente ao PRF. Para a aquisição deste concentrado, o sangue deve ser coletado em um tubo com anticoagulante e, a seguir, centrifugado. Após a centrifugação, os elementos figurados do sangue estarão separados e apenas a parte intermediária (*buffy coat*) é coletada com auxílio de uma pipeta (Figura 4). Este volume coletado possui uma alta concentração de plaquetas, leucócitos e fibrinogênio. Após a pipetagem, a este concentrado plaquetário é adicionado, em um novo recipiente, trombina bovina e cloreto de cálcio, promovendo uma rápida coagulação e a formação de um agregado de consistência gelatinosa rico em plaquetas. A rápida coagulação para o processamento do PRP resulta na formação de uma rede de fibrina disposta paralelamente – de estrutura bidimensional – contendo citocinas dispersas. Esta característica morfológica do PRP oferece uma consistência friável e liberação rápida das citocinas no sítio receptor⁴.



Figura 4
Região referente ao plasma rico em plaquetas
(parte intermediária) sendo coletada.

Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF)

A L-PRF é um concentrado plaquetário de segunda geração, ou seja, nenhum anticoagulante é utilizado para sua aquisição. O sangue deve ser coletado com um tubo de vidro ou plástico revestido por vidro e centrifugado a 3.000 RPM por dez minutos. A eletronegatividade da sílica – presente na composição do vidro – ativa a via intrínseca da cascata de coagulação no momento em que o sangue entra em contato com a parede do tubo. Desta forma, durante a centrifugação, o sangue estará em processo de coagulação, e ao final de dez minutos, é obtido um agregado consistente composto por uma parte inferior vermelha que corresponde às hemácias e uma parte superior amarela referente à fibrina, plaquetas e leucócitos (Figura 5). A separação das hemácias é feita com o auxílio de uma tesoura. Nesta secção, uma pequena parte da porção vermelha, 2 a 3 mm, deve ser preservada devido à alta concentração de leucócitos e plaquetas infiltradas nesta área (*buffy coat*), Figura 6. O exsudato (plasma pobre em plaquetas), presente na porção amarela, é separado do PRF através de compressão com estojos específicos para este fim (Figuras 7). Devido à ausência de anticoagulante no processamento deste biomaterial, a coagulação ocorre lentamente, proporcionando ligações cruzadas na rede de fibrina, resultando em uma estrutura tridimensional com citocinas aderidas de forma intrínseca. Esta característica morfológica, por sua vez, provê uma maior resistência mecânica ao agregado e liberação lenta das citocinas no sítio receptor (Figura 8)⁴.



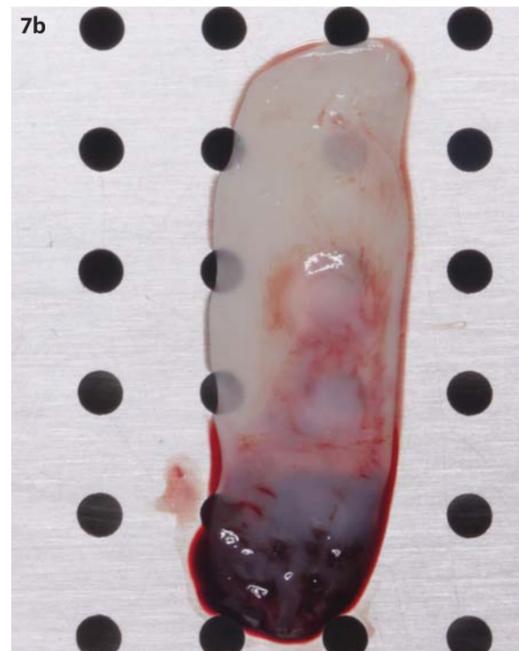
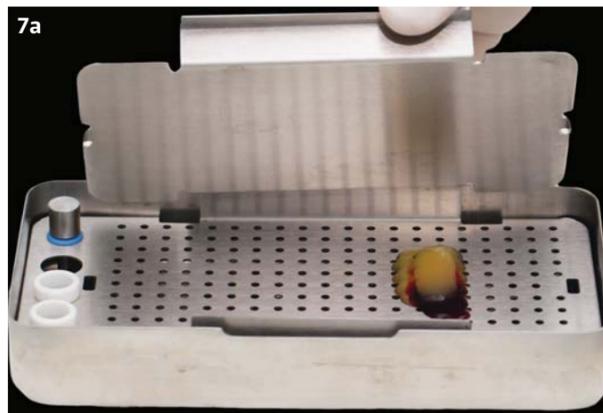
Figuras 5
A. L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos) após a centrifugação de 3000 RPM por dez minutos (400 g). B. L-PRF previamente à secção e separação da área de interesse (parte amarela).



Figura 6
Secção do L-PRF com auxílio de uma tesoura. Dois a três milímetros da parte vermelha deve ser preservado com o objetivo de manter a integridade do Buffy Coat.



Figura 8
Resistência do L-PRF representada pela tensão exercida pelo peso das pinças hemostáticas.



Figuras 7
A. L-PRF, com Buffy Coat preservado após secção, depositado sobre a grade do estojo de compressão. A placa de metal é colocada sobre o biomaterial oferecendo compressão e o plasma pobre em plaquetas é escoado para a região inferior do estojo. B. L-PRF em formato de membrana após compressão realizada com o estojo.

Ressalta-se que para a aquisição do L-PRF, foi descrito um protocolo de centrifugação de 3.000 RPM em dez minutos (aproximadamente 400 g), todavia, é fundamental atentar-se à necessidade de aplicar uma força de 400 g em dez minutos, tomando o cuidado de compreender que o RPM pode variar de acordo com o raio do rotor do aparelho centrifugador utilizado como descrito previamente.

Fibrina rica em plaquetas - avançada (A-PRF)

Com o objetivo de avaliar a influência do RCF na distribuição e concentração dos elementos figurados do sangue, Ghannati et al., 2014⁷, em estudo liderado por Choukroun, avaliaram a morfologia em dois novos protocolos de obtenção do PRF. Para isto, o sangue foi coletado em tubo de vidro e centrifugado em 1.500 RPM por 14 min (= 101 g) para o primeiro grupo, e 2.700 RPM por 12 minutos (RCF = 327 g) para o segundo grupo. Os resultados demonstraram que a aplicação de uma menor RCF proporcionou maior quantidade de plaquetas, leucócitos e citocinas, quando comparado com o grupo de maior RCF. Além disso, uma distribuição mais uniforme destes elementos em todo o comprimento do PRF foi apresentada no grupo de menor RCF. Assim, o agregado centrifugado com menor força de centrifugação (1.500 RPM / 14 minutos = 101 g) pôde apresentar um provável maior potencial regenerativo. Por este motivo, este novo concentrado plaquetário foi proposto e nomeado *advanced platelet-rich fibrin (A-PRF)*⁷⁻⁸.

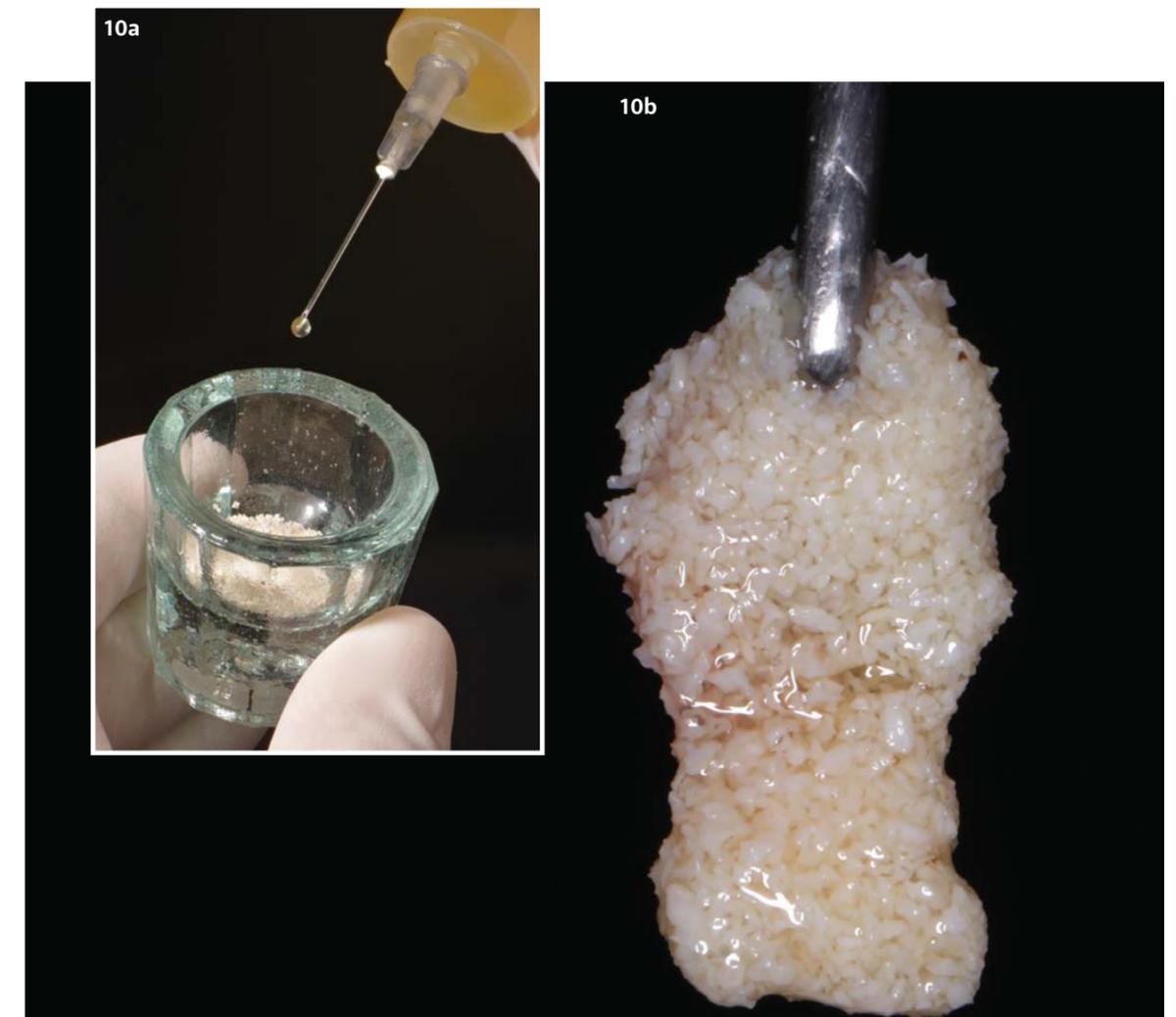
Fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF)

O i-PRF é um concentrado plaquetário de segunda geração com consistência líquida, composto por altas concentrações de citocinas, plaquetas e leucócitos. Este agregado, de origem autógena, é obtido através da centrifugação do sangue do paciente com auxílio de tubos de plástico. A ausência do vidro, presente nos tubos utilizados para os PRFs supracitados, proporciona uma coagulação ainda mais lenta. Desta maneira, após a centrifugação, o concentrado plaquetário é separado com auxílio de uma seringa e utilizado de forma injetável em regiões que necessitam de potencialização no processo regenerativo tecidual (Figura 9)⁹.



Figura 9
I-PRF sendo coletado com uma seringa descartável.

Para o protocolo de centrifugação do i-PRF, Wend et al., em 2017, demonstraram que uma menor RCF pode proporcionar maior concentração de citocinas, leucócitos e plaquetas. Desta forma, o protocolo de 700 RPM por três minutos (60 g) parece garantir melhor configuração do i-PRF⁹. Por sua consistência líquida, o i-PRF tem sido proposto em combinação com biomateriais de origem xenóloga e aloplástica para o tratamento de defeitos ósseos. Para este fim, o i-PRF é adicionado a estes biomateriais e a coagulação é finalizada na mesa cirúrgica, dando origem à um biomaterial composto chamado *Sticky Bone* (Figuras 10).



Figuras 10
A. I-PRF sendo adicionado a um biomaterial heterógeno (hidroxiapatita de origem bovina). B. Característica do Sticky Bone após término da coagulação do I-PRF.

Aplicabilidade clínica**Preservação do rebordo alveolar**

Alterações dimensionais no rebordo alveolar que ocorrem após a exodontia podem prejudicar o adequado posicionamento tridimensional dos implantes dentários. Essas alterações ocorrem principalmente nos primeiros três meses após a exodontia e com maior magnitude na parede vestibular do rebordo alveolar¹⁰. Tan et al. (2012)¹⁰, em sua revisão sistemática, relataram uma reabsorção óssea horizontal e vertical de 3,8 mm e 1,2 mm, respectivamente, nos primeiros seis meses após a exodontia sem a realização de técnicas de preservação alveolar. Isso corresponde a perda óssea vertical de 29-63% e horizontal de 11-22%.

Sendo assim, várias técnicas de preservação do rebordo alveolar foram descritas, incluindo o preenchimento da cavidade com enxertos autógenos, xenógenos, alógenos ou materiais aloplásticos, combinados ou não com membranas reabsorvíveis ou não reabsorvíveis¹¹. Entretanto, apesar desses materiais diminuírem a reabsorção do rebordo alveolar, a alta concentração de partículas substitutas remanescentes pode diminuir o contato final entre o osso e o implante. A exposição de membranas frequentemente utilizadas em combinação com esses substitutos ósseos também pode comprometer o resultado final¹¹. Além disso, seu alto custo também pode ser considerado um fator limitante para seu uso. Os enxertos autógenos são uma alternativa, mas geralmente envolvem morbidade do local doador e/ou disponibilidade limitada, embora, mais recentemente, resultados significativos e com reduzida morbidade para o leito doador do enxerto têm sido obtidos para a preservação alveolar com a técnica de restauração dentoalveolar imediata¹².

Nesse contexto, tem sido proposto o uso de membranas de PRF na preservação do rebordo alveolar. O PRF tem sido descrito como um material biologicamente adequado para preservação do rebordo alveolar, principalmente considerando baixo custo e obtenção simples e atraumática. Além disso, pode atuar modulando a resposta inflamatória reparadora, aumentando a eficácia da regeneração tecidual, angiogênese e neovascularização, e diminuindo a dor pós-operatória e o edema⁴.

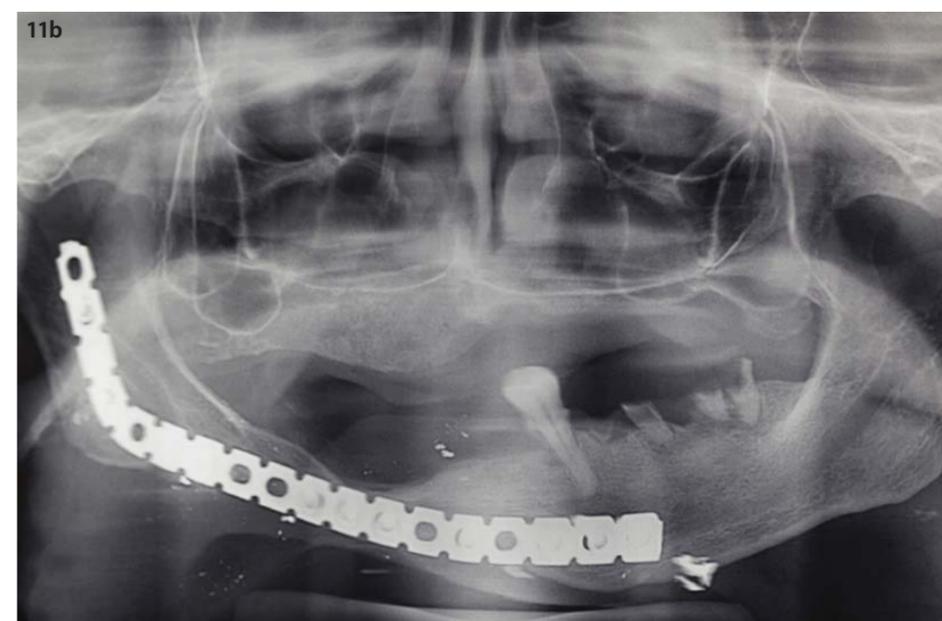
Em geral, o remodelamento dimensional obtido com o uso do PRF é comparável àqueles relatados na preservação do rebordo com substitutos ósseos, e não apresenta as desvantagens de partículas remanescentes do enxerto^{11,13-14}. O tratamento com PRF oferece vantagens adicionais, incluindo simplicidade de uso, sem necessidade de fechamento primário da ferida e nenhum risco de exposição precoce à membrana¹¹. Ademais, o PRF demonstrou histologicamente o potencial de aumentar a densidade óssea, o número e a espessura das trabéculas, o número e a organização dos osteoblastos, a formação de novos capilares e a aposição e mineralização da matriz óssea¹⁵, garantindo uma formação óssea adequada e avançada semelhante aos outros substitutos ósseos¹⁴. Por outro lado, outros artigos científicos questionam se a adição de PRF traz algum benefício na formação óssea e manutenção da estrutura do alvéolo pós-exodontia¹⁶⁻¹⁸.

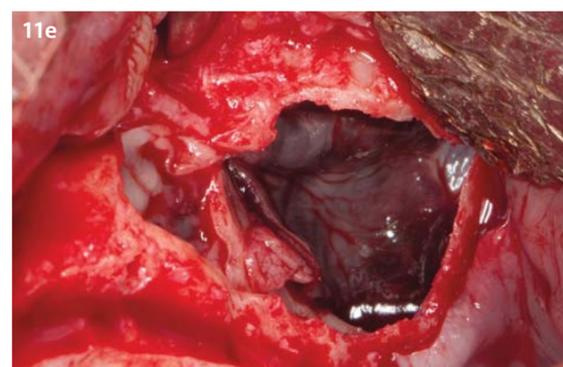
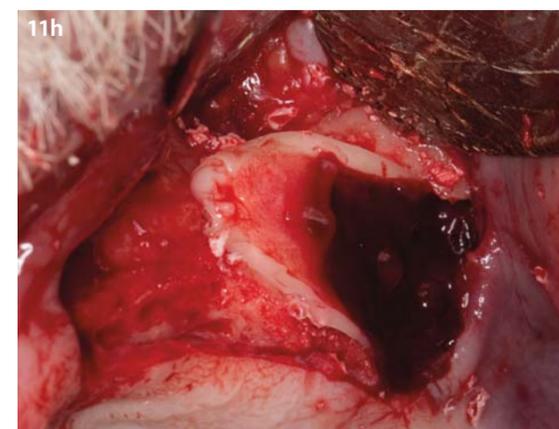
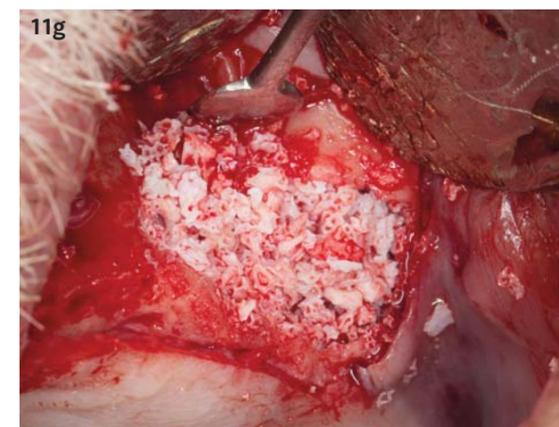
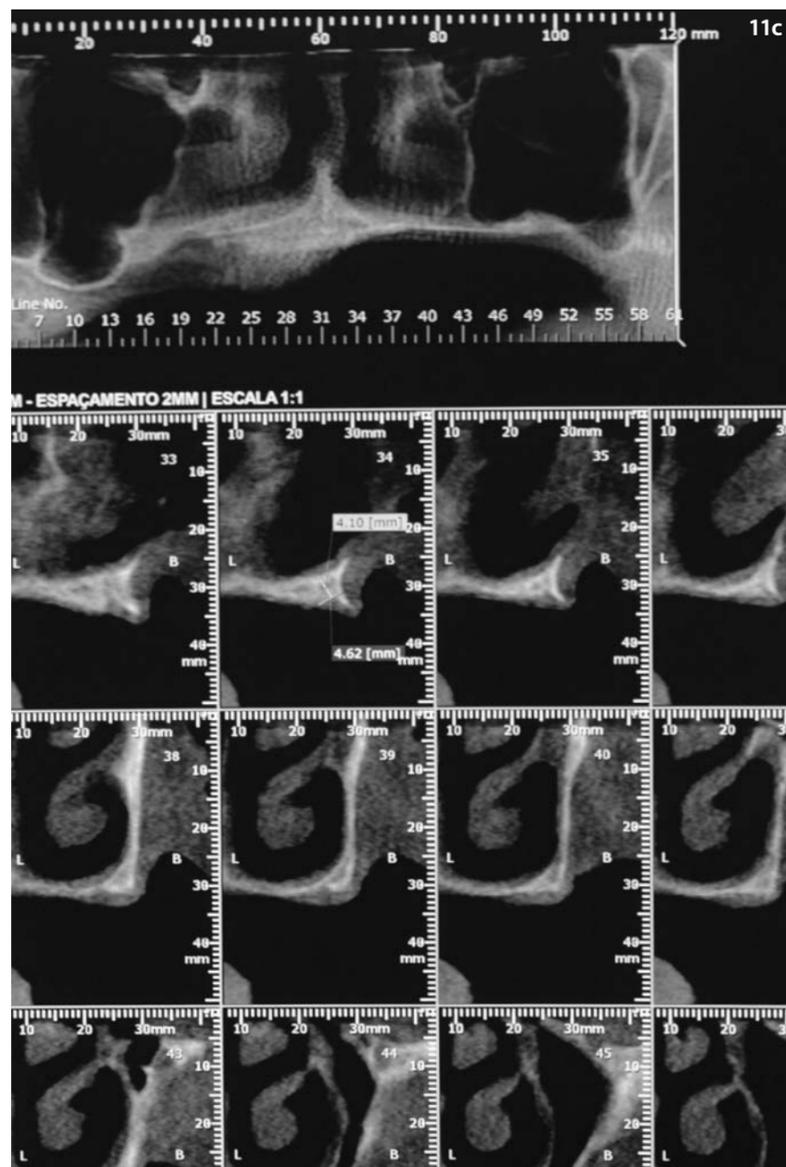
Levantamento do seio maxilar

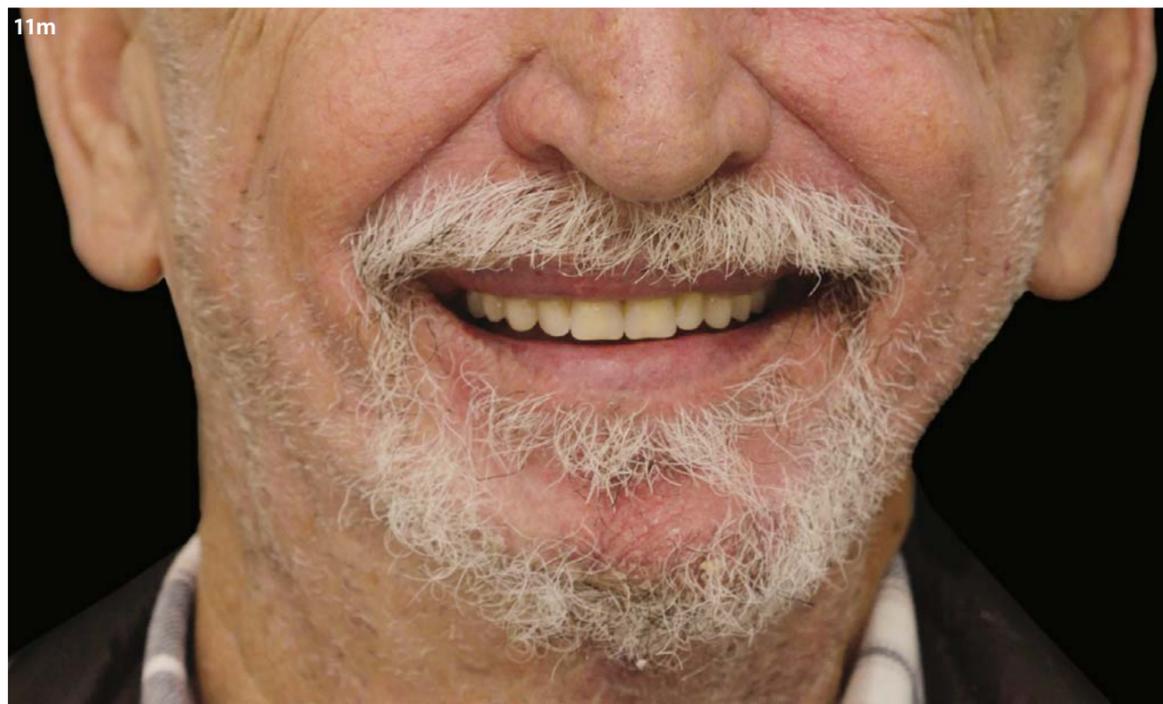
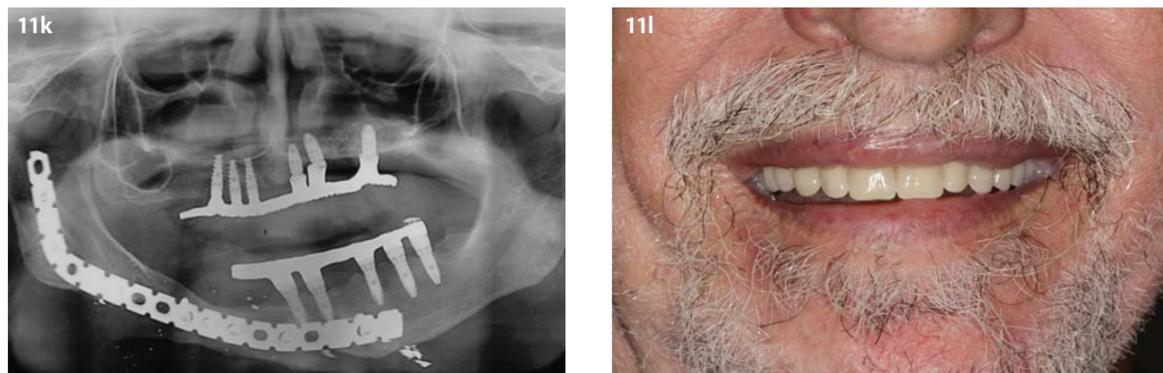
O posicionamento adequado de implantes na região posterior da maxila pode estar dificultado devido ao volume ósseo deficiente causado pela reabsorção do rebordo alveolar e pneumatização sinusal. Nesses casos, o levantamento do seio maxilar é considerado um dos procedimentos mais previsíveis para neoformação óssea, podendo ser realizado com diferentes tipos de enxertos ósseos¹⁹. Nesse contexto, foi proposta a utilização do PRF sozinho como material de enxerto para preenchimento durante o procedimento de levantamento do seio maxilar. Todavia, apesar do PRF aumentar significativamente a formação óssea entre o seio maxilar e a base do rebordo alveolar garantindo o posicionamento adequado dos implantes com elevados níveis de sucesso, os resultados observados foram comparáveis àqueles obtidos sem a utilização de nenhum biomaterial¹⁹⁻²¹.

Diante disso, Choukroun et al. (2006)²² propuseram, para aumentar o potencial regenerativo, a utilização de fragmentos de PRF misturados com enxerto ósseo alógeno liofilizado e desmineralizado (DFDBA) para preenchimento da cavidade sinusal durante o procedimento de levantamento do seio maxilar. Assim, as propriedades de osteoindução e osteocondução seriam promovidas pelos fragmentos de PRF e pelo DFDBA, respectivamente. Foi observada nova formação óssea equivalente para a mistura PRF/DFDBA após quatro meses e para DFDBA sozinho após oito meses,

sugerindo que o uso de PRF com DFDBA como material de enxerto no levantamento do seio maxilar poderia acelerar a reparação óssea, reduzir o tempo de maturação do DFDBA e permitir a colocação do implante após apenas quatro meses de cicatrização. Além disso, com base nesse possível potencial regenerativo do PRF associado ao enxerto ósseo, o mesmo também pode ser utilizado em casos mais complexos em que se faz necessário o levantamento do seio maxilar e/ou do assoalho nasal³ (Figura 11).



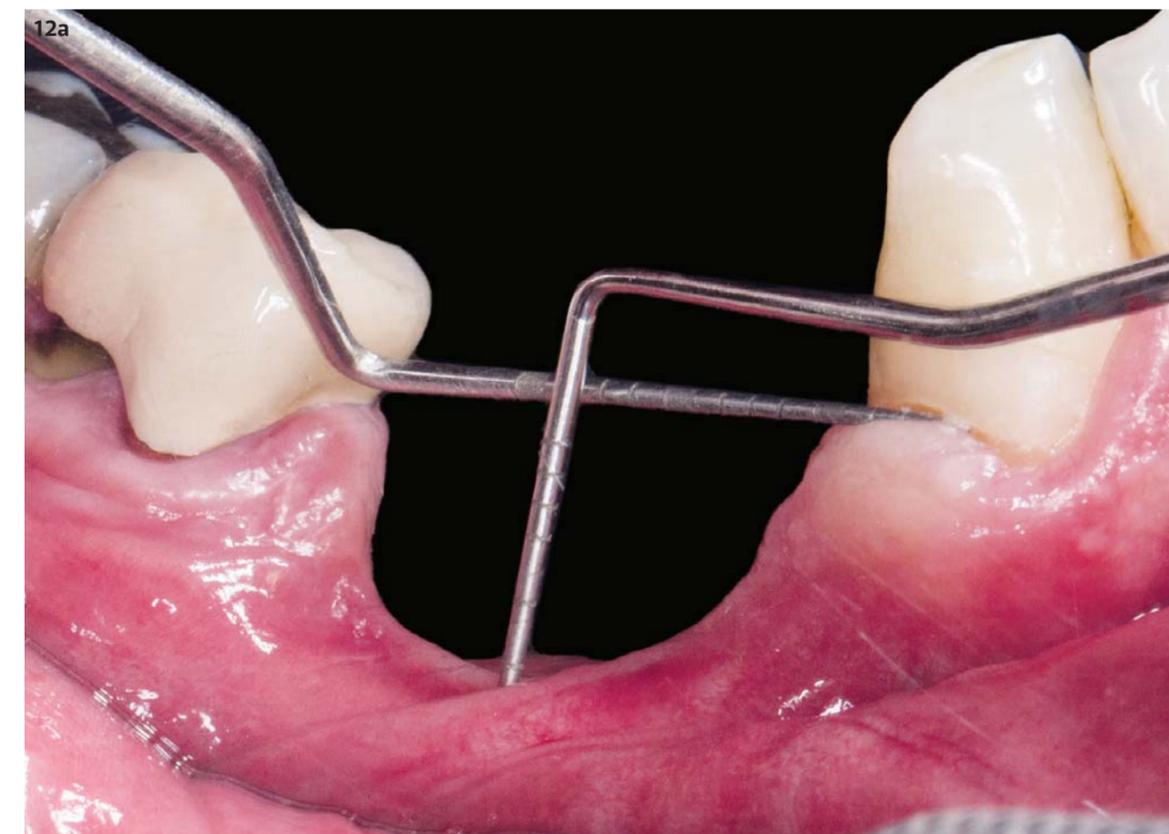


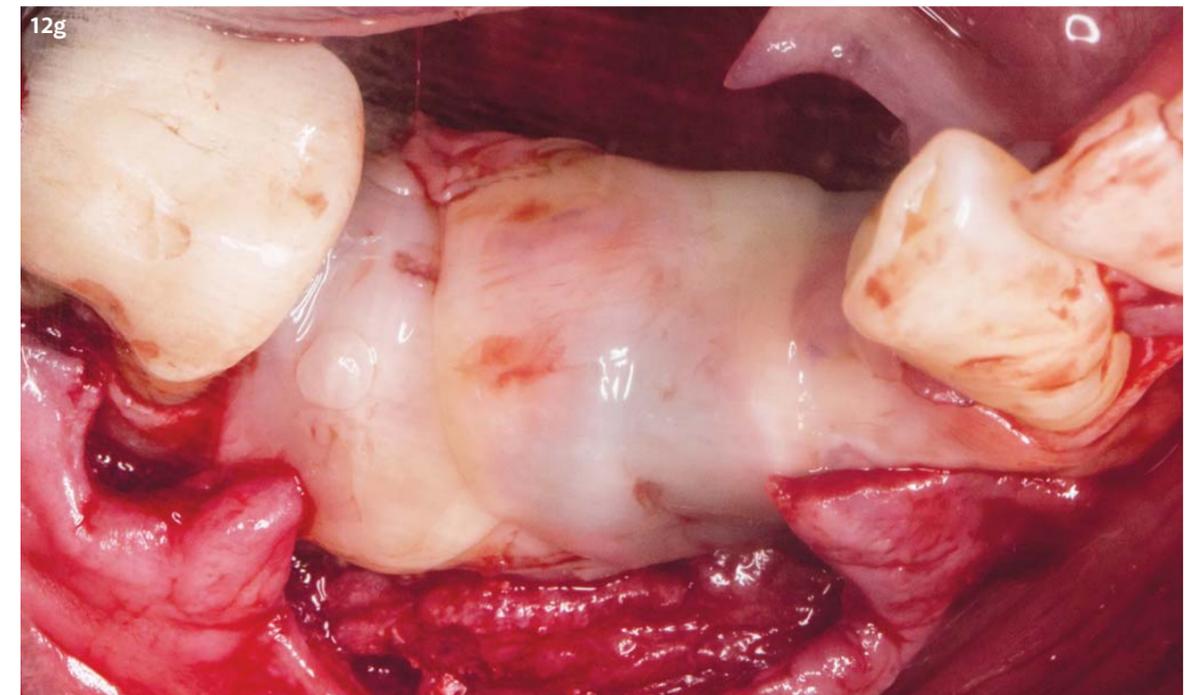
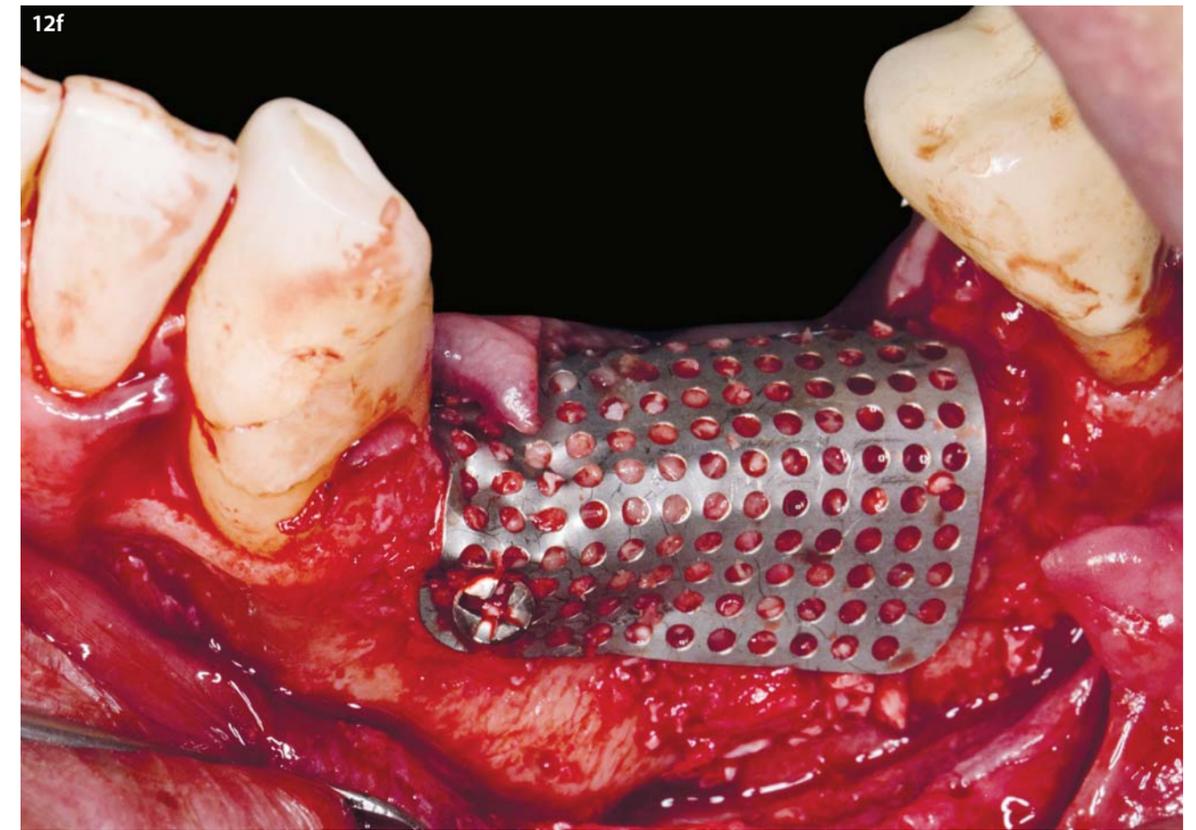
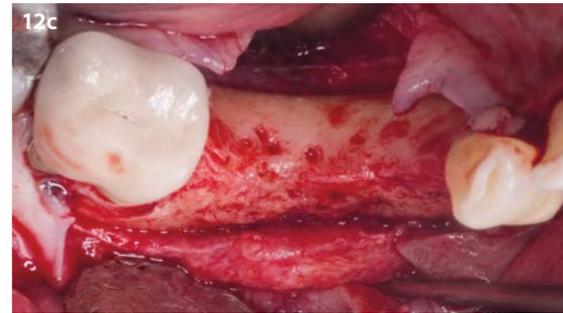


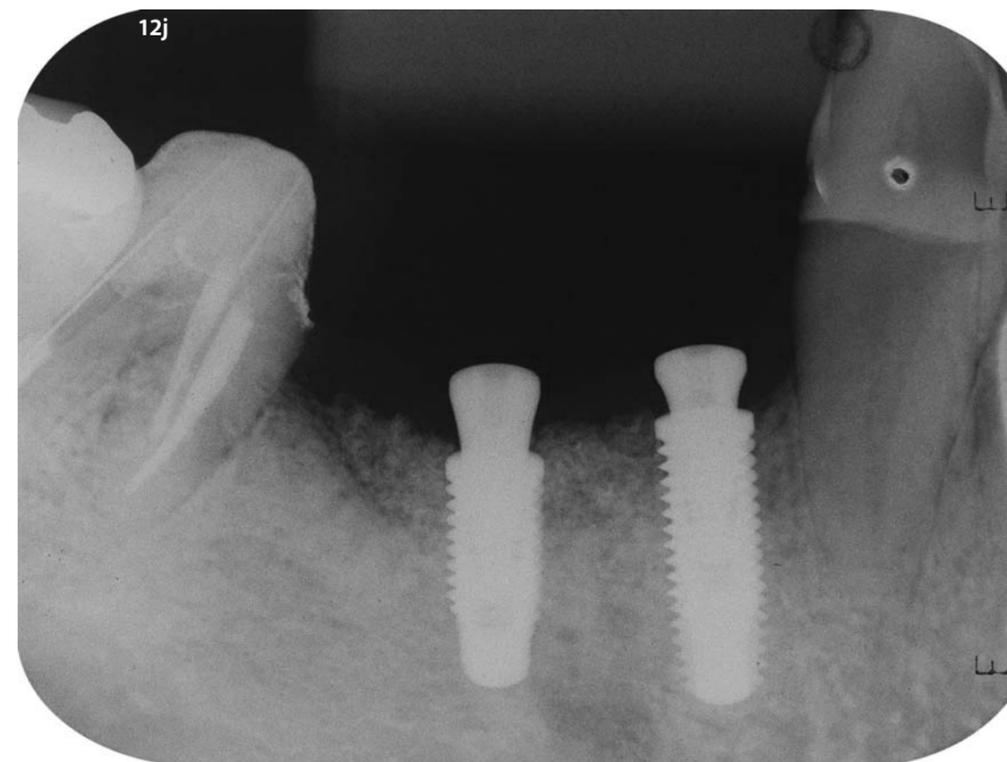
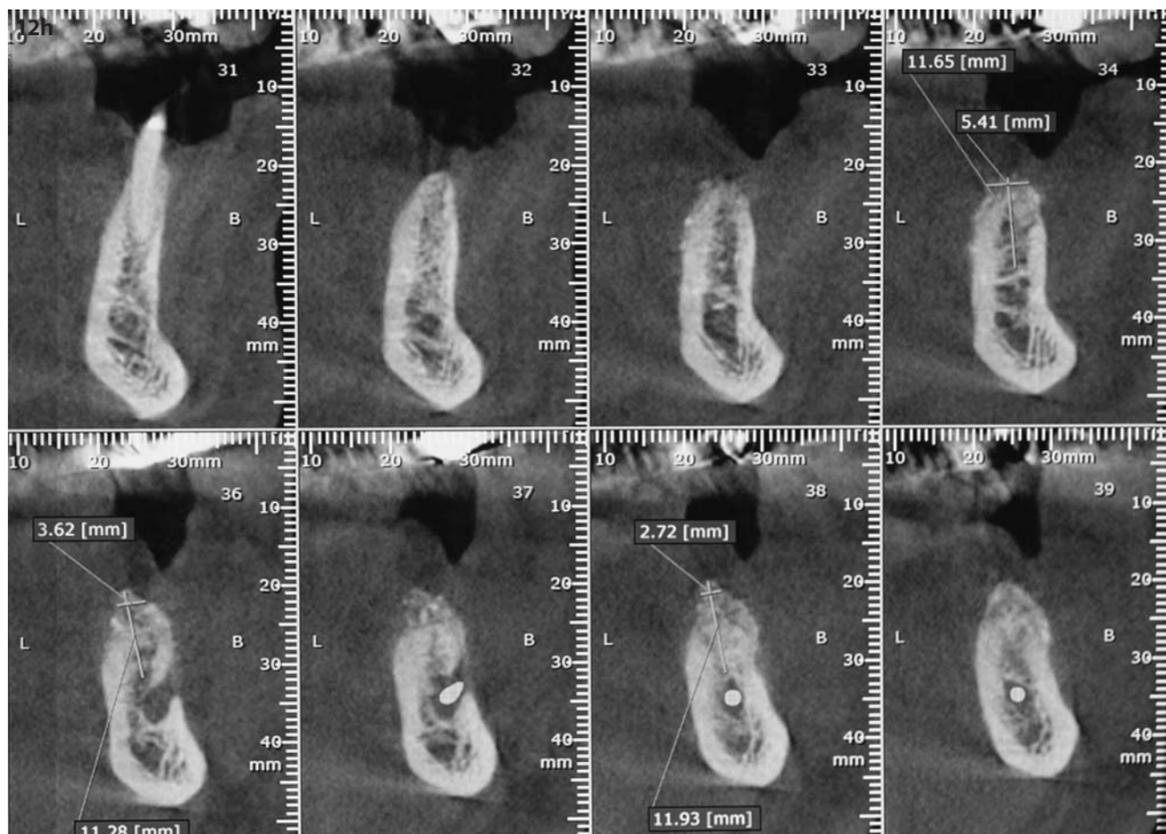
Figuras 11
 A. Imagem extraoral de paciente vítima de disparo de arma de fogo. B. Radiografia panorâmica apresentando defeito ósseo em altura no lado direito da mandíbula consequente ao disparo de arma de fogo com placa de fixação utilizada no tratamento cirúrgico do trauma. Reabsorção óssea severa em altura no lado esquerdo da maxila. C. Imagem de tomografia computadorizada cone-beam da maxila. Pneumatização do seio maxilar associada a severa reabsorção da crista alveolar no lado esquerdo da maxila. D. Imagem intraoral da maxila e mandíbula. E. Acesso cirúrgico ao seio maxilar esquerdo através de desgaste da parede lateral do seio maxilar seguido de acesso ao assoalho nasal através de desgaste da parede medial do seio maxilar. Descolamento da membrana de Schneider e mucosa nasal realizadas com auxílio de curetas específicas. F. Biomaterial. Mistura de hidroxiapatita de origem bovina com L-PRF fragmentado e Serum (Plasma Pobre em Plaquetas). G. Assoalho nasal e seio maxilar preenchidos com enxerto ósseo. H. Membrana de L-PRF acomodada sobre a janela de acesso cirúrgico. I. Sutura. J. Próteses do tipo protocolo instaladas em maxila e mandíbula. K. Radiografia panorâmica apresentando implantes e próteses do tipo protocolo instalados em maxila e mandíbula. L/M. Imagens extraorais finais do sorriso; a reprodução dessas fotografias publicadas [referência 3] foi aprovada pelo Conselho Editorial do Journal of Prosthetic Dentistry, Incorporated, em 1º de junho de 2018.

Entretanto, como Choukroun et al. (2006)²² usaram períodos diferentes de análise para ambos os grupos avaliados – quatro meses para o grupo PRF+DFDBA (grupo teste) e oito meses para o grupo (controle) DFDBA –, pode ser questionado se aos quatro meses o grupo DFDBA já não teria a mesma quantidade de osso formado do que o grupo teste. Além disso, outros estudos que compararam o uso de material de enxerto ósseo com e sem o uso adicional do PRF demonstraram que apesar dos ganhos ósseos observados com o PRF, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes com a adição do PRF²³⁻²⁵. A utilização do PRF como único material de enxertia para a elevação do seio maxilar se mostrou como um procedimento não previsível e não reproduzível²⁶.

Diante disso, embora os resultados não pareçam confirmar que o PRF é melhor que outros biomateriais, sugere-se que seu uso possa resultar em uma diminuição no tempo total de cicatrização e melhorar o manuseio do material do enxerto. Além disso, o uso do PRF parece ilustrar altas taxas de sucesso com custos mínimos, podendo reduzir a quantidade de enxerto ósseo necessário para o preenchimento total da cavidade sinusal, reduzindo os custos do procedimento²². No entanto, novos estudos são necessários para apoiar o efeito benéfico da PRF no levantamento de seio maxilar. Ressalta-se ainda que o potencial regenerativo do PRF, quando associado à biomateriais osteocondutores, pode favorecer ganho ósseo mesmo em defeitos ósseos de altura considerados de prognóstico duvidoso como exemplificado nas Figuras 12.







Figuras 12
A/B. Defeito ósseo em altura na região dos elementos 44 e 45. C. Descorticalização da área receptora com auxílio de broca cirúrgica e peça reta. D. Enxerto ósseo autógeno coletado da região de ramo mandibular com auxílio de broca particuladora. E. Na sequência dos recipientes: L-PRF fragmentado, hidroxiapatita de origem bovina e osso autógeno coletado do ramo mandibular, respectivamente. Estes biomateriais foram misturados para associação das propriedades biológicas. F. Mistura de biomateriais estabilizada através da fixação da malha de titânio. G. L-PRF em forma de membrana acomodado sobre a malha de titânio previamente à sutura. H. Tomografia após oito meses de cicatrização do enxerto ósseo apresentando satisfatório ganho ósseo em altura. I. Implantes e cicatrizadores instalados. J. Radiografia periapical após seis meses de osseointegração.

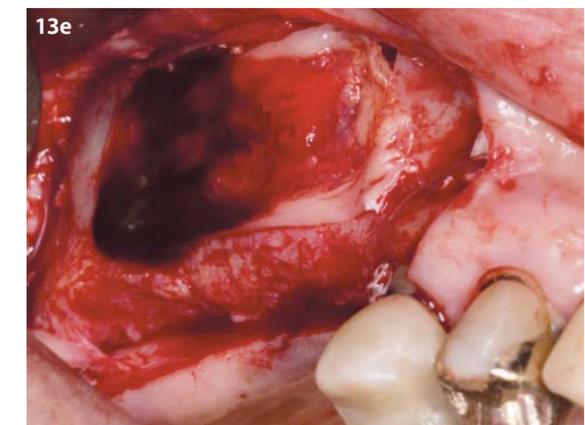
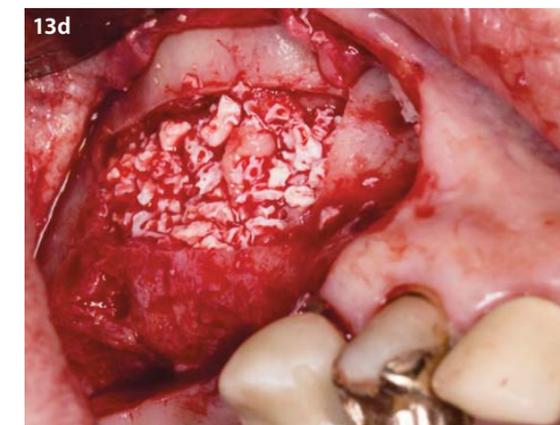
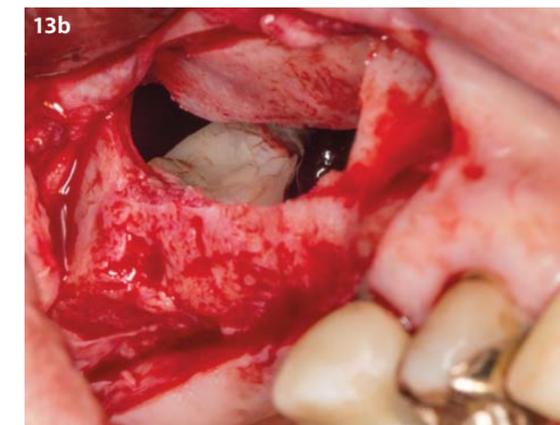
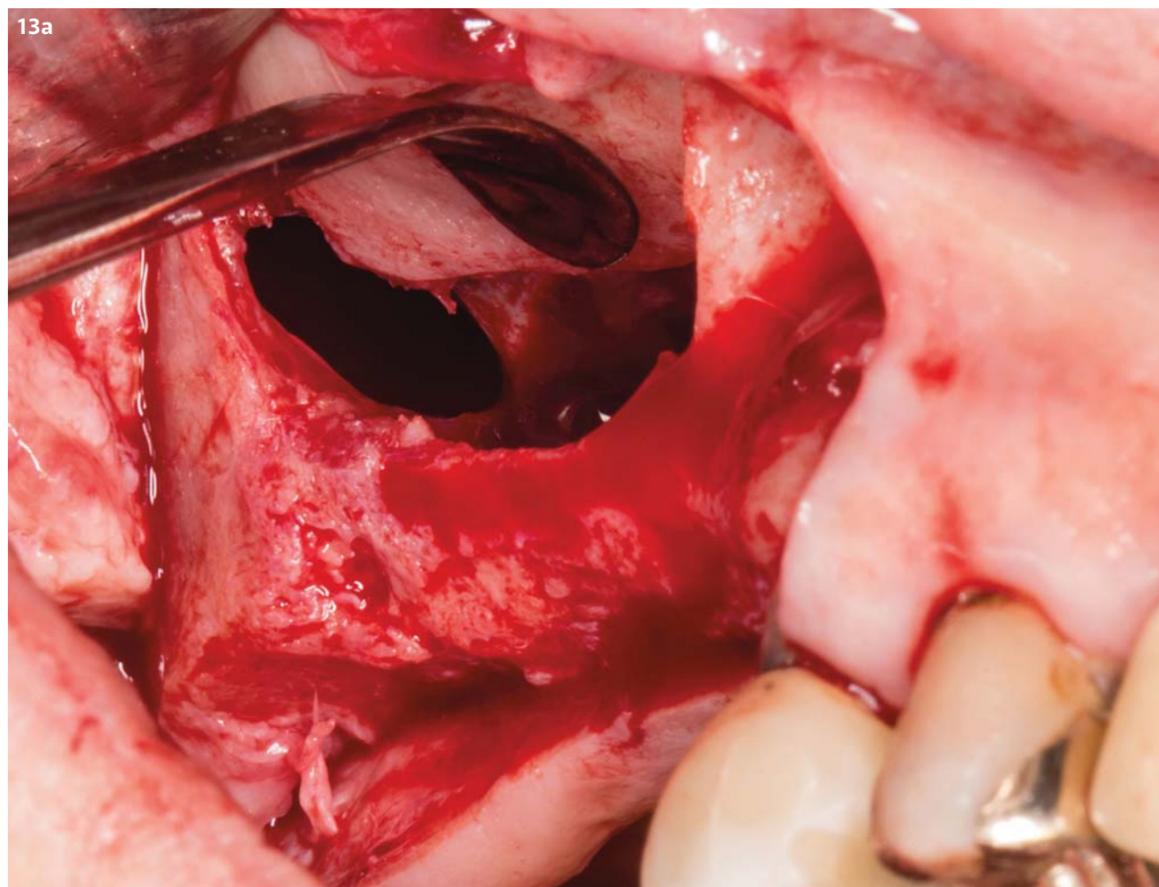


Reparação da membrana de Schneider

Apesar do levantamento do seio maxilar ser um procedimento seguro e previsível, algumas complicações ainda podem ocorrer, como infecção da ferida pós-operatória, desenvolvimento de sinusite maxilar, perda do material do enxerto, edema, sangramento e perfuração da membrana de Schneider. A perfuração da membrana de Schneider é a complicação intraoperatória mais comum, com uma frequência que varia de 10 a 56%, que pode resultar na contaminação do enxerto e em sinusite pós-operatória²⁷. A espessura inadequada da membrana e as variações na morfologia do seio podem dificultar a elevação da membrana e aumentar o risco de perfuração.

Embora uma pequena perfuração possa não ser importante, grandes perfurações e aquelas localizadas em áreas desfavoráveis precisam de reparos. Essa situação é considerada uma complicação importante e pode até mesmo ser recomendada a interrupção da cirurgia sem a colocação do enxerto ósseo, especialmente se este for granuloso. Nos casos em que o procedimento cirúrgico deve ser abortado, a reentrada deve ser realizada após seis a oito semanas da primeira tentativa cirúrgica²⁷.

Estudos clínicos avaliando a eficácia das membranas de colágeno revelaram sucesso no reparo das perfurações de membrana de Schneider com uma extensão de até 10 mm sem qualquer problema de cicatrização²⁸. No entanto, o seu uso não está indicado em casos em que a perfuração apresenta uma extensão maior que 10 mm devido a falta de resistência mecânica adequada dessas membranas para sustentar todo o comprimento da perfuração. Com base nisso, têm sido proposto o uso de membranas de PRF para o reparo das perfurações de membrana de Schneider devido a sua propriedade adesiva natural e alta resistência mecânica oferecida pela rede de fibrina (Figuras 13)^{27,29-30}. Oncu et. al., 2017²⁹, avaliaram o desempenho de procedimentos de levantamento de seio maxilar sem perfurações e com perfurações reparadas com PRF e demonstraram que a formação óssea e a taxa de sobrevivência dos implantes foram semelhantes em ambos os grupos. Além disso, análises histológicas demonstraram que as membranas de PRF apresentam resposta inflamatória e cicatricial semelhante as membranas de colágeno quando utilizadas para o reparo da membrana de Schneider³⁰. Sendo assim, sugere-se o uso das membranas de PRF como uma alternativa de tratamento em casos de perfurações extensas na membrana de Schneider por garantir um reparo eficaz que evita a interrupção do procedimento cirúrgico e retardo no tratamento reabilitador^{27,29-30}. Ademais, supõe-se que devido a liberação dos fatores de crescimento presentes no PRF, incluindo o TGF- β , uma aceleração no reparo da membrana possa ocorrer. Porém, estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.



Figuras 13
 A. Perfuração da membrana de Schneider ocorrida durante seu descolamento em cirurgia de elevação de seio maxilar. B/C. Membranas de L-PRF inseridas sobre a perfuração da membrana de Schneider com o objetivo de vedação mecânica para posterior inserção do enxerto ósseo. D. Enxerto ósseo inserido no interior do seio maxilar. E. Membranas de L-PRF acomodadas sobre a janela de acesso ao seio maxilar. F. Cicatrizadores instalados após cicatrização do enxerto (oito meses) e osseointegração do implante (seis meses).

Defeito intraósseo/furca

A progressão da doença periodontal pode resultar em reabsorção óssea irreversível na região interradicular, levando a exposição da furca nos dentes multirradiculares³¹. Nesses casos, o fechamento previsível dos defeitos de furca com regeneração do osso, cimento e ligamento periodontal tem sido um dos principais objetivos da terapia regenerativa periodontal³¹. Uma ampla gama de materiais de enxerto ósseo está disponível para o tratamento de lesões de furca, sendo que resultados superiores têm sido relatados quando enxertos ósseos são utilizados associados a membranas. Entretanto, essa modalidade de tratamento apresenta algumas desvantagens, incluindo exposição da membrana com subsequente contaminação bacteriana, eritema, inchaço, supuração e dor pós-operatória; o alto custo do procedimento e a necessidade de remoção das membranas não reabsorvíveis em um segundo estágio cirúrgico³¹. Diante disso, o uso do PRF tem sido proposto como alternativa de tratamento para os defeitos ósseos periodontais. O PRF pode ser utilizado como biomaterial de preenchimento uma vez que forma uma matriz para o crescimento de células periosteais que favorecem o reparo ósseo²² e na forma de membrana atuando como uma barreira que pode evitar a invaginação precoce do epitélio gengival devido à liberação de TGF- β que atua como um inibidor do crescimento de células epiteliais⁵.

Estudos clínicos avaliando o potencial do PRF como material de enxerto e como membrana para tratamento de defeitos de furca Grau II em mandíbulas e defeitos intraósseos têm demonstrado resultados superiores em comparação ao retalho para raspagem não associado ao PRF³²⁻³⁴. Maior redução da profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica e preenchimento ósseo do defeito foram observados nos defeitos tratados com PRF se comparados com o retalho para raspagem não associado ao PRF. Além disso, desempenho clínico semelhante foi observado no uso do PRF sozinho comparado a outros materiais de enxerto ósseo no tratamento de furca Grau II na mandíbula^{31,35-36}.

Cirurgia plástica periodontal

Um dos principais objetivos da cirurgia plástica periodontal é o recobrimento completo e previsível das superfícies radiculares expostas. As recessões gengivais estão associadas à hipersensibilidade dentinária, cárie radicular, controle de placa bacteriana prejudicado e complicações estéticas. Numerosas técnicas têm sido propostas para o tratamento de recessões únicas ou múltiplas, sendo que a combinação das técnicas de retalho posicionado coronalmente (RPC) e enxerto de tecido conjuntivo (ETC) é considerada padrão-ouro por garantir uma porcentagem significativamente maior de cobertura radicular, espessura gengival e altura de tecido queratinizado³⁷. Entretanto, para obtenção do enxerto de tecido conjuntivo é necessário um sítio doador que resulta em dor pós-operatória e limita a extensão da área receptora que pode ser recoberta em recessões múltiplas. Conseqüentemente, em cirurgia plástica periodontal tem sido proposta a utilização de enxertos ósseos xenógenos, alógenos e biomateriais, tais como os derivados de matriz de esmalte, matrizes dérmicas acelulares e o PRF³⁷.

Em geral, os estudos clínicos têm demonstrado que o RPC sozinho e em combinação com a membrana de PRF é um procedimento altamente previsível para o tratamento de recessões gengivais Classe I e Classe II de Miller. No entanto, o uso da PRF resultou em melhor cicatrização e maior espessura de tecido queratinizado quando comparado ao RPC sozinho após 6³⁸ e 12 meses³⁹. Como a adequada espessura do tecido gengival é um fator preditivo conhecido para a estabilidade em longo prazo do recobrimento radicular, sugere-se que o uso da PRF em conjunto com o RPC possa ser considerado uma escolha superior para o tratamento de tais defeitos⁴⁰. Acredita-se que a membrana de PRF atue

como um suporte que mantém espaço suficiente para facilitar os vários eventos celulares que favorecem a regeneração periodontal, garantindo assim um aumento da espessura do tecido gengival³⁸.

Por outro lado, o uso da PRF resultou em parâmetros clínicos semelhantes no tratamento de defeitos de Classe I e II de Miller quando comparado ao ETC⁴¹⁻⁴³. Entretanto, foi comumente relatado que a largura do tecido queratinizado foi significativamente maior com o ETC quando comparado ao PRF. Porém, como os procedimentos de ETC estão associados à alta morbidade do paciente, pode ser que, no futuro, tais procedimentos possam ser substituídos pelo PRF. Ressalta-se ainda que a capacidade técnica do clínico desempenhe uma influência mais proeminente durante a obtenção do ETC quando comparado ao PRF⁴⁴. Ademais, menos efeitos colaterais – incluindo dor, inchaço e hipersensibilidade – foram observados nos locais tratados com PRF, como resultado da melhor cicatrização tecidual e ausência de um segundo sítio cirúrgico doador nesses casos⁴³. Com base nesse potencial, o PRF na forma de membrana também tem sido posicionado abaixo do retalho em procedimentos de enxerto ósseo para acelerar a cicatrização do tecido mole (Figura 11H). Este conceito pode oferecer melhores condições regenerativas em reconstruções ósseas em altura com uso de malhas de titânio (Figuras 12F/G).

A literatura científica ainda apresenta grande incerteza em relação a comparação entre o PRF e os demais procedimentos utilizados para recobrimento radicular⁴⁵. Essa heterogeneidade pode estar relacionada aos diferentes métodos de preparação das membranas de PRF. Em vista dessa incerteza, novos estudos com padronização na forma de obtenção da PRF são necessários para confirmar seu verdadeiro desempenho no tratamento das recessões gengivais.

Em suma, uma possível limitação para o efeito regenerativo tecidual da PRF pode ser a limitada concentração de fatores de crescimento, na casa de algumas dezenas de nanogramas. Embora o PRF tenha maior concentração de fatores de crescimento que o PRP, a concentração de rhBMP-2 necessária para induzir aumento ósseo significativo deve ser na casa de microgramas (e não nanogramas), como será destacado posteriormente nesse capítulo.

2. RECOMBINANTE HUMANO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA – 2 (RHBMP-2)

Nos últimos anos, muito se tem pesquisado sobre a utilização dos fatores de crescimento como alternativa ao enxerto ósseo autógeno e outros biomateriais para indicações em cirurgias da área bucomaxilofacial⁴⁶⁻⁴⁷. Como vantagens na utilização do rhBMP-2 pode-se destacar morbidade diminuída, pois não tem necessidade de um local doador de enxerto, diminuição dos riscos de lesão do nervo alveolar inferior, menor tempo cirúrgico e o sucesso do procedimento não é limitado pela quantidade óssea disponível no sítio doador⁴⁸⁻⁵⁰.

As proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic protein* – BMP) foram identificadas em 1965 por Urist⁵¹, que relatou a capacidade de uma matriz óssea desmineralizada induzir a diferenciação da cartilagem e do osso em uma localização musculoesquelética em roedores, sendo de grande importância para a complexa cascata biológica da osteogênese. Desde então, diversas BMPs foram identificadas, sendo o rhBMP-2 o mais utilizado clinicamente, apresentando bons resultados científicos^{49,52-53}.

As BMPs são substâncias pertencentes a família dos fatores de crescimento transformante β (TGF- β), sendo importantes moléculas reguladoras da proliferação e/ou diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, proporcionando formação óssea através de ossificação endocondral⁵² ou intramembranosa⁵⁴.

Comercialmente, o rhBMP-2 (Infuse®; Medtronic, Memphis, Tennessee EUA) – produto obtido por técnicas de recombinação gênica, utilizada juntamente com a membrana de colágeno bovino (*absorbable collagen sponge* – ACS) como agente carreador – foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration). Primeiramente, em 2002, a aprovação se deu para uso em fusão lombar, em 2004 para fratura aberta de tíbia⁵⁵ e, posteriormente, para elevação do soalho do seio maxilar e alvéolo pós-extração (2007)^{50,56-57}, sendo consideradas essas mesmas indicações pela Anvisa no Brasil, a partir de 2009.

Carreadores e dose de rhBMP-2

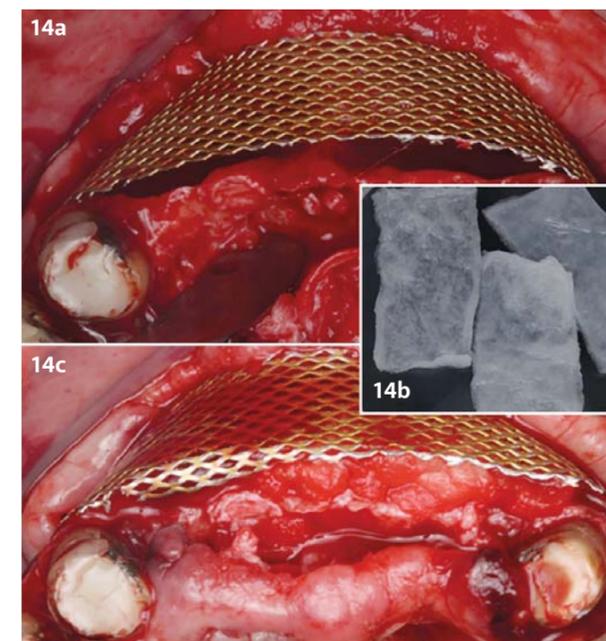
A ação do rhBMP-2 nas células é rápida e a permanência da proteína no organismo é muito curta (uma a quatro horas), em vista disso, para sua efetividade precisa ser implantado utilizando carreadores como transportadores. A liberação lenta do rhBMP-2 no local onde se deseja o aumento ósseo, fornece um ótimo efeito biológico, entretanto, se o rhBMP-2 não estiver conjugado a um carreador adequado, o rhBMP-2 pode ser liberado em alta concentração local em um curto intervalo de tempo e, nesse caso, pode estar associado a eventos adversos^{49,58-59}.

Entre os carreadores rhBMP-2 mais pesquisados, está a esponja de colágeno bovino tipo I (ACS), Figura 14, pois é biocompatível, apresenta facilidade para acomodar-se e é facilmente infiltrado por células indiferenciadas. De fato, Yon et al., 2015⁶⁰ demonstraram em estudos *in vitro*, que a BMP-2 é liberada pelo carreador durante os primeiros três dias e mantida em um nível reduzido ao longo do dia 21, portanto, o efeito da rhBMP-2 na formação óssea é maior no estágio inicial do período de cicatrização, mas essa diferença possivelmente diminui seis a nove meses após a implantação⁶¹.

O processo regenerativo guiado por modificadores biológicos ainda requer a criação de um arcabouço com resistência mecânica suficiente para manutenção do espaço onde se deseja fazer o aumento ósseo⁶²⁻⁶³. Para mimetizar esta finalidade e dar estabilidade mecânica ao rhBMP-2 embebido na esponja de colágeno (ACS), podem ser utilizadas as telas de titânio (Figura 14)⁴⁶, membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis⁶³⁻⁶⁵, assim como outros materiais que possam mimetizar um arcabouço. O rhBMP-2 também tem sido associado a diversos biomateriais osteocondutores para minimizar a falta de resistência estrutural da ACS⁴⁷.

Entretanto, outras fontes de colágeno, biomateriais, outras formas de administração e carreadores alternativos estão atualmente sendo avaliados para a liberação local de rhBMP-2, já que, um sistema de liberação adequado é necessário para prolongar os efeitos do rhBMP-2 durante o período de cicatrização, tempo esse que deve ser suficiente para permitir a proliferação e diferenciação celular⁶⁶⁻⁶⁷. A matriz de colágeno bovino (ACS) é bem-sucedida para a finalidade carreadora do rhBMP-2, no entanto, apresenta deficiências incluindo rápida biodegradabilidade e baixa retenção local, além de dificuldade no controle da cinética de liberação da rhBMP-2⁶⁶.

Respeitados trabalhos mostraram a viabilidade do rhBMP-2, como também ajudaram a estabelecer a dose apropriada de 1,5 mg de rhBMP-2/ml de colágeno (ACS) para produzir quantidade e qualidade satisfatória de aumento ósseo^{50,57,68}, concluindo que esta concentração é segura e induz a formação óssea mais rapidamente em comparação com as menores concentrações. Já doses mais elevadas devem ser equilibradas, pois tem maior potencial de eventos adversos, incluindo uma possível exacerbação da resposta inflamatória local⁵⁸. Doses menores estão sendo pesquisadas e apresentam resultados promissores⁶⁹.



Figuras 14
Imagem exemplificando o uso da malha de titânio para manutenção do espaço (A) a ser regenerado com rhBMP-2/ACS (B/C).

Segurança clínica

Não há relatos de eventos adversos significativos para os pacientes com a utilização intraoral de rhBMP-2^{56,68,70}, exceto edema local indolor e transitório, sobretudo extrabucal, e/ou eritema^{46,49,56-57,68,70} atribuídos à quimiotaxia e neovascularização da área enxertada; entretanto, esses efeitos adversos são transitórios e não afetam negativamente o resultado clínico.

Aplicabilidade clínica em Implantodontia

O rhBMP-2 pode ser utilizado em Odontologia em diferentes indicações cirúrgicas *on label*, ou seja, dentro da aprovação legal (pelo FDA), tais como elevação do soalho do seio maxilar e preservação/regeneração do alvéolo pós-extração. Além disso, foram documentados muitos estudos com uso do rhBMP-2/ACS fora da indicação original, isto é, *off-label*, o que não é proibido, mas o paciente deve estar totalmente informado sobre os riscos e benefícios da técnica. Em uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar a aplicação clínica de rhBMP-2 em reconstruções ósseas foi demonstrado que taxas de sucesso e os efeitos adversos com o uso de rhBMP-2/ACS semelhantes para as indicações *on label* e *off-label*⁷¹. Dentre os tratamentos *off-label* estão incluídos os defeitos ósseos mandibulares de grandes dimensões e os defeitos relacionados a cistos e tumores⁷², reconstrução óssea para aumento vertical/horizontal de rebordo alveolar^{46,73}, combinados com técnicas de regeneração óssea guiada⁶⁴, entre outros.

Preservação do rebordo alveolar e levantamento do seio maxilar

Baseado na indicação *on label* de rhBMP-2 em alvéolos pós-exodontia, foram avaliados os pacientes que receberam rhBMP-2/ACS em locais de extração dentária, ou em locais com crista óssea deficiente, a fim de manter a estrutura do rebordo alveolar. A avaliação – ao longo de três anos – dos implantes dentários instalados, em uma amostra de 12 pacientes, demonstrou que todos os implantes apresentaram-se clinicamente estáveis⁷⁰.

Contudo, pode-se observar maior formação óssea nos grupos rhBMP-2 (aproximadamente duas vezes maior neoformação óssea), em comparação com nenhum tratamento da parede vestibular realizado após a extração dentária ou com o grupo placebo (utilizando somente ACS)⁵⁷.

Em estudos recentes, avaliando a alteração da crista óssea alveolar com utilização da proteína rhBMP-2 colocados em alvéolos pós-exodontia, os autores mostraram que a utilização de rhBMP-2 foi mais efetivo na prevenção da redução da largura do alvéolo em comparação a redução da altura, no entanto, a remodelação da largura/altura do alvéolo foi mais significativa nos alvéolos com mais de 50% de deiscência da parede óssea bucal e concluíram que, 1,5 mg/ml de rhBMP-2 pode ser benéfico para preservar a largura do osso alveolar após a extração dentária⁷⁴, corroborando com outra revisão sistemática⁴⁷ que mostrou que o uso de rhBMP-2 é seguro e viável para a preservação alveolar após a extração dentária ou para defeitos locais.

Após a perda de dentes superiores que possuem íntima relação anatômica com o seio maxilar, o assoalho do seio maxilar sofrerá remodelação e, conseqüentemente, o seio maxilar sofrerá alterações morfológicas que irão acarretar na pneumatização do mesmo⁷⁵. O *sinus lift* é uma técnica de enxertia óssea – proposta por Tatum na década de 1970⁷⁶, mas descrita na literatura por Boyne & James, em 1980⁷⁵ – que visa restabelecer a quantidade óssea em altura com o levantamento do seio maxilar associado com o uso de materiais de enxertia. Em pacientes submetidos a aumento ósseo em região de seio maxilar utilizando o rhBMP-2, a avaliação a longo prazo dos implantes demonstrou sucesso de aproximadamente 75% a 80%⁶⁸, o que está de acordo com outros estudos, que observaram uma formação óssea clinicamente relevante utilizando rhBMP-2 em seio maxilar⁵⁰.

A utilização de rhBMP-2/ACS levou a uma formação óssea clinicamente significativa em cirurgias de aumento do seio maxilar, possibilitando a instalação de implantes dentários, sem diferenças consistentes entre as concentrações de rhBMP-2, que variaram de 0,43, 0,75 e 1,5 mg/ml, no entanto, apesar de resultados significativos, o aumento do seio maxilar com o enxerto ósseo autógeno foi significativamente maior⁴⁹. Outros relatos⁶¹ mostram que o uso de rhBMP-2 para aumento do assoalho do seio maxilar alcançou resultados clínicos e histométricos semelhantes quando comparados aos procedimentos convencionais (associação de biomateriais) de enxertos sinusais após um período de cicatrização de seis a nove meses.

Por outro lado, visando aumento do seio maxilar de mini *pigs*, Lee e colaboradores⁷⁷ mostraram que rhBMP-2/ACS (0,43 mg / ml) induziu aumento ósseo de qualidade biológica superior em comparação com enxerto ósseo autógeno particulado removido da crista ilíaca, e afirmaram, que o rhBMP-2 pode ser considerado como novo padrão-ouro para esta indicação.

Reconstruções horizontais e verticais

O aumento ósseo horizontal e vertical dos rebordos alveolares deficientes podem ser obtidos com técnicas de regeneração óssea guiada (ROG), em que a membrana é colocada em cima de enxertos ósseos e estabilizada com tachas ou parafusos. Jovanovic e colaboradores 2007⁶⁴ comprovaram que o rhBMP-2/ACS parece ser uma alternativa eficaz comparado com a ROG na reconstrução de defeitos avançados do rebordo alveolar, como também^{63,78}, mostraram que o uso de ROG (através de barreiras celulares, como membranas de ePTFE) não fornece valor adicional à cirurgia, mostrando que dispositivos oclusivos podem interromper a capacidade osteoindutiva da BMP, dificultando a migração celular⁷⁹.

No mesmo contexto, pode-se utilizar tela de titânio como um mantenedor de espaço, pois além de possuir rigidez suficiente para esta função, protegem o enxerto de compressão mecânica, direcionam a geometria do osso a ser formado, evitando seu deslocamento para locais indesejáveis e não interferem na migração de células osteoprogenitoras do retalho⁴⁶. Em uma série de casos, Howell e colaboradores 1997 e Cochran e colaboradores 2000^{70,80} realizaram em seis indivíduos a aplicação de rhBMP-2/ACS na maxila anterior desdentada, mostrando um ganho ósseo de 0,4 e 0,2 mm, respectivamente, contrastando com o trabalho prospectivo e randomizado de Freitas e colaboradores⁴⁶, que resultou ganho ósseo de aproximadamente 3 mm. Claramente, pode ser observado que a manutenção de espaço, oferecida pela malha de titânio no estudo prospectivo, pode explicar os resultados favoráveis. Dados limitados, principalmente séries de casos, estão disponíveis no que se refere ao uso de rhBMP-2/ACS para o aumento ósseo horizontal em alvéolos severamente reabsorvidos. Freitas e colaboradores⁴⁶ – com o propósito de comparar o efeito do rhBMP-2/ACS (1,5 mg/ml) com enxerto ósseo autógeno particulado, coletado da região retromolar mandibular – realizaram o primeiro estudo prospectivo randomizado utilizando rhBMP-2/ACS para esta indicação; ao total, 24 cirurgias foram realizadas com utilização da tela de titânio para aumento horizontal da maxila atrófica anterior. O rhBMP-2/ACS produziu um ganho ósseo horizontal radiográfico significativamente maior em comparação com o enxerto ósseo autógeno em níveis subcrestais, após seis meses.

Em estudo clínico randomizado controlado, foi avaliada a eficácia e as alterações de volume utilizando o rhBMP-2 com grânulos de hidroxiapatita em aumento da crista óssea alveolar, comparado ao uso de um biomaterial de origem xenógena e sem utilização de membranas em ambos os grupos. Como conclusão, os dois tratamentos foram efetivos em aumentar a crista alveolar, mas o rhBMP-2/hidroxiapatita pareceu ser mais previsível em defeitos ósseos complexos⁸¹.

Avaliando a densidade óssea após um período de pelo menos seis meses de carregamento dos implantes dentários – instalados em áreas previamente enxertadas com rhBMP-2/ACS –, os estudos revelaram formação óssea significativa, tanto quantitativa, quanto qualitativamente, de um tecido ósseo comparável aos grupos tratados com enxerto ósseo autógeno^{50,68,82} e, alguns estudos, demonstram superioridade do rhBMP-2 ao enxerto ósseo autógeno, mostrando que o osso neoformado pelo rhBMP-2/ACS é biologicamente similar ao osso nativo circundante^{57,70,83}, o que possibilita, com mais segurança, a reabilitação com implantes e próteses dentárias.

Avaliando as características histológicas do osso recém-formado após aumento ósseo horizontal da maxila atrófica anterior usando rhBMP-2/ACS (1,5mg/ml, com dose total de 4,2 mg) comparado com enxerto ósseo autógeno particulado, removido da região retromolar mandibular, os estudos⁸³ mostraram que o rhBMP-2 / ACS produziu uma medula óssea mais rica em capilares, células indiferenciadas e células de revestimento ósseo em comparação com o grupo que

recebeu enxerto ósseo autógeno. Por outro lado, partículas ósseas não vitais incorporadas ao osso vital lamelar foram observadas no grupo de enxerto ósseo autógeno e ausentes do grupo *rhBMP-2/ACS*.

Finalmente, as revisões sistemáticas concluíram que o tratamento com *rhBMP-2* é previsível e a instalação dos implantes osseointegráveis é viável no osso regenerado com *rhBMP-2*^{69,71}.

3. ASPIRADO CONCENTRADO DA MEDULA ÓSSEA (*BONE MARROW ASPIRATE CONCENTRATE – BMAC*)

Entre as razões para a superioridade dos enxertos ósseos autógenos sobre as demais opções de reconstrução óssea estão a baixa antigenicidade e a presença de mediadores biológicos (fatores de crescimento e citocinas osteoindutoras) e células (osteoblastos, células osteoprogenitoras) viáveis. Neste sentido, os enxertos de osso medular fresco são particularmente interessantes pela quantidade de material biológico incluído. Há quase três décadas sabe-se que a capacidade osteogênica do enxerto de medula óssea está diretamente relacionada à concentração de células no enxerto⁸⁴. De fato, existem evidências de que o volume do calo ósseo neoformado e a eficácia da regeneração em defeitos ósseos críticos são diretamente proporcionais ao número e a concentração de células osteoprogenitoras presentes no enxerto autógeno de medula óssea⁸⁵. No entanto, a concentração de células mesenquimais indiferenciadas na medula óssea – de maior interesse pela sua capacidade de diferenciação em osteoblastos – pode ser tão baixo quanto 0,0036% do total de células nucleadas (excluindo plaquetas e eritrócitos) presentes⁸⁶.

Os resultados clínicos promissores relatados com o enxerto de medula óssea autógena e sua crescente popularidade entre ortopedistas – associados à relação direta entre o número de células no enxerto e a qualidade da regeneração óssea obtida – levaram a indústria a desenvolver equipamentos para a concentração de células nucleadas em aspirados de medula óssea. Em comparação à expansão de células mesenquimais *ex-vivo* (em laboratório) em um processo laborioso, demorado (pode levar várias semanas), custoso e que requer equipamentos e pessoal especializado, estes equipamentos proporcionam rapidez na concentração destas células, em um fator de concentração aproximado de 6.5⁸⁷. De fato, a comercialização destes sistemas de centrifugação para uso clínico é baseada no fato de que o material utilizado é de origem autógena e fresco, isto é, não há manipulação do material ou expansão de células *in vitro* previamente ao enxerto do material no paciente⁸⁸.

Existe grande quantidade de relatos de casos clínicos e diversos ensaios clínicos controlados já publicados, e mais de 150 ensaios clínicos registrados na base de dados do *National Institutes of Health/U.S. National Library of Medicine* (<http://www.clinicaltrials.gov>) utilizando enxertos de medula óssea autógena preparados com estes sistemas de centrifugação, comumente denominado ‘aspirado concentrado de medula óssea’ (*bone marrow aspirate concentrate* ou BMAC). Existem mais de 14 protocolos e métodos disponíveis comercialmente para o preparo/concentração de aspirados de medula óssea, além de variações em relação ao sítio doador e técnicas de coleta da medula óssea⁸⁹. Notadamente, existe evidência de diferenças na proporção de células mesenquimais progenitoras obtidas utilizando diferentes sistemas de concentração⁹⁰. Além disso, o número de células mesenquimais osteogênicas em aspirados de medula varia significativamente entre diferentes pacientes⁸⁶, incluindo variações relacionadas à idade e ao sexo, com redução do número de células precursoras de osteoblastos com a idade, a qual é mais acentuada em mulheres⁹¹. O número total de células

nucleadas e de células mesenquimais (CD105+) obtidas de aspirados de medula de crista ilíaca anterior e posterior foi semelhante, e aproximadamente o dobro do número de células obtidas da tíbia⁸⁷.

Não há consenso em relação à fonte de aspirado de medula (crista ilíaca é o sítio doador mais frequentemente relatado nos estudos), técnica/forma de preparo (o equipamento mais frequentemente utilizado foi o Harvest Technologies system – Plymouth, MA, EUA), veículo/forma de aplicação (a maioria dos estudos aplica o BMAC imediatamente após o preparo) e quantidade/dose/volume de ACMO utilizada. Estas variáveis somadas às características individuais de cada paciente influenciam não apenas a quantidade e pureza de células mesenquimais obtidas, mas também a quantidade de outros tipos celulares nucleados ‘contaminando’ o preparo (os quais influenciam o comportamento das células mesenquimais) e a concentração de mediadores biológicos e fatores de crescimento presentes^{90,92}. Coletivamente, estas variáveis podem resultar em baixa previsibilidade de resultados clínicos.

A maioria dos estudos publicados se relaciona a aplicações médicas de reparo/regeneração musculoesquelética (como reparo de fraturas, osteoartrite e osteonecrose), possivelmente devido às implicações econômicas/custo e morbidade associadas à estas aplicações em comparação ao seu uso na Odontologia, bem como às instalações hospitalares rotineiramente utilizadas nos procedimentos médicos, as quais possibilitam a coleta de aspirados de medula mais facilmente.

Relatos de série de casos clínicos indicam que o tratamento com ACMO foi associado à melhoria da sintomatologia dolorosa e evidência radiológica e histomorfológica de regeneração óssea e de cartilagem na osteoartrite de joelho⁹³⁻⁹⁵, redução de sintomatologia dolorosa em discopatias lombares⁹⁶, melhoria funcional em casos de ruptura de tendão de Aquiles⁹⁷, redução da dor e evidência radiológica de formação de calo ósseo em fraturas não consolidadas em ossos longos⁹⁸. Porém, um ensaio clínico demonstrou que embora o uso de ACMO não causou efeitos adversos, também não proporcionou resultados superiores na redução da sintomatologia dolorosa associada à osteoartrite de joelho⁹⁹. Similarmente, a associação de ACMO não proporcionou benefícios adicionais em termos de melhora funcional e redução da sintomatologia dolorosa em lesões osteocondrais de tornozelo, no entanto, o reparo avaliado radiologicamente dois anos após o tratamento foi superior com a associação de ACMO¹⁰⁰. O tratamento de lesões degenerativas da coluna vertebral com ACMO proporcionou resultados significativamente superiores ao enxerto ósseo alógeno isoladamente tanto após 12 quanto 24 meses¹⁰¹.

Aplicabilidade clínica em Implantodontia

Levantamento do seio maxilar

A principal aplicação de ACMO relacionada à Odontologia e relatada na literatura é a regeneração óssea, particularmente em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Não houve diferença significativa no ganho de tecido ósseo em cirurgia de levantamento de seio maxilar com o uso de ACMO preparado com sistema ‘fechado’ (Harvest Technologies, Plymouth, MA, EUA) em comparação à concentração de células mononucleares de aspirado de medula por gradiente de centrifugação em Ficoll (sistema “aberto”), indicando que o sistema fechado de concentração que pode ser utilizado em consultório e com menores barreiras regulatórias sanitárias é adequado¹⁰². Os autores não avaliaram o uso do biomaterial isoladamente, mas o acompanhamento dos casos revelou que apenas 1 de 33 implantes foi perdido

no grupo tratado com ACMO antes da carga protética e nenhum dos 17 implantes foi perdido no grupo tratado com aspirado concentrado com Ficoll¹⁰².

Ensaio clínico demonstrou que a utilização de ACMO associado ao enxerto ósseo alógeno em cirurgias de levantamento de seio maxilar proporciona resultados similares aos obtidos com uso da associação de enxerto ósseo autógeno e alógeno na formação de novo tecido ósseo avaliado histomorfometricamente quatro meses após a cirurgia, sugerindo que ACMO e enxerto ósseo alógeno podem substituir os enxertos ósseos autógenos, com menor morbidade para o paciente¹⁰³. Em comparação ao enxerto ósseo alógeno isolado, a associação de ACMO e enxerto ósseo alógeno, em cirurgias de levantamento de seio maxilar, proporcionou aumento significativo de tecido mineralizado vital com redução significativa de tecido mineralizado não vital (enxerto residual) após seis meses¹⁰⁴.

O uso de ACMO a partir de aspirados obtidos da tíbia ou da crista íliaca não afetou a contração volumétrica do enxerto em seios maxilares observada após seis meses (entre 15 e 21% do volume inicial)¹⁰⁵.

Reconstruções ósseas horizontais e verticais

A contração volumétrica de enxertos ósseos alógenos em bloco na maxila anterior – com e sem associação de ACMO – foi similar com valores de aproximadamente 24%¹⁰⁶. Quando os defeitos atróficos de maxila anterior foram tratados com enxerto ósseo particulado, a associação de ACMO não proporcionou ganho adicional de volume de tecido mineralizado avaliado por tomografia, porém, histomorfometricamente houve uma discreta tendência de aumento de tecido ósseo neoformado¹⁰⁷.

Outras aplicações odontológicas de ACMO incluem a regeneração óssea vertical de atrofia mandibular associada à enxerto ósseo alógeno possibilitando a instalação de implantes¹⁰⁸, porém não foram encontrados ensaios clínicos controlados relacionados à esta aplicação.

Apesar dos resultados favoráveis descritos na literatura, não há garantia de que resultados favoráveis podem ser obtidos com o uso de ACMO no consultório de cada clínico. É preciso considerar o custo-benefício do investimento em um sistema de centrifugação para a obtenção de ACMO em termos da eficácia e da reprodutibilidade/previsibilidade dos resultados obtidos, além da segurança do procedimento para o paciente.

Um relato de 101 casos tratados com ACMO não observou infecções, formação óssea excessiva ou desenvolvimento de tumores na área receptora, bem como ausência de efeitos adversos na área doadora¹⁰⁹.

Por outro lado, existem diversos estudos reportando a transformação neoplásica de células mesenquimais indiferenciadas, bem como o papel pró-tumorigênico destas células no microambiente tumoral¹¹⁰⁻¹¹², inclusive especificamente de células mesenquimais isoladas da medula óssea humana¹¹³⁻¹¹⁴. Embora seja um tema controverso¹¹⁵⁻¹¹⁶, a segurança do emprego clínico de células mesenquimais derivadas da medula óssea deve ser documentada por avaliações em longo prazo de um considerável coorte de pacientes tratados.

Relatos de caso clínico não são a melhor fonte de evidência para eficácia e previsibilidade de uma metodologia terapêutica, uma vez que os resultados reportados são influenciados pelas características individuais de cada paciente (especialmente em estudos com reduzido número de pacientes); e também porque este tipo de estudo não compara a técnica ou procedimento utilizando ACMO com outro método ou abordagem de terapêutica para os mesmos defeitos ou condições clínicas. Mesmo nos ensaios clínicos controlados, diferenças nas técnicas e nos procedimentos utilizados

e também aspectos ligados ao paciente individual representam fontes de variabilidade nos resultados. Coletivamente, estas considerações indicam que os resultados obtidos em consultório para cada clínico individualmente utilizando a técnica de ACMO podem ser notadamente inferiores aos descritos na literatura. Uma revisão de 46 estudos clínicos publicados avaliando o uso de BMAC em diferentes aplicações clínicas demonstrou que nenhum estudo apresentou as informações consideradas essenciais relacionadas à metodologia e características dos pacientes que possibilitem a reprodução precisa dos protocolos de preparo e aplicação de ACMO⁸⁹. Os sistemas de centrifugação e preparo do BMAC concentram as células nucleadas; porém, segundo uma revisão sistemática recente⁸⁹, nenhum estudo publicado até setembro de 2017 caracterizou completamente os tipos celulares presentes neste concentrado. Como a proporção de células mesenquimais não é alterada pela simples concentração com o sistema de centrifugação, outros tipos celulares nucleados (em especial células linfoides, monócitos e macrófagos) continuam representando a maior quantidade de células efetivamente presentes no ACMO. Do ponto de vista biológico, é fundamental caracterizar os tipos celulares presentes e também determinar o papel de cada tipo celular na regeneração óssea. Esta caracterização pode aumentar a segurança do procedimento em termos de redução de possíveis complicações pós-operatórias não infecciosas, desde uma resposta inflamatória exacerbada, inflamação com desconforto pós-operatório e pobres resultados clínicos até o desenvolvimento de neoplasias relacionadas à influência de células mesenquimais. O entendimento dos processos biológicos envolvidos e da relevância dos tipos celulares presentes na regeneração óssea associada ao uso de ACMO também pode proporcionar a otimização do procedimento (por exemplo, com a seleção ou depleção de tipos celulares específicos presentes no ACMO ou com a adição de agentes biológicos de modulação da resposta celular), levando à melhoria da magnitude e relevância clínica da regeneração óssea obtida, bem como da sua previsibilidade.

Em resumo, o uso de ACMO para regeneração óssea é uma opção atraente e promissora no manejo de diversas situações clínicas relacionadas à Odontologia e em especial à Implantodontia; porém, apesar do entusiasmo e do apelo de 'novidade' e 'refino' técnico envolvidos, seu emprego de forma a obter resultados clínicos relevantes de forma previsível e segura necessita de melhor caracterização dos tipos celulares presentes e de uma melhor compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos. Caso contrário, o clínico continuará enfrentando problemas de variabilidade e imprevisibilidade nos níveis de sucesso da regeneração óssea obtida, além dos potenciais riscos de complicações e efeitos adversos aos pacientes.

Referências

- Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(4):616-24.
- Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24 Suppl:237-59.
- Nicolli LG, Pigossi SC, Araújo RFdSB, Marcantonio C, Marcantonio É, Marcantonio É. Multidisciplinary approach to oral rehabilitation with dental implants after gunshot injury: A clinical report. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2018;119(3):329-33.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006;101(3):e45-e50.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006;101(3):e51-e5.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006;101(3):e37-e44.
- Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J et al. Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. *Journal of Oral Implantology* 2014;40(6):679-89.
- Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of periodontology* 2010;81(4):546-55.
- Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clinical Oral Investigations* 2017;21(8):2619-27.
- Tan WL, Wong TL, Wong MC, Lang NP. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin Oral Implants Res* 2012;23 Suppl 5:1-21.
- Anwandter A, Bohmann S, Nally M, Castro AB, Quirynen M, Pinto N. Dimensional changes of the post extraction alveolar ridge, preserved with Leukocyte- and Platelet Rich Fibrin: A clinical pilot study. *J Dent* 2016;52:23-9.
- Rosa JC, Rosa AC, Francischone CE, Sotto-Maior BS. Esthetic outcomes and tissue stability of implant placement in compromised sockets following immediate dento-alveolar restoration: results of a prospective case series at 58 months follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2014;34(2):199-208.
- Thakkar DJ, Deshpande NC, Dave DH, Narayanakar SD. A comparative evaluation of extraction socket preservation with demineralized freeze-dried bone allograft alone and along with platelet-rich fibrin: A clinical and radiographic study. *Contemp Clin Dent* 2016;7(3):371-6.
- Clark D, Rajendran Y, Paydar S, Ho S, Cox D, Ryder M et al. Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2018;89(4):379-87.
- Hauser F, Gaydarov N, Badoud I, Vazquez L, Bernard JP, Ammann P. Clinical and histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study. *Implant Dent* 2013;22(3):295-303.
- Girish Rao S, Bhat P, Nagesh KS, Rao GHR, Mirlle B, Kharbhari L et al. Bone Regeneration in Extraction Sockets with Autologous Platelet Rich Fibrin Gel. *Journal of maxillofacial and oral surgery* 2012;12(1):11-6.
- Suttapreysri S, Leepong N. Influence of Platelet-Rich Fibrin on Alveolar Ridge Preservation. *Journal of Craniofacial Surgery* 2013;24(4):1088-94.
- Al-Hamed FS, Tawfik MA-M, Abdelfadil E, Al-Saleh MAQ. Efficacy of Platelet-Rich Fibrin After Mandibular Third Molar Extraction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2017;75(6):1124-35.
- Tajima N, Ohba S, Sawase T, Asahina I. Evaluation of sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28(1):77-83.
- Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan Ehrenfest DM. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *J Periodontol* 2009;80(12):2056-64.
- Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Implant Dent* 2011;20(1):2-12.
- Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod* 2006;101(3):e56-60.
- Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo AM, Scacco S, Inchingolo AD et al. Trial with Platelet-Rich Fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillary bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010;14(12):1075-84.
- Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S et al. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci* 2012;9(10):872-80.
- Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40(4):321-8.
- Jeong SM, Lee CU, Son JS, Oh JH, Fang Y, Choi BH. Simultaneous sinus lift and implantation using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *J Craniomaxillofac Surg* 2014;42(6):990-4.
- Pinto G, Pigossi SC, Pessoa T, Nicolli LG, Araujo R, Marcantonio C et al. Successful Use of Leukocyte Platelet-Rich Fibrin in the Healing of Sinus Membrane Perforation: A Case Report. *Implant Dent*. 2018.
- Becker ST, Terheyden H, Steinriede A, Behrens E, Springer I, Wiltfang J. Prospective observation of 41 perforations of the Schneiderian membrane during sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(12):1285-9.
- Oncu E, Kaymaz E. Assessment of the effectiveness of platelet rich fibrin in the treatment of Schneiderian membrane perforation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2017;19(6):1009-14.
- Aricioglu C, Dolanmaz D, Esen A, Isik K, Avunduk MC. Histological evaluation of effectiveness of platelet-rich fibrin on healing of sinus membrane perforations: A preclinical animal study. *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45(8):1150-7.
- Siddiqui ZR, Jhingran R, Bains VK, Srivastava R, Madan R, Rizvi I. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin versus beta-tri-calcium phosphate in the treatment of Grade II mandibular furcation defects using cone-beam computed tomography. *Eur J Dent* 2016;10(4):496-506.
- Sharma A, Pradeep AR. Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2011;82(12):1705-12.
- Bajaj P, Pradeep AR, Agarwal E, Rao NS, Naik SB, Priyanka N et al. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol Res* 2013;48(5):573-81.
- Pradeep AR, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K, Raju A, Singh P. Rosuvastatin 1.2 mg In Situ Gel Combined With 1:1 Mixture of Autologous Platelet-Rich Fibrin and Porous Hydroxyapatite Bone Graft in Surgical Treatment of Mandibular Class II Furcation Defects: A Randomized Clinical Control Trial. *J Periodontol* 2016;87(11):5-13.
- Lohi HS, Nayak DG, Uppoor AS. Comparative Evaluation of the Efficacy of Bioactive Ceramic Composite Granules Alone and in Combination with Platelet Rich Fibrin in the Treatment of Mandibular Class II Furcation Defects: A Clinical and Radiographic Study. *J Clin Diagn Res* 2017;11(7):ZC76-ZC80.
- Asimuddin S, Koduganti RR, Panthula VNR, Jammula SP, Dasari R, Gireddy H. Effect of Autologous Platelet Rich Fibrin in Human Mandibular Molar Grade II Furcation Defects: A Randomized Clinical Trial. *J Clin Diagn Res* 2017;11(4):ZC73-ZC7.
- Cairo F, Pagliaro U, Buti J, Baccini M, Graziani F, Tonelli P et al. Root coverage procedures improve patient aesthetics. A systematic review and Bayesian network meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2016;43(11):965-75.
- Ramireddy S, Mahendra J, Rajaram V, Ari G, Kanakamedala AK, Krishnakumar D. Treatment of gingival recession by coronally advanced flap in conjunction with platelet-rich fibrin or resin-modified glass-ionomer restoration: A clinical study. *J Indian Soc Periodontol* 2018;22(1):45-9.
- Kuka S, Ipci SD, Cakar G, Yilmaz S. Clinical evaluation of coronally advanced flap with or without platelet-rich fibrin for the treatment of multiple gingival recessions. *Clin Oral Investig*. 2018;22(3):1551-8.
- Gupta S, Banthia R, Singh P, Banthia P, Raj S, Aggarwal N. Clinical evaluation and comparison of the efficacy of coronally advanced flap alone and in combination with platelet rich fibrin membrane in the treatment of Miller Class I and II gingival recessions. *Contemp Clin Dent* 2015;6(2):153-60.
- Mufti S, Dadawala SM, Patel P, Shah M, Dave DH. Comparative Evaluation of Platelet-Rich Fibrin with Connective Tissue Grafts in the Treatment of Miller's Class I Gingival Recessions. *Contemp Clin Dent* 2017;8(4):531-7.
- Kumar A, Bains VK, Jhingran R, Srivastava R, Madan R, Rizvi I. Patient-centered Microsurgical Management of Gingival Recession using Coronally Advanced Flap with Either Platelet-rich Fibrin or Connective Tissue Graft: A Comparative Analysis. *Contemp Clin Dent* 2017;8(2):293-304.
- Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W et al. Regenerative potential of leukocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2017;44(1):67-82.
- Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig* 2017;21(6):1913-27.
- Amine K, El Amrani Y, Chemlali S, Kissa J. Alternatives to connective tissue graft in the treatment of localized gingival recessions: A systematic review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* 2018;119(1):25-32.
- de Freitas RM, Susin C, Spin-Neto R, Marcantonio C, Wikesjo UM, Pereira LA et al. Horizontal ridge augmentation of the atrophic anterior maxilla using rhBMP-2/ACS or autogenous bone grafts: a proof-of-concept randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2013;40(10):968-75.
- Gomes-Ferreira PH, Okamoto R, Ferreira S, De Oliveira D, Momesso GA, Faverani LP. Scientific evidence on the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg* 2016;20(3):223-32.
- Burkus JK, Heim SE, Gornet MF, Zdeblick TA. Is INFUSE bone graft superior to autograft bone? An integrated analysis of clinical trials using the LT-CAGE lumbar tapered fusion device. *J Spinal Disord Tech* 2003;16(2):113-22.
- Freitas RM, Spin-Neto R, Marcantonio Junior E, Pereira LA, Wikesjo UM, Susin C. Alveolar ridge and maxillary sinus augmentation using rhBMP-2: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17 Suppl 1:e192-201.
- Triplet RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(9):1947-60.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150(3698):893-9.
- Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(6):2220-4.
- Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992;32(2):160-7.
- Urist MR. Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res* 1997;12(3):343-6.
- Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2(2-3):81-96.
- Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17(1):11-25.
- Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D et al. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol* 2005;76(4):605-13.
- Kelly MP, Vaughn OL, Anderson PA. Systematic Review and Meta-Analysis of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Localized Alveolar Ridge and Maxillary Sinus Augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2016;74(5):928-39.
- Rengachary SS. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus* 2002;13(6):e2.
- Yon J, Lee JS, Lim HC, Kim MS, Hong JY, Choi SH et al. Pre-clinical evaluation of the osteogenic potential of bone morphogenetic protein-2 loaded onto a particulate porcine bone biomaterial. *J Clin Periodontol* 2015;42(1):81-8.
- Lin GH, Lim G, Chan HL, Giannobile WJ, Wang HL. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 outcomes for maxillary sinus floor augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2016;27(11):1349-59.
- Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett* 2009;31(12):1825-35.
- Wikesjo UM, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM et al. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(2):194-204.
- Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, Spiekermann H, Wozney JM, Wikesjo UM. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(2):224-30.
- Wikesjo UM, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM et al. Space-providing expanded polytetrafluoroethylene devices define alveolar augmentation at dental implants induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an absorbable collagen sponge carrier. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5(2):112-23.
- Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* 2009;31(12):1817-24.
- Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Gurny R, Jordan O. The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2-induced ectopic bone formation. *J Control Release* 2010;147(1):38-44.
- Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(12):1693-707.
- Pelaez M, Susin C, Lee J, Fiorini T, Bisch FC, Dixon DR et al. Effect of rhBMP-2 dose on bone formation/maturation in a rat critical-size calvarial defect model. *J Clin Periodontol* 2014;41(8):827-36.
- Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol* 2000;71(8):1241-57.
- de Queiroz Fernandes J, de Lima VN, Bonardi JP, Filho OM, Queiroz SBF. Bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein 2: a systematic review. *J Maxillofac Oral Surg* 2018;17(1):13-8.
- Zetola A, Ferreira FM, Larson R, Shibli JA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in the treatment of mandibular sequelae after tumor resection. *Oral Maxillofac Surg* 2011;15(3):169-74.
- Herford AS, Boyne PJ, Williams RP. Clinical applications of rhBMP-2 in maxillofacial surgery. *J Calif Dent Assoc* 2007;35(5):335-41.
- Moslemi N, Khoshkam Y, Rafei SC, Bahrami N, Aslroosta H. Outcomes of Alveolar Ridge Preservation With Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: A Systematic Review. *Implant Dent* 2018;27(3):351-62.
- Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 1980;38(8):613-6.
- Tatum Jr. OH, Lebowitz MS, Tatum CA, Borgner RA. Sinus augmentation. Rationale, development, long-term results. *N Y State Dent J* 1993;59(5):43-8.
- Lee J, Susin C, Rodriguez NA, de Stefano J, Prasad HS, Buxton AN et al. Sinus augmentation using rhBMP-2/ACS in a mini-pig model: relative efficacy of autogenous fresh particulate iliac bone grafts. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(5):497-504.
- Caplanis N, Sigurdsson TJ, Rohrer MD, Wikesjo UM. Effect of allogeneic, freeze-dried, demineralized bone matrix on guided bone regeneration in supra-alveolar peri-implant defects in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(5):634-42.
- Zellin G, Linde A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. An experimental study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1997;31(2):97-104.
- Howell TH, Fiorellini J, Jones A, Alder M, Mummikoski P, Lazaro M et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17(2):124-39.
- Nam JW, Khureltogtokh S, Choi HM, Lee AR, Park YB, Kim HJ. Randomised controlled clinical trial of augmentation of the alveolar ridge using recombinant human bone morphogenetic protein 2 with hydroxyapatite and bovine-derived xenografts: comparison of changes in volume. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2017;55(8):822-9.
- Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, Spiekermann H, Nishimura R, Wozney JM et al. Long-term functional loading of dental implants in rhBMP-2 induced bone. A histologic study in the canine ridge augmentation model. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(6):793-803.
- de Freitas RM, Susin C, Tamashiro WM, Chaves de Souza JA, Marcantonio C, Wikesjo UM et al. Histological analysis and gene expression profile following augmentation of the anterior maxilla using rhBMP-2/ACS versus autogenous bone graft. *J Clin Periodontol* 2016;43(12):1200-7.
- Connolly J, Guse R, Lippello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1989;71(5):684-91.
- Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2005;87(7):1430-7.
- Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1997;79(11):1699-709.
- Marx RE, Tursun R. A qualitative and quantitative analysis of autologous human multipotent adult stem cells derived from three anatomic areas by marrow aspiration: tibia, anterior ilium, and posterior ilium. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2013;28(5):e290-4.
- LaPrade RF, Dragoon JL, Koh JL, Murray IR, Geeslin AG, Chu CR. AAOS Research Symposium Updates and Consensus: Biologic Treatment of Orthopaedic Injuries. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2016;24(7):e62-78.
- Murray IR, Robinson PG, West CC, Goudie EB, Yong LY, White TO et al. Reporting Standards in Clinical Studies Evaluating Bone Marrow Aspirate Concentrate: A Systematic Review. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2018;34(4):1366-75.
- Hegde V, Shonuga O, Ellis S, Fragomen A, Kennedy J, Kudryashov V et al. A prospective comparison of 3 approved systems for autologous bone marrow concentration demonstrated nonequivalency in progenitor cell number and concentration. *Journal of orthopaedic trauma* 2014;28(10):591-8.
- Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2001;19(1):117-25.
- Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2014;71(8):1353-74.
- Centeno CJ, Al-Sayegh H, Bashir J, Goodyear S, Freeman MD. A dose response analysis of a specific bone marrow concentrate treatment protocol for knee osteoarthritis. *BMC musculoskeletal disorders* 2015;16:258.
- Kim JD, Lee GW, Jung GH, Kim CK, Kim T, Park JH et al. Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee. *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie* 2014;24(8):1505-11.
- Buda R, Vannini F, Cavallo M, Baldassarri M, Luciani D, Mazzotti A et al. One-step arthroscopic technique for the treatment of osteochondral lesions of the knee with bone-marrow-derived cells: three years results. *Musculoskeletal surgery* 2013;97(2):145-51.
- Pettine K, Suzuki R, Sand T, Murphy M. Treatment of discogenic back pain with autologous bone marrow concentrate injection with minimum two year follow-up. *International orthopaedics* 2016;40(1):135-40.
- Stein BE, Stroh DA, Schon LC. Outcomes of acute Achilles tendon rupture repair with bone marrow aspirate concentrate augmentation. *International orthopaedics* 2015;39(5):901-5.
- Sugaya H, Mishima H, Aoto K, Li M, Shimizu Y, Yoshioka T et al. Percutaneous autologous concentrated bone marrow grafting in the treatment for nonunion. *European journal*

- of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie 2014;24(5):671-8.
99. Shapiro SA, Kazmerchak SE, Heckman MG, Zubair AC, O'Connor MI. A Prospective, Single-Blind, Placebo-Controlled Trial of Bone Marrow Aspirate Concentrate for Knee Osteoarthritis. *The American journal of sports medicine* 2017;45(1):82-90.
 100. Hannon CP, Ross KA, Murawski CD, Deyer TW, Smyth NA, Hogan MV et al. Arthroscopic Bone Marrow Stimulation and Concentrated Bone Marrow Aspirate for Osteochondral Lesions of the Talus: A Case-Control Study of Functional and Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue Outcomes. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2016;32(2):339-47.
 101. Hart R, Komzak M, Okal F, Nahlik D, Jajtner P, Puskeiler M. Allograft alone versus allograft with bone marrow concentrate for the healing of the instrumented posterolateral lumbar fusion. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 2014;14(7):1318-24.
 102. Sauerbier S, Stricker A, Kuschnierz J, Buhler F, Oshima T, Xavier SP et al. In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method. *Tissue engineering Part C, Methods* 2010;16(2):215-23.
 103. Sauerbier S, Rickert D, Gutwald R, Nagursky H, Oshima T, Xavier SP et al. Bone marrow concentrate and bovine bone mineral for sinus floor augmentation: a controlled, randomized, single-blinded clinical and histological trial--per-protocol analysis. *Tissue engineering Part A* 2011;17(17-18):2187-97.
 104. Pasquali PJ, Teixeira ML, de Oliveira TA, de Macedo LG, Aloise AC, Pelegri AA. Maxillary Sinus Augmentation Combining Bio-Oss with the Bone Marrow Aspirate Concentrate: A Histomorphometric Study in Humans. *International journal of biomaterials* 2015;2015:121286.
 105. Kuhl S, Payer M, Kirmeier R, Wildburger A, Wegscheider W, Jakse N. The influence of bone marrow aspirates and concentrates on the early volume stability of maxillary sinus grafts with deproteinized bovine bone mineral - first results of a RCT. *Clinical oral implants research* 2014;25(2):221-5.
 106. Lavareda Correa SC, Elias de Sousa J, Pasquali PJ, Scavone de Macedo LG, Aloise AC, Teixeira ML et al. Use of Bone Allograft With or Without Bone Marrow Aspirate Concentrate in Appositional Reconstructions: A Tomographic and Histomorphometric Study. *Implant dentistry* 2017;26(6):915-21.
 107. Pelegri AA, Teixeira ML, Sperandio M, Almada TS, Kahnberg KE, Pasquali PJ et al. Can bone marrow aspirate concentrate change the mineralization pattern of the anterior maxilla treated with xenografts? A preliminary study. *Contemporary clinical dentistry* 2016;7(1):21-6.
 108. Sauerbier S, Giessenhagen B, Gutwerk W, Rauch P, Xavier SP, Oshima T et al. Bone marrow aspirate concentrate used with bovine bone mineral to reconstruct vertical and horizontal mandibular defects: report of two techniques. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2013;28(5):e310-4.
 109. Hendrich C, Franz E, Waertel G, Krebs R, Jager M. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: initial experiences in 101 patients. *Orthopedic reviews* 2009;1(2):e32.
 110. Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, de Bont ES. Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Critical reviews in oncology/hematology* 2009;69(3):187-98.
 111. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer research* 2009;69(4):1255-8.
 112. Roorda BD, Elst A, Boer TG, Kamps WA, de Bont ES. Mesenchymal stem cells contribute to tumor cell proliferation by direct cell-cell contact interactions. *Cancer investigation* 2010;28(5):526-34.
 113. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer research* 2009;69(13):5331-9.
 114. Zhou XG, Yang Y, Yang JS, Zhou J, Fang TL, Dai WD et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4 induce the malignant transformation of the bone marrow-derived human adult mesenchymal stem cells. *Chinese medical journal* 2011;124(5):729-33.
 115. Torsvik A, Rosland GV, Bjerkvig R. Comment to: "Spontaneous transformation of adult mesenchymal stem cells from cynomolgus macaques in vitro" by Z. Ren et al. *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 2950-2957: spontaneous transformation of mesenchymal stem cells in culture: facts or fiction? *Experimental cell research* 2012;318(5):441-3.
 116. Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer research* 2010;70(15):6393-6.