

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**ELIEL SCARPIONI DO LAGO**

**A VIABILIDADE DOS RECURSOS DE OTIMIZAÇÃO DO REPARO ÓSSEO  
COM O USO DA L-PRF E OSSO BOVINO EM CALVÁRIAS DE RATOS.  
ESTUDO HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO.**

**Alfenas/MG**

**2018**

**ELIEL SCARPIONI DO LAGO**

**A VIABILIDADE DOS RECURSOS DE OTIMIZAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM  
O USO DA L-PRF E OSSO BOVINO EM CALVÁRIAS DE RATOS. ESTUDO  
HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.  
Área de concentração: Odontologia.  
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

**Alfenas/MG**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

L177v Lago, Eliel Scarpioni do  
A viabilidade os recursos de otimização do reparo ósseo com o uso da L-PRF e osso bovino em calvárias de ratos, estudo histométrico e imunoistoquímico / Eliel Scarpioni do Lago – Alfenas/MG, 2018.  
82.: il. -  
Orientador: Ronaldo Célio Mariano.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018  
Bibliografia.  
1. Regeneração Óssea. 2. Transplante Autólogo. 3. Osso e Ossos - Bovinos. 4. Adesivo Tecidual de Fibrina. I. Mariano, Ronaldo Célio.  
II. Título.  
CDD-617.605

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva  
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG, CEP 37130-001



ELIEL SCARPIONI DO LAGO

**A VIABILIDADE DOS RECURSOS DE OTIMIZAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM O USO DO L-PRF E OSSO BOVINO EM CALVÁRIAS DE RATOS. ESTUDO HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

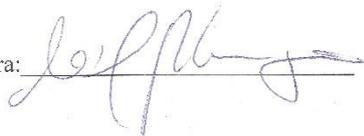
A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 09/03/18

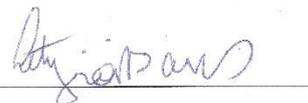
Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Letícia Monteiro de Barros  
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano  
UNIFENAS

Assinatura: 

À **Deus**, dedico primeiramente este trabalho, pois através de seu amor e cuidado, sempre estive comigo durante toda essa caminhada. À minha linda **família**, Dayana, Rebecca e (recentemente) Lucca, que com paciência estiveram ao meu lado para que esse objetivo fosse alcançado. Ao meu **pai**, Hélio, que sempre foi minha referência na busca pela excelência.

## AGRADECIMENTOS

### **Deus,**

Se hoje tenho a oportunidade de finalizar mais essa etapa em minha carreira é graças ao Seu amor e cuidado. Quantos livramentos nesses poucos milhares de quilômetros percorridos entre idas e vindas entre Alfenas e Jacutinga. De todo meu coração agradeço a Ti.

### **Família**

Em especial à você minha querida esposa **Dayana**, pela paciência, amor e compreensão pra que esse desejo fosse concretizado. Tantas noites passamos distantes por conta desse Mestrado, porém pude perceber e reconhecer dia após dia o quanto desejo passar todos os dias da minha vida ao seu lado. A minha princesa e companheira Rebecca que sempre me recebeu de maneira tão amorosa quando chegava em casa. Seu coração é lindo! Ao novo membro da família, **Lucca**, que chegou nesse ano para aumentar a nossa alegria.

Aos meus pais, **Hélio e Míriam**, que me ensinaram a nunca desistir e sempre avançar. Vocês me ensinaram coisas que o dinheiro não pode comprar: o amor a Deus e a viver uma vida correta.

Aos meus queridos sogros, Idinê (*in memoriam*) e Júnia que, como um filho, sempre me acolheram em sua casa. Obrigado pela paciência!

Ao meu irmão, **Hélio Júnior**, pela imensurável orientação na edição das imagens. Você é o melhor!

Aos meus colegas de profissão na cidade de Jacutinga, Douglas Dias Ferreira, Ivan Marcos de Souza, Gilnei Alvarenga Cardoso e Alessandra Costa Cardoso e Bianca Nicioli. Vocês são pessoas em quem tenho tido a honra de conviver e aprender profissionalmente, mas principalmente, de desfrutar de uma amizade e companheirismo que fortalece nossa classe. Obrigado me socorrerem nos meus momentos de ausência. Vocês são demais!

Aos meus queridos colegas de mestrado, que me proporcionaram grandes momentos de aprendizado ao compartilharem seus conhecimentos durante o tempo em que estivemos juntos.

À **Sabrina Ferreira**, Doutora em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da Unesp (Araçatuba), pela amizade e disponibilidade na realização do processamento das lâminas.

À professora Doutora **Roberta Okamoto**, pessoa em que tive a oportunidade de conviver por um pequeno período de tempo, porém tempo suficiente para admirar todo o conhecimento, competência e carinho por aquilo que faz.

Ao meu amigo, irmão e colega de extrema competência **Dr. Leonardo Rodrigues Magnago**, que, apesar da distância, somos unidos por uma amizade e companheirismo que faz parecer que somos vizinhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, ao corpo docente e em especial ao coordenador **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, que em todo tempo se mostrou proativo e solícito a minhas necessidades.

Aos professores **Dr. Leandro Araújo Fernandes** e **Dra. Germana de Villa Camargos**, que fizeram parte da banca de minha qualificação. Muito obrigado pelas orientações e por compartilharem seus conhecimentos e experiências para que essa dissertação pudesse ter seu nível elevado.

Às funcionárias da Clínica de Cirurgia, **Dayana** e **Valdilene**, obrigado por toda a ajuda e pela companhia tão agradável. Aos **funcionários do Biotério Central da Unifal-MG**, que sempre se mostraram solidários e presentes durante toda a fase de experimentação animal. Aos **alunos de graduação** que me permitiram fazer parte de sua formação acadêmica durante o tempo em que convivemos na Clínica de Cirurgia.

Ao meu amigo e orientador **Professor Doutor Ronaldo Célio Mariano**, que embora eu não consiga encontrar palavras que pudessem nesse momento demonstrar meu sentimento de gratidão por permitir que eu caminhasse ao seu lado desde o período de minha graduação, eu gostaria de registrar a admiração que tenho por você. Até a presente data, são 14 anos que tenho aprendido pelo seu exemplo em como exercer não apenas a Odontologia, mas a exercer a honestidade, paciência, responsabilidade, compaixão, solidariedade, a competência e a proatividade. Obrigado por sempre abrir as portas de sua casa recebendo-me de maneira tão acolhedora. Agradeço a sua família: Lúcia, Isabela e Eduardo, pessoas amáveis e de grande coração e caráter. Obrigado por sempre compartilhar seus conhecimentos profissionais, através do qual posso oferecer uma Odontologia responsável e também transferir para colegas e graduandos a informação e experiência adquirida pela nossa convivência.

Os jovens se cansarão e se fatigarão,  
e os moços certamente cairão; Mas  
os que esperam no Senhor renovarão  
as forças, subirão com asas como  
águias; correrão, e não se cansarão;  
caminharão, e não se fatigarão.  
(Isaías 40:30,31)

## RESUMO

Como apenas o osso autógeno é capaz de manter as propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução, uma das estratégias usadas para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos vivos é utilizar substâncias capazes de induzir a proliferação celular e tecidual, como a Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF), um material de enxerto autólogo não trombinizado que oferece respostas biológicas efetivas devido a um aumento na liberação de citocinas e fatores de crescimento durante o processo cicatricial de feridas. Esse estudo investigou o efeito da L-PRF, comparado ou associado ao Bio-Oss® (osso bovino), um biomaterial de propriedade osteocondutora, levando em consideração o enxerto ósseo autógeno como material padrão para o preenchimento de defeitos ósseos. Um defeito de 5 mm de diâmetro foi realizado nas calvárias de 40 ratos. Esses animais foram divididos em 5 grupos de 8 animais cada e receberam coágulo sanguíneo (CO), osso autógeno (AUT), osso bovino (BIO), fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) ou osso bovino e L-PRF associados (BIO-L-PRF). Os animais foram eutanasiados após 4 e 8 semanas. A regeneração óssea foi avaliada por análise histométrica e imunoistoquímica. Observou-se que a maior média percentual de formação óssea encontrada nos períodos de 4 e 8 semanas foi no grupo BIO-L-PRF ( $54,05\% \pm 2,8349$  e  $63,58\% \pm 2,19115$ ). A menor média percentual foi observada no grupo CO para 4 e 8 semanas ( $16,70\% \pm 2,4724$  e  $20,55\% \pm 0,9842$ ) e sem diferença estatística significativa entre os períodos. A comparação entre os grupos mostrou semelhança estatística entre os Grupos Autógeno e os grupos com Osso Bovino e L-PRF. Isso reforça o bom desempenho como material de preenchimento promovido pelo Osso Bovino e L-PRF, principalmente quando associados, no aspecto quantitativo e imunoistoquímico, pois as expressões do RUNX 2, da Osteocalcina e do VEGF evidenciaram um aspecto favorável na formação do novo osso. O VEGF foi o marcador que apresentou maior expressão por se relacionar com o processo cicatricial inicial, promovendo a migração e proliferação de células endoteliais na região do defeito. Mesmo após semanas, o VEGF foi encontrado mantendo uma expressão moderada. Conclui-se que a associação da L-PRF ao osso bovino permitiu melhorar o reparo ósseo quando esses biomateriais foram inseridos em defeitos de calvárias de ratos.

**Palavras-chave:** Regeneração óssea. Osso autógeno. Osso bovino. L-PRF.

## ABSTRACT

Autogenous bone is the only one capable of maintaining the properties of osteogenesis, osteoinduction and osteoconduction. So, one of the strategies used to restore, maintain or improve the function of living tissues is to use substances capable of inducing cellular and tissue proliferation, such as Platelets Rich in Fibrin and Leukocytes (L-PRF), an autologous non-thrombinized graft material that provides effective biological responses due to an increase in the release of cytokines and growth factors during the wound healing process. This study investigated the effect of L-PRF, compared to or associated with Bio-Oss® (bovine bone), an osteoconductive biomaterial, taking into account autogenous bone graft as a standard material for filling bone defects. A defect of 5 mm diameter was performed in the calvaries of 40 rats. These animals were divided into 5 groups of 8 animals each and received blood clot (CO), autogenous bone (AUT), bovine bone (BIO), platelets-rich fibrin and leukocytes (L-PRF) or associated bovine bone and L-PRF (BIO-L-PRF). The animals were euthanized after 4 and 8 weeks. Bone regeneration was assessed by histometric and immunohistochemical analysis. It was observed that the highest mean percentage of bone formation found in the 4 and 8 week was in the BIO-L-PRF group ( $54.05\% \pm 2.8349$  and  $63.58\% \pm 2.19115$ ). The lowest mean percentage was observed in the CO group for 4 and 8 weeks ( $16.70\% \pm 2.4724$  and  $20.55\% \pm 0.9842$ ) and with no statistically significant difference between the periods. The comparison between the groups showed statistical similarity between the autogenous group and the Bovine Bone and L-PRF groups. This reinforces the good performance as a filling material promoted by bone bovine and L-PRF, especially when associated in the quantitative and immunohistochemical aspect, since the expressions of OC, RUNX 2 and VEGF evidenced a favorable aspect in the formation of new bone. VEGF was the marker that presented greater expression to be related to the initial cicatricial process, promoting the migration and proliferation of endothelial cells in the region of the defect. Even after weeks, VEGF was found to maintain a moderate expression. It was concluded that the association of L-PRF to bovine bone allowed to improve the bone repair when these biomaterials were inserted in calvarial defects of rats.

**Keywords:** Bone Regeneration. Autogenous Bone. Bovine bone. L-PRF.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Criação do defeito cirúrgico na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica.....	33
Figura 2 – Confeção das canaletas para identificação dos limites do defeito ósseo.....	34
Figura 3 – Método de obtenção do osso autógeno.....	36
Figura 4 – Punção intracardíaca e retirada do sangue para obtenção da L-PRF.....	37
Figura 5 – Separação dos componentes do sangue após a centrifugação.....	38
Figura 6 – Separação da L-PRF dos demais componentes do sangue por pinçamento.....	39
Figura 7 – (A) Corte longitudinal ao longo da linha central (Y) do defeito de tamanho crítico; (B) Cortes transversais (X); (C) Dimensões do espécime a ser embebido em parafina.....	40
Figura 8 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 4 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	43
Figura 9 – (A) Tecido conjuntivo mostrando a presença de fibroblastos numa área de pouca formação de fibras colágenas do grupo CO no período experimental de 4 semanas (centro do defeito. Aumento 40x. HE); (B) presença de infiltrado inflamatório do grupo CO no período experimental de 4 semanas (borda do defeito. Aumento 10x. HE).....	44
Figura10 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 4 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	44
Figura 11 – Osso neoformado junto ao osso nativo, com boa mineralização, circundado por tecido conjuntivo maduro do grupo AUT no período experimental de 4 semanas (Borda do defeito. Aumento 40x. HE)...	45
Figura 12 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO no período experimental de 4 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	45
Figura 13 – Tecido conjuntivo rico em fibroblastos, em alguns pontos com características de tecido maduro e bem organizados com	

	presença de matriz osteóide e osteoblastos do grupo BIO no período experimental de 4 semanas (Aumento 40x. HE).....	46
Figura 14 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo L-PRF no período experimental de 4 semanas (Aumento 6,3x. HE).....	47
Figura 15 –	Trabéculas ósseas densas e tecido conjuntivo nas adjacências do grupo L-PRF no período experimental de 4 semanas (Aumento 40x. HE).....	47
Figura 16 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 4 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	48
Figura 17 –	Osso neoformado e tecido conjuntivo nas regiões próximas à borda do defeito e áreas com osteoblastos e matriz osteóide do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 4 semanas (Aumento 40x. HE).....	48
Figura 18 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 8 semanas (CO. 8 semanas. Aumento 6.3x. HE).....	49
Figura 19 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	49
Figura 20 –	Osso neoformado no centro do defeito, com tecido conjuntivo maduro entre as trabéculas no grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento 40x. HE).....	50
Figura 21 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	50
Figura 22 –	Partícula de osso bovino remanescente e tecido conjuntivo e matriz osteóide nas adjacências. Infiltrado inflamatório à direita do grupo BIO no período experimental de 8 semanas. (Aumento 40x. HE).....	51
Figura 23 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo L-PRF no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	51
Figura 24 –	Osso com características de maduro e tecido conjuntivo bem organizado nas adjacências e locais de matriz osteóide formada do grupo L-PRF no período experimental de 8 semanas. (Aumento 40x. HE).....	52

Figura 25 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE).....	52
Figura 26 – Região próxima à borda do defeito com ausência das partículas de Bio-Oss® e com formações ósseas isoladas do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 8 semanas. (Aumento 40x. HE).....	53
Figura 27 – Imunomarcção de RUNX 2 no período de 4 semanas para os grupos experimentais (CO: leve; AUT: moderada) e período de 8 semanas (CO: leve; AUT: leve) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).....	59
Figura 28 – Imunomarcção de RUNX 2 no período de 4 semanas para os grupos experimentais (BIO: leve; L-PRF: moderada; BIO-L-PRF: moderada) e período de 8 semanas (BIO: leve; L-PRF: leve; BIO-L-PRF: leve) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).....	59
Figura 29 – Imunomarcção de osteocalcina (OC) no período de 4 semanas para os grupos experimentais (CO: leve; AUT: leve) e período de 8 semanas (CO: leve; AUT: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).....	60
Figura 30 – Imunomarcção de osteocalcina (OC) no período de 4 semanas para os grupos experimentais (BIO: leve; L-PRF: leve; BIO-L-PRF: leve) e período de 8 semanas (BIO: moderada; L-PRF: leve; BIO-L-PRF: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).....	61
Figura 31 – Imunomarcção de VEGF no período de 4 semanas para os grupos experimentais (CO: leve; AUT: moderada) e período de 8 semanas (CO: leve; AUT: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).....	62
Figura 32 – Imunomarcção de VEGF no período de 4 semanas para os grupos experimentais (BIO: moderada; L-PRF: intensa; BIO-L-PRF: moderada) e período de 8 semanas (BIO: moderada; L-PRF: moderada; BIO-L-PRF: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias percentuais e desvio padrão dos dados da histometria da AO segundo os períodos experimentais.....	53
Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os grupos.....	54
Tabela 3 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os grupo.....	55
Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os períodos experimentais.....	55
Tabela 5 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos experimentais.....	56
Tabela 6 – Médias dos dados da análise imunoistoquímica da borda do defeito (BD) e centro do defeito (CD) para RUNX 2 segundo os períodos experimentais.....	58
Tabela 7 – Médias dos dados da análise imunoistoquímica da borda do defeito (BD) e centro do defeito (CD) para OC segundo os períodos experimentais.....	60
Tabela 8 – Médias dos dados da análise imunoistoquímica da borda do defeito (BD) e centro do defeito (CD) para VEGF segundo os períodos experimentais.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica das médias percentuais da AO nos diferentes grupos experimentais, considerando os períodos de avaliação.....	54
--	----

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	– Análise de Variância
<b>AO</b>	– Área de osso
<b>AT</b>	– Área total do defeito
<b>AUT</b>	– Grupo osso autógeno
<b>BD</b>	– Borda do defeito
<b>BIO</b>	– Grupo Bio-Oss®
<b>BIO-L-PRF</b>	– Grupo Bio-Oss® + L-PRF
<b>CD</b>	– Centro do defeito
<b>CO</b>	– Grupo coágulo
<b>CO<sub>2</sub></b>	– Gás carbônico
<b>EDTA</b>	– Ácido etilenodiaminotetracético.
<b>FcFb</b>	– Fator de Crescimento de fibroblasto
<b>G.L.</b>	– Graus de Liberdade
<b>HE</b>	– Hematoxilina e Eosina
<b>IGF</b>	– Fator de crescimento de Insulina 1 e 2
<b>L-PRF</b>	– Fibrina rica em plaquetas e leucócitos
<b>OC</b>	– Osteocalcina
<b>PDGF</b>	– Fator de Crescimento derivado de Plaquetas
<b>PRP</b>	– Plasma Rico em Plaquetas
<b>PVPI</b>	– Poliidovinilpirrolidona
<b>Q.M.</b>	– Média dos quadrados
<b>RPM</b>	– Rotações por minuto
<b>RUNX 2</b>	– Fator 2 de transcrição relacionado a RUNT
<b>S.Q.</b>	– Soma dos quadrados
<b>TGF-b</b>	– Fator de Crescimento de Transformação
<b>VEGF</b>	– Fator Endotelial de Crescimento Vascular
<b>µm<sup>2</sup></b>	– Micrômetros quadrados

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1	<i>ENXERTOS ÓSSEOS.....</i>	22
2.2	<i>L-PRF.....</i>	25
2.3	<i>ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....</i>	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1	<i>MODELO EXPERIMENTAL.....</i>	32
4.2	<i>PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....</i>	32
4.3	<i>PROTOCOLO PARA A OBTENÇÃO DA L-PRF.....</i>	37
4.3.1	<i>Punção intracardíaca e retirada do sangue.....</i>	37
4.3.2	<i>Separação celular.....</i>	38
4.3.3	<i>Isolamento da L-PRF.....</i>	38
4.4	<i>EUTANÁSIA.....</i>	39
4.5	<i>PROCESSAMENTO DAS PEÇAS.....</i>	39
4.6	<i>ANÁLISE HISTOLÓGICA.....</i>	40
4.7	<i>ANÁLISE HISTOMÉTRICA.....</i>	40
4.8	<i>ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....</i>	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1	<i>AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 4 SEMANAS.....</i>	43
5.1.1	<i>Grupo CO.....</i>	43
5.1.2	<i>Grupo AUT.....</i>	44
5.1.3	<i>Grupo BIO.....</i>	45
5.1.4	<i>Grupo L-PRF.....</i>	46
5.1.5	<i>Grupo BIO-L-PRF.....</i>	47
5.2	<i>AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 8 SEMANAS.....</i>	48
5.2.1	<i>Grupo CO.....</i>	48
5.2.2	<i>Grupo AUT.....</i>	49
5.2.3	<i>Grupo BIO.....</i>	50
5.2.4	<i>Grupo L-PRF.....</i>	51
5.2.5	<i>Grupo BIO-L-PRF.....</i>	52

5.3	<i>ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA.....</i>	53
5.4	<i>ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....</i>	57
6	<b>DISCUSSÃO .....</b>	63
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	71
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	72
	<b>ANEXO .....</b>	82

## 1 INTRODUÇÃO

A alta capacidade do tecido ósseo de se regenerar é um dos mecanismos mais fascinantes no organismo. Porém, situações como a doença periodontal, tumores, traumas, exodontias, anomalias de desenvolvimento, patologias, ressecções oncológicas e perda fisiológica de massa óssea podem levar a defeitos ósseos críticos, os quais não possuem a capacidade de se regenerar espontaneamente. Especialmente na região bucomaxilofacial, a reabsorção severa de mandíbula e maxila, associada à perda dos dentes, pode levar a defeitos anatômicos significativos comprometendo a função e a estética e, em muitos casos inviabiliza a reabilitação oral (LINDHE, 2010).

Uma vez que as reabilitações orais tradicionais com próteses fixas ou removíveis, apoiadas sobre dentes e/ou mucosa, não são mais o tratamento de escolha dos pacientes totais ou parcialmente edêntulos, o tratamento com implantes requer um adequado volume ósseo. Hoje, a Odontologia, na era da Implantodontia, trouxe para esses pacientes a possibilidade de reabilitação do sistema estomatognático com próteses implanto-suportadas, representando o tratamento que mais se aproxima da dentição natural (NARAIN; GARG; NARAIN, 2010).

Portanto, previamente à reabilitação oral com próteses implantossuportadas, cirurgias de enxerto ósseo antes ou durante a instalação dos implantes geralmente são necessárias para evitar ou até mesmo restabelecer a perda óssea vertical e horizontal e, ao mesmo tempo, prover uma quantidade e qualidade ósseas adequadas, garantindo a estabilidade primária de inserção do implante. Assim, são necessários biomateriais que possam modular, alterar ou estimular a atividade osteogênica nos defeitos teciduais e/ou inibir a osteoclastogênese (KIM et al., 2013; TETÉ et al., 2013).

Dentre os biomateriais, destaca-se nesse tipo de reabilitação a utilização dos enxertos alógenos, aloplásticos, xenogênicos e fatores de crescimento. Porém, o recrutamento de células, a modulação do processo inflamatório e a promoção do reparo por cicatrização ou regeneração, são influenciados pelas características físicas, químicas e biológicas desses biomateriais (KOLK et al., 2012). Por isso, cada um desses tipos de enxertos apresenta vantagens e limitações que partem desde suas propriedades biológicas individuais, disponibilidade de grandes quantidades e

aumento da morbidade cirúrgica de áreas doadores do enxerto autógeno segundo Fillingham (2016), o que justifica o grande número de estudos realizados para verificar o efeito dos “ainda considerados” novos biomateriais, associados ou não, a outros biomateriais de uso rotineiro.

Otimizar o reparo tecidual é uma busca constante das tecnologias aplicadas à saúde na atualidade (EHRENFEST et al., 2009). A utilização de concentrados derivados de plaquetas para potencializar o reparo dos tecidos bucais tem sido válida de acordo com Serna et al. (2011), principalmente no âmbito da Implantodontia, uma vez que condições ósseas satisfatórias são indispensáveis (EHRENFEST et al, 2010). É fato que tais materiais são ricos em fatores de crescimento e citocinas, responsáveis pelo processo inflamatório que conduz à substituição por reparo. Por isso, sua utilização pode acelerar este processo fisiológico segundo Messoria et al. (2007), através do fornecimento local e progressivo dos fatores de crescimento e proteínas que fornecem propriedades únicas para a remodelação de tecidos, cicatrização de feridas e ação angiogênica (ANITUA et al., 2006).

No entanto, os efeitos de alguns concentrados como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) possuem limitações, pois estudos sugerem que a rápida liberação dos fatores de crescimento produza um benefício imediato e passageiro, pouco significativo para a reparação tecidual, principalmente em relação à regeneração óssea (HE et al., 2009; RAO et al., 2012). Assim, graças ao avanço no desenvolvimento de materiais que realmente contribuam para a regeneração óssea, surgiu uma segunda geração de concentrado de plaquetas denominada Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) (CHOUKROUN et al., 2006a; HE et al., 2009).

A L-PRF é obtida através do sangue do próprio paciente sem a adição de trombina bovina ou outros componentes exógenos. Os fatores de crescimento e citocinas permanecem na malha da rede de fibrina formada favorecendo a liberação gradativa e duradoura no processo de reparo tecidual (CHOUKROUN et al., 2006b). Estudos *in vitro* demonstram aumento da proliferação dos osteoblastos em contato com a L-PRF de acordo com estudos de He et al. (2009) e maior estímulo angiogênico mediante a utilização desse biomaterial (ROY et al., 2011). Choukroun et al. (2000) foram os primeiros a descrever as vantagens na utilização da L-PRF no reparo dos tecidos bucais.

Novas pesquisas com a L-PRF podem otimizar a regeneração óssea na Odontologia moderna, uma vez que sua utilização, isolada ou em associação com outros enxertos, parece favorecer e acelerar a regeneração óssea.

Existe uma vasta discussão sobre a utilização de diferentes enxertos como substitutos ósseos a fim de minimizar ou até evitar a permanência de defeitos ósseos nos maxilares. Neste contexto, os enxertos xenógenos, particularmente o osso bovino particulado, tem sido amplamente usado como biomaterial de arcabouço, fornecendo condições para o tecido ósseo crescer e se fixar biologicamente (LINDHE; KARRING; LANG, 2003).

Assim, acredita-se que a associação da L-PRF aos xenoenxertos, como o osso bovino, poderia permitir melhorias na cicatrização de defeitos ósseos de tamanhos críticos, pois acrescentariam-se fatores de crescimento no biomaterial usado como preenchimento ósseo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A prevenção e o tratamento de perdas ósseas através de procedimentos de enxertia óssea é uma realidade na atual Odontologia moderna. Associada a essa realidade a literatura científica relata o uso de derivados sanguíneos utilizados para auxiliar reparação tecidual.

### 2.1 ENXERTOS ÓSSEOS

Historicamente, o primeiro enxerto ósseo xenógeno registrado ocorreu em 1668 por Job Van Meekeren, um cirurgião holandês. Desde então, a prevenção e tratamento de perdas ósseas têm sido realizados através de procedimentos de enxertia óssea.

O enxerto ósseo é considerado um procedimento padrão utilizado comumente para se alcançar a regeneração óssea, sendo empregado nas mais diversas especialidades médicas e odontológicas (BOER, 1988; FINKEMEIER, 2002; JENSEN et al., 2012).

Os enxertos ósseos devem ser biocompatíveis, possuir propriedades biomecânicas satisfatórias e capacidade de devolver a funcionalidade ao osso para que sejam aplicáveis na Odontologia, como cirurgias ósseas reconstrutivas dos maxilares, à regeneração periodontal e à reconstrução do rebordo alveolar em fissuras labiopalatinas congênitas (FINKEMEIER, 2002; JENSEN et al., 2012).

É de suma importância compreender que enxerto ósseo é um procedimento que implica na utilização de osso autógeno ou outro substituto ósseo, obtido a partir de fonte natural ou sintética, numa área com defeito ósseo. O enxerto ósseo não pode ser confundido com a regeneração óssea. A regeneração óssea é a real formação de novo osso no defeito enxertado, de modo que o enxerto ósseo não conduz necessariamente à formação de osso com as mesmas qualidades de osso nativo (OGUNSALU, 2011).

Sendo assim, os diferentes enxertos ósseos são classificados quanto ao seu mecanismo de ação em: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores (LOURENÇO, 2002; CARVALHO et al., 2010; OGUNSALU, 2011).

O mecanismo da osteogênese é conseguido quando os materiais osteogênicos, materiais orgânicos, são capazes de formar osso diretamente dos

osteoblastos (MARX; SAUNDERS, 1986; MISCH; DIETSH, 1993). Refere-se ao crescimento de osso a partir de células viáveis transferidas dentro do enxerto. Ou seja, os osteoblastos e células-tronco presentes no enxerto e que sobrevivem ao processo de transplante são inicialmente os únicos responsáveis pela proliferação e formação de novo produto osteóide (LOURENÇO, 2002; GIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO et al., 2010; OGUN SALU, 2011).

Já os materiais osteoindutores são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas (pluripotentes) ou osteoprogenitoras em osteoblastos nos tecidos adjacentes, estimulando assim, a formação óssea no local ou mesmo num local onde não é esperado (LOURENÇO, 2002; GIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO et al., 2010; OGUN SALU, 2011).

Por outro lado, os osteocondutores, auxiliam a cicatrização através de seu arcabouço ou *scaffold*, micro e macroscópico, permitindo a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação de osso como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos. Conduzem o crescimento do osso e permitem aposição óssea a partir do osso existente, mas não induzem a formação óssea, se colocado por exemplo em tecido mole (LOURENÇO, 2002; GIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO et al., 2010; OGUN SALU, 2011).

Os substitutos ósseos podem ser também classificados quando relacionados à sua origem: autógenos ou autólogos (quando obtidos do próprio sujeito); homogêneo, homólogo ou aloenxerto (quando obtidos de indivíduos da mesma espécie); heterogêneo ou xenogêneo (quando obtidos de indivíduos de espécie diferente); e, sintéticos ou aloplásticos (que possuem origem sintética) (CARVALHO et al., 2010; CONZ et al., 2010; FARDIN et al., 2010; OGUN SALU, 2011).

Mediante as classificações relacionadas aos mecanismos de ação e à origem, o substituto ósseo autógeno ainda permanece como padrão ouro pois este possui os três elementos essenciais da regeneração óssea: a osteogênese, osteoindução e osteocondução, elementos esses que favorecerão a ligação final entre o osso do hospedeiro e o material de enxertia, processo denominado osteointegração (JOHANSSON et al., 2001; GIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; SMOLKA et al. 2006; SBORDONE et al., 2009; SBORDONE et al., 2012; SILVA et al., 2012; SBORDONE et al. 2012; MLADENOVIC et al., 2013; LONG et al., 2014).

Atualmente, a principal fonte de enxertos heterógenos comercializados como biomaterial de substituição óssea na clínica é a de origem bovina. Dentre eles, o Bio-Oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) é o substituto ósseo mais utilizado. Sua base se consiste de osso bovino inorgânico livre de patógenos que contém uma hidroxiapatita com estrutura cristalina e proporção cálcio/fósforo, composição química e estrutura física bastante semelhante ao osso humano. O Bio-Oss® oferece um arcabouço para a migração de células e desenvolvimento de osso lamelar, além de aumentar a densidade óssea. Esse processo se dá pela migração de osteoblastos pré-existentes do osso adjacente na matriz celular, os quais penetram entre as porosidades das partículas do enxerto e sintetizam matriz osteóide. Estas propriedades fazem do Bio-Oss® um material confiável para promover a regeneração óssea. Estudos histológicos já demonstraram área óssea recém-formada em estreita relação com suas partículas justificando seu amplo emprego para aumento ósseo em cirurgias periodontais, dentoalveolares, em combinação com a instalação do implante e/ou outros tipos de enxertos (ORSINI et al., 2005; DAHLIN; SIMION; HATANO, 2009; GALINDO-MORENO et al., 2010; JENSEN, 2012; MLADENOVIC et al., 2013).

Mladenovic et al. (2013) propuseram investigar por meio de estudo *in vitro*, a interface biológica do Bio-Oss®, analisando o seu comportamento de dissolução e precipitação, além das respostas osteogênicas. Como resultado, confirmou-se que este biomaterial, através das reações de dissolução e precipitação dos fluidos teciduais, favoreceu o processo inicial de formação óssea na interface biológica, de modo que a análise de cultura de células demonstrou uma redução significativa de cálcio e de fósforo, confirmada com a marcação isotópica radioativa. Sendo assim, as partículas de Bio-Oss® são capazes de absorver os íons de cálcio e fósforo presentes no fluido tecidual, favorecendo assim o processo inicial de neoformação óssea.

Galindo-Moreno et al. (2010) avaliaram a colonização celular e vascular do osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) após 6 meses em enxertos de elevação do assoalho do seio maxilar em humanos. Sabe-se que o grau de formação óssea entre as partículas depende das propriedades de osteocondução do material, isto é, da capacidade de manter o espaço destinado à neoformação óssea. A porosidade do material deve fornecer um arcabouço para a vascularização e penetração de células associadas. Os autores concluíram após análise morfológica e imunoistoquímica que após este período foram observadas colonização por osteócitos e neovascularização bastante satisfatórias.

## 2.2 L-PRF

Os primeiros relatos de uso de derivados sanguíneos utilizados para auxiliar na cicatrização de feridas datam aproximadamente há 40 anos, com o uso de colas de fibrina, constituídas de fibrinogênio concentrado. As colas de fibrina produzidas a partir do plasma humano foram amplamente utilizadas e constituem-se numa boa opção para prevenir a contaminação das feridas de acordo com Ehrenfest, Rasmusson e Albrektsson (2009), devido às suas propriedades hemostáticas e adesivas (ANITUA et al., 2006). No entanto, devido aos altos custos e complexidade dos protocolos de obtenção, seu uso permanece restrito. As últimas décadas demonstram uma expansão considerável na utilização como biomaterial dos concentrados de plaquetas, favorecendo a regeneração tecidual e substituindo de forma importante as colas de fibrina (EHRENFEST; RASMUSSON; ALBREKTSSON, 2009; GUPTA et al., 2011).

O primeiro concentrado de plaquetas, descrito em 1998 e conhecido como Plasma Rico em Plaquetas (PRP) segundo Kang et al. (2011), foi e ainda vem sendo utilizado amplamente para acelerar a regeneração tecidual, principalmente óssea (HE et al., 2009; LUCARELLI et al., 2010). Em decorrência de resultados inconstantes, a previsibilidade de sua eficiência tem sido questionada (ANITUA et al., 2006; CHOUKROUN et al., 2006a; MESSORA et al., 2007; GABLING et al. 2009; KANG et al, 2011; MARIANO, MELO, AVELINO, 2012). Acredita-se que devido ao fato de que o PRP promove uma rápida liberação dos fatores de crescimento e citocinas para os tecidos, o que exerce um efeito descontrolado e de curta duração, o benefício é considerado pouco significativo na reparação (HE et al, 2009; KANG et al., 2011; RAO et al., 2012). Mas o papel das plaquetas é crucial não apenas na hemostasia, mas também no processo de cicatrização de feridas (GASSLING et al., 2010). Como fragmentos citoplasmáticos anucleados são derivados de megacariócitos da medula óssea e repletas de grânulos e de algumas mitocôndrias, afirmado por Gabling et al. (2009), as plaquetas apresentam uma vida útil que varia de 8 a 10 dias (DOHAN et al., 2004). Esses grânulos formam uma unidade de armazenamento de proteínas fundamentais para a reparação de feridas (GABLING et al., 2009; ROY et al., 2011). Possuem proteínas plaquetárias específicas, como o fator antiplaquetário e a tromboglobulina, como também proteínas não específicas das quais podemos destacar, a fibronectina, fatores da coagulação, fibrinogênio, fator de Von Willebrand,

fatores de crescimento, inibidores da fibrinólise e imunoglobulinas (DOHAN et al., 2004).

Assim a racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no fato de que plaquetas autólogas ativadas retidas na matriz de fibrina são uma fonte de sinais moleculares que controlam crescimento e diferenciação celular através da liberação de diversas proteínas e outras moléculas biologicamente ativas (NURDEN, 2011).

A liberação precoce e inicial dos fatores de crescimento e citocina ocorre devido à presença da trombina exógena que, quando ativada, libera a maior parte dos fatores de crescimento no primeiro dia, reduzindo drasticamente com 3, 7 e 14 dias. Além do mais, a trombina parece exercer um efeito tóxico sobre o corpo celular que em quantidades elevadas pode dificultar a proliferação celular e a formação óssea. Isso leva à liberação rápida da maior parte dos fatores de crescimento, antes mesmo do início da proliferação osteoblástica. Com isso, não sobram muitos fatores de crescimento a serem libertados após o início da multiplicação celular, quando realmente são importantes para acelerar o processo de reparo. Outra dificuldade na utilização do PRP se dá devido a uma propriedade mecânica frágil, o que favorece uma fibrinólise rápida. Como é utilizado na forma de líquido ou gel na maioria das vezes, apresenta um manuseio difícil, o que impede a sua implantação segura em um local específico quando se tem essa necessidade (LUCARELLI et al., 2010). Assim, após o estudo clínico pioneiro de Marx et al. (1998), pesquisadores avaliaram os efeitos do PRP associado a enxertos ósseos e/ou biomateriais em modelos animais (CHOI et al., 2004; AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2005; GERARD et al., 2006; NAGATA et al., 2010; MESSORA et al., 2013). Estudos clínicos posteriores a Marx et al. (1998) também relatam essa associação (WILTFANG et al., 2003; RAGHOEBAR et al., 2005; INCHINGOLO et al., 2012; MARIANO; MELO; AVELINO, 2012). Esses trabalhos, entretanto, têm demonstrado resultados contraditórios em relação à formação e maturação ósseas.

Diante disso, a Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) vem ganhando amplo espaço na literatura científica (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011; WU et al., 2012). Considerada como uma segunda linha de concentrado de plaquetas tem sido discutida, a L-PRF foi introduzida por Joseph Choukroun et al. (2000), na França, com indicação principal para o reparo tecidual em cirurgia bucomaxilofacial e Implantodontia (KANG et al., 2011; DOUGLAS et al., 2012). Gupta (2011) cita a sua utilização em várias áreas da Odontologia. Vários estudos têm demonstrado que a L-

PRF promove uma liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento (DANIELSEN; AGREN; JORGENSEN, 2010; ROY et al., 2011; THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011; WU et al., 2012). Esse processo dura pelo menos uma semana podendo chegar a 28 dias (DOHAN et al., 2004; CHANG; ZHAO, 2009; KANG et al., 2011). Assim, ele cria condições favoráveis sobre o processo de reparo tecidual para que o mesmo ocorra de forma adequada e mais rápida (ROY et al., 2011). Aplicações clínicas positivas da L-PRF em cirurgias plásticas, segundo Ehrenfest et al. (2010) e Thorat, Pradeep e Pallavi (2011), e em cirurgia oral de implantes dentários e cirurgias periodontais já foram relatadas, de acordo com Chang E Zhao (2011), de modo que Huang et al (2010) relata uma ótima biocompatibilidade e nenhum efeito citotóxico da L-PRF foi notado em sua pesquisa em células da polpa dental humana. Contudo, os estudos em relação à regeneração óssea são escassos embora já existam evidências que demonstram o crescimento e proliferação de osteoblastos humanos em contato com a L-PRF (KANG et al., 2011; RAO et al., 2012; WU et al., 2012).

Diferentemente das outras técnicas de preparo dos concentrados de plaquetas, o preparo da L-PRF exige uma técnica relativamente simples, não requer o uso de anticoagulantes ou ativadores, como a trombina bovina (DOHAN et al., 2004; DOHAN et al., 2006; CHANG; ZHAO, 2011; ROY et al., 2011; DOUGLAS et al., 2012; RAO et al., 2012). Exige-se para sucesso dessa técnica da velocidade de coleta do sangue e transferência do mesmo para centrifugação (DOHAN et al., 2006). Ao contrário do PRP, a L-PRF não se dissolve rapidamente após a aplicação. A forte matriz de fibrina é lentamente remodelada de forma semelhante ao coágulo sanguíneo natural segundo estudos realizados por Dohan et al. (2009), o que lhe confere uma arquitetura fisiológica favorável para suportar o processo de cicatrização. Junto a esse processo, requer-se um arsenal de materiais muito pequeno, se restringindo a tubos de ensaio esterilizados, seringas descartáveis e uma centrífuga (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012). O protocolo de obtenção se dá pela coleta de 10 ml de sangue do paciente que, sem adição de qualquer anticoagulante, é imediatamente centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Ao final desse processo, podem ser vistas a olho nu três partes distintas no tubo: na parte inferior observam-se as células vermelhas do sangue, na porção central a L-PRF e na porção superior do tubo o plasma acelular ou plasma pobre em plaquetas (PPP) (EHRENFEST et al., 2009; GUPTA et al., 2011).

Esta estrutura de fibrina possui uma complexa arquitetura com propriedades mecânicas adequadas que abriga as células, fatores de crescimento e citocinas, além

de servir como um veículo para transporte destas substâncias até os tecidos em regeneração (DOHAN et al., 2004; EHRENFEST et al., 2009; GASSLING et al., 2010; WU et al., 2012). Entre as linhagens celular presente evidencia-se a presença de células-tronco mesenquimais, que contribuem para a regeneração e proliferação das células ósseas e de muitos outros tecidos, favorecendo o reparo dos defeitos ósseos. Graças a essas propriedades mecânicas da L-PRF, como adesividade e resistência à tração segundo Singh, Kohli e Gupta (2012), é possível a obtenção de membranas de fibrina que favorecem uma maior migração celular e funcionam como uma barreira reabsorvível de ótima qualidade para a regeneração óssea guiada (SIMONPIERI et al., 2004; CHANG; ZHAO, 2011; GUPTA et al., 2011). As propriedades hemostáticas, angiogênicas e de biocompatibilidade da L-PRF são notáveis, e capazes de estimular a regeneração das células do periósteo para evitar a instalação de defeitos ósseos nas cirurgias pré-protéticas ou para recobrir sítios de enxertos (RAOS et al., 2012). Gassling et al (2010) cita que uma maior proliferação celular pode ser observada com a utilização de membranas de L-PRF em comparação com membranas de colágeno.

Para melhor compreender o efeito biológico da matriz de fibrina da L-PRF, é necessário considerar a capacidade de estimulação da angiogênese, de controle imunológico e de proteção da ferida. Devido à sua estrutura, a L-PRF pode dar suporte ao desenvolvimento simultâneo destes três fenômenos, essenciais no processo de reparo tecidual. A atividade angiogênica do material é explicada pelo formato tridimensional da fibrina e pela ação das citocinas presas em suas malhas. A rigidez da rede de fibrina favorece a formação dos capilares sanguíneos pela estimulação das células endoteliais pelos fatores de crescimento de fibroblastos (FCFb) e de crescimento endotelial vascular (VEGF) (GUPTA et al., 2011; SINGH; KOHLI; GUPTA et al., 2012).

Outros fatores de crescimento importantes no processo de cura liberados pela L-PRF são o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), responsável pela migração e proliferação de células mesenquimais de acordo com Dohan et al. (2004), o Fator de Crescimento de Transformação (TGF- $\beta$ ) segundo Danielsen, Agren e Jorgensen (2010), Chang e Zhao (2011) e Douglas et al. (2012), agindo como um mediador da inflamação favorecendo a cicatrização dos tecidos como descreve Ehrenfest et al. (2010) e o Fator de Crescimento de Insulina 1 e 2 (IGF) (GUPTA et al., 2011). Este está envolvido com a multiplicação celular, estimula a apoptose com objetivo de proteção celular e também expressa quimiotaxia para os osteoblastos

humanos favorecendo a regeneração óssea (DOHAN et al., 2004). Além disso, a L-PRF contém interleucinas e fator de necrose tumoral capazes de ativar o sistema de defesa segundo Garbling et al. (2009), que associados à migração de neutrófilos, promovem fagocitose e degradação enzimática estimulada pela fibrina e o fibrinogênio, demonstrando um papel importante no controle da imunidade (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012). Isso confere uma menor incidência de infecções pós-operatórias quando o alvéolo é preenchido com L-PRF após as extrações dentárias (GUPTA et al., 2011).

### 2.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A análise imunoistoquímica visa localizar antígenos em tecidos, explorando princípio de ligação específica entre anticorpos e antígenos no tecido biológico. Atualmente, o processo fisiológico da integração de enxertos ósseos em seus leitos receptores pode ser evidenciado com a identificação dos fatores de crescimento e citocinas responsáveis pelo equilíbrio dinâmico de aposição/reabsorção óssea. Na pesquisa proposta, destacamos três marcadores imunológicos envolvidos nesse processo: Fator 2 de transcrição relacionado ao RUNT (RUNX 2), Osteocalcina (OC) e Fator endotelial de crescimento vascular (VEGF).

O RUNX 2 (do inglês, *Runt-related transcription factor 2*) é um fator de transcrição que tem por principal característica expressar-se em pré-osteoblastos e osteoblastos jovens. Portanto, a sua presença evidencia propriedades osteoindutoras, ou seja, sua presença mostra o momento em que pré-osteoblastos se diferenciarão em osteoblastos ativos (FRANCHESCHI, 2003).

Inicialmente, a regulação da cicatrização óssea ocorre por diferenciação osteoblástica, no qual é mediada pelo RUNX 2. A transcrição do RUNX 2 é regulada através de proteínas morfogenéticas e FcFb nos estágios próximos de diferenciação osteoblástica. A ação do RUNX 2 é mediada por células mesenquimais pluripotentes até o estágio final de diferenciação osteoblástica, momento no qual o processo é inibido (PEREIRA, 2017b).

A Osteocalcina é uma proteína não colágena, produzida pelas células osteoblásticas e desenvolve um papel essencial no processo de mineralização óssea (GARCÍA-MARTIN, 2013). Estimulada pela vitamina K, a osteocalcina permite a fixação do cálcio e da hidroxiapatita na matriz extracelular, promovendo uma efetiva

mineralização no tecido ósseo (XIAO, 2002). Além da biomineralização na matriz extracelular, a osteocalcina desempenha um papel de recrutamento de osteoclastos envolvidos na remodelação óssea (KOBAYASHI, 2013). Estudos imunoistoquímicos tem também identificado a presença de osteocalcina no osso alveolar, dentina e o cimento. Isto por serem secretadas também pelos odontoblastos (BRITO, 2013).

O VEGF (do inglês, *Vascular endothelial growth factor*) é uma proteína de sinalização que induz o crescimento de novos vasos sanguíneos. Está associado ao mecanismo de angiogênese e osteogênese que ocorrem durante o reparo ósseo, exercendo, inclusive, efeito quimiotático nos osteoblastos (STREET, 2002).

A cicatrização óssea requer um ambiente adequado para promover formação vascular a fim de fornecer nutrientes e oxigênio ao enxerto. O VEGF é um dos mais importantes fatores de crescimento vascular porque promove a migração e proliferação de células endoteliais (PEREIRA, 2017a).

O VEGF é o principal regulador do crescimento vascular tanto na angiogênese normal quanto na patológica e é, por conseguinte, o fator mais substancial para induzir o crescimento terapêutico de novos vasos sanguíneos (HELMRICH, 2013).

Um estudo *in vitro* realizado por Helmrich et al (2013) indicou que a sobre-expressão de VEGF extraído de células tronco da medula óssea humana modificada geneticamente produziu duas condições que caminham em direções totalmente opostas: a primeira foi alcançar melhor potencial osteogênico pelo aumento da vascularização de enxertos; a segunda situação foi aumentar o potencial de prejudicar a formação de tecido ósseo, elevando o recrutamento de osteoclastos e reabsorção óssea. Por isso, o equilíbrio entre a angiogênese estimulada por VEGF, osteogênese e reabsorção óssea deve ser investigadas em modelos controlados, a fim de conceber estratégias racionais que exploram o potencial pró-angiogênico da expressão de VEGF para uma aplicação clínica.

### **3 OBJETIVOS**

O presente estudo investigou o efeito isolado ou combinado da L-PRF e do enxerto ósseo bovino sobre o reparo ósseo de defeitos críticos na calvária de ratos por meio de análises histométrica e imunoistoquímica.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG pelo número 22/2017 (ANEXO A).

### 4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Para o presente trabalho foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), machos, com peso entre 350 e 450 gramas e idade aproximada entre 9 e 11 semanas (Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG – Unifal-MG). Os animais se mantiveram em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental.

### 4.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6mg/kg) e quetamina (70mg/kg).

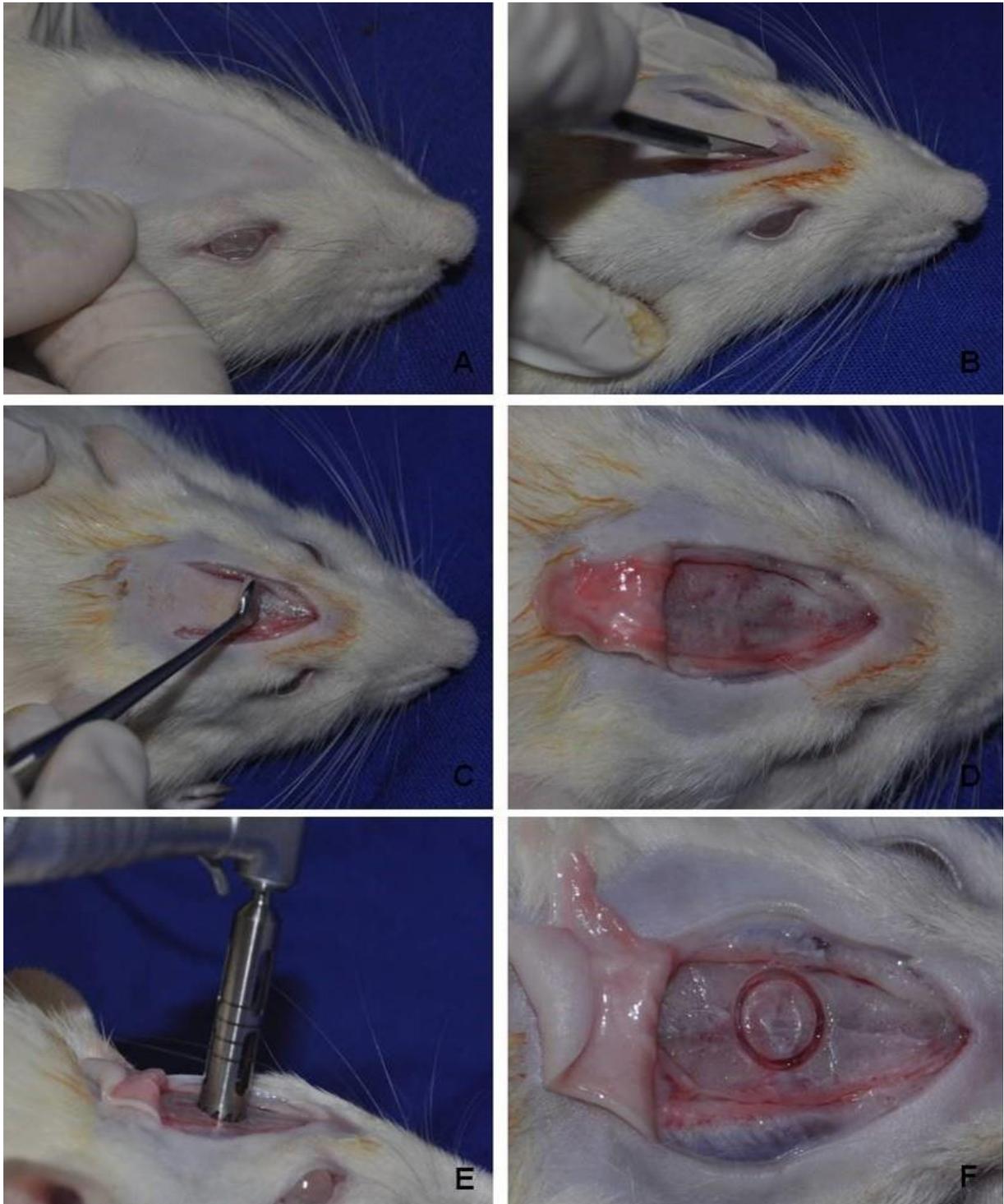
Posteriormente foi realizada tricotomia na região fronto-parietal da calvária dos animais e, posteriormente, anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Figura 1).

A seguir, com uma lâmina de bisturi n<sup>o</sup> 15 foi realizada uma incisão em “U”, com base caudal na calvária do rato. A incisão atingiu o periósteo, permitindo o deslocamento de um retalho de espessura total em direção posterior.

Com broca trefina de 5mm de diâmetro (3i), acoplada em motor BLM 600 plus (Driller) e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril, foi preparada uma cavidade cirúrgica circular com 5mm de diâmetro (defeito de tamanho crítico) na calvária do rato. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital. Marcações em formato de “L” foram feitas a 2mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico e preenchidas com ionômero de vidro (Vidrion, Rio de Janeiro, Brasil) (SILVA et al., 2016). O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividiu o defeito cirúrgico ao meio (Figura 2). Estas marcações foram úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o

processamento laboratorial, permitindo localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histológica (SILVA et al., 2016).

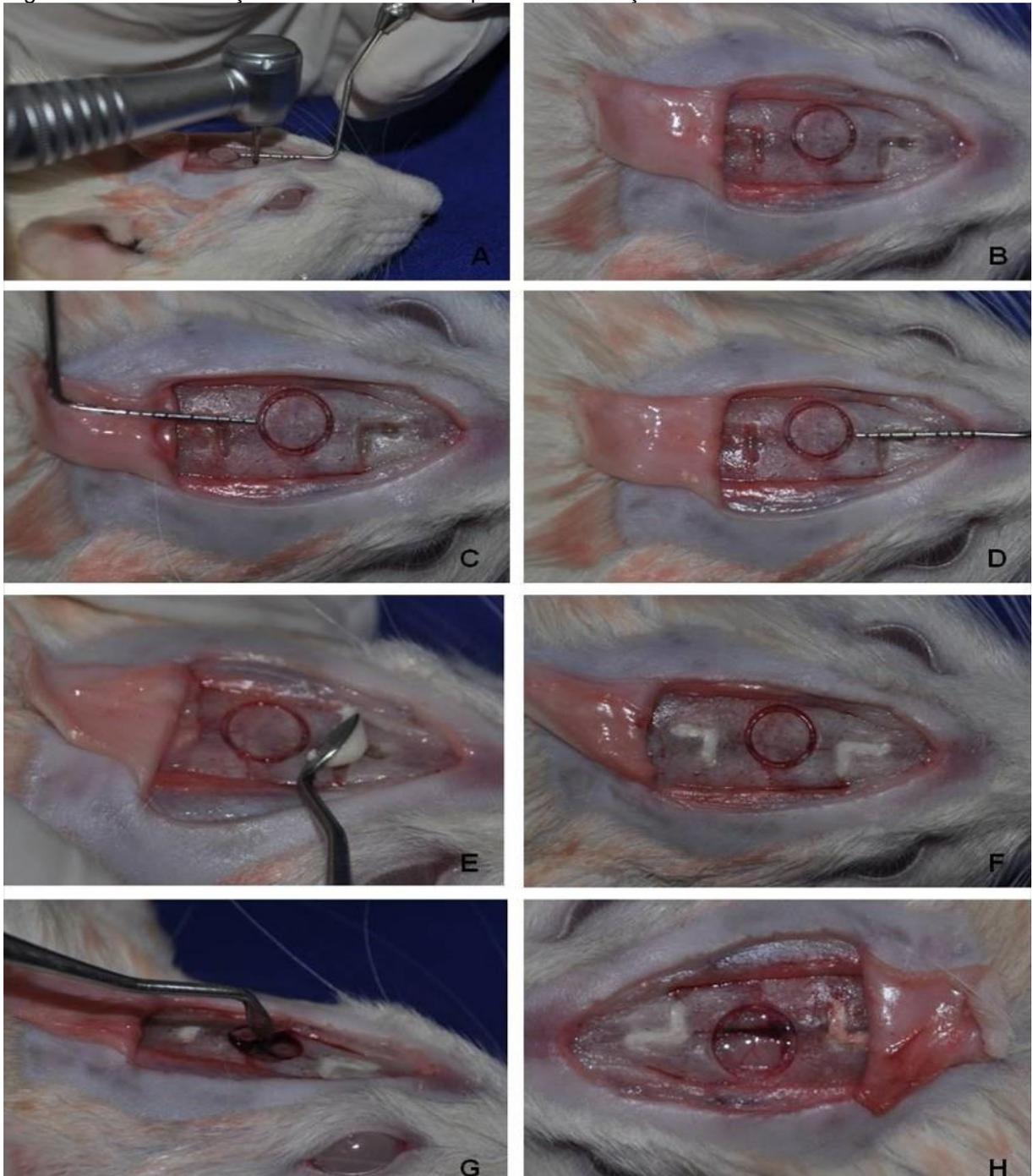
Figura 1 – Criação do defeito cirúrgico na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica



Fonte: Acervo do orientador.

Notas: (A) Tricotomia; (B) Incisão de base caudal; (C) Divulsão do retalho total; (D) Retalho divulsionado e afastado; (E) Osteotomia com broca trefina; (F) Defeito ósseo criado.

Figura 2 – Confeção das canaletas para identificação dos limites do defeito ósseo



Fonte: Acervo do orientador.

Notas: (A) Confeção das canaletas em “L” com ponta diamantada em alta rotação; (B) Canaletas posicionadas bilateralmente ao defeito ósseo; (C) Canaleta distanciada a 2mm da borda posterior do defeito; (D) canaleta a 2mm da borda anterior do defeito; (E) Preenchimento da canaleta com ionômero de vidro; (F) Canaletas preenchidas com ionômero; (G) Exérese do tecido ósseo ostectomizado; (H) Aspecto final do defeito ósseo.

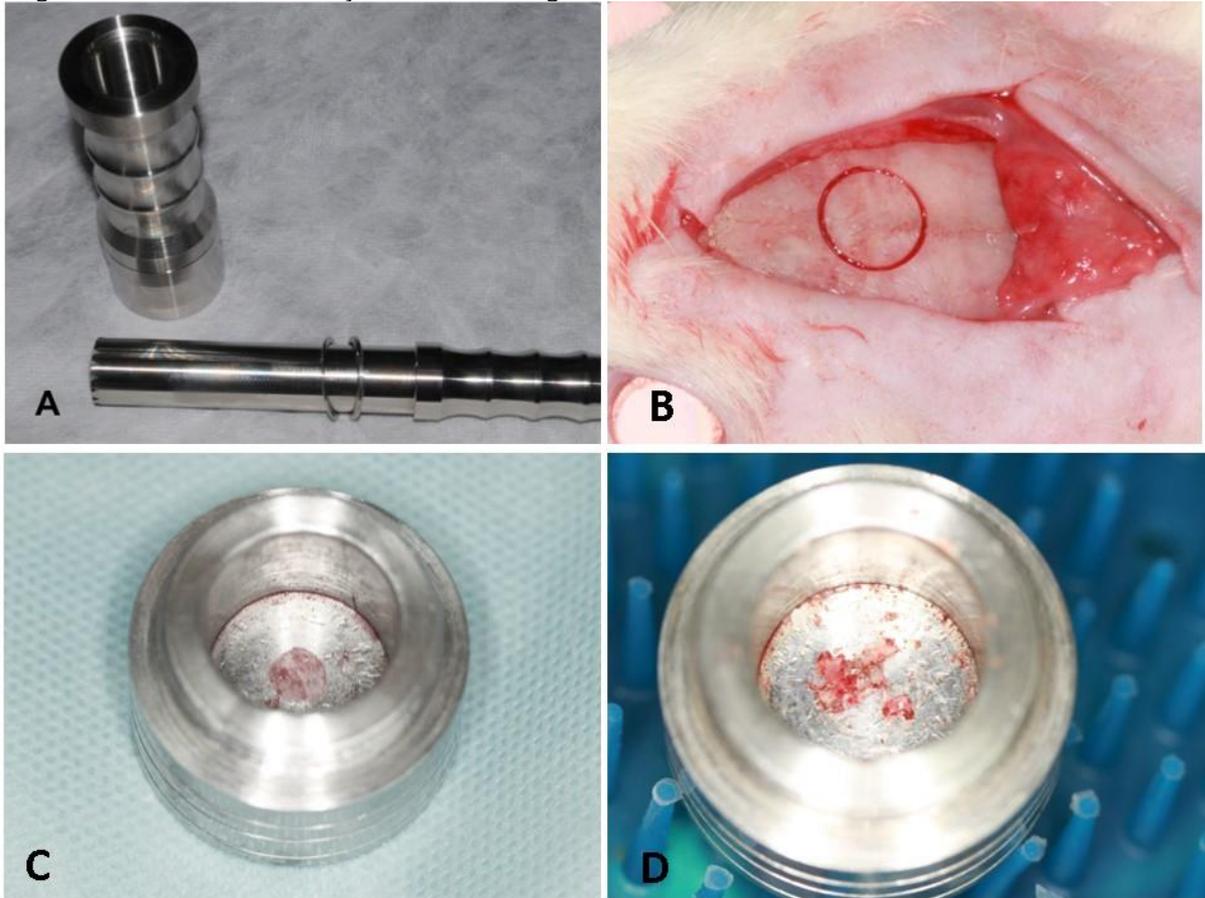
Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, com 8 ratos em cada grupo, considerando que se fez necessária a utilização do grupo controle negativo – coágulo sanguíneo preenchendo naturalmente os defeitos das calvárias – e o controle

positivo – defeitos preenchidos com osso autógeno considerado “padrão ouro” nos preenchimentos das cavidades ósseas:

- a) GRUPO CO (coágulo): uma cavidade cirúrgica de 5 mm de diâmetro na calvária do animal sem o preenchimento de nenhum material de enxerto, apenas com o coágulo sanguíneo natural.
- b) GRUPO AUT (autógeno): uma cavidade cirúrgica de 5 mm de diâmetro na calvária do animal com preenchimento de osso autógeno particulado e obtido da própria calvária do animal.
- c) GRUPO L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos): foi realizada na calvária do animal uma cavidade cirúrgica de 5 mm de diâmetro que permaneceu preenchida com L-PRF autógena.
- d) GRUPO BIO (osso bovino): uma cavidade cirúrgica de 5 mm de diâmetro na calvária do animal foi preenchida com osso bovino particulado (Bio-Oss®, Geistlich Pharma AG, Suíça);
- e) GRUPO BIO-L-PRF (osso bovino + fibrina rica em plaquetas e leucócitos): uma cavidade cirúrgica de 5 mm de diâmetro na calvária do animal foi preenchida com osso bovino particulado (Bio-Oss®, Geistlich Pharma AG, Suíça) associado à L-PRF autógena.

Para o grupo em que as cavidades foram preenchidas com osso autógeno, o osso da calota craniana removido com a broca trefina foi triturado com auxílio de um triturador para osso e devolvido à cavidade (Figura 3).

Figura 3 – Método de obtenção do osso autógeno



Fonte: Acervo do orientador.

Notas: (A) Triturador de osso; (B) Defeito ósseo criado na calvária com trefina; (C) Osso autógeno da calvária para trituração; (D) Osso da calvária triturado.

Para o grupo em que as cavidades foram preenchidas com L-PRF, o defeito ósseo foi preenchido com a L-PRF obtida a partir da centrifugação do sangue do próprio animal (protocolo descrito no ítem 4.3).

Depois de preenchidos os defeitos, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com fio de nylon 5-0.

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de penicilina G - benzatina 0,2mL/100mg de peso corporal (Pentabiótico Veterinário para animais de pequeno porte - Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil), via intramuscular, e uma dose analgésica de 0,5 ml de fosfato de codeína (ampola 30mg/2mL), por via intramuscular. As doses analgésicas foram administradas ao final do procedimento e por mais 3 dias de 4 em 4 horas (MARIANO et al. 2010).

O acompanhamento foi feito todos os dias na primeira semana do pós-operatório e de 15/15 dias, para avaliação clínica, alternando os animais a fim de minimizar o estresse gerado pelo manejo.

Cada grupo foi subdividido de acordo com os períodos experimentais de 4 e 8 semanas (MESSORA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

#### 4.3. PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DA L-PRF

A L-PRF seguiu os mesmos parâmetros descritos por Oliveira et al. (2015) em todos os seus passos descritos abaixo.

##### 4.3.1 Punção intracardíaca e retirada do sangue

Realizou-se a punção intracardíaca com agulha 25x7 acoplada em seringa de 5 ml (Prolab - Materiais para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil), diretamente no ventrículo esquerdo do animal (Figura 4). Um volume de aproximadamente 3,5 ml de sangue foi retirado e centrifugado imediatamente para a produção da L-PRF autógeno dos ratos que receberam o defeito na calvária.

Figura 4 - Punção intracardíaca e retirada do sangue para obtenção da L-PRF

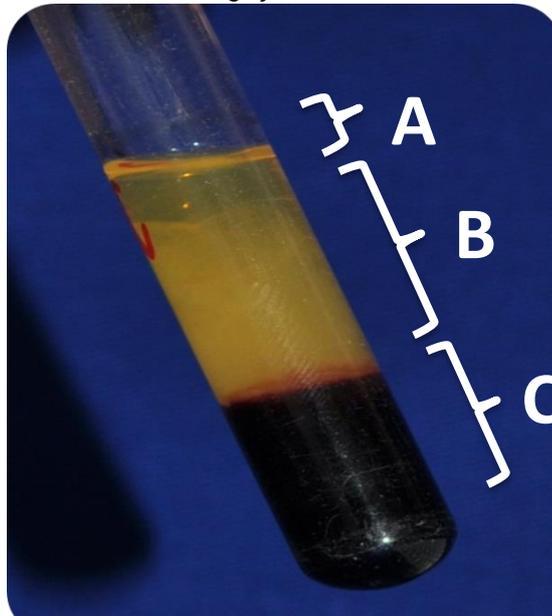


Fonte: Acervo do orientador.

#### 4.3.2 Separação celular

A separação dos elementos do sangue foi realizada por centrifugação (Centrífuga de Bancada NT 810, Novatécnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). O sangue coletado foi centrifugado uma única vez a 3000 rpm por 10 minutos sem a adição de qualquer anticoagulante como preconizado por Dohan et al. (2006), resultando em três componentes básicos: células vermelhas do sangue (fundo do tubo), Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos–L-PRF (meio do tubo) e plasma pobre em plaquetas ou componente seroso ou acelular-PPP (parte superior do tubo) como observado na Figura 5.

Figura 5 - Separação dos componentes do sangue após a centrifugação



Fonte: Acervo do orientador.

Nota: (A) plasma pobre em plaquetas (PPP); (B) Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF); (C) células vermelhas do sangue.

#### 4.3.3 Isolamento da L-PRF

Após a centrifugação, a porção do meio do tubo (L-PRF) foi pinçada para separá-la dos restantes dos componentes do sangue (Figura 6).

Figura 6 - Separação da L-PRF dos demais componentes do sangue por pinçamento



Fonte: Acervo do orientador.

#### 4.4 EUTANÁSIA

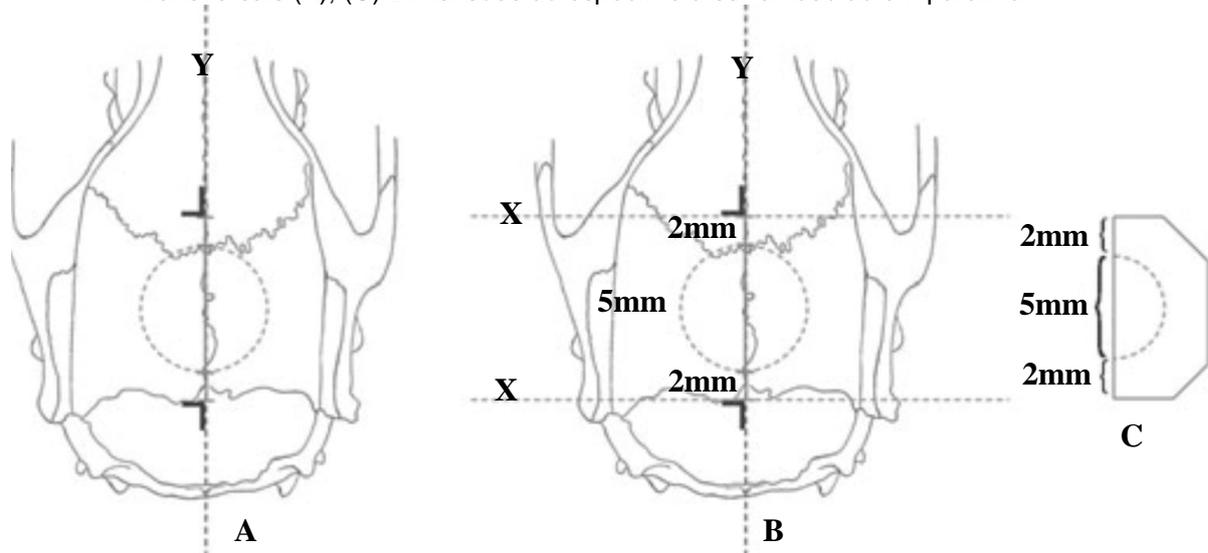
Quatro animais de cada grupo foram eutanasiados em 4 e 8 semanas pós-operatórias por inalação excessiva de gás carbônico (CO<sub>2</sub>).

#### 4.5 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS

As peças obtidas dos ratos foram fixadas em formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18%. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de ionômero de vidro com formato de “L” como referência. Foram realizados, também, cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime se apresentou com 9 mm de extensão no sentido longitudinal (Figura 7). Assim, tornou-se possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original. Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas

e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados no sentido longitudinal da peça com 5 micrometros de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas da Hematoxilina e Eosina (HE).

Figura 7 - (A) Corte longitudinal ao longo da linha central (Y) do defeito de tamanho crítico; (B) Cortes transversais (X); (C) Dimensões do espécime a ser embebido em parafina



Fonte: Adaptado de Messora et al. (2007).

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina foram avaliados qualitativamente em microscopia ótica, observando os seguintes aspectos (SILVA et al, 2016):

- Qualidade e intensidade da reação inflamatória desenvolvida;
- Presença de fibroblastos e fibras colágenas;
- Presença de tecido de granulação e formação das trabéculas ósseas;
- Tipo e qualidade do tecido formado no interior do defeito cirúrgico.

#### 4.7 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Os cortes histológicos foram selecionados de maneira que a neoformação óssea no defeito cirúrgico original pudesse ser avaliada histometricamente em toda a sua extensão em comparação ao volume ósseo total. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (AxioCam MRc 1.4 Mb

- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada à um microscópio óptico binocular (AxioLab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com um aumento original de 10X e 40x (lente objetiva N - Achroplan) e salvas em um computador. A análise histométrica foi realizada com o auxílio de um software (AxionVision 4.8, Carl Zeiss, Alemanha). Os seguintes critérios baseados nos trabalhos de Melo et al. (2005) e Messora et al. (2007) foram utilizados para padronizar a análise histométrica das imagens digitalizadas:

- 1) A área total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico. Esta área foi determinada pela identificação das superfícies interna e externa da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas curvaturas. Foram então medidas a partir das extremidades dos espécimes 2 mm em direção ao centro do defeito para estabelecer os limites do defeito cirúrgico original. A área de osso (AO) foi delineada dentro dos limites da área AT.
- 2) A AT foi medida em  $\mu\text{m}^2$  e considerada 100% da área a ser analisada. A AO também foi medida em  $\mu\text{m}^2$  e calculada como porcentagem de AT.

#### 4.8 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Foi realizada a inibição da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, a recuperação antigênica com tampão citrato a 60° por 20 minutos, e o bloqueio das reações inespecíficas com leite desnatado e albumina bovina durante as incubações dos anticorpos.

Foram utilizados os anticorpos primários contra RUNX 2 (fator 2 de transcrição relacionado ao Runt), OC (osteocalcina) (Santa Cruz Biotechnology®) e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e, anticorpo secundário biotilado (Pierce Biotechnology®), o amplificador Streptavidina Biotina (Dako®) e a diaminobenzidina (Dako®) como cromógeno. Ao término das reações foi realizada a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Harris. Foram realizados controles negativos (pela omissão dos anticorpos primários) para evitar a análise de falsos positivos.

Para a análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 16 e 25X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador com um software analisador de

imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). Três imagens foram obtidas de cada lâmina para análise: As duas bordas e o centro do defeito. Para efeito comparativo da intensidade das imunomarcações entre os grupos experimentais, foi criado um escore onde as imunomarcações foram classificadas em uma escala de 4 graus: ausente (-), leve (+), marcação moderada (++) e marcação intensa (+++). Assim, os escores utilizados foram: marcação, sendo consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos (PEDROSA, 2009).

Os escores referentes à intensidade de imunomarcação estão de acordo com trabalhos previamente publicados (PEDROSA, 2009; DEMPSTER et al, 2013; PEREIRA, 2017b).

## 5 RESULTADOS

Os animais se mantiveram saudáveis durante todo o período experimental, demonstrando boa tolerabilidade ao procedimento cirúrgico e ausência de sinais de infecção após as intervenções.

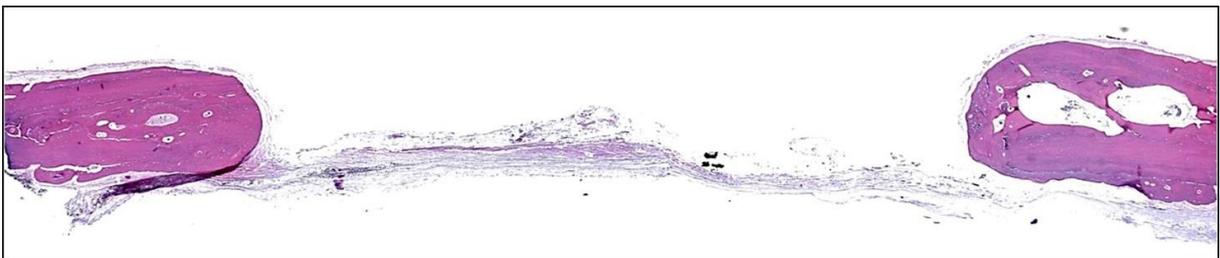
### 5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 4 SEMANAS

No período experimental de 4 semanas nenhum dos espécimes apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico.

#### 5.1.1 Grupo Coágulo (CO)

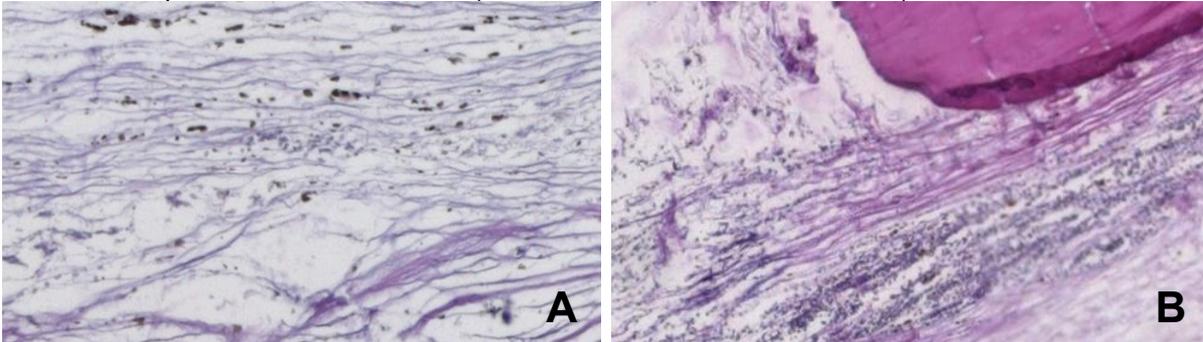
A formação óssea observada foi discreta, restrita às margens do defeito (Figura 8), sendo predominante a presença de tecido conjuntivo com um grande número de fibroblastos e poucas fibras colágenas (Figura 9A). A região do defeito mostrou espessura menor que a espessura da calvária original. Em alguns pontos pode-se observar a presença de infiltrado inflamatório (Figura 9B).

Figura 8 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 4 semanas (Aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 9 – (A) Tecido conjuntivo mostrando a presença de fibroblastos numa área de pouca formação de fibras colágenas do grupo CO no período experimental de 4 semanas (centro do defeito. Aumento 40x. HE); (B) presença de infiltrado inflamatório do grupo CO no período experimental de 4 semanas (borda do defeito. Aumento 10x. HE)

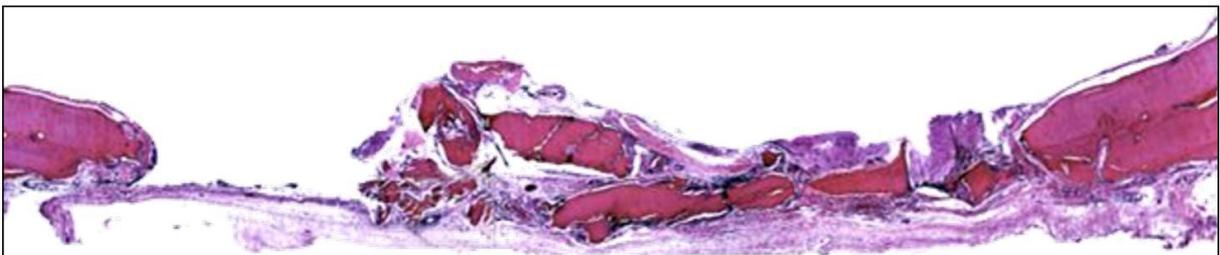


Fonte: Do autor.

### 5.1.2 Grupo Osso Autógeno (AUT)

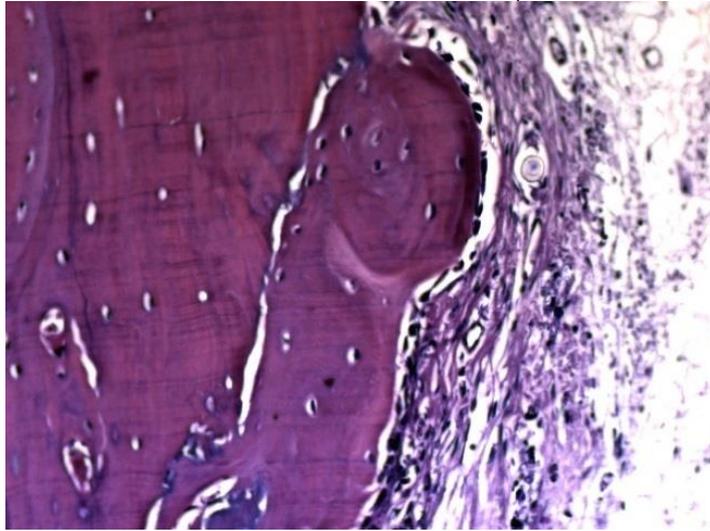
A análise microscópica dos cortes das calvárias do grupo mostrou neoformação óssea a partir das bordas do defeito em direção ao centro embora sem o preenchimento completo do defeito. O tecido ósseo neoformado apresentou um aspecto menos denso e mais vascularizado em relação ao osso nativo da calvária, permitindo a diferenciação da interface osso neoformado/nativo (Figura 11). Observou-se na região do osso neoformado manutenção da espessura do defeito (Figura 10).

Figura 10 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 4 semanas (Aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 11 – Osso neoformado junto ao osso nativo, com boa mineralização, circundado por tecido conjuntivo maduro do grupo AUT no período de 4 semanas (Borda do defeito. Aumento 40x. HE)

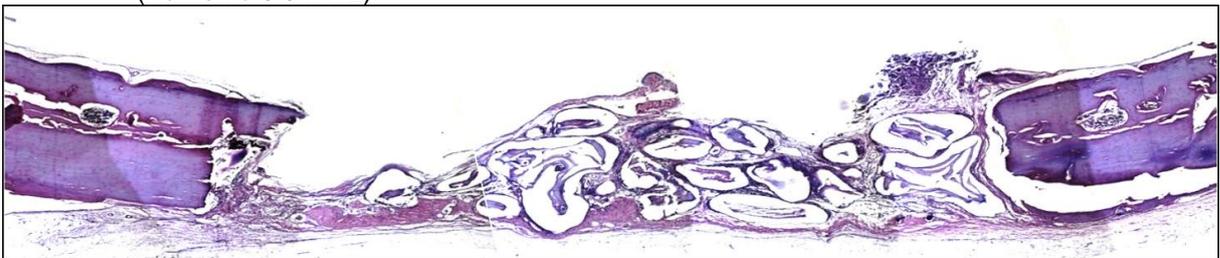


Fonte: Do autor.

### 5.1.3 Grupo Bio-Oss® (BIO)

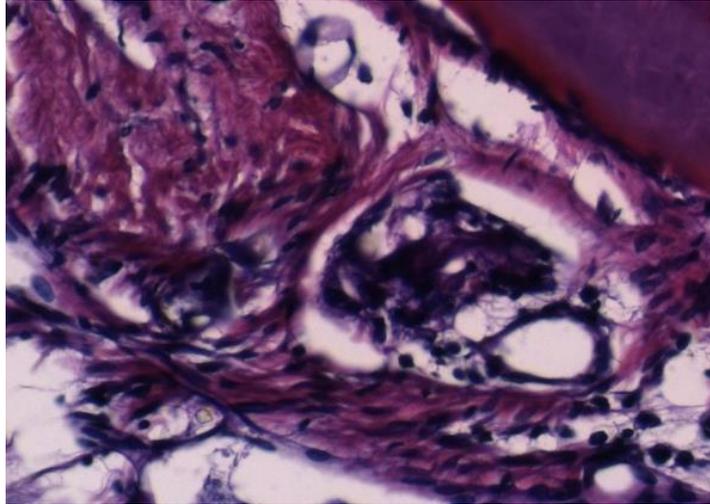
Novo osso bem desenvolvido foi observado restrito às margens do defeito. As partículas de Bio-Oss® preenchem a maior parte do defeito (Figura 12), mantendo a espessura da calvária original e apresentaram-se circundadas por tecido conjuntivo rico em fibroblastos, em alguns pontos com características de tecido maduro e bem organizado com presença de matriz osteóide e osteoblastos (Figura 13), e em outras regiões frouxo e desorganizado. A maioria das partículas apresentou-se fissurada com invaginação de tecido conjuntivo em suas fissuras e centros escavados. Em algumas áreas foi observada a presença de infiltrado inflamatório.

Figura 12 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO no período experimental de 4 semanas (Aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 13 – Tecido conjuntivo rico em fibroblastos, em alguns pontos com características de tecido maduro e bem organizados com presença de matriz osteóide e osteoblastos do grupo BIO no período experimental de 4 semanas (Aumento 40x. HE)

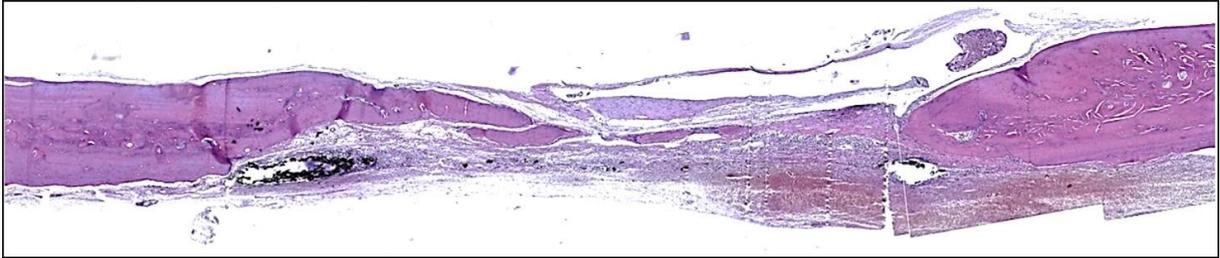


Fonte: Do autor.

#### 5.1.4 Grupo PRF-L (L-PRF)

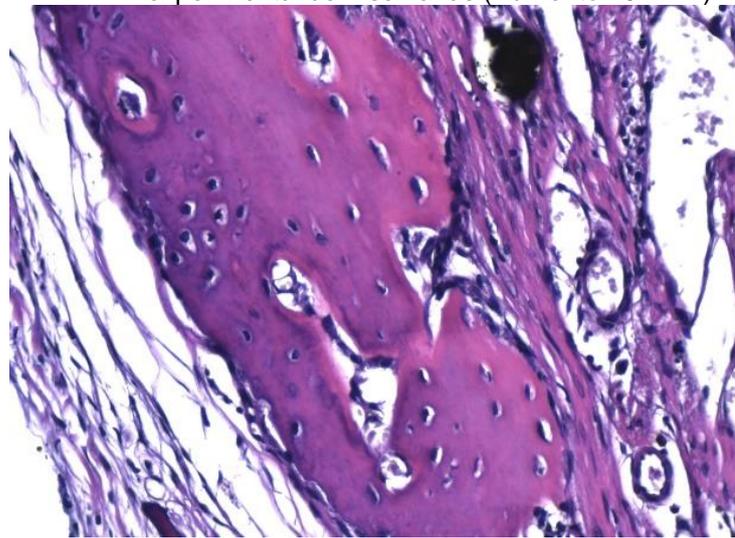
Foi notada neoformação óssea em ambas as margens do defeito ósseo, sendo mais evidente em uma das margens. A formação óssea progrediu das extremidades do defeito para o seu centro de forma que a menor espessura de tecido ósseo foi observada na porção central do defeito cirúrgico e grande parte do mesmo ainda encontrava-se repleto de tecido conjuntivo frouxo com moderada quantidade de fibroblastos e raras células inflamatórias. A porção de osso neoformado mostrava qualidade adequada caracterizada por trabéculas densas e tecido conjuntivo nas adjacências (Figura 15). Em alguns espécimes foram observadas formações ósseas “isoladas” ao longo do defeito (Figura 14).

Figura 14 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo L-PRF no período experimental de 4 semanas (Aumento 6,3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 15 – Trabéculas ósseas densas e tecido conjuntivo nas adjacências do grupo L-PRF no período experimental de 4 semanas (Aumento 40x. HE)



Fonte: Do autor.

#### 5.1.5 Grupo Bio-Oss® associado ao L-PRF (BIO-L-PRF)

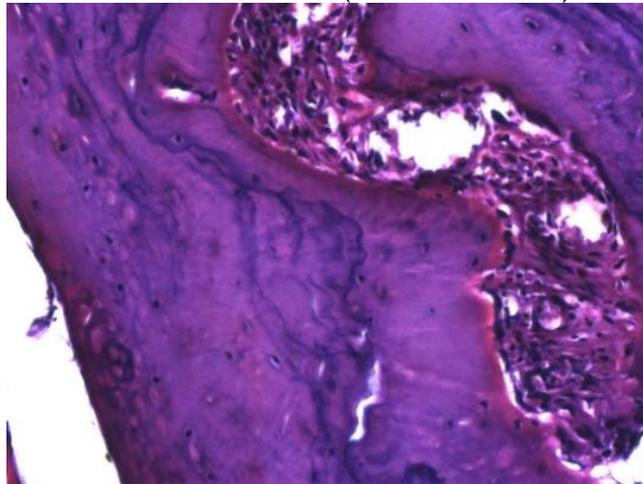
Uma neoformação óssea bem desenvolvida foi observada em todos os espécimes sendo maior em uma das margens do defeito e aproximando-se de sua região central. A espessura do novo osso acompanhou a espessura da calvária original. As partículas de Bio-Oss® encontravam-se distribuídas ao longo do defeito e circundadas por tecido conjuntivo maduro, com muitas fibras colágenas e moderada quantidade de células e vasos sanguíneos associados à grande quantidade de matriz osteóide (Figura 16). O aspecto fissurado das partículas e presença de centros escavados ao redor das mesmas com invaginação de tecido conjuntivo foi percebido em várias regiões. Outras regiões mostraram formação óssea importante (Figura 17).

Figura 16 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 4 semanas (aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 17 - Osso neoformado e tecido conjuntivo nas regiões próximas à borda do defeito e áreas com osteoblastos e matriz osteóide do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 4 semanas (Aumento 40x. HE)



Fonte: Do autor.

## 5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 8 SEMANAS

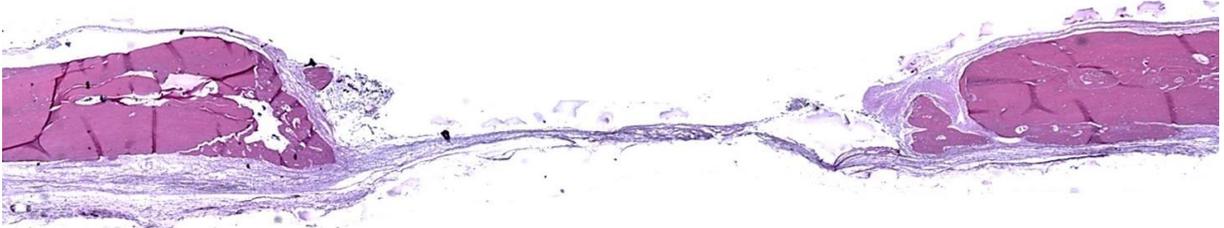
Igualmente ao período experimental de 4 semanas, o período experimental de 8 semanas nenhum dos espécimes apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico.

### 5.2.1 Grupo Coágulo (CO)

A formação óssea permaneceu limitada às margens do mesmo. Porém, maior quantidade de trabéculas ósseas foi observada e o tecido ósseo apresentou-se bem

desenvolvido. O tecido conjuntivo ao longo do defeito apresentou grande quantidade de fibras colágenas e espessura bem menor que a espessura da calvária original (Figura 18).

Figura 18 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE)

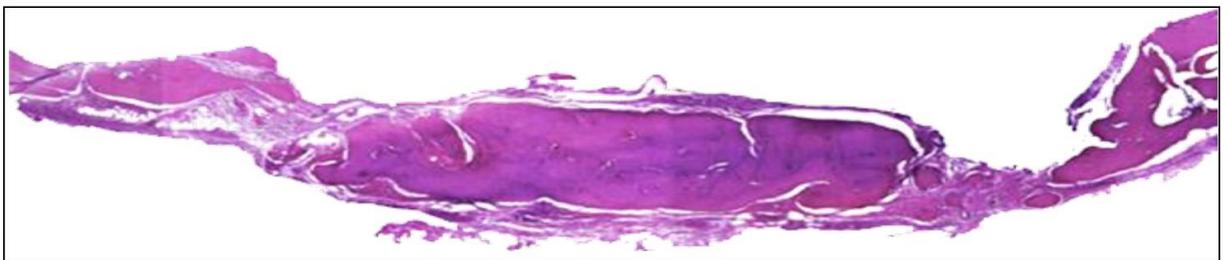


Fonte: Do autor.

### 5.2.2 Grupo Osso Autógeno (AUT)

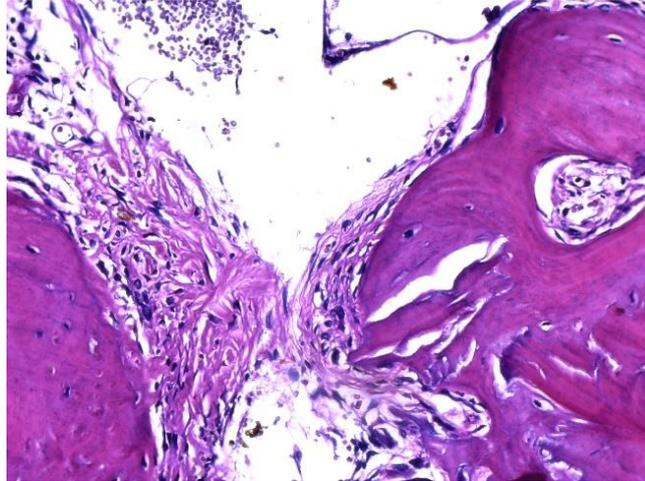
A análise microscópica dos espécimes mostrou neoformação de tecido ósseo nas margens do defeito cirúrgico com maior intensidade em relação ao período anterior (Figura 19). Observa-se que a maior parte do defeito está preenchido por tecido ósseo neoformado, com manutenção da altura das margens ósseas (Figura 20).

Figura 19 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 20 – Osso neoformado no centro do defeito, com tecido conjuntivo maduro entre as trabéculas no grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento 40x. HE)

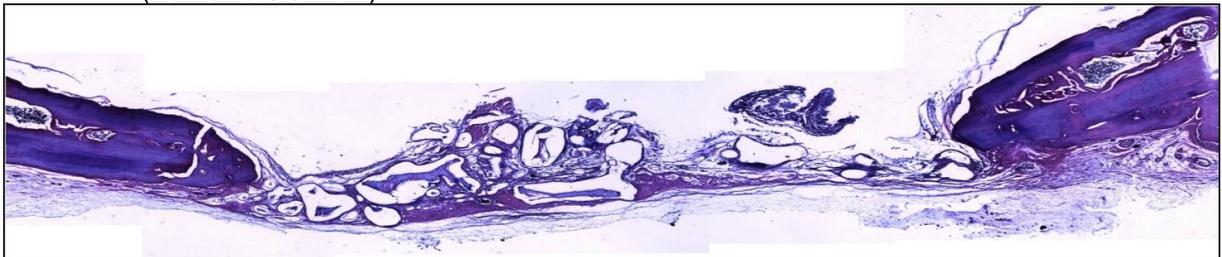


Fonte: Do autor.

### 5.2.3 Grupo Bio-Oss® (BIO)

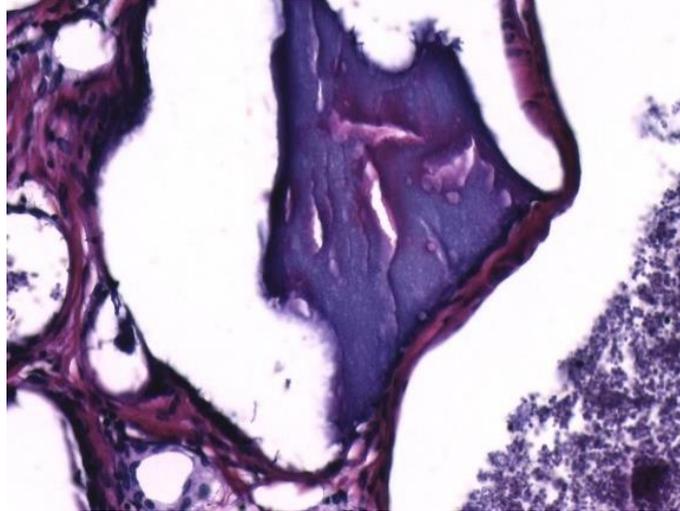
Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. A maior neoformação óssea localizou-se próxima as margens do defeito de ambos os lados, estendendo-se em direção ao seu centro. Em vários pontos foram observadas trabéculas ósseas isoladas ao longo do defeito. As partículas de Bio-Oss® apresentaram invaginação de tecido conjuntivo em seus centros escavados e fissuras (Figura 22). Entretanto, foi percebido um tecido conjuntivo mais denso, organizado e com presença de matriz osteóide e maior neoformação óssea neste período experimental do que no período de 4 semanas. Uma tendência de manutenção da espessura da calvária original no novo osso depositado e tecido conjuntivo circunjacente foi observada (Figura 21).

Figura 21 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 22 - Partícula de osso bovino remanescente e tecido conjuntivo e matriz osteóide nas adjacências. Infiltrado inflamatório à direita (Grupo BIO. 8 semanas. Aumento 40x. HE)

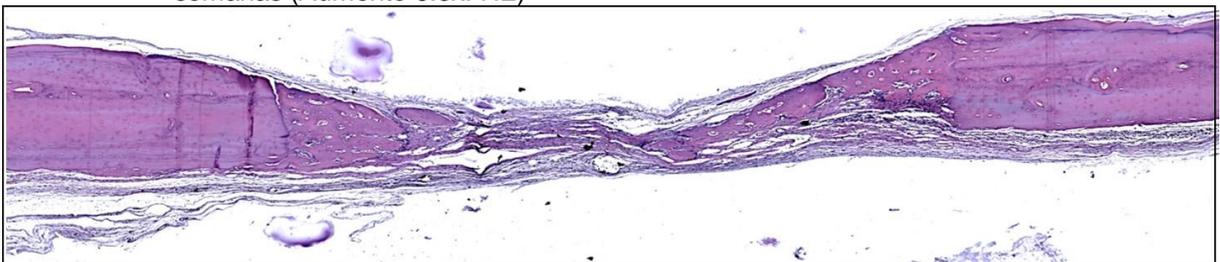


Fonte: Do autor.

#### 5.2.4 Grupo L-PRF

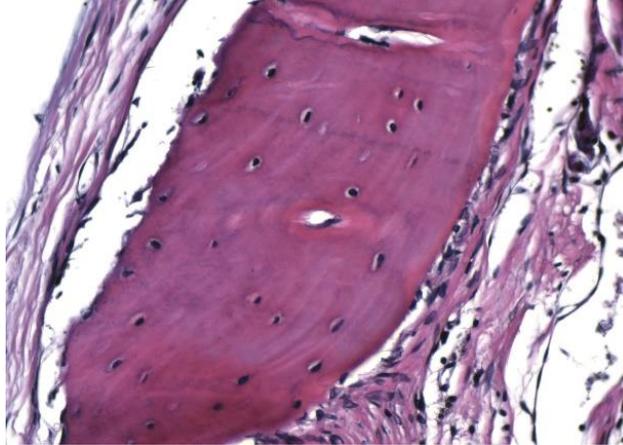
Nenhum espécime apresentou formação óssea ao longo de todo o defeito. Tecido ósseo neoformado bem desenvolvido foi observado próximo às margens do defeito e ao longo do mesmo, trabéculas ósseas isoladas foram vistas entre o tecido conjuntivo denso e organizado (Figura 24). Os tecidos ósseo e conjuntivo depositados ao longo do defeito apresentaram espessura discretamente menor à espessura original da calvária (Figura 23).

Figura 23 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo L-PRF no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 24 – Osso com características de maduro e tecido conjuntivo bem organizado nas adjacências e locais de matriz osteóide formada do grupo L-PRF no período experimental de 8 semanas. (Aumento 40x. HE)

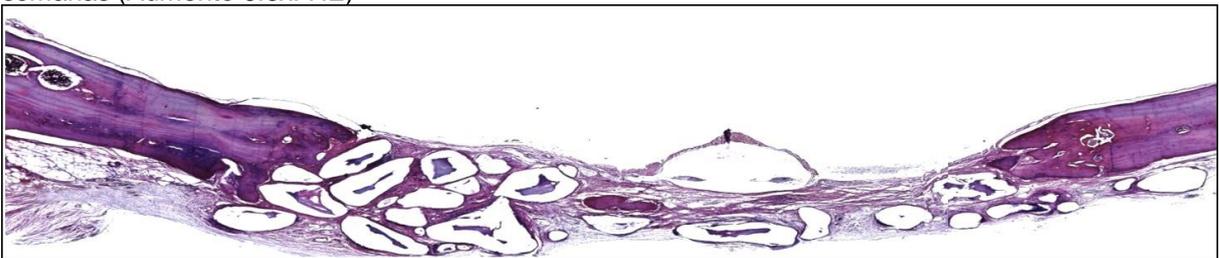


Fonte: Do autor.

#### 5.2.5 Grupo Bio-Oss® associado ao L-PRF (BIO-L-PRF)

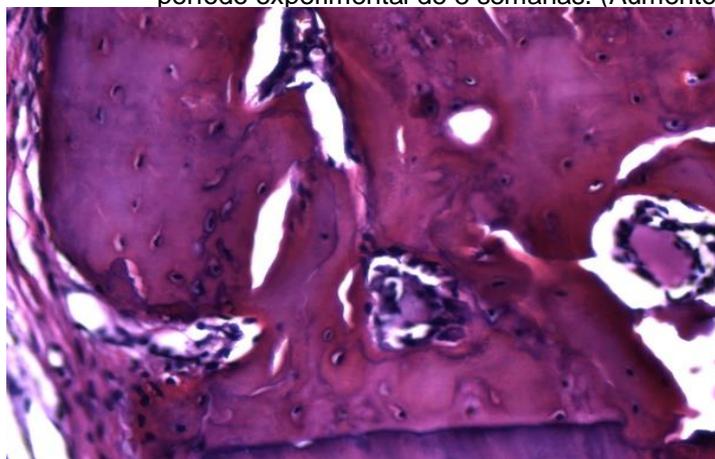
Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito ósseo. O novo osso foi depositado das margens do defeito em direção ao seu centro. Em todos os espécimes foi observada uma manutenção da espessura da calvária original no tecido ósseo neoformado. As partículas de Bio-Oss® encontraram-se dispersas ao longo do defeito, sendo encontradas em menor número e tamanho quando comparadas ao período experimental de 4 semanas. As partículas remanescentes apresentavam-se fissuradas e circundadas por centros escavados com tecido conjuntivo bem organizado invaginado e matriz osteóide em abundância (Figura 25). Em diversos pontos do defeito já havia ausência das partículas de Bio-Oss® que deram lugar a formações ósseas isoladas (Figura 26).

Figura 25 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 8 semanas (Aumento 6.3x. HE)



Fonte: Do autor.

Figura 26 – Região próxima à borda do defeito com ausência das partículas de Bio-Oss® e com formações ósseas isoladas do grupo BIO-L-PRF no período experimental de 8 semanas. (Aumento 40x. HE)



Fonte: Do autor.

### 5.3 ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA

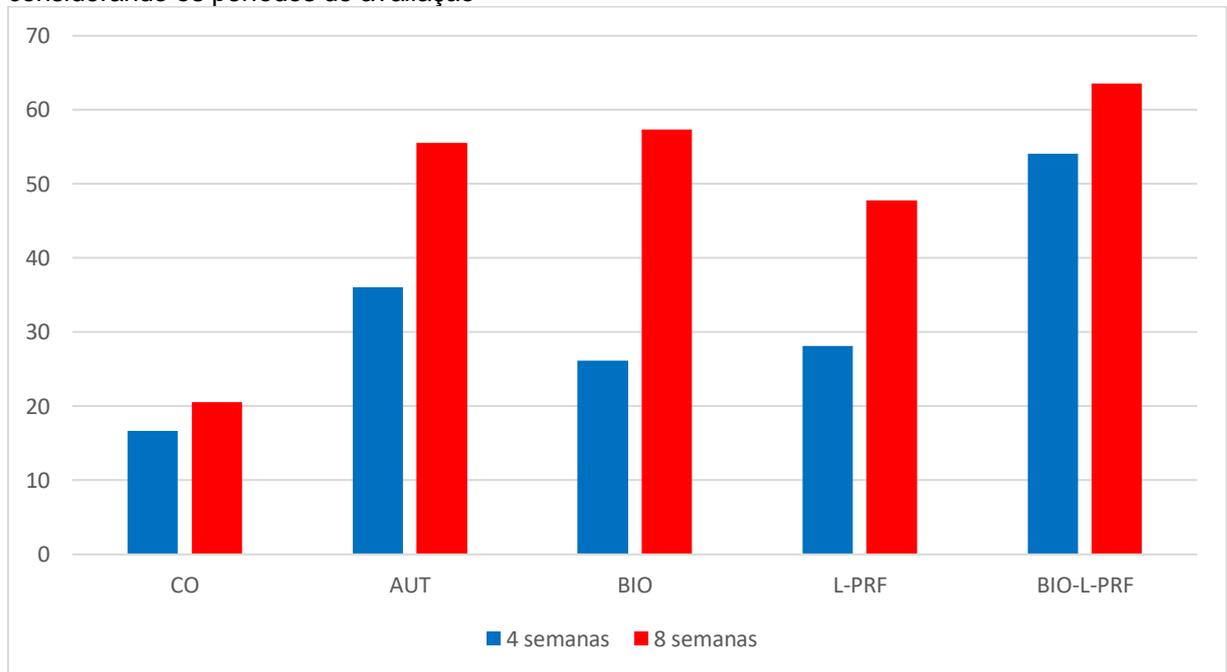
A percentagem de formação óssea levando-se em conta a AT (área total do defeito) e AO (área de osso) de cada espécime segundo os períodos e grupos experimentais serviram para o cálculo das médias percentuais da histometria da AO, mostrada na Tabela 1. Observa-se que a maior média percentual de formação óssea tanto no período de 4 como no de 8 semanas foi encontrada no grupo BIO-L-PRF, correspondendo a 54,05% e 63,58% respectivamente. A menor média percentual foi observada no grupo CO para 4 e 8 semanas com médias de 16,70% e 20,55%, respectivamente e sem diferença estatística significativa (TABELA 5). Isso reforça que o defeito na calvária de 5mm pode mesmo ser considerado defeito de tamanho crítico.

**Tabela 1** - Médias percentuais e desvio padrão dos dados da histometria da AO segundo os períodos experimentais

Grupo	N	4 semanas			8 semanas	
		Média	Desvio padrão	n	Média	Desvio padrão
CO	4	16,70	2,4724	4	20,55	0,9842
AUT	4	36,05	5,6991	4	55,56	1,5572
BIO	4	26,15	1,6831	4	57,34	1,4703
L-PRF	4	28,12	2,0767	4	47,75	1,6769
BIO-L-PRF	4	54,05	2,8349	4	63,58	2,1915

Fonte: Do autor.

**Gráfico 1** - Representação gráfica das médias percentuais da AO nos diferentes grupos experimentais, considerando os períodos de avaliação



Fonte: Do autor.

Após a submissão dos dados de histometria da AO dos diferentes grupos e períodos experimentais à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatística entre os dados ( $\alpha < 0,05$ ) (TABELA 2). Então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para poder observar entre quais períodos ocorreram estas diferenças (TABELA 5).

Quando se considerou todo o período experimental, a comparação entre os grupos mostrou semelhança estatística entre os Grupos Autógeno e os grupos com Bio-Oss® e L-PRF (TABELA 3). Isso reforça o bom desempenho como material de preenchimento promovido pelo Bio-Oss® e/ou L-PRF.

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os grupos

<b>ANOVA</b>					
<b>Causas da variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>Valor de f</b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>Histometria X Grupos</b>	4	68,102	17,020	15,3211	0,0001
<b>Resíduo</b>	35	38,900	111,051		
<b>Total corrigido</b>	39	106,002			

Fonte: Do autor.

Notas: G.L.: graus de liberdade; S.Q.: soma dos quadrados; Q.M.: média dos quadrados.

**Tabela 3** – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os grupos

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Homogeneidade</b>
<b>CO</b>	8	18,6250	A
<b>AUT</b>	8	45,8550	B
<b>BIO</b>	8	41,7450	BC
<b>L-PRF</b>	8	37,9350	C
<b>BIO-L-PRF</b>	8	58,8150	BD

<b>Contraste</b>	<b>Diferença</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>
<b>1-2</b>	27,2300	7,3085	<0,01
<b>1-3</b>	23,1200	6,2054	<0,01
<b>1-4</b>	19,3100	5,1828	<0,01
<b>1-5</b>	40,1900	10,7870	<0,01
<b>2-3</b>	4,1100	1,1031	ns
<b>2-4</b>	7,9200	2,1257	ns
<b>2-5</b>	12,9600	3,4785	ns
<b>3-4</b>	3,8100	1,0226	ns
<b>3-5</b>	17,0700	4,5816	<0,05
<b>4-5</b>	20,8800	5,6042	<0,01

Fonte: Do autor.

Nota: ns: não significativa.

**Tabela 4** – Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os períodos experimentais

<b>ANOVA</b>					
<b>Causas da variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>Valor de f</b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>Grupos</b>	3	25,4019	8,467	1.2679	0,3049
<b>Períodos</b>	9	10486,809	1165,201	174,4793	0,0001
<b>Resíduo</b>	27	180,310	6,678		
<b>Total corrigido</b>	39	10692,5209			

Fonte: Do autor.

Notas: G.L.: graus de liberdade; S.Q.: soma dos quadrados; Q.M.: média dos quadrados.

**Tabela 5** – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos experimentais  
(Continua)

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Homogeneidade</b>		
<b>1.CO 4 sem</b>	4	16,70	A		
<b>2.AUT 4 sem</b>	4	36,05	B		
<b>3.BIO 4 sem</b>	4	26,15	C		
<b>4.L-PRF 4 sem</b>	4	28,12	C		
<b>5.BIO-L-PRF 4 sem</b>	4	54,05	D		
<b>6.CO 8 sem</b>	4	20,55	A		
<b>7.AUT 8 sem</b>	4	55,56	D		
<b>8.BIO 8 sem</b>	4	57,34	D		
<b>9.L-PRF 8 sem</b>	4	47,75	E		
<b>10.BIO-L-PRF 8 sem</b>	4	63,58	DF		

<b>Contraste</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>	<b>Contraste</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>
<b>1-2</b>	15,0529	<0,01	<b>4-10</b>	27,4436	<0,01
<b>1-3</b>	7,3136	<0,01	<b>5-6</b>	25,9266	<0,01
<b>1-4</b>	8,8383	<0,01	<b>5-7</b>	1,1686	ns
<b>1-5</b>	28,9063	<0,01	<b>5-8</b>	2,5462	ns
<b>1-6</b>	2,9796	ns	<b>5-9</b>	4,8758	<0,05
<b>2-3</b>	7,7393	<0,01	<b>5-10</b>	7,3756	<0,01
<b>2-4</b>	6,2147	<0,01	<b>6-10</b>	33,3022	<0,01
<b>2-5</b>	13,8533	<0,01	<b>7-9</b>	6,0444	<0,01
<b>3-4</b>	1,5246	ns	<b>7-10</b>	6,2069	<0,01
<b>3-5</b>	21,5926	<0,01	<b>8-9</b>	7,4220	<0,01
<b>3-8</b>	24,1389	<0,01	<b>8-10</b>	4,8293	ns
<b>4-5</b>	20,0680	<0,01	<b>9-10</b>	12,2513	<0,01
<b>4-9</b>	15,1922	<0,01			
<b>1-2</b>	15,0529	<0,01	<b>4-10</b>	27,4436	<0,01
<b>1-3</b>	7,3136	<0,01	<b>5-6</b>	25,9266	<0,01
<b>1-4</b>	8,8383	<0,01	<b>5-7</b>	1,1686	ns
<b>1-5</b>	28,9063	<0,01	<b>5-8</b>	2,5462	ns
<b>1-6</b>	2,9796	ns	<b>5-9</b>	4,8758	<0,05
<b>2-3</b>	7,7393	<0,01	<b>5-10</b>	7,3756	<0,01

(Continuação)					
<b>Contraste</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>	<b>Contraste</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>
<b>2-4</b>	6,2147	<0,01	<b>6-10</b>	33,3022	<0,01
<b>2-5</b>	13,8533	<0,01	<b>7-9</b>	6,0444	<0,01
<b>3-4</b>	1,5246	ns	<b>7-10</b>	6,2069	<0,01

Fonte: Do autor.

Nota: ns: não significante.

#### 5.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A utilização dos anticorpos primários contra RUNX 2 (fator 2 de transcrição relacionado ao Runt), VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e OC (osteocalcina) (Santa Cruz Biotechnology®), anticorpo secundário biotilado (Pierce Biotechnology®), o amplificador Streptavidina Biotina (Dako®) e a diaminobenzidina (Dako®) como cromógeno, permitiram através da captação das imagens dos cortes histológicos, que fosse realizada a análise imunoistoquímica nos grupos experimentais abaixo nos períodos de 4 e 8 semanas.

As fotomicrografias com a imunomarcação RUNX 2, obtidas no período de 4 semanas para o Grupo BIO (Bio-Oss®) mostraram uma leve coloração para essa proteína. No período de 8 semanas percebe-se uma menor expressão de RUNX 2 para todos os grupos indicando uma menor atividade de diferenciação osteoblástica.

Na análise das imunomarcações para OC foram observadas marcações positivas nos osteoblastos dos três grupos experimentais avaliados. O biomarcador OC mostrou-se menos presente nos grupos do período de 4 semanas e foram expressos com intensidade moderada no período de 8 semanas. Isso pode ser explicado pelo aumento de atividade da mineralização óssea com atuação agora de osteoclastos, colaborando no processo de remodelação do defeito. Especificamente no período de 8 semanas, nas áreas em que houve formação óssea, foi observada a marcação de osteocalcina junto à matriz óssea mineralizada, mostrando maior grau de maturidade nestes espécimes. Foi observada imunomarcação leve para o grupo CO em 4 e 8 semanas. Para os grupos AUT e BIO e BIO-L-PRF, no período de 8 semanas, a imunomarcação foi moderada.

O VEGF foi o marcador que apresentou maior expressão nesse estudo por se relacionar com o processo cicatricial inicial, pois promove a migração e proliferação

de células endoteliais na região do defeito. Mesmo após semanas, o VEGF foi encontrado mantendo uma expressão moderada.

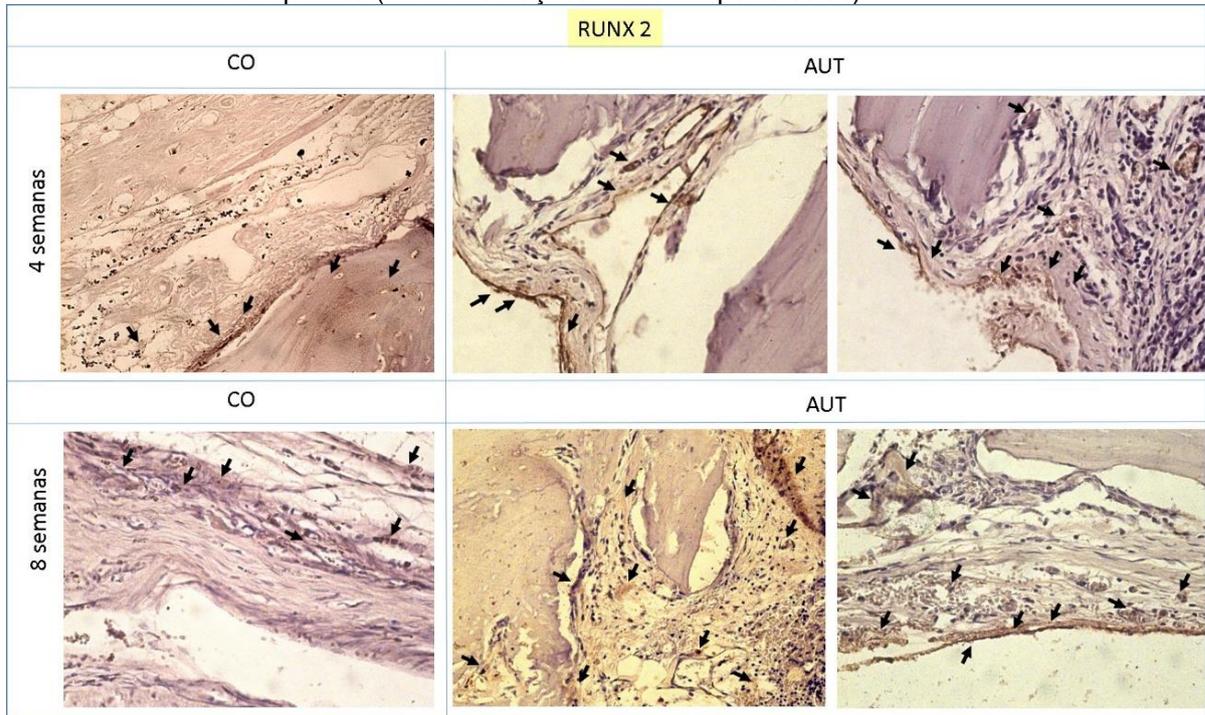
Tabela 6 - Médias dos dados da análise imunoistoquímica da borda do defeito (BD) e centro do defeito (CD) para RUNX 2 segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	BD	CD	Moda	BD	CD	Moda
<b>CO</b>	+	+		+	+	
	+	-		+	+	
	+	-	+	+	+	+
<b>AUT</b>	+	+		+	-	
	++	++		++	++	
	++	++	++	+	+	
<b>BIO</b>	++	++		+	+	+
	+	+		+	+	
	+	+	+	+	+	+
<b>L-PRF</b>	+	+		+	+	
	++	++		+	+	
	++	++	++	+	+	+
<b>BIO-L-PRF</b>	++	++		+	+	
	++	++		+	+	
	++	++	++	++	++	+
	++	++		+	+	
	++	++		+	+	

Fonte: Do autor.

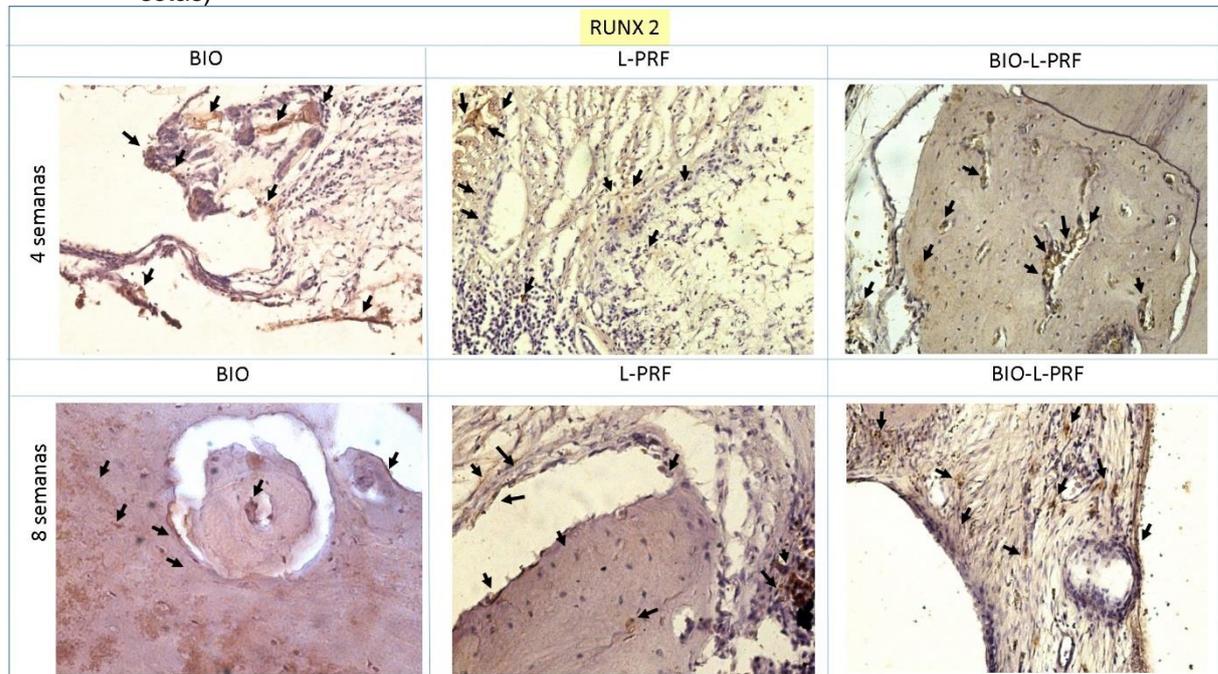
Notas: (-): marcação ausente; (+): marcação leve; (++) : marcação moderada; (+++) : marcação intensa.

Figura 27 – Imunomarcção de RUNX 2 no período de 4 semanas para os grupos experimentais (CO: leve; AUT: moderada) e período de 8 semanas (CO: leve; AUT: leve) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas)



Fonte: Do autor.

Figura 28 – Imunomarcção de RUNX 2 no período de 4 semanas para os grupos experimentais (BIO: leve; L-PRF: moderada; BIO-L-PRF: moderada) e período de 8 semanas (BIO: leve; L-PRF: leve; BIO-L-PRF: leve) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas)



Fonte: do autor.

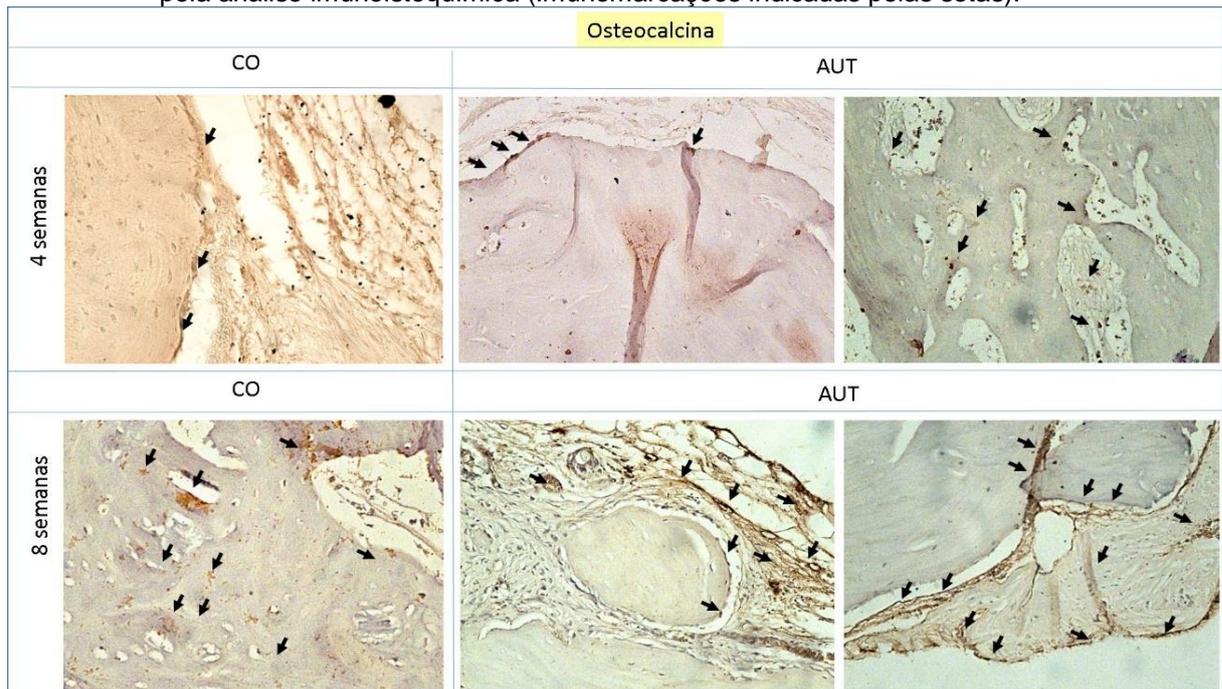
Tabela 7 – Médias dos dados da análise imunoistoquímica da borda do defeito (BD) e centro do defeito (CD) para OC segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	BD	CD	Moda	BD	CD	Moda
<b>CO</b>	+	-		++	-	
	++	+	+	++	+	+
	+	-		+	-	
<b>AUT</b>	+	-		+	-	
	+	+		++	+	
	+	+	+	++	++	++
<b>BIO</b>	++	+		+	++	
	+	+		++	++	
	+	+		++	+	
<b>L-PRF</b>	++	+	+	++	+	++
	++	++		++	++	
	+	+		++	++	
<b>BIO-L-PRF</b>	+	+	+	+	+	+
	+	+		++	+	
	+	+		+	+	
<b>BIO-L-PRF</b>	++	+		++	+	
	+	+	+	++	+	++
	++	+		++	++	
	+	+		++	++	

Fonte: Do autor.

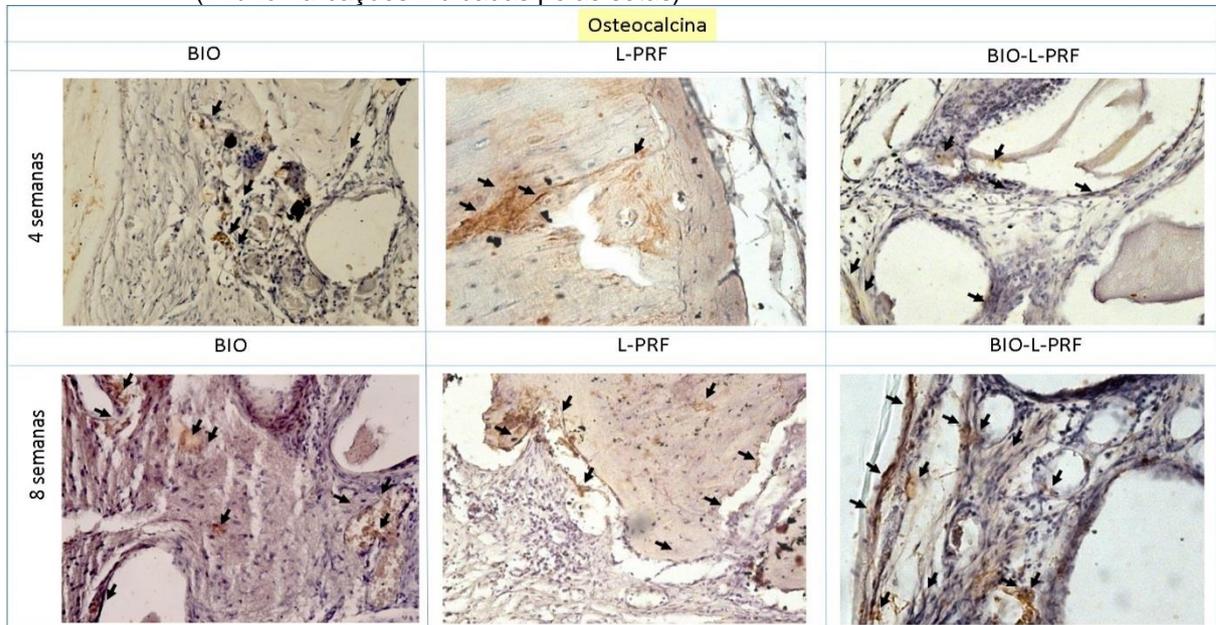
Notas: (-): marcação ausente; (+): marcação leve; (++) : marcação moderada; (+++) : marcação intensa.

Figura 29 – Imunomarcação de osteocalcina (OC) no período de 4 semanas para os grupos experimentais (CO: leve; AUT: leve) e período de 8 semanas (CO: leve; AUT: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).



Fonte: do autor.

Figura 30 – Imunomarcção de osteocalcina (OC) no período de 4 semanas para os grupos experimentais (BIO: leve; L-PRF: leve; BIO-L-PRF: leve) e período de 8 semanas (BIO: moderada; L-PRF: leve; BIO-L-PRF: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas)



Fonte: Do autor.

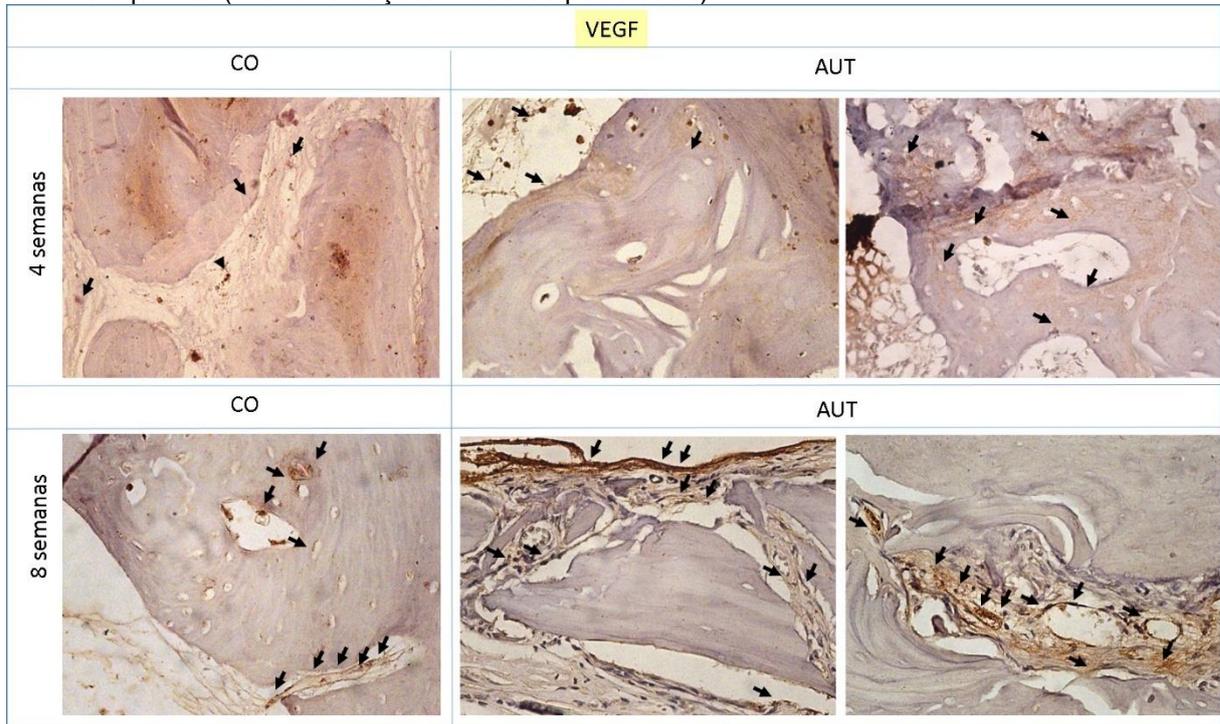
Tabela 8 - Médias dos dados da análise imunoistoquímica da borda do defeito (BD) e centro do defeito (CD) para VEGF segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	BD	CD	Moda	BD	CD	Moda
<b>CO</b>	+	-		+	+	
	+	+	+	+	+	+
	++	+		++	++	
<b>AUT</b>	++	+		++	+	
	+	+		++	+++	
	++	++	++	++	++	++
<b>BIO</b>	+	++		++	++	
	++	++	++	++	++	++
	++	++		++	++	
<b>L-PRF</b>	++	++		+	+	
	+++	++		++	++	
	+++	+++	+++	++	++	++
<b>BIO-L-PRF</b>	++	+++		++	+	++
	+++	++		++	++	
	++	++	++	++	+	++
	++	++	++	++	++	++
	++	++		++	++	++
	++	++		++	+	

Fonte: Do autor.

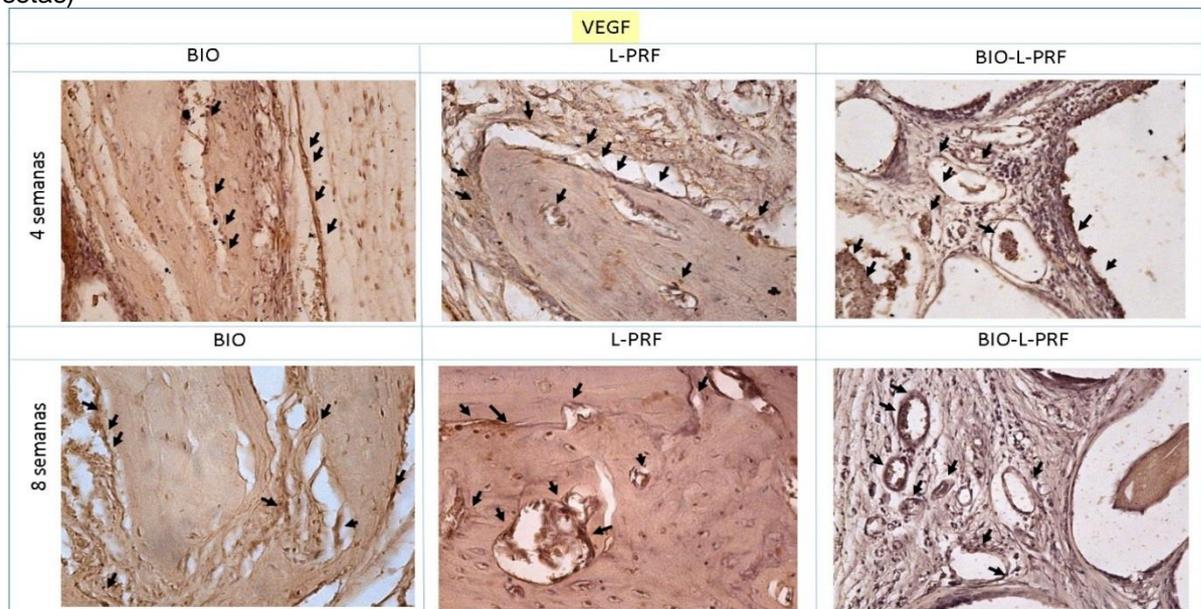
Notas: (-): marcação ausente; (+): marcação leve; (++) : marcação moderada; (+++): marcação intensa.

Figura 31 – Imunomarcção de VEGF no período de 4 semanas para os grupos experimentais (CO: leve; AUT: moderada) e período de 8 semanas (CO: leve; AUT: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas)



Fonte: Do autor.

Figura 32 – Imunomarcção de VEGF no período de 4 semanas para os grupos experimentais (BIO: moderada; L-PRF: intensa; BIO-L-PRF: moderada) e período de 8 semanas (BIO: moderada; L-PRF: moderada; BIO-L-PRF: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas)



Fonte: Do autor.

## 6 DISCUSSÃO

A hipótese apresentada de que a associação da L-PRF ao osso bovino permitiria melhorias na cicatrização dos defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos pode ser demonstrada nos estudos histológicos e marcações imunoistoquímicas, evidenciados pelos aspectos histológicos dos tecidos em formação e através das observações do papel de três marcadores imunológicos envolvidos no processo de reparo ósseo: RUNX 2, Osteocalcina e VEGF.

As últimas décadas foram marcadas pela evidente preferência pela reabilitação oral com próteses implanto-suportadas como opção para substituição e reposição dos dentes perdidos. No entanto, para lidar com as limitações anatômicas, vários procedimentos coadjuvantes para o aumento do osso alveolar atrófico, antes da colocação do implante, têm sido essenciais. Estes procedimentos incluem enxertos autógenos, técnicas de elevação do assoalho do seio maxilar, regeneração óssea guiada e preservação do rebordo alveolar. Mas, apesar do grande número de substitutos ósseos disponíveis, todos apresentam vantagens e desvantagens, explicando o grande número de pesquisas que buscam novos biomateriais para esta finalidade (YIP et al., 2014).

Para determinar as características vantajosas de um material a ser empregado como substituto ósseo, a verificação dos requisitos de biocompatibilidade, estabilidade, segurança e previsibilidade, tanto *in vitro* como *in vivo* deve ser realizada. Mas como os resultados de estudos *in vitro* podem ser difíceis de extrapolar para a situação *in vivo*, a utilização de modelos animais é, ainda, muitas vezes um passo essencial que precede o uso clínico em seres humanos (HOLLINGER, KLEINSCHMIDT, 1990; GARDEL et al., 2014).

E como descrito anteriormente, este trabalho objetivou avaliar o efeito isolado ou combinado da L-PRF e do enxerto ósseo bovino sobre o reparo ósseo de defeitos críticos na calvária de ratos por meio de análises histométrica e imunoistoquímica. O modelo experimental utilizado para este fim pareceu apropriado, já que modelos bem conduzidos e totalmente validados com o uso de animais, principalmente os de pequeno porte, como ratos, são essenciais para o estudo comportamental biológico e o desenvolvimento de novos substitutos ósseos, uma vez que apresentam como vantagens o fácil manejo, a prolificidade, a docilidade, o baixo consumo alimentar, a

pequena área para criação, a fisiologia conhecida e o ciclo reprodutivo curto (HISTING et al., 2011).

Esse modelo experimental de calvária, muito utilizado em estudos sobre eficácia de biomateriais (LOURENÇO, 2002; MESSORA et al, 2007, MARIANO et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2015; SILVA et al, 2016; FABRIS et al, 2018), permitiu observar, no presente trabalho, que todos os espécimes apresentaram fechamento incompleto nos períodos de 4 e 8 semanas, evidenciando a condição específica do defeito crítico, assim chamado por se tratar da menor ferida óssea em um animal que não cicatriza espontaneamente em um determinado período de tempo (SOHN et al., 2010). No presente trabalho, além de ter pouca formação óssea (restrita às margens do defeito) no grupo controle negativo (Grupo CO), observada nas diferenças estatísticas em relação aos demais grupos experimentais, a evolução de 4 para 8 semanas de observação não mostrou diferenças significativas no referido grupo, deixando claro a dificuldade de cicatrização óssea nesse tipo de defeito experimental (TABELA 5). Pode ser considerado então que o modelo experimental utilizado de defeitos ósseos na calvária de ratos pareceu adequado para avaliação da regeneração óssea com a utilização do osso bovino (Bio-Oss®) isolado ou em associação com o L-PRF, pois a maior formação óssea encontrada nos grupos tratados pode ser realmente atribuída ao material de preenchimento do defeito.

A técnica de confecção de canaletas em formato de “L”, posicionadas 2mm anterior e posteriormente ao defeito na calvária e preenchidas com ionômero de vidro em estudos realizados por Silva et al. (2016) ao invés de amálgama como inicialmente proposta por Messoria et al. (2007), permite resultados de identificação das margens do defeito cirúrgico original trazendo boa referência para a quantificação do osso neoformado e evita artefatos de imagem na microtomografia computadorizada trazidos por material de preenchimento metálico, como o amálgama, e que produziria interferência na interpretação das imagens tomográficas a serem analisadas em estudos futuros.

Quanto aos períodos experimentais aplicados no estudo em questão, muitos autores têm comprovado que um período de cicatrização de 2 a 4 semanas pode ser recomendado para avaliar a fase inicial da resposta de cura tecidual, bem como a estabilidade dos materiais ou reação do hospedeiro, enquanto 8 semanas ou mais pode ser apropriado para avaliar a cicatrização tardia, tais como a incorporação de osso, a reabsorção de materiais, a remodelação óssea ou a quantidade de

regeneração óssea alcançada (BODDE et al., 2008; SOHN et al., 2010). Preferiu-se nesse estudo os períodos de avaliação de 4 e 8 semanas, obtendo informações das fases inicial e tardia da cicatrização das feridas de calvária, como já utilizados nos trabalhos de Oliveira et al. (2015) e Silva et al. (2016), desenvolvidos por nossa equipe.

Diferentes estudos têm investigado o comportamento de vários biomateriais que contribuem para as reconstruções ósseas na área Odontológica principalmente no campo da cirurgia bucomaxilofacial, implantodontia e periodontia. E se ainda hoje as pesquisas objetivam analisar a regeneração óssea associada com a utilização de substitutos ósseos são plenamente justificáveis porque dentre os materiais disponíveis nenhum apresenta as características de um material ideal. E, portanto, são também justificáveis os estudos já desenvolvidos que avaliam a associação de diferentes biomateriais (JENSEN et al., 2012; KÜHL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2016). O presente trabalho investiga exatamente o comportamento de um dos biomateriais mais utilizados e aceitos na clínica como substituto ósseo, e comprovadamente osteocondutor – o osso bovino (Bio-Oss®) associado à L-PRF, um enxerto autólogo que contribuiria com fatores de crescimento no local da ferida cirúrgica. Observa-se que o estudo de Oliveira et al. (2015) também investigou histologicamente e com análises histométricas a associação da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) com o osso bovino (Bio-Oss®), mas com uma proposta de investigar se a PRF autógena teria comportamento diferente na biomodulação quando comparada à PRF homogênea, obtida de ratos doadores. O presente estudo propôs, além da análise histométrica, identificar o comportamento de 3 imunomarcadores importantes no reparo, envolvidos em estágios iniciais e tardios da formação óssea.

Ressalta-se que um dos pontos críticos que interfere diretamente com o sucesso de qualquer tipo de terapia óssea regenerativa é o espaço disponível abaixo do retalho mucoperiosteal. De tal modo, a capacidade de formação de um arcabouço ou *scaffold* pelo biomaterial utilizado para promover a regeneração óssea é de fundamental importância, uma vez que também permite a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação de osso como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos (LOURENÇO, 2002; SARTORI et al., 2003; GIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO, et al., 2010; OGUN SALU, 2011). Desta maneira, o osso bovino particulado usado no presente trabalho permitiu a manutenção do arcabouço sob os

tecidos moles, característica de um biomaterial osteocondutor, como pode ser visualizado nas figuras nº 11, 14, 17 e 19. Histologicamente identificou-se nas 4 e 8 semanas a presença das partículas de osso bovino com formação óssea nas adjacências e manutenção de grande parte da espessura original da calvária. Verificase, portanto, que a neoformação óssea foi maior nos grupos que contém o osso bovino (médias de 26,15 e 54,05 nos grupos BIO e BIO-L-PRF; médias de 57,34 e 63,58 nos grupos BIO e BIO-L-PRF respectivamente para 4 e 8 semanas), em relação ao grupo CO (média de 16,70 e 20,55 para 4 e 8 semanas), em que a espessura dos tecidos conjuntivo e ósseo foram drasticamente menores que a da calvária original.

Salienta-se que no grupo controle positivo (Grupo AUT) a manutenção do espaço sob os tecidos ósseos foi adequadamente conseguida com as partículas ósseas autógenas, evidenciando histologicamente uma maior quantidade do osso formado na região do defeito da calvária (média de 36,05 e 55,56 para 4 e 8 semanas respectivamente). Isso era esperado por ser tratar de um enxerto que apresenta as principais propriedades necessárias para a regeneração tecidual (a osteocondução, a propriedade osteogênica e a capacidade osteoindutora do material). O presente estudo mostra resultados de preenchimento do defeito ósseo no Grupo AUT bastante semelhante ao estudo de Fabris et al. (2018).

Como cada biomaterial apresenta maior ou menor capacidade de oferecer um *scaffold* adequado dependendo da sua aplicação, as partículas de Bio-Oss® mesmo tendo oferecido um adequado arcabouço, quando estiveram agregadas a outro biomaterial com mecanismos de ação diferentes, mostraram resultados ainda mais promissores. A L-PRF mostrou ser uma favorável alternativa quando associada ao osso bovino no preenchimento das cavidades ósseas nas calvárias.

A literatura já evidenciou que a influência da L-PRF isolada é discreta sobre a regeneração periodontal (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011; SHARMA; PRADEEP, 2011) e óssea (CHOUKROUN et al., 2006a; PECK; MAMEWICK; STEPHEN, 2011), sendo mais significativa quando associada ao enxerto bovino ou autógeno (INCHINGOLO et al., 2010; ZHANG et al., 2012; PRIPATNANONT et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Os resultados do presente estudo corroboram com Oliveira et al. (2015) evidenciando os melhores resultados de formação óssea para o grupo BIO-L-PRF, nos períodos de 4 e 8 semanas.

Portanto, sob o aspecto histológico, o Bio-oss® pode ser considerado uma boa alternativa ao uso do enxerto autógeno, considerando o modelo de defeito de calvária

de ratos, principalmente se associado à L-PRF no momento do preenchimento, pois acredita-se que essa associação atribui ao osso bovino propriedades osteoindutoras.

Porém uma das principais desvantagens do Bio-Oss® é a reabsorção muito lenta e incompleta de suas partículas, que resulta em um volume considerável do enxerto que não pode ser substituído pelo novo osso, processo denominado por alguns autores de osteobstrução (VALENTINI et al., 2000; MORDENFELD et al. 2010; OGUNSAKU, 2011; KOLERMAN et al., 2012; LEE et al., 2012). Mordenfeld et al. (2010), por exemplo, avaliaram espécimes obtidos de enxertos ósseos realizados para elevar seios maxilares com o Bio-Oss® após 11 anos e constataram que a porcentagem média de partículas residuais foi de 17,3%. Esses dados podem explicar os resultados histométricos obtidos nesta pesquisa, já que no período de 4 e 8 semanas o grupo BIO-L-PRF apresentou as maiores médias de neoformação óssea, e com diferenças estatísticas para o grupo BIO. Salienta-se que na histometria dos grupos com o Bio-Oss®, as partículas residuais do osso bovino, tanto no período de 4 e 8 semanas foram incluídas na contagem do osso formado.

O fator de transcrição RUNX 2 quando presente caracteriza a capacidade de osteoindução, ou seja, a maior presença de pré-osteoblastos no momento em que se diferenciarão em osteoblastos ativos (FABRIS et al., 2018). O RUNX 2 foi evidenciado nos estudos de Pereira et al. (2017a). Quando o Bio-Oss® foi adicionado ao enxerto de osso autógeno em seio maxilar humano, o composto mostrou tendência de ser um osteoindutor nos períodos precoces (CAUBET et al, 2015). Após 6 meses de cicatrização óssea, o Bio-Oss® misturado ao osso autógeno na proporção 1:1 apresentou um padrão similar, com moderada imunomarcagem para RUNX 2 indicando que esse substituto ósseo ainda tem diferenciação osteogênica.

Na análise dos cinco grupos experimentais do presente estudo, a marcação positiva RUNX 2 foi observada em pré-osteoblastos e osteoblastos bastante jovens especialmente nos grupos autógeno, L-PRF e BIO-L-PRF. No período de 4 semanas, evidenciou-se expressão leve para os grupos CO e BIO, enquanto a expressão mostrou-se moderada para os grupos em que a L-PRF esteve presente de forma semelhante ao grupo AUT. Já no período de 8 semanas, em todos os grupos experimentais observou-se uma queda na marcação positiva deste fator nas células da linhagem osteoblástica.

As marcações imunoistoquímicas para RUNX 2, e também VEGF, no período de 4 semanas para os grupos com L-PRF podem demonstrar que a concentração

aumentada de fatores de crescimento presentes na L-PRF deve ter interagido com os receptores de superfície em células alvo estimulando a proliferação celular, formação de matriz produção de tecido osteóide e síntese de colágeno aos moldes do que ocorre com o PRP nos estágios iniciais, evidenciado por Schilephake (2002) e Marx (2004). A concentração aumentada desses fatores de crescimento nos sítios cirúrgicos certamente estimulou a proliferação celular e também estimulou a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, como pode ser constatado pela maior expressão do RUNX 2 nos Grupos L-PRF e BIO-L-PRF quando comparado ao grupo CO. Evidencia-se que essa expressão foi semelhante ao grupo AUT, que teoricamente mantém as propriedades osteoprogenitoras e atividade osteogênica. Nesse período de 4 semanas, considerado ainda na fase inicial do reparo ósseo, mas mais adiantada que o estudo que evidenciou pouca expressão do RUNX 2 aos 7 dias para o Grupo PRF (POLA, 2013).

O resultado de POLA (2013), que encontrou expressões significativamente menores do RUNX 2 para a PRF em relação ao PRP, parece indicar que todo o processo de proliferação de células precursoras de osteoblastos e suas diferenciações em osteoblastos estavam atrasados no Grupo PRF quando comparado ao Grupo PRP. Uma possível explicação para esses resultados seria o tempo necessário para o início da liberação dos fatores de crescimento pela PRF, que seria maior que o do PRP. Esta hipótese é sustentada pelos achados de um estudo *in vitro*, onde as características biológicas do PRP e da PRF na proliferação e diferenciação de osteoblastos de ratos foram comparadas, e observou-se que o pico de liberação de fatores de crescimento na PRF está atrasado quando comparado a aquele no PRP (HE et al., 2009). A PRF é uma matriz de fibrina na qual as citocinas plaquetárias estão aprisionadas segundo Mosesson (2005) e podem ser liberadas após certo tempo (GASSLING et al., 2009). Dohan et al. (2006) e Dohan et al. (2009) têm demonstrado que a PRF possui uma liberação lenta e sustentada muito significativa de fatores de crescimento essenciais, por no mínimo uma semana e para HE et al. (2009) até 28 dias, o que significa que a PRF poderia estimular o seu ambiente por um tempo significativo durante o reparo tecidual (WU et al., 2012). Isso pode ser considerado no presente estudo em função da evidente formação óssea maior nos grupos com PRF (grupos L-PRF e BIO-L-PRF) em relação ao coágulo sanguíneo (Grupo CO).

Com relação ao protocolo de preparo da L-PRF no presente estudo, foram coletados 3 ml de sangue periférico, o que corresponde a aproximadamente 12 % do

volume sanguíneo de um rato com peso de 350g, não colocando em risco a vida do animal (DOHAN et al., 2010a). Deve-se enfatizar que, mesmo com o uso deste pequeno volume de sangue, a citoarquitetura da PRF obtida seguiu os padrões que caracterizam a verdadeira PRF, relatados em estudos anteriores (DOHAN et al., 2010b).

A neoformação vascular ocorrida após qualquer dano tecidual, e que pode ser marcada pela proteína VEGF, mostrou neste estudo que o suprimento sanguíneo, em especial para combater o déficit de oxigênio local, foi expressa moderadamente nos dois períodos analisados para os grupos BIO e BIO-L-PRF. Especialmente no grupo BIO a presença de VEGF caracteriza o potencial osteocondutor do enxerto bovino em função da proliferação vascular necessária para a formação óssea no espaço criado pelo arcabouço propiciado pelas partículas do Bio-Oss®. Como o osso autógeno já possui células viáveis para o reparo incluindo células endoteliais, nos estágios precoces do reparo, como demonstrado por Fabris et al, 2018, aos 14 dias a marcação de VEGF foi leve, aumentando aos 28 dias. No presente estudo, a marcação de VEGF nas 4 e 8 semanas foi moderada.

As reações de imunoistoquímica mostraram no presente trabalho que a mineralização do tecido ósseo neoformado nos períodos de 4 e 8 semanas, período considerado suficiente para a avaliação *in vivo* nesses modelos experimentais, foi semelhante para os materiais usados como preenchedores dos defeitos ósseos e expressa por meio de marcação da OC. A OC, proteína não colágena mais abundante da matriz óssea, que expressa a mineralização do tecido ósseo e também representa a marcação de células da linhagem osteoblástica, não mostrou diferença na sua expressão entre os biomateriais quando o Bio-Oss® esteve presente e em relação ao osso autógeno.

Assim, os resultados histomorfométricos e imunoistoquímicos do presente trabalho sugerem que o Bio-Oss® mostrou-se favorável para o preenchimento dos defeitos ósseos de calvária de ratos, como já evidenciado por vários outros estudos. Mas o seu aspecto de lenta degradação, visto que no período de 8 semanas ainda se encontrava considerável quantidade de partículas do osso bovino preenchendo o defeito ósseo, sugere mais estudo de qualidade óssea pois o interesse maior em áreas enxertadas é a inserção do implante de forma que os resultados de reabilitação sejam duradouros.

Afirmar que a L-PRF propiciou maior formação óssea quando esteve associado ao Bio-Oss® é um fato quantitativo observado neste estudo, o que caracteriza um aspecto importante e desejado para uma terapia que objetiva a reconstrução óssea, pois conseguir maior volume de formação óssea permite mais rápida recuperação do tecido ósseo perdido. Contudo, estudos experimentais a longo prazo e clínicos controlados são ainda necessários para avaliar os reais benefícios desta associação para que identifique se a utilização da L-PRF garante melhor qualidade de formação óssea no momento em que o paciente estiver sendo reabilitado funcionalmente.

## **7 CONCLUSÃO**

Considerando a metodologia proposta, o período de avaliação e os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a associação da L-PRF ao osso bovino permitiu melhorar o reparo ósseo quando esses biomateriais foram inseridos em defeitos de calvárias de ratos.

## REFERÊNCIAS

- AL-ALI, W.; BISSADA, N. F.; GREENWELL, H. The effect of local doxycycline with and without tricalcium phosphate on the regenerative healing potential of periodontal osseous defects in dogs. **J. Periodontol**, v. 60, n. 10, p. 582-590, 1989.
- AGHALOO, T. L., MOY, P.K., FREYMILLER, E.G. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. **Clin Oral Implants Res**, v. 16 p. 250-257, 2005.
- ANITUA, E. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 227-234, 2006.
- BANG, S. M. et al. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. **Clin. Oral Implants Research**, p. 1-7, 2013.
- BASSETTI, M. et al. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Impl. Res**, p. 1-9, 2013.
- BÍBLIA DE ESTUDO MACARTHUR. A. T. Isaías. 2 ed. Barueri: Sociedade Bíblica do Brasil, 2010. cap. 40, p. 904.
- BODDE, E. W. et al. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. **J. Biomed. Mater. Res**, v. 85, p. 206-217, 2008.
- BOER, H. H. D. **The History of Bone Grafts. Clinical Orthopaedics & Related Research: section III: basic science and pathology**, v. 226, p. 292-298, 1988.
- BRITO M.V.; PÉREZ M.A.A.; RODRÍGUEZ F.J.M. Expresión de la osteocalcina em el ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodóncicas. **Revista Odontológica Mexicana**, v. 17, n. 3, p. 152-155, 2013.
- BUCHTER, A. et al. Sustained release of doxycycline for the treatment of peri-implantitis: randomised controlled trial. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, p. 439-444, 2004.
- CARVALHO, P. S. P. et al. Biomateriais aplicados à implantodontia. **Revista Implantnews**, n. 7, p. 56-65, 2010.
- CATON, J.; RYAN, M. E. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 114-120, 2011.
- CAUBET J., et al. Gene expression and morphometric parameters of human bone biopsies after maxillary sinus floor elevation with autologous bone combined with Bio-Oss or BoneCeramic. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 6, p. 727-735, 2015.

CHAMBERS, T. J. The birth of the osteoclast. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1192, p. 19-26, 2010.

CHANG, Y. C.; ZHAO, J. H. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblast and application for periodontal infrabony defects. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. 4, p. 365-371, 2011.

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

CHOUKROUN, 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**, v. 101, n. 3, p. 37-44, 2006a.

CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. 56-60, 2006b.

CHOUKROUN J. et al. Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF. **Implantodontie**, v. 42, p. 55-62, 2000.

CONZ, M. B. et al. Caracteriza o f sico-qu mica de 12 biomateriais utilizados como enxertos  sseos na Implantodontia. **Revista Implantnews**, v. 7, n. 4, p. 541-6, 2010.

DAHLIN, C.; SIMION, M.; HATANO, N. Longterm follow up on soft and hard tissue levels following guided bone regeneration treatment in combination with a xenogenic filling material: a 5 years prospective clinical study. **Clinical Implant Dentistry**, v. 12, p. 263-270, 2009.

DANIELSEN, P. L.; AGREN, M. S.; JORGENSEN, L. N. Platelet-rich fibrin versus albumin in surgical wound repair. **Annals of Surgery**, v. 251, n. 5, p. 825-831, 2010.

DASHTI, A. et al. *In Vitro* antibacterial efficacy of tetracycline hydrochloride adsorbed onto Bio-Oss bone graft. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 93B, n. 2, p. 394-400. 2010.

DEMPSTER D.W.; et al. Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res.** v. 28, p. 2-17, 2013.

DOHAN, D.M. et al. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF), **Trends Biotechnol.** v.27, p. 158-167, 2009.

DOHAN, S. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a new healing biomaterial. **Implantodontie**, v. 13, p. 99-108, 2004.

DOHAN, D.M. et al. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates *in vitro* proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. **Arch Oral Biol**, v. 55, p.185-194, 2010a.

DOHAN, D. M. 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 Endodontics**, v. 101, n. 3, p. 37-44, 2006.

DOHAN, D.M. et al. Threedimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane, **J Periodontol**, v. 81, p. 546-555, 2010b.

DOUGLAS, T. E. L. et al. Enzymatically induce mineralization of platelet-rich fibrin. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.100, n.1, p.1335-1346, 2012.

EHRENFEST, D. M. D. et al. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates *in vitro* proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose dependent way. **Archives of Oral Biology**, v.55, n.3, p.185-194, 2010.

EHRENFEST, D. M. D. et al. *In vitro* effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Endodontics**, v. 108, n. 3, p. 341-352, 2009.

EHRENFEST, D. M. D.; RASSMUND, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.

FABRIS, A. L. S. et al. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects. Study on rat calvaria. **J Appl Oral Sci**, v. 26, p. 1-12, 2018.

FARDIN, A. C. et al. Bone graft in dentistry: review of literatura. **Innov Implant J, BiomaterEsthet**. v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.

FILLINGHAM Y.; JACOBS J. Bone grafts and their substitutes. **Bone Joint J**. v. 98-B, 1 Suppl A, p. 6–9, 2016.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J. Bone J. T. Surg. Am.**, v. 84, p. 54-64, 2002.

FRALEIGH, C. M. An evaluation of topical terramycin in post gingivectomy pack. **J. Periodont.**, v. 27, n. 201, 1956.

FRANCESCHI R.T. et al. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/RUNX 2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. **Connect Tissue Res**, v. 44, n. 1, p. 109-162, 2003.

GAIKWAD, S. P. et al. Effect of scaling and root planing combined with systemic doxycycline therapy on glycemic control in diabetes mellitus subjects with chronic

generalized periodontitis: a clinical study. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 43, p. 79-86, 2013.

GALINDO-MORENO, P. et al. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 122-128, 2010.

GARBLING, V. L. W. et al. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cells culture. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontic**, v. 108, n. 1, p. 48-55, 2009.

GARCÍA-MARTÍN A. et al. Osteocalcina: nexo de unión entre homeostasis ósea y metabolismo energético. **Endocrinología Nutrición**, v. 60, n. 5, p. 260-263, 2013.

GARDEL, L. S. et al. Use of Perfusion Bioreactors and Large Animal Models for Long Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering: Part B**, v. 20, n. 2, p. 127-145, 2014.

GASSLING, V.L. et al. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 5, p. 543-549, 2010.

GASSLING, V.L. et al. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, p. 48-55, 2009.

GERARD, D. et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 64, p. 443-451, 2006.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update injury. **International Journal of the Cure of the Injured**, v. 365, p. 520-527, 2005.

GUPTA, V. et al. Regenerative potential of platelet-rich fibrin in dentistry: Literature Review. **Asian Journal of Oral Health & Allied Sciences**, v. 1, n. 1, p. 22-28, 2011.

HE, L. et al. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of a rat osteoblasts *in vitro*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endod**, v. 108, n. 5, p. 707-713, 2009.

HELMRICH U. et al. Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors. **Biomaterials**, v. 34, p. 5025-5035, 2013.

HISTING, T. et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. **Bone**, v. 49, n. 4, p. 591-599, 2011.

HOBIOYD, S. V. Antibiotics in the practice of periodontics. **J. Periodont**, v. 42, n. 9, p. 584-589, 1971.

- HOLLINGER J.O.; KLEINSCHMIDT, J.C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg**, v. 1, p. 60-68, 1990.
- HUANG, F. M. et al. Platelet-rich fibrin increase proliferation and differentiation of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 1628-1632, 2010.
- INCHINGOLO F. 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**, v. 14, p. 1075–84, 2010.
- JENSEN, T. et al. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Su**, v. 41, p. 114-120, 2012.
- JOHANSSON, B. et al. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. **DentoMaxilloFacial Radiology**, v. 30, p. 157–161, 2001.
- KANG, Y. H. et al. Platelet-rich fibrin is a bioresorbable reservoir of growth factors for tissue regeneration. **Tissue Engineering**, v. 17, n. 3 e 4, p. 349-359, 2011.
- KIM, D. M. et al. The clinical and histologic outcome of dental implant in large ridge defect regenerated with alloplast: a randomized controlled preclinical trial. **Journal of Oral Implantology**, v. 39, n. 2, p. 148-153, 2013.
- KINUGAWA, S. et al. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. **The Journal of Immunology**. v. 188, p. 1772-1781. 2012.
- KOBAYASHI Y. et al. Effects of local administration of osteocalcin on experimental tooth movement. **Angle orthodontist**. v. 68, n. 3, p. 259-266, 1998.
- KOLERMAN, R. et al. Histomorphometric analysis of newly formed bone after bilateral maxillary sinus augmentation using two different osteoconductive materials and internal collagen membrane. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 32, p. e21-e28, 2012.
- KOLK, A. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials from space holders to innovative biomaterials. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**. v. 40, p. 706 – 718, 2012.
- KÜHL, S. et al. The influence of bone substitute materials on bone volume after maxillary sinus augmentation: a microcomputerized tomography study. **Clin Oral Investig**, v.17, n. 2, p. 543-551, 2013.
- LEE, D. Z. et al. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, p. 918–924, 2012.
- LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Periodontologia Clínica e Implantologia Odontológica**. 4ª ed. São Paulo. Editora: Médica Panamericana, 2003.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LONG, T. et al. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice. **Biomaterials**. p. 1-8, 2014.

LOURENÇO, E. J. V. **Avaliação da osteogênese com Proteínas Ósseas Morfogênicas (BMPs)**: Análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio de coelhos. 2002. 191 f. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade Federal de São Paulo, Bauru, 2002.

LUCARELLI, E. et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. **European Cells and Materials**, v.20, p.13-23, 2010.

MARIANO, R. C.; MELO, W. M.; AVELINO, C.C. Comparative Radiographic Evaluation Alveolar Bone Healing Associated With Autologous Platelet-Rich Plasma After Impacted Mandibular Third Molar Surgery. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.70, n.1, p.19-24, 2012.

MARIANO, R. et al, Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, n.109, p.72–78, 2010.

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

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

MARX, R.E.; SAUNDERS, T.R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: FONSECA, R.J.; DAVIS, W.R. **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery**. Philadelphia: Saunders; 1986. p. 347-428.

MELO, L. G. et al. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 6, p. 683–691, 2005.

MESSORA et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria, **Journal of Periodontology Research**, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2007.

MESSORA M.R. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of fresh frozen bone allograft in mandibular defects: a histomorphometric study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 12, p. 1347–1353, 2013.

MISCH C.E.; DIETSH. F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent**, v. 2, n. 3, p. 158-167, 1993.

MLADENOVIC, Z. et al. *In vitro* study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, p. 329-335, 2013.

MOIDEEN, S.; KHAN, R. A.; SIDDIQUI, A. A. Efficacy of Metronidazole in Combination with Amoxicillin and Doxycycline in Adult Periodontitis. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 9, p. 99-104, 2013.

MORDENFELD, A. et al. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 961–970, 2010.

MUTHUKURU, M.; SUN, J. Doxycycline Counteracts Bone Morphogenic Protein 2–Induced Osteogenic Mediators. **J Periodontol.** v. 85, n. 4, p. 657 – 665, 2013.

NAGATA, M. J. et al. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria, **J Orthop Res**, v. 28, p. 468-473, 2010.

NARAIN, R. U.; GARG, S.; NARAIN, P. A Prospective Study Of The Quality Of Removable Prosthesis And Patients' Satisfaction In Post-Prosthetic Phase. **The Internet Journal of Dental Science**, v. 9, n. 1, 2010.

NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **Annals of The New York Academy of Sciences**. v. 1241, p. 17–32, 2011.

NURDEN, A. T., Platelets, inflammation and tissue regeneration, **Thromb Haemost.** v. 105, n. 1, p. 13-33, 2011.

OGUNSALE, C. Bone Substitutes and Validation. *Implant Dentistry - The Most Promising Discipline of Dentistry*, book edited by IlserTurkyilmaz, p. 481-8, 2011.

OLIVEIRA, M.R. et al. Influence of the association between plaque-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **Int Journal Oral Maxil. Surgery**, v. 44, n. 5, p. 649-655, 2015.

ORSINI, G. et al. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: light, scanning and transmission electron microscopy study in man. **Journal of Biomedical Materials Research**, Part B, v. 74B, p. 448-457. 2005.

PARK, J. B. Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone onto Bio-Oss VR bone graft. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 93B, 2010.

PECK, M.T.; MARNEWICK, J.; STEPHEN, L. Alveolar ridge preservation using leukocyte and platelet-rich fibrin: a report of a case. **Case Rep Dent** v. 2011, 2011.

PEDROSA, J.R. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone grafts remodeling. Part II: calvarial bone. **Clin Oral Impl Res**, v. 20, p. 1254–1264, 2009.

PEREIRA, R. S et al. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: histomorphometric study and immunohistochemical assessment of RUNX 2 and VEGF. **Internacional Journal Oral Maxillofacial Surgery**. v. 2017, n.46, p. 503-510, 2017b.

PEREIRA, R.S. et al. Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX 2 and VEGF Biogran and autogenous graft in human maxillary sinus bone augmentation: a prospective and randomized study. **Clin Implant Dent Relat Res** v.19, p.867-875, 2017a.

POLA, N. M. **Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas ou com fibrina rica em plaquetas. Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em calvárias de ratos**. 2013. 107f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, UNESP, Araçatuba, 2013.

PRIPATNANONT, P. et al. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. **J Craniomaxillofac Surg**, v.41, n.8, p.191–200, 2013.

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

RAO, S. G. Bone regeneration in extraction sockets with autologous platelet-rich fibrina gel. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.12, n.1, p.11-16, 2012.

ROODMAN, G. D. Regulation of osteoclast differentiation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1068, p. 100–109, 2006.

ROY, S. et al. Platelet-rich matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. **Wound Repair and Regeneration**, v.19, n.6, p.753-766, 2011.

SALMINEN, A. et al. Subantimicrobial-dose doxycycline treatment increases serum cholesterol efflux capacity from macrophages. **Inflammation Research**, v. 62, p. 711–720, 2013.

SARTORI S. et al. Ten-years follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, p. 369-372, 2003.

SBORDONE, C. et al. Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: a 6-year computerized tomographic follow-up. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, p. 2559-2565, 2012.

SBORDONE, L. et al. Implant survival in maxillary and mandibular osseous onlay grafts and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 24, p. 695–703, 2009.

- SCHAR, D. et al. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 1, p. 104-110, 2012.
- SCHILEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 31, p.469-484, 2002.
- SERNA, V. M. F. Colocación de plasma rico em factores de crecimiento postextracción de terceros molares inferiores: Reporte de un caso. **Revista Odontológica Mexicana**, v.15, n.2, p.109-114, 2011.
- SHARMA A.; PRADEEP A.R. Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 82, p. 1705–1712, 2011.
- SILVA, A. C et al. Effect of Doxycycline in Gel Form in Regeneration Bone: Histomorphometric and Tomographic Study in Rats Calvary. **J Periodontol**, v. 87, p.74-82, 2016.
- SIMONPIERI, A. et al. Immediate post extraction implantation: interest of the PRF. **Implantodontie**, v.13, n.3, p.177-189, 2004.
- SINGH, A.; KOHLI, M.; GUPTA, N. Platelet-rich fibrin: a novel approach for osseous regeneration. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v.11, n.4, p. 430-434, 2012.
- SMOLKA, W. et al. Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, p. 149–155, 2006.
- SOHN, J. Y. et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. **J. Periodontal Implant. Sci.**, v. 40, n. 4, p. 180-187, 2010.
- STREET J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.99, p. 9656-61, 2002.
- SUNDARARAJ, S. C. et al. Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis. **Biomaterials**, v.34, p. 8835-8842, 2013.
- TETÈ, S. et al. Maxillary sinus augmentation procedures through equine-derived biomaterial or calvaria autologous bone: immunohistochemical evaluation of OPG/RANKL in humans. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 10, p. 60 – 65, 2013.
- THORAT, M.; PRADEEP, A. R.; PALLAVI, B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects a controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, n.10, p.925-932, 2011.

THORAT. M.; PRADEEP A.R.; PALLAVI B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 38, p. 925–932, 2011.

UDAGAWA, N. et al. Minocycline to be used a potential anti bone resorption agents due to the suppression of osteoclastic bone resorption. **Journal of Oral Biosciences**, v.55, p. 16–22. 2013.

VALENTINI, P. et al. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 20, p. 245-253, 2000.

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

WU, C. L. et al. Platelet-rich fibrin increase cell attachment, proliferation and collagen – related protein expression of human osteoblasts. **Australian Dental Journal**, v.57, n.2, p.207-212, 2012.

XIAO G. et al. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/RUNX 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.39, p. 36181-36187, 2002.

YAGAN, A.; KESIM, S.; LIMAN, N. Effect of Low-Dose Doxycycline on Serum Oxidative Status, Gingival Antioxidant Levels and Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, p. 1-18, 2013.

YIP, I. et al. Healing of calvaria defect with various bone substitutes. **Clin Oral Impl Res**, p. 1- 9, 2014.

ZHANG Y. et al. 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**, v. 40, p. 321–328, 2012.

## ANEXO

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A viabilidade dos recursos de otimização da regeneração óssea: L-PRF, doxíciclina, osso bovino comparados ao enxerto ósseo autógeno. Estudo histométrico e imunoistoquímico em calvárias de ratos", registrada com o nº 22/2017, sob a responsabilidade de Ronaldo Célio Mariano, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	( ) Ensino                      ( X ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 05/06/2017 a 31/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	52
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 05 de Junho de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador CEUA-UNIFAL