

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
**Mestrado em Odontologia**

**Fabio Murillo Domingues**

**AVALIAÇÃO POR MEIO DE MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA DO  
EFEITO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS ASSOCIADA AO  
BETA TRICÁLCIO FOSFATO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIAS DE  
COELHO**

**São Paulo**  
**2015**

**FABIO MURILLO DOMINGUES**

**AVALIAÇÃO POR MEIO DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DO  
EFEITO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS ASSOCIADA AO  
BETA TRICÁLCIO FOSFATO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIAS DE  
COELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Angélica Castro Pimentel

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson R Sendyk

**São Paulo**

**2015**

## RESUMO

As indicações de procedimentos de enxertia quando há escasso volume ósseo em pacientes submetidos à cirurgia de implantes bucais tem levado ao desenvolvimento de vários biomateriais. Há situações em que a capacidade de reparo é limitada pelo tamanho da perda óssea como aquelas causadas por traumas, patologias ou consequências de procedimentos cirúrgicos diversos, onde o defeito ósseo torna-se crítico a reparação espontânea e se faz necessário o uso de enxertos para um correto tratamento e bom prognóstico. Vários estudos têm demonstrado que biomateriais de enxertia como o beta tricálcio fosfato (BTCP) e a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (PRF - L) otimizam o processo de regeneração. O objetivo deste estudo foi de avaliar a formação óssea em defeitos ósseos criados cirurgicamente em tíbias de coelho por meio de microtomografia computadorizada, comparando o BTCP e o PRF - L e em associação. Foram criados defeitos ósseos não críticos com trefina de 5mm de diâmetro em tíbias de 20 coelhos da raça Nova Zelândia. O experimento foi dividido em 4 grupos, cada um com 2 períodos (30 dias / 06 coelhos e 60 dias / 14 coelhos). O grupo coágulo foi denominado de controle, uma vez que ele é o ponto de referência para a comparação dos resultados entre os grupos PRF - L, PRF - L + BTCP e o grupo BTCP. Os coelhos foram eutanasiados nos períodos determinados respectivamente e as amostras foram encaminhadas para análise microtomográfica. Foram utilizados dois softwares para a verificação do volume total de osso formado. Todos os dados obtidos nos resultados foram submetidos há um teste de normalidade e os testes estatísticos utilizados foram Anova e Tukey. No período de 30 dias não houve diferença entre os grupos. Após período de 60 dias o grupo BTCP e grupo BTCP + PRF - L apresentaram diferença estatística comparado aos grupos coágulo e PRF -L. Houve um comportamento semelhante entre os grupos coágulo e PRF - L, quando avaliado o percentual de volume ósseo. De acordo com o estudo proposto, pode-se concluir que a associação de PRF e BTCP não promoveu aumento da formação do tecido mineralizado neste modelo experimental. A utilização do BTCP é uma técnica segura e clinicamente previsível, sendo uma alternativa viável para enxerto de osso autógeno.

Palavras chave: Enxerto. Formação Óssea. Implantes dentários. Beta Tricálcio Fosfato. Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos.

## **ABSTRACT**

Keywords: Graft. Bone formation. Dental implants. BTCP. Fibrin Rica Platelet and Leukocyte.

## Lista de abreviaturas

$\mu$ A	Microampère
$\mu$ CT	Microtomografia computadorizada
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AB	Osso autólogo
ABB	Osso inorgânico bovino
Akt	Proteína kinase
Bio-Oss®	Osso bovino desproteínizado
BMSC	células estromais da medula óssea
BCP	Fosfato de cálcio bifásico
BO	Bio-Oss®
BTCP	Beta tricálcio fosfato
BV	Volume de tecido mineralizado
CD	Receptores membranários
CPCs	Cimentos de fosfato de cálcio
CT	Tomografia computadorizada
CGF	Concentrado de fatores de crescimento
DCPD	Fosfato de cálcio di-hidratado
DBBM	Osso bovino desproteínizado
DBM	Matriz óssea desmineralizada
EM	Microscopia eletrônica de varredura
FDBA	Osso bovino liofilizado
FDP	Produto de degradação do fibrinogênio
g	Gramas
GBR	Regeneração óssea guiada
HA	Hidroxiapatita
Kg	Kilograma
kV	Kilovolt
L-PRP	Plasma Rica em Plaquetas e Leucócitos

mA	Miliampère
min.	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
PBBM	Partículas de osso bovino desproteinizado
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PDLF	Fibroblasto do ligamento periodontal
PPP	Sobrenadante
P-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas Puro
P-PRP	Plasma Rica em Plaquetas Puro
PRF - L	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos
RBC	Glóbulos Vermelhos
ROG	Regeneração óssea guiada
ROI	Região de interesse
Rpm	Rotação por minuto
Sint-Oss	Beta tricálcio fosfato
TCP	Tricálcio fosfato
TMA	Área total mineralizada
TV	Volume de tecido total

## Índice de Ilustrações

<b>Figura 1.</b> Amostra de sangue, após a centrifugação, sem anticoagulante .....	21
<b>Figura 2. A -</b> Coleta de sangue para obtenção do PRF – L; <b>B -</b> Obtenção do coágulo de PRF – L; <b>C -</b> Preparo da membrana de PRF – L; <b>D -</b> Compressão para formação da membrana de PRF – L; <b>E –</b> Membrana de PRF – L; <b>F -</b> Porcionamento da membrana para preenchimento e recobrimento do defeito ósseo; <b>G -</b> Centrífuga Intra Spin – Intra-Lock ®.....	30
<b>Tabela 1 -</b> .....	31
<b>Figura 4. A e B –</b> BTCP; <b>C –</b> BTCP + PRF - L .....	32
<b>Figura 5. A -</b> Grupo coágulo; <b>B -</b> Grupo BTCP; <b>C -</b> Grupo PRF – L; <b>D -</b> Grupo BTCP + PRF L .....	33
<b>Figura 6.</b> DataViewer: visualização da microtomografia computadorizada .....	34
<b>Figura 7.</b> CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium: marcações morfométricas de interesse (ROI) .....	35
<b>Figura 8.</b> CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium: Análise dos resultados .....	36
<b>Figura 9. A -</b> Corte da tíbia corada com Hematoxilina e Eosina (H/E); <b>B –</b> Corte da tíbia corada Tricrômico de Masson.....	37
<b>Figura 10. A -</b> Grupo coágulo 30 dias (amostra 65-G4); <b>B -</b> Grupo BTCP 30 dias (amostra 48-G4); <b>C -</b> Grupo PRF - L 30 dias (amostra 65-G1); <b>D -</b> Grupo BTCP + PRF - L 30 dias (amostra 48-G2); <b>E -</b> Grupo coágulo 60 dias (amostra 38-G3); <b>F -</b> Grupo BTCP 60 dias (amostra 13-G2); <b>G -</b> Grupo PRF - L 60 dias (amostra 38-G1); <b>H -</b> Grupo BTCP + PRF - L 60 dias (amostra 13-G3).....	39
<b>Figura 11. A -</b> Imagem da membrana de PRF-L após obtenção e compressão; <b>B -</b> Imagem da união coágulo/fibrina com aumento de 20X; <b>C -</b> Imagem da união coágulo/fibrina com aumento 100X; <b>D -</b> Imagem da fibrina com aumento de 20X; <b>E -</b> Imagem da fibrina com aumento de 100X.....	43

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	0
2 PROPOSIÇÃO.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1 Biomateriais .....	4
3.2 Beta tricálcio fosfato .....	5
3.3 PRF – L.....	12
3.4 Associação de biomateriais BTCP e PRF - L.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Obtenção do PRF - L.....	28
4.2 Técnica cirúrgica / Criação do defeito ósseo.....	30
4.3 Pós-operatório .....	33
4.4 Eutanásia dos coelhos.....	33
4.5 Análise por microtomografia computadorizada – $\mu$ CT .....	34
4.6 Análise histológica e processamento histológico .....	36
4.7 Análise estatística.....	37
5 RESULTADOS .....	38
5.1 Análise de Microtomografia Computadorizada.....	38
5.2 Volume de Tecido Total (TV) e Volume de Tecido Mineralizado (BV) .....	39
5.3 Análise Histológica .....	41
5.3.1 Membrana de PRF-L.....	41
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO .....	48
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento de pacientes edêntulos com implantes dentais tem se tornado confiáveis ao longo do tempo. Os resultados clínicos obtidos têm comprovado sua osseointegração e sucesso. As indicações de procedimentos de enxertia quando há escasso volume ósseo em pacientes submetidos à cirurgia de implantes orais tem levado ao desenvolvimento de vários biomateriais. Há situações em que a capacidade de reparo é limitada pelo tamanho da perda óssea como aquelas causadas por trauma, patologias ou consequência de procedimentos cirúrgicos diversos, onde se faz necessário o uso de enxertos para um correto tratamento e bom prognóstico.<sup>1 2 3</sup>

As técnicas de reconstruções ósseas, entre elas, a Regeneração Óssea Guiada (ROG) e o enxerto ósseo autógeno, vieram permitir a colocação de implantes em locais que anteriormente não seriam viáveis.

A técnica de enxerto ósseo autógeno é considerada o "padrão ouro" das técnicas de reconstrução óssea, devido à ausência de reação antigênica e pela presença dos potenciais de osteogênese, osteoindução e osteocondução. No entanto, o enxerto de osso autógeno apresenta desvantagens como a necessidade de segundo sítio cirúrgico para a obtenção do enxerto, quantidade limitada, e maior desconforto do paciente.

A necessidade de encontrar um material de enxerto adequado para os defeitos ósseos criados no esqueleto, que possa substituir o osso autógeno, vem sendo estudado nesses últimos 30 anos.

Uma grande variedade de biomateriais como osso bovino desproteínizado, osso humano desmineralizado, congelado e seco, hidroxiapatita (HA), vidro bioativo, TCP e polímeros, foi desenvolvido como alternativas ao osso autógeno para promover a formação óssea.<sup>1</sup>

Os biomateriais de origem sintética apresentam melhor osteocondutividade e potencial osteogênico e possibilitam, em muitos casos, a diminuição ou a eliminação do uso de materiais de origem autógena, alógena ou xenógena.<sup>11 12</sup>

De acordo com Gutierrez et al.<sup>13</sup> é possível produzir materiais cerâmicos sintéticos com uma composição semelhante à matriz óssea inorgânica e sem limitações em termos de quantidade disponível.

Os derivados inorgânicos sintéticos como a hidroxiapatita e beta tricálcio fosfato (BTCP), têm recebido grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos, pois apresentam uma geometria tridimensional adequada e são capazes de unir e concentrar proteínas ósseas morfogenéticas na circulação e podem se tornar osteocondutivo além de atuar como efetivo transportador de células ósseas. Como principal vantagem, o BTCP possui excelente biocompatibilidade e osteocondução em relação ao tecido hospedeiro.<sup>1</sup>

1 1

Em virtude da não característica do material BTCP como osteoindutor, atualmente a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (PRF - L) tem sido bastante utilizada. Se trata de um derivado plaquetário, advindo inicialmente do plasma rico em plaquetas (PRP), de primeira geração, que foi inicialmente desenvolvido em 1954 por Kingsley para designar trombócitos concentrado, utilizado para o tratamento de pacientes que sofrem de trombocitopenia grave. São obtidos pela centrifugação da amostra de sangue do próprio paciente, onde deu início ao uso de fatores de crescimento e o uso do termo Plasma Rico em Plaquetas (PRP). O PRP começou realmente a ser usado após o artigo de Marx et al. (1998) em um estudo sobre o efeito de uma preparação rica em plaquetas durante a reconstrução óssea maxilo-facial. A suspensão de plaquetas era ativada num gel usando trombina bovina. Após este artigo, o prazo de PRP - associado ao conceito de fatores de crescimento - logo foi usado para nomear todos os tipos de preparações e técnicas.<sup>1</sup>

O PRF - L foi desenvolvido na França pelo médico francês Joseph Choukroun et al., em 2001<sup>1</sup>, e é um concentrado de plaquetas de segunda geração largamente empregado para apressar a cicatrização de tecido mole e duro, podendo ser empregado associado também com biomateriais de enxertia. Possui um método de preparo com sangue autólogo, que forma um gel de fibrina através da ativação plaquetária do sangue em contato com as paredes do tubo vacutainer para provocar a cascata de coagulação intrínseca que conduz à formação de um coágulo

de fibrina que pode ser espremido em uma membrana de fibrina rica em plaquetas, fatores de crescimento e leucócitos, sendo esta concentração 4 a 6 vezes acima dos níveis fisiológicos, ou seja, aproximadamente 1 milhão de plaquetas por microlitros.

Foi demonstrado em vários estudos que os processos regenerativos do osso podem ser melhorados através da adição de fatores de crescimento específicos. Os concentrados de plaquetas contidos na PRF - L liberam fatores de crescimento que otimizam o processo de regeneração, além disso, a matriz de fibrina promove angiogênese, facilitando o acesso ao local lesionado, com importante papel na cicatrização tecidual. Biomateriais à base de plaquetas ricas em fatores de crescimento são obtidas a partir de um único doador autólogo.<sup>1 2 21</sup>

Existem poucos resultados de estudos com o PRF – L e muita controversa a respeito do seu protocolo de fabricação e resultados para uso clínico.

A técnica de enxerto ósseo com utilização de PRF - L em associação com o biomaterial sintético – BTCP como substituto ósseo, tem despertado o interesse por muitos cirurgiões.

Nesse estudo avaliamos o resultado da regeneração óssea com o PRF – L e o BTCP em defeitos ósseos criados cirurgicamente em tíbias de coelho.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a formação óssea em defeitos ósseos criados cirurgicamente em tíbias de coelho por meio de microtomografia computadorizada, comparando o PRF – L e o BTCP e em associação.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Biomateriais

Uma das definições correntes diz que biomaterial é parte de um sistema que trata, aumenta ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo.<sup>22</sup>

A utilização de biomateriais sintéticos ou naturais como substitutos do tecido ósseo em contato com roscas de implantes expostas, assim como para preenchimento de defeitos ósseos, tem demonstrado, histologicamente, resultados satisfatórios.<sup>23</sup>

Há mais de duas décadas, pesquisas têm mostrado que os biomateriais cerâmicos à base de fosfato de cálcio são seguros e efetivos para uma variedade de aplicações clínicas e têm recebido maior atenção dos pesquisadores como biomaterial de substituição óssea.<sup>2</sup>

As biocerâmicas têm sido vastamente utilizadas em virtude da semelhança estrutural, química e física com a matriz mineral óssea não induzindo qualquer reação imunológica ou tóxica.<sup>1</sup>

Os biomateriais têm se tornado uma alternativa para a correção de defeitos ósseos como preenchimento de alvéolos pós exodontia, preenchimento de espaços vazios entre os implantes osseointegrados instalados imediatamente e as paredes alveolares do terço cervical, para preenchimento do seio maxilar, nos procedimentos de reconstrução do rebordo alveolar total ou parcialmente perdido como consequência de doenças periodontais, cistos, tumores e traumatismos.<sup>2</sup>

Segundo Carvalho et al.<sup>2</sup> os biomateriais devem apresentar as propriedades de não induzir à formação de trombos como resultado do contato entre o sangue e o biomaterial; não induzir resposta imunológica adversa; não ser tóxico; não ser carcinogênico; não perturbar o fluxo sangüíneo; não produzir resposta inflamatória aguda ou crônica que impeça a diferenciação própria dos tecidos adjacentes.

Biomateriais aloplásticos vêm sendo utilizados no preenchimento de cavidades ósseas na tentativa de induzir reparação óssea. No início dos anos 70,

muitos pesquisadores começaram a estudar um grupo de materiais sintéticos constituídos de cerâmicas de fosfato de cálcio. Nos anos 80, uma série de artigos foram publicados, avaliando os diversos aspectos destas cerâmicas. Estes materiais são biocompatíveis, pois não induzem qualquer reação adversa, além de conter cálcio e fosfato que estão presentes no tecido ósseo.<sup>26</sup>

Materiais de fosfato de cálcio, por si só, não são osteoindutores (ou seja, não têm a capacidade de induzir a formação de osso novo), já os biomateriais derivados do sangue, possui essa característica de osteoinduzir a formação óssea, possibilitando que tais materiais sejam usados para substituir o uso de enxertos autógenos e homogêneos.

Dalapicula et al.<sup>3</sup> afirmaram que os biomateriais vêm sendo cada vez mais utilizados na Implantodontia, atuando nos procedimentos de reconstrução do rebordo alveolar total ou parcialmente perdido como consequência de doenças periodontais, extrações traumáticas, cistos, tumores e traumatismos.

LeGeros<sup>2</sup> e Ehrenfest et al.<sup>1</sup> exemplificam os materiais substitutos ósseos incluindo metais; polímeros; bovinos; corais; cerâmicas sintéticas (fosfatos de cálcio, sulfatos de cálcio, carbonatos de cálcio, vidros bioativos) e derivados plaquetários: Plasma Rico em Plaquetas Puro (P – PRP); Plasma Rico em Plaquetas e Leucócitos (L – PRP); Fibrina Rica em Plaquetas Pura (P – PRF); Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (PRF – L).

### **3.2 Beta tricálcio fosfato**

Bhaskari et al.<sup>2</sup> em análise microscópica eletrônica de implantes cerâmicos biodegradáveis de fosfato de cálcio em tíbias de 66 ratos, demonstraram que o fosfato de cálcio é bem tolerado pelos tecidos dos ratos; em de 4 dias há o crescimento de tecido de conexão no interior dos poros da cerâmica; após 1 semana, a formação óssea se inicia ao redor do implante e se estende até o centro; o osso é depositado diretamente na estrutura cerâmica e calcificada; a cerâmica é

fagocitada por células mesenquimais e pode ser vista no interior de seu citoplasma; em 14 semanas, o córtex já está completamente reparado, mas na região central do defeito, parte do implante ainda pode ser detectado. Foi possível demonstrar através da microscopia eletrônica que o osso neoformado é estruturalmente normal e se deposita diretamente na cerâmica. Com o decorrer do tempo, há uma redução progressiva na quantidade de cerâmica e um aumento de tecido ósseo. Os estágios iniciais de reparação na cerâmica incluem fagocitose e digestão pronunciada das menores partículas da cerâmica. De acordo com esses achados, os implantes cerâmicos de fosfato cálcio não causam reação inflamatória, são reabsorvíveis e osteogênicos. Baseado nesses resultados, esse material pode ser utilizado para o preenchimento de defeitos ósseos cirúrgicos ou traumáticos.

Lange et al.<sup>2</sup> estudaram o potencial de crescimento ósseo com tricálcio fosfato (TCP) em defeitos de osso medular em porcos adultos. Foram criados defeitos na tíbia e no fêmur de cada membro posterior, em um total de 12 locais. No grupo controle, o osso remanescente foi conservado para ser utilizado como enxerto autógeno, enquanto os outros defeitos foram preenchidos com tricálcio fosfato. Todos os animais foram sacrificados após 9 meses. A quantidade de osso regenerado foi medida utilizando técnicas histomorfométricas. A avaliação qualitativa em 4 meses demonstrou ausência de inflamação e TCP envolvido por osso trabecular, o qual está uniformemente viável. Havia pouco TCP presente aos 9 meses. A análise quantitativa demonstrou que as tíbias apresentaram um maior percentual de substituição de emaranhado ósseo com TCP comparado com o grupo controle, sendo o valor de 32% versus 13% respectivamente. O defeito de fêmur preenchido com TCP foi comparável ao do osso autógeno em 29%. Os resultados combinados de tíbia e fêmur revelaram que o TCP possui um maior percentual de emaranhado ósseo comparado com o osso autógeno em 30.5% versus 21%. Tanto os locais com TCP quanto com osso autógeno apresentaram um maior percentual de substituição óssea com o passar do tempo. Tanto na análise qualitativa quanto quantitativa, o TCP demonstrou-se de forma favorável quanto ao enxerto de osso autógeno em termos de formação de osso trabecular. Os autores afirmaram que o TCP é uma cerâmica que possui propriedades biológicas de biocompatibilidade, não causam reação inflamatória e são reabsorvíveis, agindo como um arcabouço para crescimento ósseo.

Yamamoto et al.<sup>3</sup> desenvolveram dois tipos diferentes de cimento de fosfato de cálcio para a fixação de implante: cimento A - um composto de 95% de cimento de TCP (α-TCP) e 5% de di-hidrato de fosfato de cálcio (DCPD) e cimento B – um composto de 90% de fosfato tricálcio e 10% de fosfato de cálcio di-hidrato. A fim de avaliar as características mecânicas dos cimentos de fosfato de cálcio, testes de resistência à compressão e tração foram realizadas *in vitro* e *in vivo*. Resistência à compressão *in vitro* não houve diferença significativa entre o cimento A e o cimento B em 3 dias e 4 semanas do ensaio. Resistência à compressão *in vivo* o cimento A foi consideravelmente mais forte do que no cimento B, 2 semanas após o ensaio, mas não foi observada diferença significativa em 1 semana. Força de tração *in vitro*: o cimento A mostrou uma força de tracionamento de 490,5 N após 3 dias, 570,2 N após 1 semana, 595,5 N após 2 semanas, e 458,1 N depois de 4 semanas. Cimento B mostrou uma força de tração de 386,5 N após 3 dias, 443,4 N após 1 semana, 453,2 N após 2 semanas, e 389,5 N após 4 semanas. Ambos os cimentos não mostraram nenhuma grande mudança ao longo do período de imersão *in vitro*. Cimento A foi ligeiramente mais forte do que o cimento B mostrando diferença significativa em 2 semanas dos testes. Força de tração *in vivo*: Cimento A mostrou uma força de tração de 6,9 N após 3 dias, 81,4 N após 1 semana, 220,7 N após 2 semanas, e 167,8 N após 4 semanas. Cimento B mostrou uma força a retirada de 40,2 N após 3 dias, 51,0 N após 1 semana, 262,9 N após 2 semanas, e 144,2 N após 4 semanas. Não foi observada diferença significativa entre o cimento e cimento A B. As observações radiográficas e histológicas obtidas a partir de cimento A e B cimento foram quase idênticas. Aos 3 dias após o implante, o defeito foi encontrado na interface do osso e o cimento, onde foram observadas lacunas na interface entre o cimento e o osso original, e formação de osso novo não foi observada. Nenhuma falha foi encontrada na interface entre o cimento e o parafuso. Duas semanas após a implantação, a formação de novo osso foi observada na interface cimento ósseo onde o tecido foi ligado diretamente ao cimento. Concluiu-se que os cimentos de fosfato de cálcio podem ser utilizados como biomaterial para melhorar a fixação de implantes.

Ortega et al.<sup>31</sup> relataram resultados do tratamento com implantes dentários inseridos em diversas situações clínicas usando um biomaterial como preenchimento ósseo. Quarenta e três pacientes com perda de dentes foram

tratados com 171 implantes Microdent®. BTCP (KeraOs®) foi usado em todos os casos, como biomaterial para regeneração óssea. Os implantes foram carregados depois de 6 meses. Os resultados clínicos indicaram uma taxa de sobrevivência e de sucesso dos implantes de 98,8%. Este estudo sugere que o BTCP pode ser utilizado com sucesso como material de enxerto em tratamentos de implantes dentários.

Yamada et al.<sup>32</sup> compararam BTCP como material de enxerto ósseo para aumentar rebordos alveolares altamente reabsorvidos. Foram utilizados os ossos do crânio de 15 coelhos. Três câmaras cheias de titânio com blocos porosos de BTCP, a-TCP, e coágulos de sangue foram colocadas em cada fenda. Os animais foram sacrificados após 2, 4 e 8 semanas. Análise histológica e histomorfométrica foram utilizadas. As partículas de osso recém-formado foram reabsorvidas por células semelhantes a osteoclastos. Os autores sugerem que as partículas de BTCP desaparecem progressivamente a partir da remodelação óssea em combinação com a formação de osso.

Jensen et al.<sup>33</sup> compararam cicatrização de defeitos com coágulo, osso autógeno particulado, e osso bovino desproteínizado (DBBM), três compósitos bifásicos de fosfato de cálcio (BCP) nas proporções (HA / TCP) 20/80, 60/40 e 80/20. Os defeitos foram preparados nas mandíbulas de 24 porcos que foram divididos em quatro grupos de seis, com tempos de 4, 13, 26 e 52 semanas, respectivamente. A análise histológica e avaliação histomorfométrica focou nas diferenças de quantidade e padrão de formação óssea, degradação do material de enchimento e a interface entre o osso e carga. Auto-enxerto mostrou mais formação óssea que DBBM, BCP, 80/20, 60/40 e BCP nas fases iniciais de cicatrização e uma maior percentagem de superfície coberta com enxerto ósseo ao longo do período de estudo. Histomorfometricamente, BCP 20/80 realizada semelhante ao autoenxerto durante todo o período de cicatrização ING, apesar de uma fracção menor da superfície de enchimento coberta com osso após 4 semanas. No entanto, não foram observadas diferenças qualitativas. Células semelhantes a osteoclastos foram ocasionalmente identificadas nas superfícies de todos os materiais de enxerto. Auto-enxerto e BCP 20/80 apresentou uma alta taxa de reabsorção, BCP 80/20 e 60/40 BCP teve uma taxa de reabsorção baixo, enquanto DBBM foi o único material que não demonstrou evidências quantitativas de degradação em 52 semanas.

Covani et al.<sup>34</sup> em estudo prospectivo avaliaram a sobrevivência de implantes instalados após a elevação de assoalho de seio maxilar, a longo prazo na prática clínica com pós-operatório de cinco anos em pelo menos 50 pacientes. Foram incluídos nesse estudo apenas pacientes com 12 meses após a colocação do implante. Os pacientes foram tratados de acordo com a técnica de duas fases e o preparo foi preenchido com BTCP. A sobrevivência do implante foi avaliada a cada 3 meses durante os primeiros dois anos, e depois a cada 6 meses até 5 anos. Esta análise sugere que a elevação do assoalho do seio maxilar com BTCP é uma opção clínica eficaz.

Lezzi et al.<sup>3</sup> avaliaram histológica e histomorfometricamente, em cirurgias de enxerto de levantamento de assoalho de seio maxilar em seres humanos, tratados com hidroxiapatita, cerâmica bifásicas de fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, osso suíno e osso bovino inorgânico depois de um período de cicatrização de 6 meses. Um total de 15 pacientes, foram submetidos a 30 procedimentos de levantamento do assoalho dos seios maxilares com um dos cinco biomateriais. Um total de 82 implantes dentários foram inseridos nos seios aumentados após um período de 6 meses. Algumas partículas de biomateriais foram parcialmente reabsorvidas e substituídas por osso recém-formado. Exames histológicos e de histomorfometria mostraram que em todos os biomateriais, osso recém-formado e partículas de material enxertadas residuais representaram cerca de 30%. A alta microporosidade permite, em todos os biomateriais, o crescimento interno do osso e dos vasos recém-formados nos poros das partículas parcialmente reabsorvidas. Este estudo apoia o fato de que todos estes biomateriais podem ser usados com êxito em procedimentos de levantamento de assoalho de seio maxilar.

Shalash et al.<sup>3</sup> avaliaram a eficácia do BTCP isoladamente e em comparação com matriz óssea desmineralizada (DBM) nas deficiências de rebordo alveolar maxilar antes da colocação do implante. O estudo incluiu 20 pacientes com atrofia maxilares horizontais limitados a um ou mais dentes vizinhos e largura do rebordo inicial < 5mm. Os pacientes foram divididos em dois grupos iguais. O aumento ósseo foi realizado utilizando regeneração óssea guiada (ROG). No grupo I ROG foi realizada utilizando apenas BTCP, enquanto que no grupo II foram utilizados tanto BTCP e DBM. Após um período de 6 meses, biópsias de tecido

ósseo foram coletados de ambos os grupos e os implantes foram instalados. Um caso de cada grupo demonstrou exposição precoce da membrana que exigiu sua remoção após quatro semanas deixando apenas 18 pacientes. Todos os demais casos foram finalizados sem quaisquer efeitos adversos graves e demonstraram clinicamente significativo aumento na largura do rebordo alveolar e resistência à perfuração, quando o local de implantação foi preparado. Exames histológicos foram usados para calcular a porcentagem de osso mineralizado. Tomografia computadorizada foi usada para avaliar mudanças apical e crestal imediatamente após a colocação do enxerto e após seis meses. Os achados histológicos no grupo I mostraram evidências de remodelação e novo osso que circunda os fragmentos de enxerto. No grupo II, grandes quantidades de tecido ósseo e mineralização com vestígios mínimos de material de enxerto rodeado por tecido ósseo recém-formado. Análise dos cortes histológicos demonstraram que a porcentagem de osso mineralizado na área obteve média de 40,1 % para o grupo I e 68,96% para o grupo II. A porcentagem remanescente de  $\beta$ -TCP área média foi de 6,5% para o grupo I e 1,7% para o grupo II. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, onde o grupo II teve um percentual maior área de osso mineralizado e uma porcentagem do material de enxerto restante do grupo I menor área. Radiograficamente, a quantidade de ganho ósseo tanto apical e crestal foi estatisticamente significativa para ambos os grupos. Embora o grupo II mostrou maior ganho de osso com uma média de 1,37 mm crestal e 2,44 mm apicalmente, onde essa diferença não foi estatisticamente significativa. ROG utilizando  $\beta$ -TCP pode resultar em bem sucedido aumento ósseo horizontal suficiente para a colocação de implantes endósseos. Tanto  $\beta$ -TCP com DBM pode aumentar ainda mais o valor do ganho óssea na área do defeito.

Zhang et al.<sup>3</sup> em estudos com cimentos de fosfato de cálcio (CPCs) para substituição óssea enfocam alguns parâmetros de processamento, tais como o tamanho das partículas, composição de reagentes de cimento e aditivos que podem ser ajustados para controlar o processo de definição dos CPCs, influenciando seu desempenho mecânico. A limitação real para uso de CPCs parece ser sua baixa resistência à fratura e baixa capacidade mecânica que até agora foram pouco estudadas. CPCs com resistências comparáveis as do de osso cortical podem ser produzidas, e estes cimentos podem ter potencial para a reparação de defeitos de

suporte de carga. Pesquisas devem se concentrar mais na tenacidade à fratura, a tolerância aos danos e confiabilidade e, especialmente, sobre as formas de melhorá-los sem sacrificar as outras propriedades importantes que fazem CPCs bons substitutos ósseos. No entanto, esta nova geração de cimentos compósitos ainda iria apresentar uma estrutura porosa limitada que dificulta ambas as interações com fluidos biológicos e colonização celular. Um equilíbrio, então, tem que ser encontrado entre o desempenho biológico e as mudanças no comportamento mecânico provocado por tanto a macroporosidade e também o efeito compósito. No entanto, um estudo completo das reações químicas, manuseio, performances mecânicas e biológicas ainda não foi realizado.

Tosta et al.<sup>3</sup> investigaram a eficácia de um fosfato de cálcio bifásico como um material de enxerto ósseo para o levantamento de assoalho do seio maxilar em humanos. Quinze pacientes selecionados para o aumento do seio foram enxertados com fosfato de cálcio bifásico, e outros 15 pacientes foram enxertados com osso autógeno colhido na hora da cirurgia, da região oral. Após 9 meses, biópsias de tecido ósseo foram coletadas a partir das áreas de colocação dos implantes para análise histológica e avaliação histomorfométrica. As áreas enxertadas com osso autógeno apresentaram formação de osso com um padrão muito semelhante ao da área nativa. A histomorfometria demonstrou que a quantidade de osso neoformado no grupo osso autógeno foi significativamente maior do que no grupo de fosfato de cálcio bifásico ( $P < 0,05$ ). No grupo de fosfato de cálcio bifásico, menor formação de osso foi observada na região mais distante a partir da interface osso nativo do que na região mais estreita para a interface osso nativo ( $P < 0,05$ ), enquanto que não se observaram diferenças significativas entre as duas zonas do grupo autógeno. Em ambos os grupos, a taxa de sobrevivência do implante foi de 100%, com um mínimo de 1 ano de acompanhamento. Os dados apresentados neste trabalho confirmam as propriedades osteocondutoras do fosfato de cálcio bifásico, bem como a sua utilização para o tratamento de levantamento de assoalho de seio maxilar.

Chou et al.<sup>3</sup> em estudo para examinar as propriedades de regeneração óssea de BTCP no reparo de defeitos em calvárias de ratos, afirmam que estes materiais naturais possuem rede porosa interligada única. Foram criados defeitos ósseos de 5 mm de diâmetro em calvárias de 20 ratos Wistar machos adultos. A

taxa de osso recém-formado foi medida radiologicamente por raio-X, microtomografia computadorizada e exame histológico. Após 2 semanas, o grupo BTCP apresentou fechamento completo do local do defeito, enquanto que o grupo controle permaneceu sem formação óssea. Observaram no grupo BTCP, um crescimento ósseo significativo a partir de 2 semanas de pós-operatório, com taxa muito mais elevada de formação óssea quando comparado com o grupo controle vazio. Nenhuma reação dos tecidos moles foi observada e os ratos permaneceram saudáveis. Estes resultados mostraram que o BTCP, possui potencial para aplicação como enxertos ósseos para cirurgias de levantamento de assoalho do seio maxilar.

Lange et al. em um estudo comparativo por meio de microtomografia computadorizada entre fosfato de cálcio bifásico e osso bovino desproteínizado em levantamento de assoalho do seio maxilar em humanos, trataram cinco pacientes com maxilas atroficas. Os pacientes submeteram-se a elevação do seio maxilar bilateral com DBA (Bio-Oss®) e BTCP (Straumann BoneCeramic). Depois de 3 a 8 meses, 32 implantes foram colocados, e biópsias foram realizadas. O volume de enxerto, o grau de mineralização óssea, e os números de osteoclastos e osteócitos foram semelhantes, mas enxerto com BTCP obteve relativamente mais osteóide do que pelo DBA. O BTCP e materiais DBA apresentaram padrões osteocondutores semelhantes e sinais de formação óssea mais ativa foram observadas em BTCP do que em enxerto com DBA.

### **3.3 PRF – L**

Estudos de Choukroun et al.<sup>18</sup> definiram conceitos tecnológicos e evolução do PRF – L, que pertence a uma nova geração de concentrados de plaquetas com preparação simplificada sem manipulação bioquímica de sangue. Um dos grandes desafios clínicos é o desenvolvimento de aditivos cirúrgicos bioativos que regulam o processo inflamatório e aumento da cicatrização. A fibrina é a forma ativada de uma molécula fibrilar solúvel, maciçamente presente tanto em plasma e plaquetas, desempenhando um papel determinante durante a hemostasia. O fibrinogénio é o

substrato final de todas as reações de coagulação. Sendo uma proteína solúvel, o fibrinogénio é transformado em fibrina e constitui a primeira matriz de cicatrização de feridas do sítio cirúrgico. O modo de funcionamento de adesivos de fibrina reproduz a última fase das cascatas enzimáticas de coagulação durante o qual o fibrinogénio é convertido em fibrina, na presença de trombina, fator XIII, e fibronectina. PRF - L foi inicialmente desenvolvido na França por Choukroun et al. (2001) para uso específico em cirurgia oral e maxilo-facial. O protocolo PRF – L é muito simples, uma amostra de sangue é coletada sem anticoagulante em 10 ml em tubos *vacutainers* que são imediatamente centrifugados a 3000 rpm (aproximadamente 400g de acordo com nossos cálculos) por 10 minutos. O fibrinogénio é inicialmente concentrado na parte alta do tubo, antes da trombina circulante transforma-lo em fibrina. Um coágulo de fibrina é então obtido no meio do tubo, entre os glóbulos vermelhos no fundo e no plasma acelular na parte superior. O sucesso desta técnica depende inteiramente da velocidade de coleta do sangue e da transferência para o centrifugador. A manipulação rápida é a única maneira de obter um coágulo de PRF - L clinicamente utilizável. Se a duração necessária para coletar sangue e lançamento de centrifugação for muito longa, pode ocorrer falha na obtenção do PRF-L. O modo de polimerização lenta confere à membrana de PRF – L uma arquitetura fisiológica particularmente favorável para apoiar o processo de cicatrização.

Dohan et al.<sup>1</sup>, estudaram as características biológicas das plaquetas associada ao PRF – L. Durante o processamento do PRF - L por centrifugação, as plaquetas são ativadas e sua enorme degranulação implica uma liberação muito significativa de citocinas. Para um estudo comparativo, portanto, deve-se quantificar PDGF-BB, TGFb-1 e IGF-I no PPP (plasma pobre em plaquetas), sobrenadante e PRF – L. A quantificação de citocinas de plaquetas no PRF – L, portanto, constitui um passo significativo na compreensão deste biomaterial, porque estas moléculas solúveis são mediadores no processo inflamatório. No entanto, na realidade, muito mais do que a quantificação, é o seu modo de incorporação a matriz de fibrina que parece ser muito importante para determinar. Estas análises iniciais revelaram que a polimerização da fibrina durante o processamento lento de PRF - L conduz à incorporação intrínseca de citocinas e nas malhas de fibrina. Este resultado implica que PRF - L, ao contrário dos outros concentrados de plaquetas, é capaz de liberar

progressivamente citocinas durante remodelação da matriz de fibrina; tal mecanismo poderia explicar as propriedades curativas clinicamente observados do PRF – L. A coleta de sangue foi realizada em 15 voluntários. Amostras de sangue foram coletadas de acordo com o protocolo PRF – L: 10 ml de sangue em tubos de plástico revestido de vidro e imediatamente centrifugados a 3000 rpm (aproximadamente 400 g) por 10 minutos. Depois do processamento, 2 amostras de PRF – L foram separadas. Os 2 tipos de amostras foram armazenadas em tubos de Eppendorf a -80 °C. As taxas de PDGF-BB, IGF-1, e TGFb $\beta$ -1 nestas amostras foram quantificadas por ELISA (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, Minn). Os valores foram então comparados com os obtidos em sangue total de acordo com o protocolo 2 a amostra de sangue foi tirada em um tubo seco e ainda manteve durante 30 minutos, para deixá-lo tempo suficiente para coagular completamente. Em seguida, o tubo foi submetido a uma centrifugação de 15 minutos a 1000g, tornando possível recuperar um soro representante para as taxas de citocinas do sangue completamente ativada. A amostra de sangue foi feita com anticoagulante (EDTA, citrato, ou heparina) e imediatamente centrifugadas durante 15 minutos a 1000g. Análise de Plasma, em seguida, apresentou taxas de citocinas que circulantes livres no sangue. Em primeiro lugar, não houve diferença significativa entre as concentrações de citocinas medidos no sobrenadante PPP e aqueles no coágulo real PRF. Em segundo lugar, PDGF-BB e TGFb-1 taxas medidos em sobrenadantes e PRF coágulos exsudato são bastante. Esta primeira análise bioquímica da composição do PRF - L indicou que este consiste de um biomaterial de montagem íntima de citocinas, cadeias glicânicas, e glicoproteínas estruturais enredadas dentro de uma rede de fibrina polimerizada lentamente. Esses componentes bioquímicos com efeitos sinérgicos sobre o processo de cura. Como exemplo, a fibronectina na proliferação celular, potencializa os efeitos estimulantes de PDGF-BB. Estes dados preliminares, portanto, implica que PRF – L não seria apenas uma nova geração de gel de plaquetas, mas um concentrado de cura completamente usável.

Dohan et al.<sup>42</sup>, em estudo de avaliação de ativação de leucócitos, investigaram as características imunológicas do PRF - L. Durante o processamento do PRF - L, leucócitos também poderiam secretar citocinas em reação ao processo

hemostático e inflamatório induzido artificialmente no tubo centrifugado. Quantificaram 5 mediadores celulares significativos dentro do sobrenadante de plasma pobre e PRF – L: três citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6, e TNF-a), uma citocina anti-inflamatória (IL-4), e um fator de crescimento de angiogênese (VEGF). Os dados foram correlacionados com os valores obtidos no plasma (sangue não ativado) e no soro (sangue ativado). Análises iniciais revelaram que PRF - L pode regular o processo inflamatório e aumentar imunidade local. Este conceito poderia explicar a redução de infecções pós-operatórias quando PRF - L é usado como aditivo cirúrgico. Para o estudo, coleta de sangue foi realizada em 15 voluntários. Amostras de sangue foram coletadas de acordo com o protocolo PRF – L: 10 ml de sangue em tubos de plástico revestido de vidro e imediatamente centrifugados a 3000 rpm (aproximadamente 400 g) por 10 minutos. Depois do processamento, 2 amostras de PRF – L foram separadas. Os 2 tipos de amostras foram armazenadas em tubos de Eppendorf a -80°C. As taxas de PDGF-BB, IGF-1, e TGFb $\beta$ 1 nestas amostras quantificadas por ELISA (Quantikine, R & amp; D Systems, Minneapolis, Minn). Os valores médios foram diferidos em histogramas e analisados estatisticamente. Estes valores foram então comparados com os obtidos em sangue total de acordo com o protocolo 2: - A amostra de sangue foi tirada em um tubo seco e ainda manteve durante 30 minutos, para deixá-lo tempo suficiente para coagular completamente. Em seguida, o tubo foi submetido a uma centrifugação de 15 minutos a 1000g, tornando possível recuperar um soro representante para as taxas de citocinas do sangue completamente ativada. A amostra de sangue foi feita com anticoagulante (EDTA, citrato, ou heparina) e imediatamente centrifugadas durante 15 minutos a 1000g. Dois principais itens de dados foram destacados pela análise estatística dos resultados obtidos. Em primeiro lugar, não existem diferenças significativas ( $P < 5\%$ ) entre as concentrações de citocinas medidos no sobrenadante PPP e aqueles no coágulo real PRF. Em segundo lugar, os valores obtidos nos exsudados (ou coágulo PRF PPP sobrenadante) são significativamente mais altos do que os medidos em amostras de plasma e de soro. As citocinas desempenham um papel significativo no equilíbrio delicado de homeostase do tecido. Embora CPRP e agora características de plaquetas PRF já estão bem documentados, isso definitivamente não é o caso para os aspectos inflamatórios. Os resultados obtidos, portanto, abrir uma nova investigação às operações para a compreensão dessas

tecnologias, porque PRF não é apenas um concentrado de plaquetas, mas também um nó imunológico capaz de estimular os mecanismos de defesa. É até provável que a regulação inflamatória significativa observada em locais cirúrgicos tratados com PRF - L é o desfecho de efeitos de citocinas na rede de fibrina e liberadas durante a remodelação desta matriz inicial.

Choukroun et al.<sup>3</sup> investigaram sobre a biologia de PRF - L com os resultados clínicos, para determinar as potenciais áreas de aplicação para este biomaterial. O raciocínio é estruturado cerca de 4 eventos fundamentais da cicatrização, ou seja, a angiogênese, controle imunológico, células-tronco circulantes e epitelização da ferida. Estas são as 3 chaves para a cura e dos tecidos moles maturação Todas as aplicações clínicas conhecidas do PRF - L destacam uma cicatrização de tecidos acelerado devido o desenvolvimento de neovascularização eficaz, acelerado ferida fechando com rápida remodelação do tecido cicatricial, e ausência quase total de eventos infecciosos. Assim, a presente pesquisa inicial faz com que seja possível planejar várias aplicações futuras PRF, incluindo cirurgia plástica e osso, desde que os efeitos reais são avaliados tanto com imparcialidade e rigor. A experiência clínica confirma que PRF - L pode ser considerado como um biomaterial de cura. Dispõe de todo o parâmetros necessários que permitem a cura ótima. Estes consistem numa matriz de fibrina polimerizada em tetramolecular estrutura, a incorporação de plaquetas, leucócitos, e citocinas, e a presença de haste circulante células. Apesar do fato de que as citocinas são presos em PRF gradualmente libertado e capaz de acelerar a celular fenómeno, a estrutura da rede de fibrina é a elemento-chave de todos melhoraram PRF processos de cura. Finalmente, do ponto de vista clínico, isto biomaterial parece acelerar a cicatrização fisiológica e os numerosos perspectivas da PRF ainda tem que ser clinicamente testados.

Choukroun et al. em avaliação histológica do efeito de PRF - L na maturação do enxerto ósseo na elevação do seio em combinação com enxerto ósseo liofilizado (FDBA) (Phoenix; TBF, França). Nove aumentos do assoalho do seio foram realizados. Em 6 sítios, PRF foi adicionado às partículas FDBA (grupo de teste), e em 3 locais FDBA sem PRF foi utilizado (grupo controle). Quatro meses mais tarde para o grupo de teste e 8 meses mais tarde para o grupo de controle, as amostras de osso foram colhidas a partir da região aumentada durante o processo

de inserção do implante. Estas amostras foram tratadas para análise histológica. Avaliações histológicas revelaram a presença de osso residual cercado por osso recém-formado e do tecido conjuntivo. Após 4 meses de tempo de cura, maturação histológica do grupo de teste parece ser idêntico ao do grupo de controle após um período de 8 meses. Além disso, as quantidades de osso neoformado foram equivalentes entre os 2 protocolos. Com aumento FDBA e PRF leva a uma redução do tempo de cicatrização antes da colocação do implante. Do ponto de vista histológico, este tempo de cicatrização poderia ser reduzido para 4 meses, mas estudos em grande escala ainda são necessários para validar estes primeiros resultados.

Para Raja e Naidu o PRF - L é amplamente utilizado para acelerar a cicatrização de tecido mole e de tecido ósseo. Este estudo descreve a evolução deste novo concentrado de plaquetas, denominado PRF - L. A quantidade necessária de sangue é tirada para dentro de tubos de ensaio de 10 ml sem anticoagulante e imediatamente centrifugado. O sangue é centrifugado usando uma centrífuga de bancada (REMY® Laboratórios) durante 12 min a 2.700 rpm. O produto resultante consiste de três camadas seguintes: - Camada superior que consiste em acelular (PPP); - PRF - L (coágulo no meio); - Hemácias na parte inferior. Tem-se demonstrado várias vantagens sobre PRP preparado tradicionalmente. Suas principais vantagens incluem a facilidade de preparação e falta de manuseio bioquímico do sangue, o que torna esta preparação estritamente autóloga. Concluíram que a popularidade deste material deve aumentar considerando as suas muitas vantagens. No futuro, as avaliações histológicas são necessárias para entender os benefícios deste concentrado de plaquetas de segunda geração.

Ehrenfest, Rasmusson e Albrektsson classificaram os concentrados de plaquetas a partir de plasma puro rico em plaquetas (PRP-P) para fibrina rica em plaquetas e leucócitos (PRF - L), mas a sua eficácia ainda continua controversa. O objetivo é reconhecer que há várias técnicas disponíveis, no entanto, suas aplicações apresentam-se confusas, pois cada método conduz a um produto diferente, com uma biologia diferente e potencial de uso também diferente. A classificação desses diferentes concentrados se dá em quatro categorias,

dependendo do seu teor de leucócitos e de fibrina: - plasma rico em plaquetas puro (P-PRP), tal como PRP separador de células, Vivostat PRF ou de PRGF Anitua; - plasma Rica em plaquetas e leucócitos (L-PRP), como Curasan, Regen, Plateltex, SmartPrep, PCCS, Magellan ou GPS PRP; - fibrina pura em plaquetas (P-PRF), tal como Fibrinet; - fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), tal como PRF - L de Choukroun. Esta classificação deve ajudar a elucidar sucessos e fracassos que ocorreram até agora, bem como uma panacéia de abordagens para o desenvolvimento destas técnicas.

Gassling et al. estudaram o PRF – L em forma de membranas utilizadas para cobrir o osso alveolar em vários estudos in vivo. Existem poucas pesquisas in vitro sobre PRF - L e não há estudos utilizando células de perióstio para engenharia de tecidos humanos. Este estudo compara PRF - L com a membrana de colágeno Bio-Gide para engenharia de tecidos periosteal. Células do perióstio humanos foram semeadas em pedaços de membrana (colágeno Bio-Gide e PRF - L). Membranas de colágeno Bio-Gide mostraram biocompatibilidade ligeiramente inferior ao PRF - L. PRF - L parece ser superior ao colágeno (Bio-Gide) como andaime para humanos em proliferação de células de perióstio. Membranas de PRF - L são adequados para cultivo in vitro de células de perióstio para engenharia de tecido ósseo.

Mazor et al. em estudos de levantamento de assoalho do seio maxilar com a colocação do implante simultâneo sem material de enxerto ósseo, afirmam que essa é uma técnica muito discutida, e que esta pode ser melhorada e assegurada pelo uso de PRF - L (técnica de Choukroun). Avaliaram a relevância de coágulos e membranas de PRF - L como o material de preenchimento único durante elevação do seio com instalação de implantes imediatos por meio de exames radiológicos e análises histológicas. Vinte e cinco procedimentos de elevações do seio com PRF - L foram realizados em 20 pacientes como único biomaterial de preenchimento. Após 6 meses, biópsias ósseas foram colhidas na parede vestibular do rebordo ósseo ao nível da janela de osteotomia e avaliada por histomorfometria. Todos os implantes foram inseridos em altura óssea residual entre 1,5 e 6 mm. O ganho de osso final foi muito significativo (entre 7 e 13 milímetros). Após análises radiológicas, a posição do seio maxilar final foi na continuação da extremidade do implante. Todas as biópsias

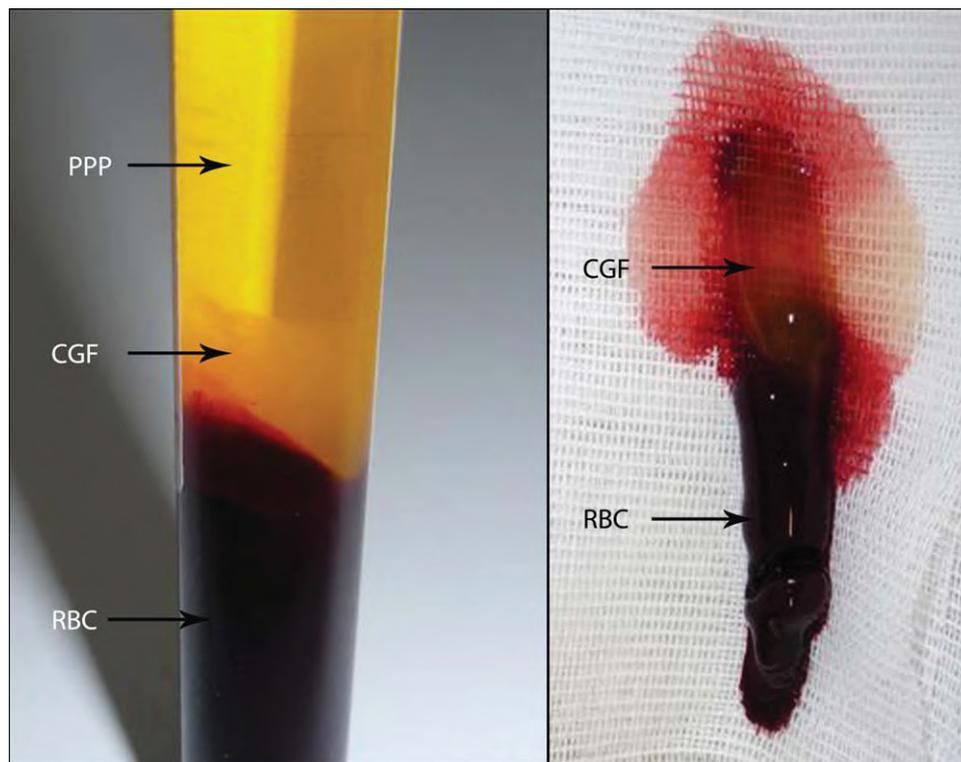
mostraram osso bem organizado. A utilização de PRF - L como material de preenchimento único durante procedimento de elevação do seio com instalação imediata do implante teve um alto volume de osso regenerado. PRF - L é um biomaterial simples e barato, e seu uso durante elevação do assoalho do seio maxilar parece uma opção relevante.

Toffler et al. estudaram PRF – L e apontaram que esse biomaterial é uma segunda geração de concentrado de plaquetas amplamente utilizado para acelerar a cicatrização de tecidos moles e duros. O objetivo desse estudo foi verificar as vantagens sobre o PRP que incluem a facilidade de preparação/aplicação e sem necessidade de modificação bioquímica (sem trombina bovina ou anticoagulante). PRF - L é uma matriz de fibrina estritamente autóloga contendo uma grande quantidade de plaquetas, leucócitos e citocinas. Vários estudos têm mostrado que a regeneração óssea pode ser melhorada pela adição de fatores de crescimento de PRP. Fatores de crescimento como PDGF, TGF-B, e IGF-1 no local da cirurgia, enriquecem o coágulo de sangue natural, a fim de acelerar a cicatrização de feridas e estimular a regeneração óssea. Um coágulo de sangue humano natural, contém 95% de glóbulos vermelho (RBCs), 5% de plaquetas, menos de 1% de glóbulos brancos (leucócitos), e quantidades numerosas de cadeias de fibrina. Um coágulo de sangue de PRP, por outro lado, contém 4% GVs, 95% de plaquetas, e 1% WBCs. As primeiras experiências clínicas parecem indicar que a PRF - L melhora a cicatrização de tecido mole e maturação de enxertos ósseos.

Del Corso et al. apontaram que PRF - L pode ser considerado um bom material para acelerar a cicatrização, incorporando leucócitos, plaquetas e uma ampla gama de proteínas dentro de uma matriz de fibrina densa. PRF – L possui lenta liberação de fatores de crescimento e glicoproteínas ao longo de vários dias. Esta membrana bioativa natural pode aumentar tecidos moles/duros e ao mesmo tempo proteger ambos os locais cirúrgicos e materiais enxertados das agressões externas. O objetivo desse estudo foi de propor uma visão geral do uso do PRF - L em procedimentos de regeneração tecidual. O PRF - L pode ser utilizado como um material de preenchimento em avulsão (ou extração) ou misturado com um substituto de osso. Utilizado como uma membrana de revestimento para a regeneração óssea guiada (GBR), PRF - L tanto protege o material enxertado e

acelera o fechamento da ferida, particularmente quando sutura contígua das margens da ferida não é possível. A gama de aplicações clínicas do PRF - L é ampla, mas um conhecimento exato do biomaterial, sua biologia, eficiência e limitações é necessário para otimizar sua utilização na prática clínica.

Rodella et al. <sup>1</sup> avaliaram a presença de importantes fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1 e VEGF) envolvidos na regeneração de tecidos, uma vez que as células-tronco circulantes são recrutadas do sangue através das plaquetas para o tecido ferido. Os concentrados de fatores de crescimento (CGF) são produzidos através da transformação do sangue com um dispositivo especial de centrifugação. Amostras de sangue venoso foram coletadas de seis voluntários saudáveis. O CGF foi produzido a partir de 9 ml de sangue coletado em tubos estéreis *vacutainers* sem soluções anticoagulantes. Esses tubos foram depois imediatamente centrifugados (Medifuge MF200, SRL Silfradent, Itália), utilizando um programa com as seguintes características: 30 @ aceleração, 2 '2.700 rpm, 40 2.400 rpm, 2.700 rpm, 40, 30, 3.000 rpm, e 36 @ desaceleração e parada. No final do processo existem forma-se três constituintes do sangue: (PPP) na camada superior de plasma pobre em plaquetas; no meio o gel de fibrina Rica em plaquetas com agregação de fatores de crescimento (CGF); na camada inferior os glóbulos vermelhos (RBC) (Fig. 1). Este estudo demonstrou a presença de TGF- $\beta$ 1 e VEGF em CGF e RBC em camadas, sugerindo que procedimentos com CGF pode otimizar a quantidade de fatores em aplicações clínicas.



**Figura 1.** Amostra de sangue, após a centrifugação, sem anticoagulante (PPP- plasma pobre em plaquetas; CGF- com agregação de fatores de crescimento, RBC-glóbulos vermelhos)

Fonte: Rodella et al., 2010

Kobayashi et al. <sup>2</sup> preconizaram que para avaliar com precisão o resultado clínico do PRF - L, o protocolo de preparação deve ser padronizado. Coágulos de PRF - L preparados na hora foram compactados em uma fina membrana pelo dispositivo de compressão do PRF - L. O sangue foi coletado a partir de 5 voluntários saudáveis. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas por um sistema de centrifugação Medifuge (Silfradent S.rl, Santa Assim fia, Itália), utilizando um programa com as seguintes características: 3000 de aceleração, 20-2700 rpm (600 g), 40 - 2400 rpm (500 g), 30-3000 rpm (800 g), e 3600 e desaceleração. A localização das plaquetas foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e imunocoloração. Os níveis de fatores de crescimento foram avaliados por bioensaios e técnicas de matriz de citocina-anticorpo. Em conclusão, é difícil dizer com precisão como controlar a qualidade dos materiais de origem humana, tais como preparações de PRF - L, mas é muito importante realizar o mais alto nível de controle de qualidade sobre os preparativos do PRF - L antes da sua aplicação em um ambiente clínico. Para a padronização de

preparações de PRF - L como um material de enxerto para a regeneração de tecidos, foi proposto a utilização da região da membrana PRF - L com a maior área de enriquecimento de plaquetas e, além disso, não espremer para fora todo o plasma contido nos coágulos originais de PRF - L. A utilidade clínica deve ser avaliada em estudos clínicos.

Estudos de Ehrenfest et al.<sup>1</sup> apontam a classificação de concentrados de plaquetas para utilização cirúrgica, preparações regenerativas autógenas, produzidas pela centrifugação da amostra de sangue do próprio paciente. A literatura sobre o tema é considerável, mas os resultados publicados são muitas vezes contraditórios. É muito difícil de classificar e interpretar os dados disponíveis, devido a um grande número de técnicas de preparação, terminologias e formas destes materiais, bem como uma lista infinita de aplicações potenciais.

Classificação dos principais métodos disponíveis para a produção de concentrados de plaquetas: P - PRP – Plasma Rico em Plaquetas Puro; L - PRP – Plasma Rico em Plaquetas e Leucócitos; P-PRF – Fibrina Rica em Plaquetas Pura; PRF - L - Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos.

Mesmo se todas as técnicas e conceitos similares se mantenham dentro dos limites deste sistema de classificação, as variações possíveis das técnicas de produção são infinitas. Este sistema de classificação deve ser considerado como diretrizes para a preparação de trabalhos de pesquisa sobre o tema e melhorar o nosso conhecimento dessas preparações.

Naik et al.<sup>3</sup> em uma revisão crítica do papel do PRF - L na cicatrização de feridas. analisaram e discutiram as estratégias disponíveis para o uso do PRF - L em odontologia. PRF - L é uma matriz de fibrina em que as citocinas de plaquetas, fatores de crescimento e as células estão presas e podem ser liberadas depois de um determinado período de tempo e que pode servir como uma membrana reabsorvível. A busca eletrônica resultou em 302 artigos com base em critérios de inclusão e exclusão que foram especificamente pre-determinados, 72 trabalhos foram identificados como adequados aos critérios de inclusão e os restantes 230 artigos foram excluídos. A conclusão que se chegou foi que o PRF - L, tem uma boa

perspectiva para a sua utilização a título de ajuda de regeneração tecidual em vários aspectos da odontologia.

Tunali et al. desenvolveram uma nova fibrina rica em plaquetas preparado em tubos *vacutainers* de titânio para a formação de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (T-PRF - L). Baseiam na hipótese de que os tubos de titânio podem ser mais eficazes na ativação de plaquetas do que os tubos de vidro utilizados por Chouckroun em seu método de PRF - L. O objetivo foi o de encontrar um modelo animal adequado para se avaliar o método e para investigar a eficácia da T-PRF - L para a cicatrização de feridas. Amostras de sangue de seis coelhos foram utilizados para confirmar o protocolo para a formação de t-PRF - L. Avaliaram morfológicamente T-PRF - L e os coágulos através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O sangue coletado foi centrifugado durante 15 min a 3500 rpm e, 15 dias após a colocação da membrana, descobriram formação de tecido conjuntivo e de tecido ósseo na membrana T-PRF - L. Estes resultados mostraram que o t-PRF - L pode induzir a formação de osso e tecido conjuntivo, e cicatrização de feridas no prazo de 30 dias de tratamento.

Seung et al. estudaram PRF - L como material de enxertia único em procedimento de elevação do seio com colocação de implantes imediatos. Tem-se demonstrado pelas pesquisas que a elevação do seio simultâneo a instalação de implantes usando PRF - L como material único de enxerto é um procedimento confiável, promovendo aumento ósseo no seio maxilar. Um implante foi colocado após a elevação do assoalho do seio maxilar de seis cães. Os implantes foram deixados no local durante seis meses. Os achados deste estudo sugerem que a elevação do seio com colocação simultânea de implantes usando PRF - L como material de enxertia único não é um procedimento previsível e reprodutível, especialmente no que diz respeito à formação óssea ao redor dos implantes na cavidade maxilar.

Kim et al. compararam PRP, PRF - L e fator de crescimento concentrado (CGF) na cicatrização de defeitos em calvária de coelhos. Doze coelhos foram incluídos neste estudo randomizado e prospectivo. Defeitos de 15 mm de diâmetro foram criados no osso parietal e preenchidos com PRP, PRF - L, CGF, e o grupo controle sem preenchimento. O volume da densidade mineral óssea e osso foram

analisados com microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT) e análise histomorfométrica na 6ª e 12ª semana. Os resultados apontam que em análise  $\mu$ CT, a densidade mineral óssea e volume ósseo foi maior no grupo experimental do que nos controles, tanto a 6ª e 12ª semana, mas não entre os grupos experimentais. Da mesma forma, a análise histomorfométrica revelou que mais osso formado foi observado no grupo experimental. Conclui-se que a adição de PRP, PRF - L, e CGF tenha aumentado significativamente a formação óssea na 6ª semana. O efeito de PRP, PRF - L, e CGF são semelhantes e podem ser úteis no futuro para aumentar a taxa de sucesso do enxerto ósseo.

Yelamali e Saikrishna<sup>57</sup> discorreram sobre um estudo comparativo com PRF - L e PRP na cicatrização de feridas de terceiros molares extraídos. Este estudo incluiu 20 pacientes que se submeteram à extração bilateral de terceiros molares retidos. PRF - L e PRP foram preparados a partir de sangue autólogo dos pacientes e colocados nos locais das extrações do lado direito e esquerdo da boca dos pacientes, respectivamente. Os dados para a cicatrização dos tecidos moles foram registrados no final de uma semana, usando o índice de reparação de Landry et al. e os dados para a reparação do tecido ósseo foram registrados no final de 4 meses usando imagens digitalizadas *orthopantomogram* no Adobe Photoshop CS, que foi então comparada entre os dois locais do mesmo paciente. Os resultados apontam que os valores médios de cicatrização dos tecidos moles recolhidos em uma semana de pós-operatório, para o grupo PRF - L foram significativamente maiores em relação ao grupo PRP. E os valores médios de densidade óssea recolhidos no final do quarto mês de pós-operatório, para o grupo PRF - L também foram significativamente maiores em relação ao grupo PRP. PRF - L é significativamente melhor para promover a cicatrização do tecido mole e também a regeneração óssea em comparação com o PRP.

Boora, Rathee e Mohanee estudaram a viabilidade de PRF - L no reforço da cicatrização do tecido ósseo. Este estudo prospectivo avaliou o efeito de PRF - L aplicado sobre implante. Vinte indivíduos sistemicamente saudáveis com fácil manutenção da higiene oral foram divididos em dois grupos: grupo de estudo - PRF - L; e grupo controle - sem PRF - L. Os indivíduos foram avaliados clinicamente e radiograficamente no momento da colocação do implante, um mês e três meses de

pós-operatório para tecidos moles peri-implantar e crista óssea. Todos os implantes permaneceram após 3 meses. A média das alterações ósseas marginais foram observadas desde o início até três meses em ambos os grupos. Não há diferenças significativas na profundidade de sondagem e sangramento. Dentro das limitações deste estudo, PRF - L pode ser considerado como um biomaterial de enxerto com potencial efeito de regeneração tecidual sobre o tecido peri-implantar e pode ser usado como um adjuvante terapêutico em procedimento de colocação do implante.

Knapen et al. discutiram sobre o efeito do PRF - na regeneração óssea, comparando o efeito potencial de PRF - L com hidroxiapatita bovina (BHA), BHA + PRF - L e grupo controle sem preenchimento de biomaterial, em um modelo padronizado em calvária de coelhos. O efeito positivo do PRF - L na osteogênese tem sido amplamente descrito *in vitro*. No entanto, existem poucos estudos clínicos e muito controverso em demonstrar um efeito benéfico significativo de PRF - L na regeneração óssea. Foram implantados 72 hemisférios na calvária de 18 coelhos e preenchidos com os três biomateriais diferentes. Análises histomorfométrica e histológica foram realizadas. De acordo com o presente estudo, PRF - L não parece fornecer qualquer efeito adicional sobre a cinética, qualidade e quantidade de osso no atual modelo de regeneração óssea guiada.

Schar et al. em estudo *in vitro*, pesquisaram diferentes concentrados plaquetários ricos em fatores de crescimento. Os diversos protocolos de preparação e a falta de conhecimento de suas propriedades dificultam a interpretação dos resultados clínicos. O objetivo desse trabalho foi de analisar a concentração e cinética de fatores de crescimento liberados a partir de PRF - L, PRP-L, e coágulo de sangue natural durante o cultivo *in vitro*. Os concentrados foram cultivados *in vitro* por 28 dias e os sobrenadantes recolhidos após 8 horas e 1, 3, 7, 14 e 28 dias. Fatores de crescimento b1 (TGF- $\beta$  1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB), e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) foram medidos com ensaio imunoenzimático. Concluíram que o PRF - L pode oferecer vantagens em relação a L-PRP compreendendo quantidades mais elevadas de TGF- $\beta$ 1 liberado por mais tempo e indução mais forte de migração celular *in vitro*.

### **3.4 Associação de biomateriais BTCP e PRF - L**

Bölükbaşı et al. <sup>1</sup> avaliaram por meio histológico e histomorfométrico no tratamento de defeitos ósseos criados em tíbias de 6 ovelhas usando a combinação de fosfato de cálcio bifásico com PRF - L. O potencial para o aumento do tecido duro do PRF - L como um material de enxerto único ou em combinação com outros materiais de enxerto tem sido investigado em vários estudos. Foram criados defeitos de 5 mm de diâmetro em ambas as tíbias das ovelhas. Os defeitos foram preenchidos com BCP, PRF - L, ou BCP + PRF - L e os defeitos sem preenchimento usados como controle. Os animais foram sacrificados aos 10, 20 e 40 dias. Todos os grupos apresentaram sinais de necrose. Sinais de inflamação foi observada em todos os grupos de 10 e 20 dias. Durante o período de avaliação de 40 dias, o grupo PRF + BCP apresentaram as maiores proporções de novo osso formado. Os outros três grupos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes. O presente estudo revelou um aumento na formação óssea com a adição de PRF - L + BCP.

Yilmaz et al. <sup>2</sup> num estudo para avaliarem o efeito do PRF - L e BTCP, isoladamente ou em combinação, sobre a regeneração óssea em defeitos tibiais de porco. Quatro defeitos padronizados foram preparados em ambas as tíbias de três porcos adultos do sexo masculino. O primeiro defeito foi deixado sem preenchimento como um controle; os outros foram enxertados com PRF - L, BTCP ou PRF - L misturado com BTCP. Todos os animais foram sacrificados na 12<sup>a</sup> semana pós-operatória e os ossos da tíbia foram removidos, cortes histológicos foram preparados e os sítios experimentais foram examinadas ao microscópio. Análise histológica revelou a formação óssea em maior quantidade nos defeitos preenchidos com PRF - L misto BTCP do que nos defeitos enxertados com qualquer BTCP ou PRF - L sozinho. PRF - L em combinação com BTCP induz efetivamente nova formação óssea.

Acar et al. <sup>3</sup> estudaram os efeitos do PRF - L na regeneração óssea por meio de microtomografia computadorizada e microanálise histomorfométrica quando usado sozinho ou em combinação com hidroxiapatita (HA) / BTCP em calvárias de 20 coelhos da raça Nova Zelândia. Foram criados quatro defeitos e preenchidos com PRF - L, Straumann® Bone Ceramic (SBC), PRF - L + SBC e um defeito foi deixada sem tratamento como controle. Dez coelhos foram sacrificados com 30 dias e dez

com 60 dias. Após a análise com microtomografia computadorizada (micro-CT), as amostras foram enviadas para análise histológica e histomorfométrica para avaliar e comparar o volume e área de osso regenerado. Para concluir, PRF - L aumenta a formação de osso novo, quer isoladamente ou em combinação com HA / BTCP. O HA / BTCP aumenta a formação de osso novo, quer isoladamente ou em combinação com a PRF - L.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética Animal com Registro CEP Unisa nº 28 / 2013 (Anexo 1) .

Para a realização do estudo foram utilizados 20 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, com peso aproximado de 3,0 kg. Durante a pesquisa, os animais foram mantidos no biotério da Universidade de Santo Amaro, São Paulo – SP, e foram alimentados com ração comercial, cenoura, couve e água *ad libitum* e alojados em baias.

No baseline (dia 0), foi realizada sedação prévia com:

- Ketamina 1,16%(Dopalen - Ceva®, Paulínia, SP, Brasil) –0,06ml/kg, IM
- Xilazina 2,3% (Anasedan - Ceva®, Paulínia, SP, Brasil) – 0,1ml/kg, IM

Após sedação foi realizado tricotomia de membro superior esquerdo ou direito para colocação de acesso venoso para anestesia.

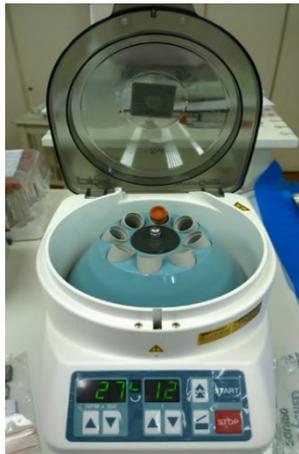
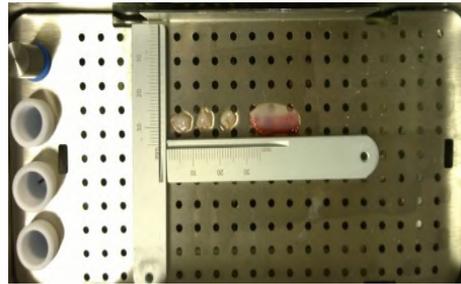
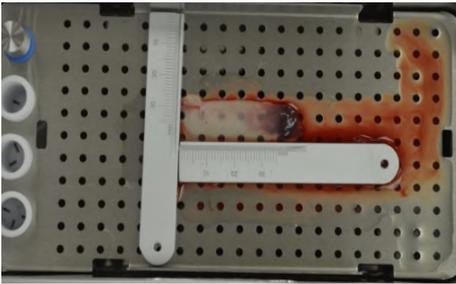
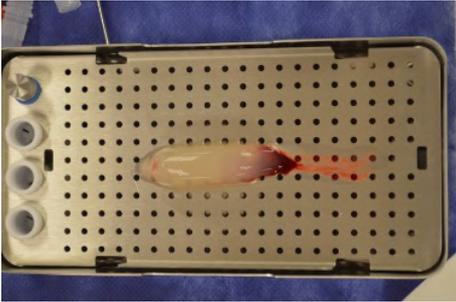
A anestesia foi obtida com:

- Centra® (cetamina 10g, tramadol 2g, midazolam 1g – ourofino, Uberaba MG) – 10 ml IV;
- Propofol (propovet®, ourofino Uberaba MG) – 10mg/ml, IV. (Figura 7)

### 4.1 Obtenção do PRF - L

Após anestesia, foi tricotomizada região do pescoço do animal para acesso à veia jugular.

Foi coletado 8 ml de sangue total e centrifugado a 2700 rpm por 12 min. O PRF - L foi preparado seguindo protocolo descrito por Dohan, *et al.*, 2006. (Figura 2)



**Figura 2. A** - Coleta de sangue para obtenção do PRF – L; **B** - Obtenção do coágulo de PRF – L; **C** - Preparo da membrana de PRF – L; **D** - Compressão para formação da membrana de PRF – L; **E** – Membrana de PRF – L; **F** - Posicionamento da membrana para preenchimento e recobrimento do defeito ósseo; **G** - Centrifuga Intra Spin – Intra-Lock ®

#### 4.2 Técnica cirúrgica / Criação do defeito ósseo

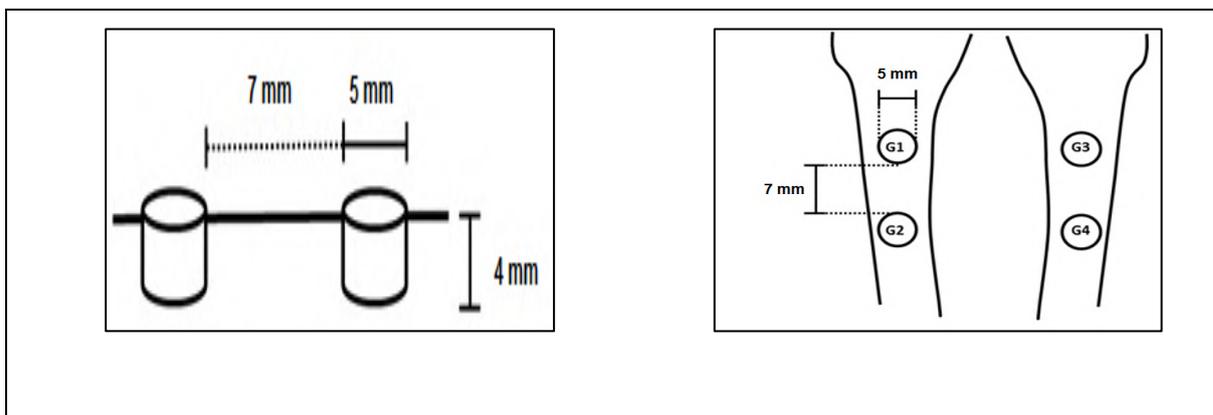
A região da tíbia foi tricotomizada e desinfetada com álcool iodado a 0,1 % (Vic Pharma, Taquaritinga sp).

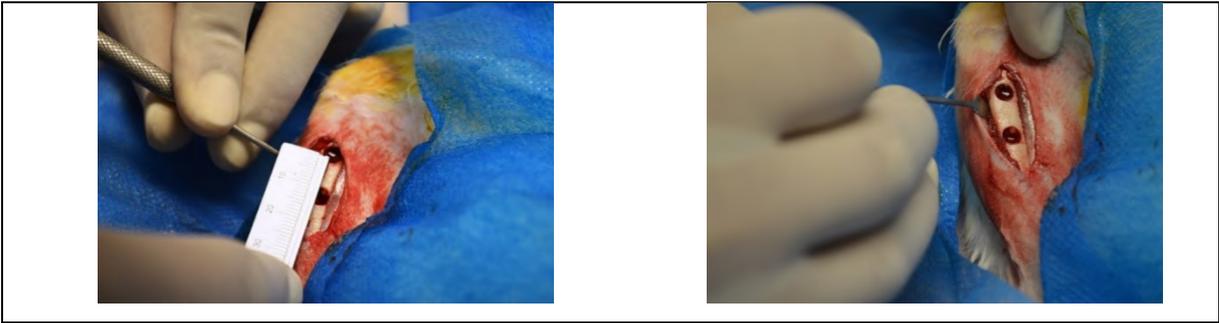
Inicialmente, foi usado aparelho neurolocalizador (DL250 Delta Life, São José dos Campos) com anestésico Neocaína 0,5% com glicose 8% (Bupivacaína com epinefrina 1:200.000, marca Cristália®, Itapira, São Paulo) para anestesia troncular dos membros inferiores.

Após foi realizado anestesia infiltrativa com anestésico local de lidocaína 2% com vasoconstritor epinefrina (1:100.000, DFL, Rio de Janeiro, Brasil) na região operada.

Com uso de bisturi de lâmina 15 foi realizada uma incisão vertical e tecidos foram descolados com descoladores de Freer (Quinelato®, Rio Claro, Brasil).

Em seguida, foram criados 2 defeitos ósseos circulares padronizados pela utilização de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro (SIN, São Paulo, Brasil) por 4 mm de profundidade em cada tíbia, sob irrigação de solução fisiológica 0,9% com motor de baixa rotação a 1200 rpm (Figura 3).



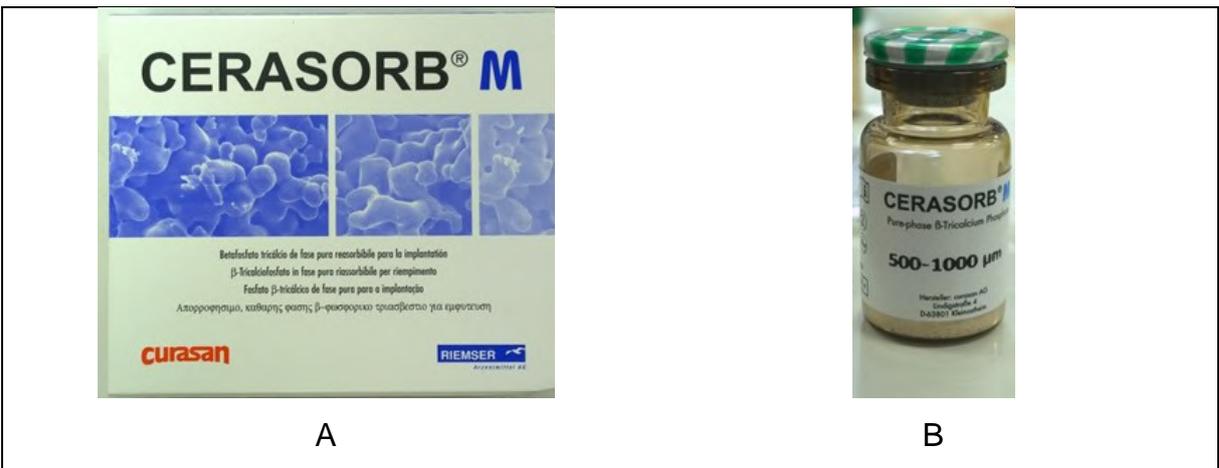


**Figura 3.** A e C - Dimensão dos defeitos; B e D - Distância entre os defeitos

As lesões ósseas foram divididas em quatro grupos experimentais de acordo com o biomaterial de preenchimento (Tabela 1e Figura 4).

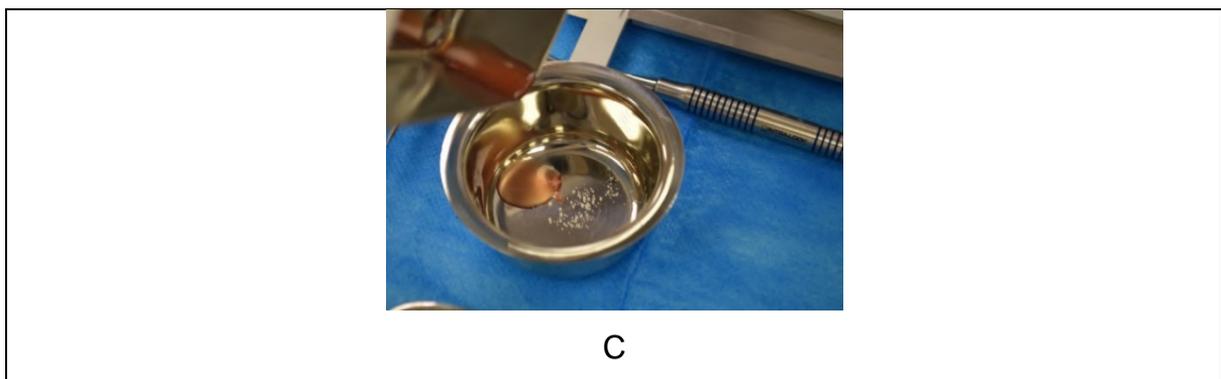
**Tabela 1** – Descrição dos grupos de do preenchimento dos defeitos padronizados pelos biomateriais

Grupo	Biomaterial de Preenchimento
G1	Sangue
G2	PRF - L
G3	BTCP
G4	BTCP + PRF - L



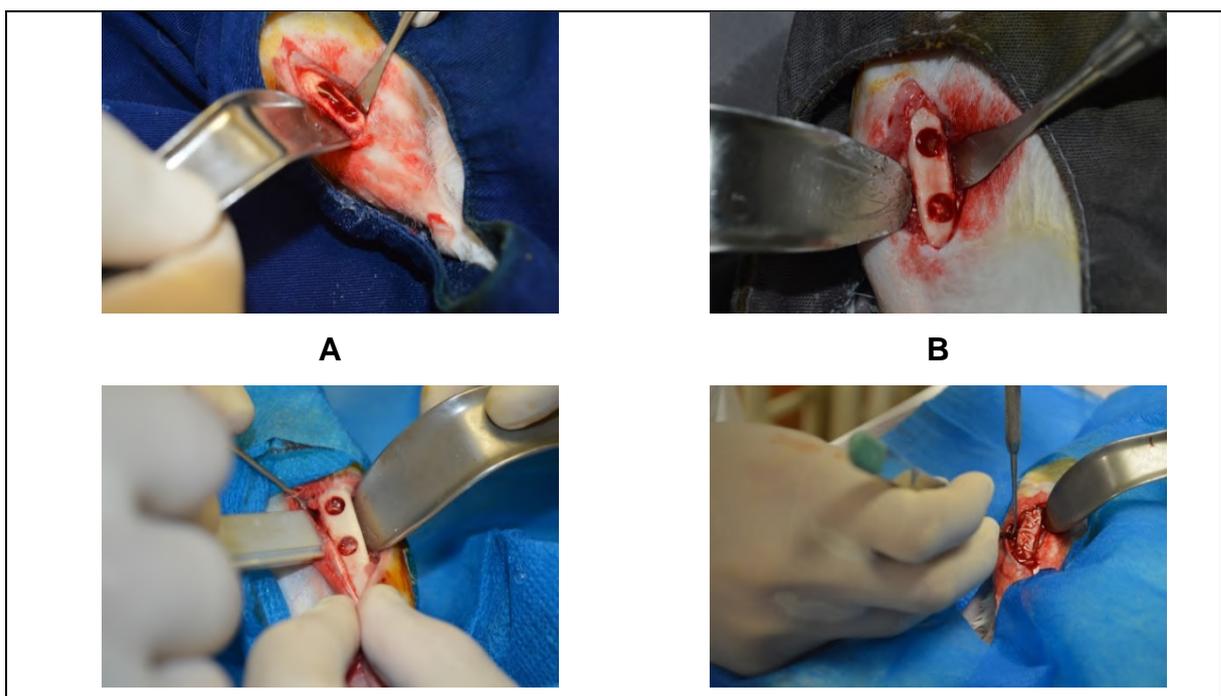
A

B



**Figura 4. A e B – BTCP; C – BTCP + PRF - L**

Os biomateriais foram utilizados aleatoriamente no preenchimento dos defeitos ósseos sendo que cada animal recebeu todos os quatro tratamentos. Foi usado a porção de 0,02 mg de BTCP, onde a pesagem foi realizada com auxílio de balança de precisão (Marte AL200c). O PRF-L teve a proporção de 5 mm x 5 mm por cada defeito preenchido e foi condicionado no em forma de fragmentos. Após o tratamento, os retalhos foram suturados com fio de nylon 4-0 e suturas removidas após 14 dias do procedimento cirúrgico (Figura 5).



<b>C</b>	<b>D</b>
----------	----------

**Figura 5.** **A** - Grupo coágulo; **B** - Grupo BTCP; **C** - Grupo PRF – L; **D** - Grupo BTCP + PRF L

Após o tratamento, os retalhos foram suturados com fio de nylon 5-0 e as suturas foram removidas após 14 dias do procedimento cirúrgico.

### 4.3 Pós-operatório

Após o procedimento cirúrgico, para controle de dor e reação inflamatória, os coelhos foram medicados com:

- Meloxicam (Maxicam® injetável 2%, OuroFino, São Paulo, Brasil) – 0,2mg/kg, (SC), 1x/dia por 7 dias.
- Kinolox 2,5% (Enrofloxacina® 2,5%, Mundo Animal, São Paulo, Brasil) – 0,7ml/3mg/3kg, (SC) 1x/dia por 7 dias.

### 4.4 Eutanásia dos coelhos

Os períodos de biópsias foram de 30 e 60 dias após as cirurgias, onde foram eutanasiados 6 e 14 coelhos respectivamente, de acordo com o seguinte protocolo:

- Ketamina 1,16% (Dopalen - Ceva®, Paulínia, SP, Brasil) –0,06ml/kg, IM
- Xilazina 2,3% (Anasedan - Ceva®, Paulínia, SP, Brasil) – 0,1ml/kg, IM
- Pentobarbital (Euthanyle, Brouwer, Buenos Aires, Argentina) – 25mg/krefina de 8mmg/EV.

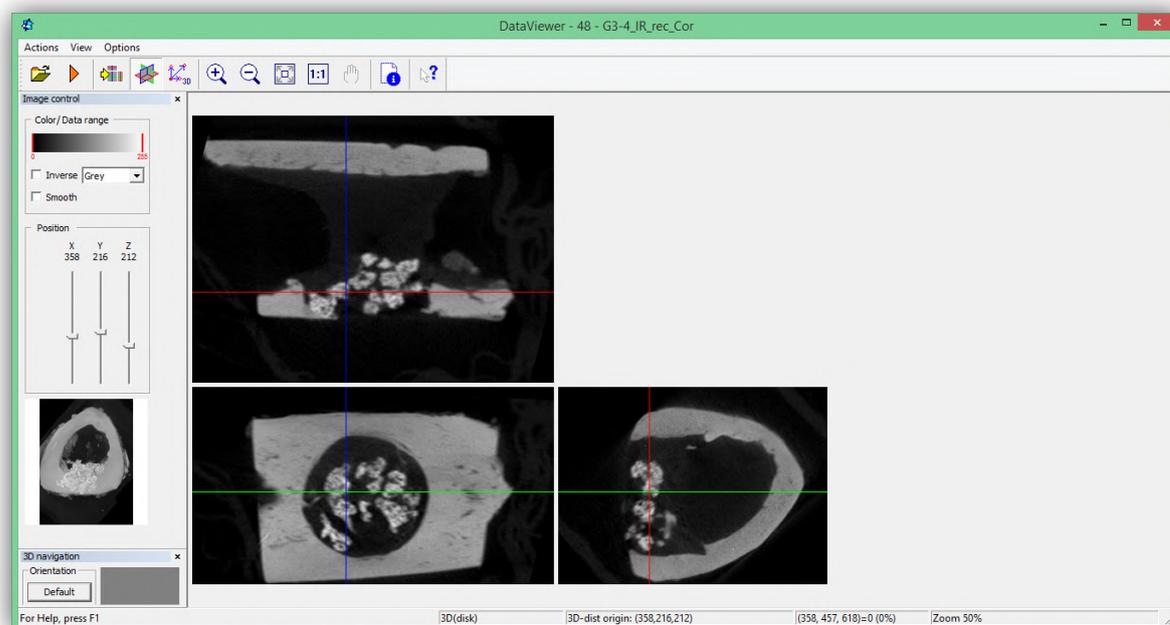
Após a eutanásia, foram realizadas tricotomia, incisão, dissecação dos tecidos moles e exposição da tíbia. Cada defeito foi removido com utilização de um disco diamantado (KG Soresen, Cotia, Brasil) sob irrigação constante com soro fisiológico 0,9 (Figura 43). As amostras obtidas de cada material de preenchimento foram fixadas em solução de paraformaldeído neutro 4% por 24 horas e depois foram transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente para análises posteriores.

#### 4.5 Análise por microtomografia computadorizada – $\mu$ CT

As amostras foram escaneadas utilizando um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1176, Aartselaar, Belgium), no laboratório de processamento de imagens da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP – Araraquara – SP – Brasil

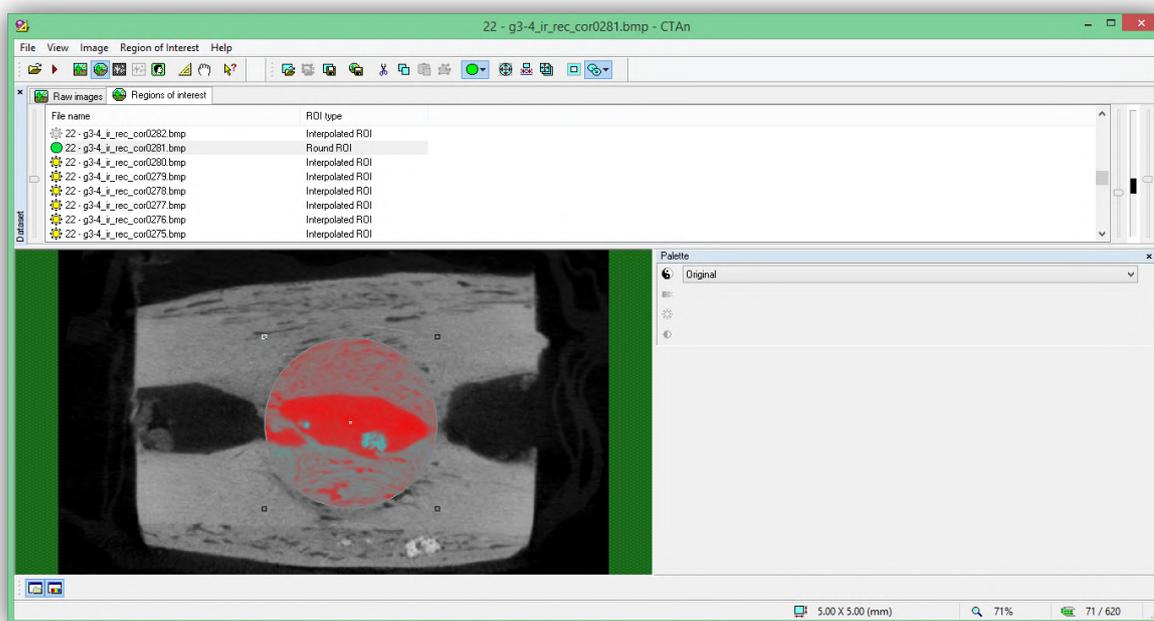
*Método de escaneamento:* Os parâmetros utilizados da tomografia computadorizada foram os seguintes: o tamanho da imagem em pixel de 2000 x 1336; a espessura dos cortes de 12 $\mu$ m; a magnificação da imagem de 10x; a voltagem do tubo de raios-X de 50 kV, o feixe de 496 uA e a corrente elétrica ajustada para 0.1mA. As imagens tridimensionais foram reconstruídas utilizando um software de reconstrução (NRecon 1.6.1.5 – SkyScan N. V. Belgium). Os parâmetros para reconstrução foram:

*Análise linear (2D):* Para a realização da análise linear foi utilizado um software bidimensional (Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Belgium) para possibilitar a visualização e a quantificação formação óssea em um computador (Figura 6).



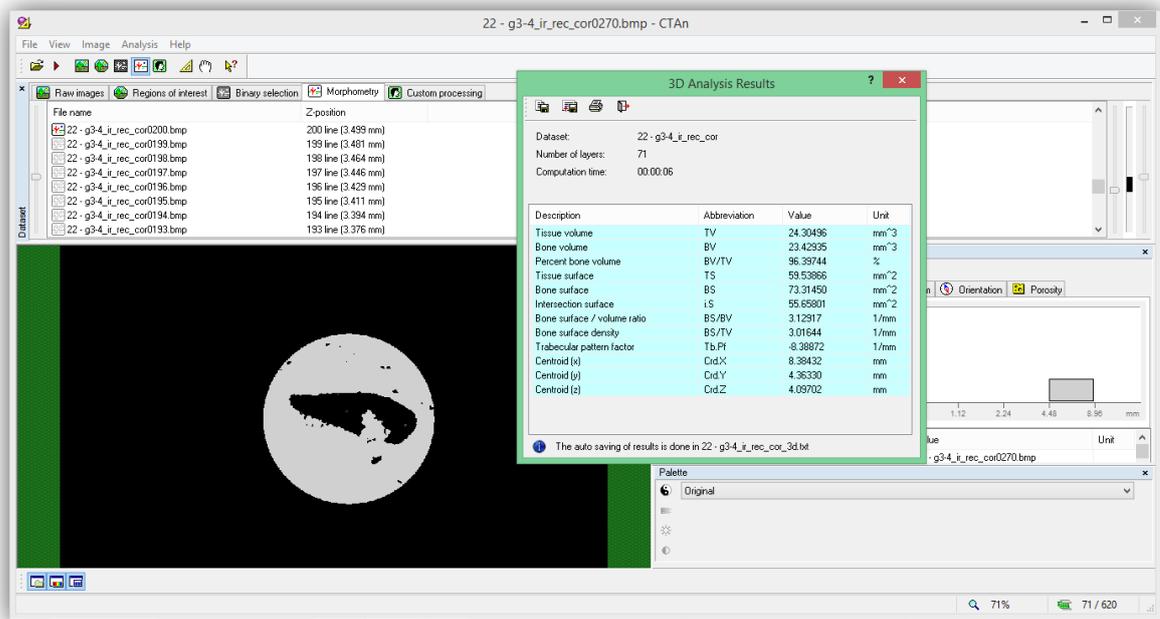
**Figura 6.** DataViewer: visualização da microtomografia computadorizada

*Análise Volumétrica (3D):* A mensuração volumétrica realizada foi uma modificação da metodologia proposta por Park et al. As mensurações foram feitas utilizando um software específico (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium), seguindo a seleção de uma área de interesse (ROI – region of interest) tridimensional. O examinador seguiu as marcações morfométricas durante o desenho do ROI (Figura 7).



**Figura 7.** CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium: marcações morfométricas de interesse (ROI)

Utilizando uma ferramenta avançada para o desenho do ROI, o contorno 2D foi desenhado em intervalos regulares (a cada 70 planos) para minimizar o efeito da variabilidade e maximizar a quantificação do osso. Depois, o ROI 3D foi criado, seguindo a medida da perfuração (defeito ósseo), com diâmetro de 5mm, utilizando um software (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium) baseado na resultante do contorno 2D. A partir daí os parâmetros de fração do volume ósseo foram determinados. As análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado. (Figura 8)

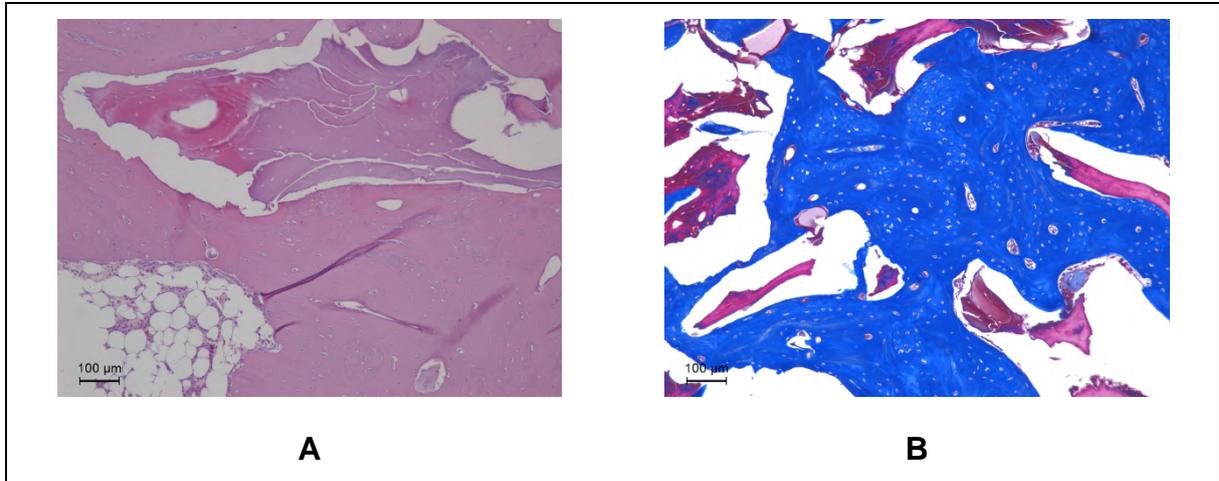


**Figura 8.** CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium: Análise dos resultados

#### 4.6 Análise histológica e processamento histológico

Após o escaneamento, as amostras da tíbia e membrana de PRF-L foram encaminhadas para processamento histológico convencional. As amostras de tecido ósseo fixadas em álcool 70% foram descalcificadas em solução de EDTA 4% por 120 dias. Após a descalcificação, cada amostra foi dividida ao meio e encaminhada para processamento. O processamento das peças, desde a desidratação até o banho em parafina foi realizado em uma processadora automática. Essa fase consistiu em desidratação das peças usando álcool 70% durante 1 hora, álcool 90% por 1 hora e álcool absoluto por 18 horas. Após o processo de desidratação, as peças ficaram em solução de álcool-xilol a 50% por 30 minutos, passando para o processo de diafanização em xilol por aproximadamente 3 horas. Finalmente, foram colocadas em solução de parafina a 60 °C por 18 horas, com uma troca de solução no meio deste período. Logo após, as peças foram colocadas em uma inclusora semiautomática, na qual foi feito a sua inclusão em forma de blocos. Após a inclusão, foram obtidos cortes seriados de 4 µm de espessura a partir do centro, no sentido longitudinal, em um micrótomo. Cortes representativos de cada animal foram

corados com Hematoxilina e Eosina (H/E) e Tricrômico de Masson (Figura 9).



**Figura 9. A** - Corte da tíbia corada com Hematoxilina e Eosina (H/E); **B** – Corte da tíbia corada Tricrômico de Masson

A análise descritiva foi realizada por um patologista cego aos grupos sob a análise. Foi avaliada a reação tecidual ao biomaterial, presença de reação inflamatória, o tipo e a qualidade dos tecidos neoformados, presença de biomaterial remanescente e tipos de células presentes. Isto permitiu uma comparação entre as observações nos diferentes grupos e períodos.

#### **4.7 Análise estatística**

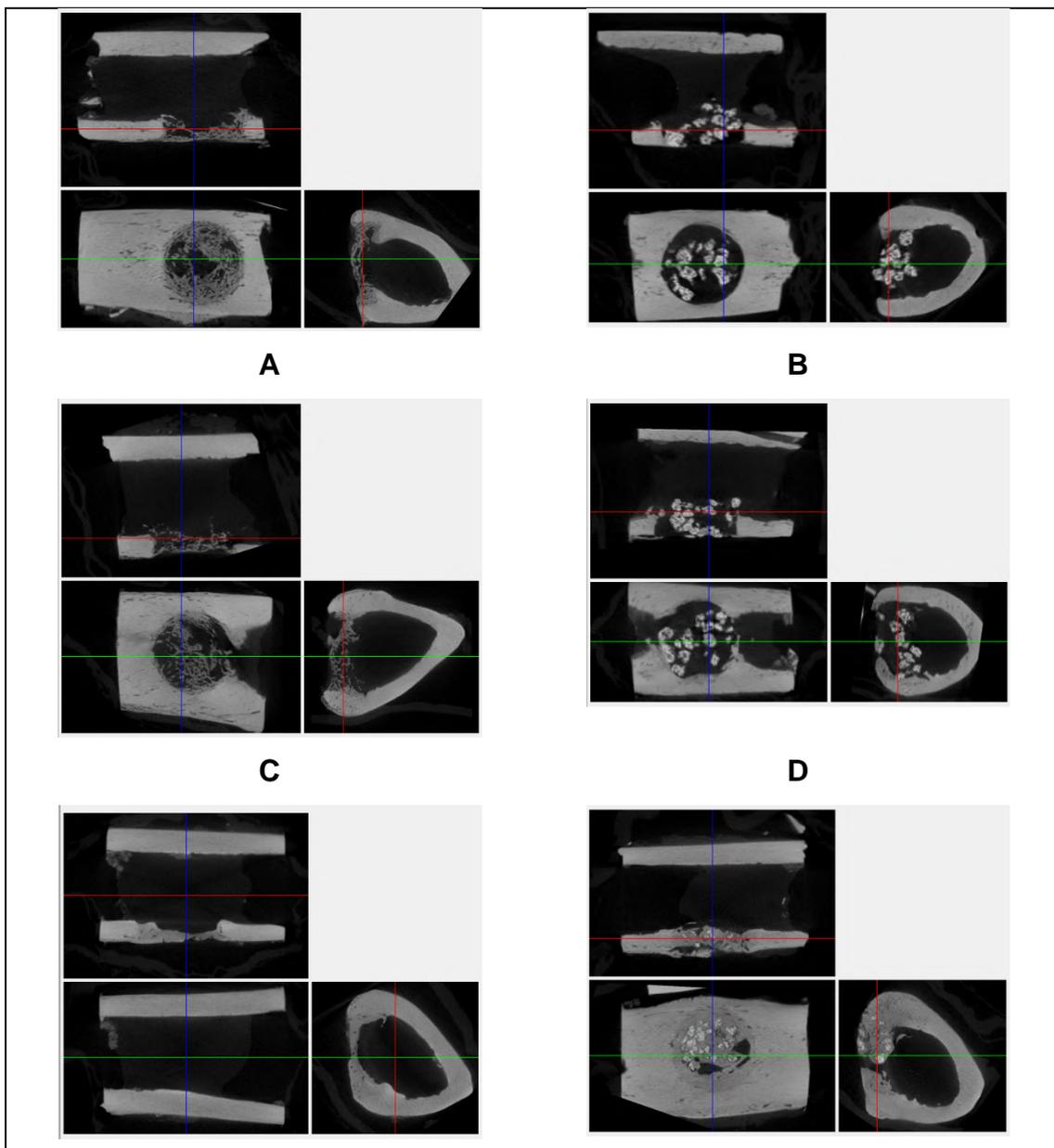
Todos os dados obtidos foram avaliados, e então submetidos a um teste de normalidade. Anova e Tukey foram os testes estatísticos apropriados para comparações entre cada grupo e diferentes períodos de observação. Em todos os procedimentos, foi adotado um nível de significância de 5%.

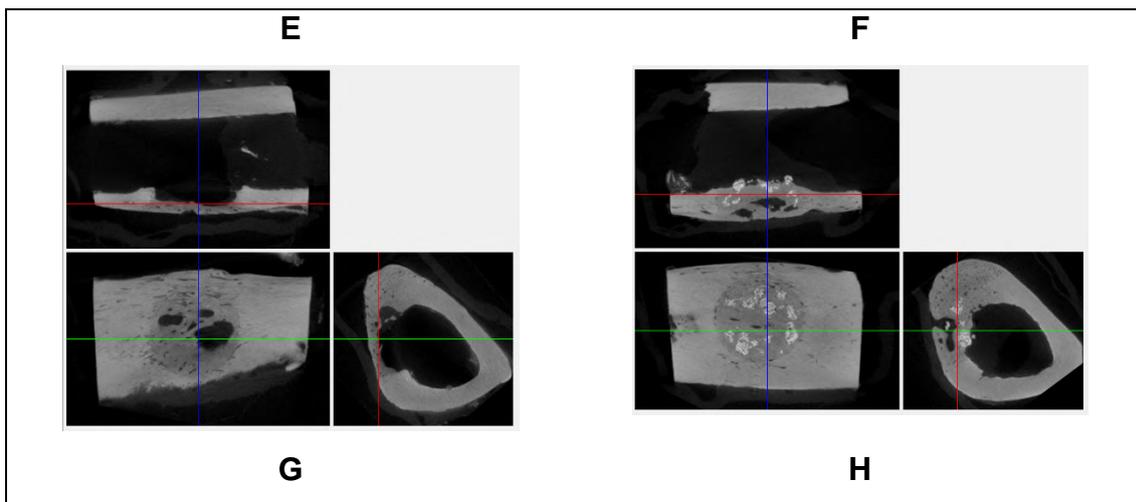
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise de Microtomografia Computadorizada

As reconstruções das imagens dos cortes microtomográficos foram analisadas quanto à quantidade e qualidade óssea pela relação entre o volume ósseo e tecidual formado. A análise foi realizada individualmente para cada variável.

As imagens reconstruídas pela microtomografia computadorizada são apresentadas nas Figura 10, conforme os grupos:





**Figura 10.** **A** - Grupo coágulo 30 dias (amostra 65-G4); **B** - Grupo BTCP 30 dias (amostra 48-G4); **C** - Grupo PRF - L 30 dias (amostra 65-G1); **D** - Grupo BTCP + PRF - L 30 dias (amostra 48-G2); **E** - Grupo coágulo 60 dias (amostra 38-G3); **F** - Grupo BTCP 60 dias (amostra 13-G2); **G** - Grupo PRF - L 60 dias (amostra 38-G1); **H** - Grupo BTCP + PRF - L 60 dias (amostra 13-G3)

## 5.2 Volume de Tecido Total (TV) e Volume de Tecido Mineralizado (BV)

As reconstruções das imagens dos cortes microtomográficos foram analisadas quanto à quantidade de tecido mineralizado pela relação do Volume de Tecido Total (TV) e Volume de tecido Mineralizado (BV).

O Volume de Tecido Total (TV) é uma variável com valor expresso em  $\text{mm}^3$  e está exposto na Figura 11, demonstrando os seus valores obtidos nas amostras dos 20 coelhos. O volume de tecido mineralizado (BV) também é uma variável com valor expresso em  $\text{mm}^3$ , na qual está exposto na Figura 11, que aponta todos os grupos em relação a variável. Todos os dados estão representados na Tabela 2.

Desta forma, o  $\text{BV/TV}$  é a variável expressa em % e representa a relação do tecido mineralizado na totalidade dos tecidos formados, isto é, quantidade da parte do volume mineralizado encontrado no TV, ou seja, no volume total, de acordo com a ROI estabelecida.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão dos grupos estudados em 30 e 60 dias (comparação intra-grupos).

	Coagulo	PRF-L	BTCP	BTCP + PRF- L
<b>30</b>	34,51 ± 11,24	39,98 ± 17,82	51,00 ± 11,2	38,00 ± 7,16
<b>60</b>	45,29 ± 14,79	42,29 ± 10,98	77,78 ± 12,02	81,78 ± 19,70
<b>p</b>	0,3037	0,8252	0,0165 *	0,0166 *

Teste ANOVA /Tukey DP=desvio padrão

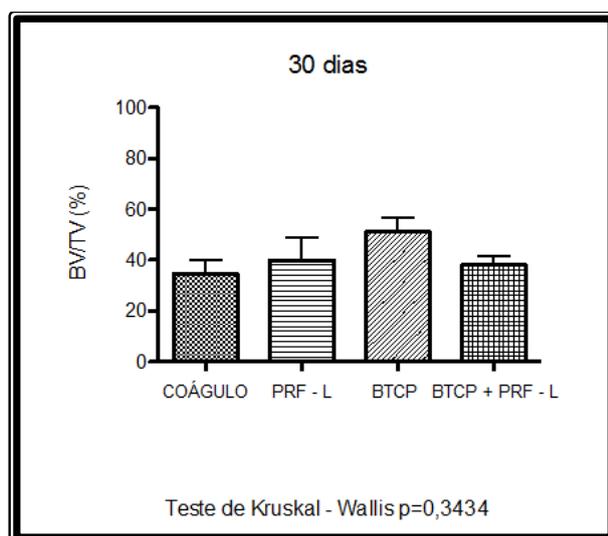


Figura 11. Representação gráfica dos resultados de cada grupo estudados em 30 dias

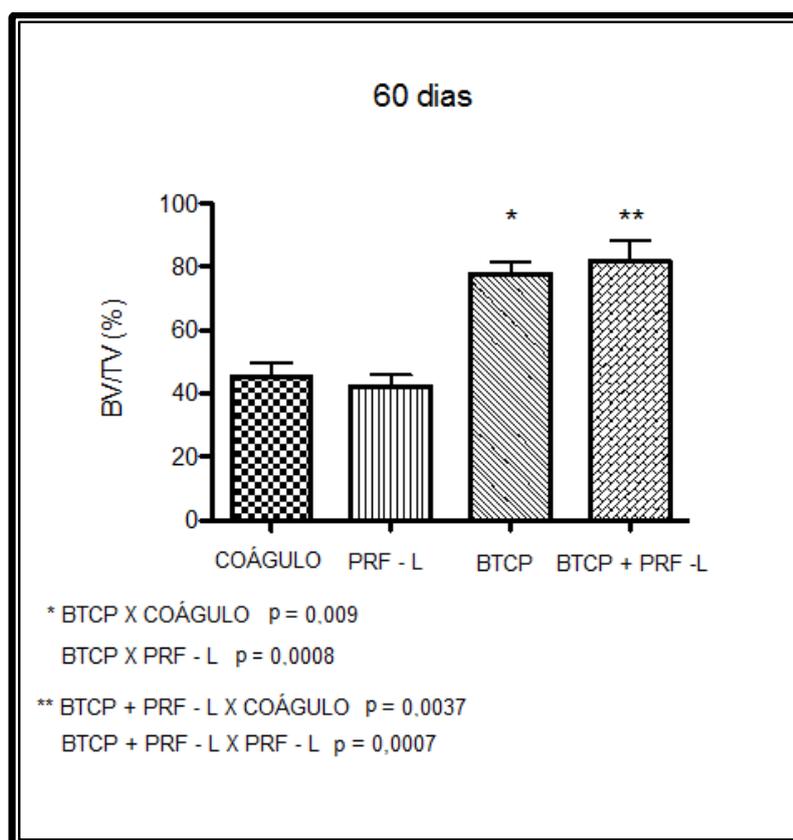


Figura 12. Representação gráfica dos resultados de cada grupo estudados em 60 dias

No período de 30 dias não houve diferença entre os grupos. Após período de 60 dias o grupo BTCP e grupo BTCP + PRF – L apresentaram diferença estatística comparado aos grupos coágulo e PRF –L.

Houve um comportamento semelhante entre os grupos coágulo e PRF – L, quando avaliado o percentual de volume ósseo.

### 5.3 Análise Histológica

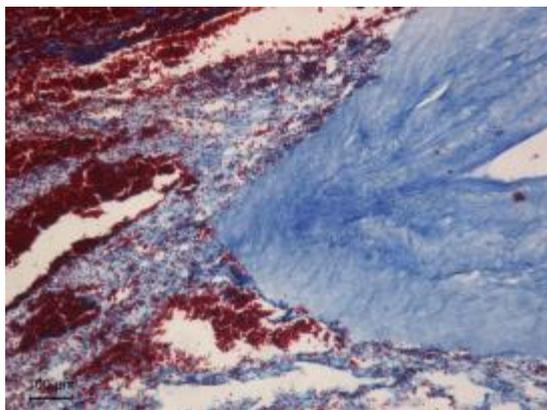
#### 5.3.1 Membrana de PRF-L

A membrana de PRF-L foi produzida pelo sangue coletado na eutanásia dos coelhos e analisada histologicamente com o objetivo de realizar uma análise detalhada da sua composição e arquitetura. Foi possível observar na histologia que realmente existe uma malha de fibrina densa entremeada com diferentes tipos celulares, dentre eles uma grande quantidade de leucócitos retidos nela e também

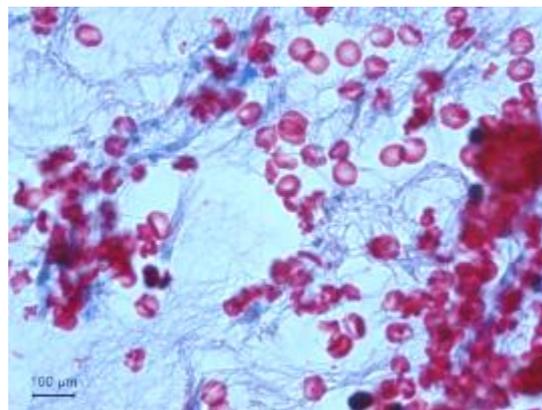
linfócitos que possuem um papel importante na imunomodulação. Na região próxima ao coágulo observou-se maior quantidade de plaquetas e leucócitos. Foi possível observar também que o PRF-L comprimido mantém a sua composição celular (Figura 13) Desta forma existe semelhança com outro trabalho publicado na literatura (Ehrenfest et al, 2010).(isso é discussão) Sendo assim, é possível afirmar que o protocolo utilizado para obtenção do PRF-L em coelhos foi satisfatório.



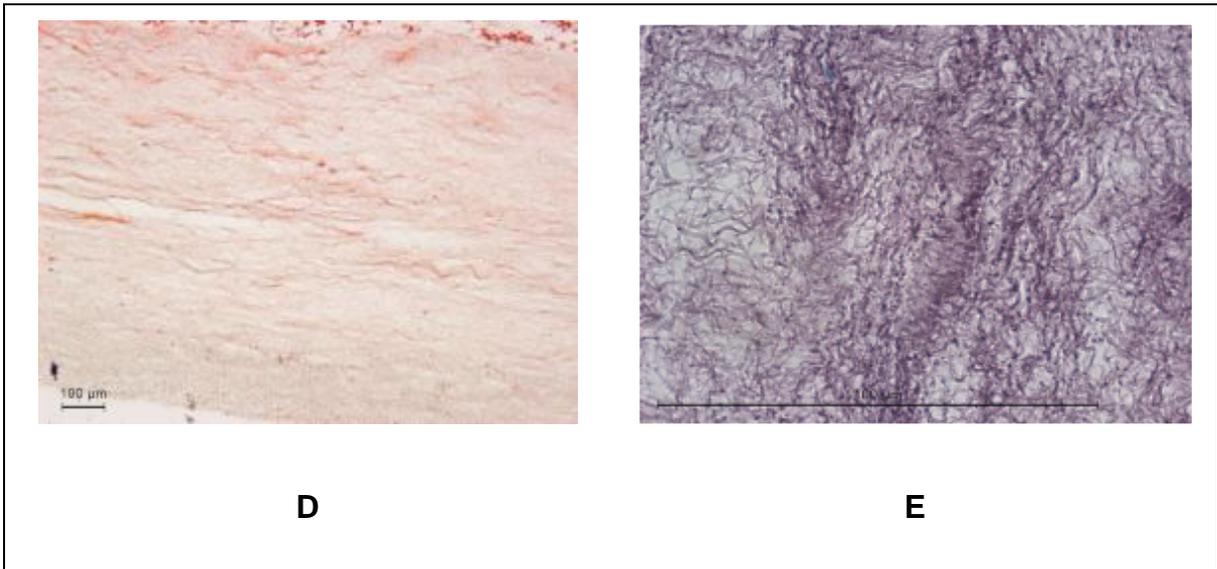
**A**



**B**



**C**



**Figura 13.** **A** - Imagem da membrana de PRF-L após obtenção e compressão; **B** - Imagem da união coágulo/fibrina com aumento de 20X; **C** - Imagem da união coágulo/fibrina com aumento 100X; **D** - Imagem da fibrina com aumento de 20X; **E** - Imagem da fibrina com aumento de 100X.

## 6 DISCUSSÃO

Os tratamentos com implantes dentários têm-se tornado constantes na prática odontológica, bem como a necessidade de reconstruções ósseas e uso de biomateriais com a finalidade de acelerar o processo de reparo e diminuição dos processos inflamatórios. Uma das definições correntes diz que biomaterial é parte de um sistema que trata, aumenta ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo.<sup>22</sup>

A utilização de biomateriais sintéticos ou naturais como substitutos do tecido ósseo em contato com roscas de implantes expostas, assim como para preenchimento de defeitos ósseos, tem demonstrado, histologicamente, resultados satisfatórios.<sup>23</sup>

Há mais de duas décadas, pesquisas têm mostrado que os biomateriais cerâmicos a base de fosfato de cálcio é segura e efetiva para uma variedade de aplicações clínicas e têm recebido maior atenção dos pesquisadores como biomateriais de substituição óssea.<sup>2</sup>

O PRF - L, é um derivado plaquetário de segunda geração, que é uma tecnologia de fibrina, desenvolvido por Choukroun em 2001, e amplamente utilizada para acelerar a regeneração óssea e de tecido mole. Seu uso faz com que haja diminuição de processo inflamatório e infecção, já que é rico em leucócitos, diminuindo o risco de transmissão de doenças ou reação antigênica uma vez que apenas sangue autólogo é utilizado. <sup>1</sup>

A microtomografia computadorizada, é um exame radiológico de realização extremamente rápida, derivada da tomografia convencional, com referência inicial de FELDKAMP et al., (1989) <sup>3</sup> com a tomografia cone beam. Devido à alta resolução micrométrica ( $\mu\text{m}$ ), possibilita visualização de imagens até 10 mil vezes menores que o convencional. A principal característica da microtomografia computadorizada, é que ela preserva a amostra no processo de aquisição das imagens, permite realizar inúmeras repetições no mesmo setor, não é invasiva, e os equipamentos permitem escaneamentos de animais vivos.

Foram utilizados como modelo animal nesse estudo, o coelho, pois é eficiente e aceitável para avaliação de materiais de enxertos ósseos. Diversas pesquisas utilizaram o coelho para investigar osseointegração de implantes dentários e biomateriais.<sup>1</sup> <sup>1</sup> A escolha da tíbia foi na tentativa de reproduzir o mesmo ambiente encontrado nos defeitos atróficos em humanos, devido a semelhança óssea.

Por meio de exame de microtomografia computadorizada, este estudo teve como objetivo avaliar alterações e reações biológicas da associação do PRF - L com BTCP na formação óssea em tíbias de coelho. A metodologia desse estudo foi determinada em esclarecer contradições observadas na literatura. Observa-se 4 grupos, cada um com 2 períodos (30 e 60 dias). O grupo sangue foi denominado de controle, uma vez que ele é o ponto de referência para a comparação dos resultados.

Primeiramente, comprova-se que o tempo é fator essencial para a potencialização da formação óssea, já que todos os grupos obtiveram uma diferença significativa nos resultados.

Nesse experimento, verificou-se que o BTCP é uma opção segura e eficaz no tratamento de enxerto em regiões críticas de regeneração óssea, onde o mesmo atua como arcabouço para formação óssea, sendo excelente osteocondutor. Os estudos de Bhaskari et al.;<sup>2</sup> Lange et al.;<sup>2</sup> Yamamoto et al.;<sup>3</sup> Ortega et al.;<sup>31</sup> Covani et al.;<sup>3</sup> Zhang et al.;<sup>3</sup> Tosta et al.;<sup>3</sup> Chou et al.<sup>3</sup> e Lange et al. também obtiveram bons resultados em seus experimentos e afirmam a eficácia do BTCP como biomaterial de enxertia.

Demonstram que a polimerização lenta do sangue durante a preparação do PRF - L parece gerar uma rede de fibrina muito semelhante ao natural que regula o aumento da cicatrização e diminuição da inflamação. No entanto, suas aplicações apresentam-se confusas, pois cada método conduz a um produto diferente, com uma biologia diferente e potencial de uso também diferente, gerando controversas devido à complexidade dos protocolos de produção.

Estudos semelhantes na literatura apresentaram efeito adicional do PRF-L na formação óssea (Del Corso et al, 2010; Oliveira et al, 2014; Tunali et al, 2013;

Tatullo et al, 2012; Mazor et al, 2009; Simompieri et al, 2009). Neste trabalho o uso do PRF-L não apresentou efeito significativo quando associado ou não ao biomaterial BTCP nas análises de Volume de Tecido Mineralizado. É necessário avaliar qualitativamente o tecido ósseo neoformado pela análise histológica.

Um fato importante que devemos considerar em relação ao resultado do nosso estudo seria a quantidade de PRF-L obtido dos animais, que apesar de utilizado o mesmo protocolo de obtenção e centrifugação descrito por Choukroun 2001, há de se considerer que a quantidade de sangue do coelho é reduzida e o acesso para coleta difícil em relação ao humano. A quantidade de sangue coletado no coelho foi de apenas 8ml, sendo que o volume total de sangue em coelho adulto com 3 kilos é em torno de 180 ml (Taborda . et al. 2004) em indivíduos adultos é coletado cerca de 8 tubos com 10 ml (80 mls), sendo que o volume total de sangue em indivíduo adulto com setenta quilos é em media de 5 litros. Desta forma no trabalho de Enhrenfest et al 2009, foi levantado a questão de qual seria o número de plaquetas ideal para um bom PRF-L. Concluíram que o PRF representa cerca de 40% do volume total do tubo e que a concentração de plaquetas no coágulo seria 2,5 vezes superior à concentração no sangue do doador , podendo esse valor estar muito próximo do valor ideal

Deve-se considerar que a avaliação do PRF-L em apenas dois períodos (30 e 60 dias), pode ser que não tenha sido suficiente para observar o efeito do PRF-L, sendo necessário para maior entendimento do processo de cicatrização em um período intermediário.

Outro ponto a ser analisado é a tibia, região eleita para a confecção dos defeitos ósseos. Possuía uma espessura cortical de 2mm que foi ultrapassada pelo preparo de 4mm de profundidade confeccionado pela trefina. Desta forma, o espaço medular foi exposto e o PRF-L pode ter permanecido no seu interior. Na microtomografia foi avaliado apenas a área de 70 cortes microtomográficos, correspondendo apenas, cerca de 2mm da região cortical do defeito. Desta forma o efeito do PRF-L em sua totalidade não pôde ser observado. Visto que outros trabalhos (Mazor et al, 2009; Simonpieri et al, 2009; Wu et al, 2012; Oliveira et al, 2014) com resultados satisfatórios na literatura, mostram o PRF-L armazenados em defeitos ósseos de três paredes, ou seja, protegidos por osso cortical.

Os períodos avaliados foram de 30 e 60 dias. Nesses períodos o grupo PRF-L não sobressaiu aos outros grupos se mantendo sem alterações estatísticas. Considerando que o período de 60 dias já seria o final do processo de reparo do coelho, que por sinal tem o metabolismo seis vezes mais rápido uma avaliação intermediária seria interessante para avaliar se o grupo PRF-L sozinho ou associado ao BTCP atingiria o pico de formação óssea antes dos demais grupos.

Tendo em vista os achados deste estudo, pesquisas adicionais são necessárias para o melhor entendimento dos eventos biológicos envolvidos na neoformação óssea e sua relação com resultados clínicos.

## **7 CONCLUSÃO**

De acordo com o estudo proposto, pode-se concluir que a associação de PRF e BTCP não promoveu aumento da formação do tecido mineralizado neste modelo experimental.

A utilização do BTCP é uma técnica segura e clinicamente previsível, sendo uma alternativa viável para enxerto de osso autógeno.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ADELL R. et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int j. Oral Surg.* n. 10, 1981.
- 2 - BABBUSH C. A., Kent, J. e Misiek D. Titanium plasma sprayed (TPS) screw implants for reconstruction of edentulous mandible. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Philadelphia, v. 44, n. 4, p. 274-282, Apr. 1986.
- 3 - DALAPÍCULA S., Vidigal Jr, Conz M.B., e Cardoso E.S. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas: uma revisão crítica. *Implant News*, v. 03, n. 05, p. 487- 491, 2006.
- 4 - BUSER D. et al. Basic surgical principles with ITI implants. *Clin Oral Impl Res.* v.11 (Suppl.). p-59-68.2000.
- 5 - BRANEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a ten-year period. *Scan jPias Reconstr Surg. Suppl.* 16, 1977.
- 6 - MARX, R. E., Garg, A. K. Bone structure, metabolism, and Physiology: Its impact on dental implantology. *Implant Dentistry.* v.7, n.4, 1998.
- 7 - GAPSKI, R. et al. Critical review of immediate implant loading. *Clin. Oral Impl. Res.*, v. 14, p.515-527, 2003
- 8 - MISCH, C, M, et al. Reconstruction of the Maxilar Alveolar Defects With Mandibular Symphysis Grafts for Dental Implants: A Preliminary Procedural Report. *Int Oral Maxillofac Impants*, v.7, p.360-366, 1992.
- 9 - BRANEMARK, P. I. et al. Branemark Novum: a new treatment concept for rehabilitation of edentulous mandible. Preliminary results for a prospective clinical follow-up study. *Clin. Implant. Dental Rehabil. Res.*, Hamilton, v. 1, n. 1, p. 2-6, 1999.
- 10 - SENDYK C. L., Sendyk W R; Gromatzky A. Análise em elemento finito não linear da influência do tipo ósseo na estabilidade do implante osseointegrado. *Revista da Faculdade de Odontologia de Santo Amaro, São Paulo*, v. 1, n. 1, p. 85-88, 2002.
- 11 - BUSER D, Weber HP, Lang NP. Tissue integration of non-submerged implants. One-year results of a prospective study with 100 ITI hollow-screw and hollow-cylinder implants. *Clin Oral Implants Res.*1990;1:33–40.
- 12 - CARVALHO P. S. P., Bassi A. P. F., Pereira L. A. V. D. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Rev. Implant News*, 2004,n.3, mai/jun.
- 13 - GUTIERRES, M., et al. Substitutos ósseos. *Arquivos de medicina*, v.19, n. 4, p. 153-62, 2006.

- 14 - LANGE GL, Putter D. C., Wijs D. FL. Histological and ultra-structural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. *J Biomed Mater Res.* 1990;24:829-845.
- 15 - LEGEROS RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;395:81-98.
- 16 - BOSS, J. H. et al. The Relativity of Biocompatibility: A critical of the concept of biocompatibility. *Israel Journal Medical Science*, v. 31, n. 4, p- 203-209, 1995.
- 17 - EHRENFEST D., Sammartino G., Shibli J.A., Wang H.Y., Zou D. R. e Bernard J.P. Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma - PRP, or Platelet-Rich Fibrin - PRF): the international classification of the POSEIDO. Submitted May 7th, 2013
- 18 - CHOUKROUN J, Dohan S, Dohan A, Donsimoni J-M, Gabrieleff D, Fioretti F, Dohan D. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. Paris. Mosby, Inc. All rights reserved © 2006.
- 19 - Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., Becker, J., Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA® titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Research.* Volume 18, Issue 4, August 2007, Pages 481–488.
- 20 - ALBREKTSSON T., Jansson T., Lekholm V. Osseointegrated dental implants. *Dental clinics of North America*, v 30, n.1; p 151-174, jan/1986.
- 21 - ARTZI Z, Weinreb M, Carmeli G, Lev-Dor R, Dard M, Nemcovsky CE. Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19: 686-692.
- 22 - SANCHES J.F. BIOMATERIAIS SUBSTITUTOS ÓSSEOS NA IMPLANTODONTIA. Funorte. Manaus - 2010
- 23 - BLOCK M. S e Kent J. N. J Sinus Augmentation for Dental Implants: The Use of Autogenous Bone. *Oral Maxillofac Surg* 55:1281-1286,1997
- 24 - STEPHAN E. B., Di Jiang, Samuel Lynch, Peter Bush and Rosemary Dziak. Anorganic Bovine Bone Supports Osteoblastic Cell Attachment and Proliferation. *J Periodontol* 1999;70:364-369.
- 25 - CARVALHO V.A.P., Tosello D. O., Salgado M. A. C., Gomes M. F. Histomorphometric Analysis of Homogenous Demineralized Dentin Matrix as Osteopromotive Material in Rabbit Mandibles. *Intjoral Maxillofac Implants.* 2004;19:679-686
- 26 - BUCHAIM R. D., Roque, JS., Toledo F. JL. e Andreo. Gen-Phos(R) implant in surgical cavities performed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism: a microscopic study. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru, JC.* 2002 vol. 10, no. 1, p. 17-22.

- 27 - LEGEROS RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev* 2008;108:4742–53.
- 28 - BHASKARI SN, Brady JM, Getter L, Grower MF, Driskell T. Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971;32:336-346.
- 29 - LANGE T.A., Zerwekh J.E., Peek R.D., Mooney V., Harrison B.H. Granular tricalcium phosphate in large cancellous defects. *Ann Clin Lab Sci.* 1986. Nov-Dec;16(6):467-72.
- 30 - YAMAMOTO H, Niwa S, Hori M, Hattori T, Sawai K, Aoki S, et al. Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro. *Biomaterials* 1998;19:1587–91.
- 31 - ORTEGA V. E., Pato Mourelo J., Segura Egea J.J., Pérez Pérez O., Medel Soteras R. La utilización del beta-fosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral. *Avances em Periodoncia.* 2007;19(3).
- 32 - YAMADA M., Shiota M., Yamashita Yasuo. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha and beta-tricalcium phosphate in block graft. *Journal of biomedical materials research.* 2007;82(1):139-148.
- 33 - JENSEN SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects: a long-term histomorphometric study in minipigs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90:171-181.
- 34 - COVANI U, Orlando B, Giacomelli L, Cornelini R, Barone A. Implant survival after sinus elevation with Straumann (R) BoneCeramic in clinical practice: adinterim results of a prospective study at a 15-month follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:481-484.
- 35 - LEZZI G, Degidi M, Piattelli A, et al. Comparative histological results of different biomaterials used in sinus augmentation procedures: a human study at 6 months. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:1369-1376.
- 36 - SHALASH MA, Rahman HA, Azim AA, Neemat AH, Hawary HE, Nasry SA. Evaluation of horizontal ridge augmentation using beta tricalcium phosphate and demineralized bone matrix: A comparative study. *J Clin Exp Dent.* 2013;5(5):e253-9.
- 37 - ZHANG J, Liu W., Schnitzler V, Tancret F., Bouler J. M. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 1035–1049
- 38 - TOSTA M, Cortes AR, Correa L, Pinto DD Jr, Tumenas I, Katchburian E. Histologic and histomorphometric evaluation of a synthetic bone substitute for maxillary sinus grafting in humans [e-pub]. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:866-870.
- 39 - CHOU J., Hao J, Kuroda S., Nissan B. B., Milthopre B, e Otsuka M. Bone regeneration of calvarial defect using marine calcareous-derived beta-

tricalciumphosphate microspheres. Journal of Tissue Engineering 5 2014: 2041731414523441

40 - LANGE G. L., Overman J. R., Farré-Guasch E., Korstjens C. M, Hartman B., Geerling E.J. Langenbach, Marion A. Van Duin, BA Jenneke Klein-Nulend. A histomorphometric and microcomputed tomography study of bone regeneration in the maxillary sinus comparing biphasic calcium phosphate and deproteinized cancellous bovine bone in a human split-mouth model. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2014;117:8-22)

41 - DOHAN D. M, Choukroun J., Diss A., Dohan S. L., Anthony J. J. Dohan, Jaafar Mouhyi, and Bruno Gogly. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E45-50

42 - CHOUKROUN J, Dohan S, Dohan A, Donsimoni J-M, Gabrieleff D, Fioretti F, Dohan D. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? Paris. © Mosby, Inc. All rights reserved 2006.

43 - CHOUKROUN J, Antoine Diss, Alain Simonpieri, Marie-Odile Girard, Christian Schoeffler, Steve L. Dohan, Anthony J. J. Dohan, Jaafar Mouhyi, and David M. Dohan. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E56-60)

44 - CHOUKROUN J, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan S, Dohan D. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;101:299-303

45 - RAJA V S, Naidu E. M. Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. Indian J Dent Res 2008;19:42-6

46 - EHRENFEST, Rasmusson e Albrektsson. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009 Available online 31 January 2009

47 - GASSLING V, Douglas T, Warnke, PH, Acil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. Clin. Oral Impl. Res. 21, 2009.

48 - MAZOR Z, Robert A. Horowitz, Marco Del Corso, Hari S. Prasad, Michael D. Rohrer and David M. Dohan Ehrenfest. Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A Radiologic and Histologic Study at 6 Months. J Periodontol • December 2009.

49 - TOFFLER M., Toscano N., Holtzclaw D., Del Corso M., Dohan Ehrenfest D. Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery

Milieu. The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry. Vol. 1, No. 6 , September 2009.

50 - DEL CORSO M., Toffler M., Dohan Ehrenfest D. Use of an Autologous Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) Membrane in Post-Avulsion Sites: An Overview of Choukroun's PRF. The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry. Vol. 1, No. 9. December/January 2010.

51 - RODELLA L.F., Favero G., Boninsegna R., Buffoli B., Labanca M., Scari G., Sacco L, Batani T. e Rezzani R. Growth Factors, CD34 Positive Cells, and Fibrin Network Analysis in Concentrated Growth Factors Fraction. Rev microscopy research and technique. 2010 Wiley-Liss, INC.

52 - KOBAYASHI M, Tomoyuki Kawase, Makoto Horimizu Kazuhiro Okuda, Larry F. Wolff, Hiromasa Yoshie b. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use Biologicals. 40 (2012) 323 e 329

53 - NAIK B. P., Karunakar M J, e Marshal V. R J Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review Conserv Dent. 2013 Jul-Aug; 16(4): 284–293.

54 - TUNALI M., Özdemir H., Küçükođacı Z., Akmanç S., Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate / British. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 51 (2013) 438–443.

55 - SEUNG M. J., Lee C.U., Son J.S., Oh J.H., Fang Y., Choi B.H., Simultaneous sinus lift and implantation using platelet-rich fibrin as sole grafting material. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 42 (2014) 990 e 994.

56 - KIM T H, Kim S H, Sandor G K, Kim Y D, Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. Archives of Oral Biology 59 (2014) 550 – 558

57 - YELAMALI T & Saikrishna D. Role of Platelet Rich Fibrin and Platelet Rich Plasma in Wound Healing of Extracted Third Molar Sockets: A Comparative Study. J. Maxillofac. Oral Surg. DOI 10.1007/s12663-014-0638-4

58 - BOORA P., Rathee M e Mohanee B. Effect of Platelet Rich Fibrin (PRF) on Peri-implant Soft Tissue and Crestal Bone in One-Stage Implant Placement: A Randomized Controlled Trial. DOI: 10.7860/JCDR/2015/12636.5788

59 - KNAPEN et al. Effect of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) on Bone Regeneration: A Study in Rabbits. Clinical Implant Dentistry and Related Research, Volume 17, Supplement 1, 2015

60 - SCHAR V. M. O., Romero J. D., Kohl S., Zumstein M. A., Nesic D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Clin. Orthop Relat Res DOI 10.1007/s11999-2015-4192-2

61 - BÖLÜKBAŞI N., Yeniyoł S, Tekkesin M S, Altunatmaz K. The Use of Platelet-Rich Fibrin in Combination With Biphasic Calcium Phosphate in the Treatment of Bone Defects: A Histologic and Histomorphometric Study. Current Therapeutic Research 75(2013)15–21

62 - YILMAZ D., Dogan N, Ozkan A, Sencimen M, Ora B. E., Mutlu I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. *Acta Cirúrgica Brasileira* - Vol. 29 (1) 2014 - 59

63 - ACAR M. K. A., Erdem NF, Kahraman S. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Archives of Oral Biology* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.09.017>

61 - EHRENFEST D., Andia I, Zumstein M.A., Zhang C.Q., Pinto N.R., Bielecki N. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2014; 4 (1): 3-9.

62 - FELDKAMP L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, M.A., Jasion G., Kleerekoper, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography, *Journal of Bone and Mineral Research* Volume 4, Issue 1, pages 3–11, February 1989.

63 - HUANG H., Hsu, J., Chen, M.Y.C., Liu C., Chang, C., Li, Y., Chen, K.T.C. Microcomputed tomography analysis of particular autogenous bone graft in sinus augmentation at 5 months: differences on bone mineral density and 3D trabecular structure. *Clin Oral Invest* (2013) 17:535–542.

64 - VANDEWEGHE S., Coelho, P.G., Vanhove, C., Wennerberg, A., Jimbo, R., Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: A comparison with histomorphometry. *Wiley Online Library*, 2013. 10.1002/jbm.b.32938.

65 - ESPOSITO M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006;21:696-710.

66 - Ehrenfest D., Andia I, Zumstein M.A., Zhang C.Q., Pinto N.R., Bielecki N. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2014; 4 (1): 3-9.

71 - Ozdemir H, Ezirganli S, Isa Kara M, et al. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Arch Oral Biol*. 2013;58:537–544.

