

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**

**Mestrado em Odontologia**

**Rafael Soares Vieira**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS  
ASSOCIADO AO OSSO BOVINO DESPROTEINIZADO NA  
NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIAS DE COELHO POR MEIO DE  
MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA**

**São Paulo**

**2015**

**RAFAEL SOARES VIEIRA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS  
ASSOCIADO AO OSSO BOVINO DESPROTEINIZADO NA  
NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIAS DE COELHO POR MEIO DE  
MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA**

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. Yeon Jung Kim

**São Paulo**

**2015**

## RESUMO

Atualmente, o tratamento de pacientes edêntulos com implantes dentários tem se tornado seguro e eficaz, no entanto, um dos desafios nas reconstruções ósseas previamente a instalação de implantes é a presença de defeitos ósseos nos rebordos alveolares. Por essa razão, muitas pesquisas têm contribuído para o desenvolvimento de novos biomateriais. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da associação do Plasma rico em Fibrina e Leucócitos (PRF-L) com osso bovino desproteínizado (Bio-Oss®) na formação óssea em tíbias de coelho por meio de microtomografia computadorizada. Na metodologia empregada foram criados defeitos ósseos em tíbias de 20 coelhos da raça Nova Zelândia. O experimento foi dividido em 4 grupos: Sangue, PRF-L, Bio-Oss® e Bio-Oss® associado ao PRF-L e avaliados em dois períodos, 30 e 60 dias. Os resultados da microtomografia computadorizada demonstraram em relação ao volume de tecido mineralizado e densidade mineral óssea, que não houve diferença significativa entre os grupos no período de trinta dias, contudo no período de 60 dias, os grupos Bio-Oss® e Bio-Oss® associado ao PRF-L, obtiveram maior formação de tecido mineralizado e densidade óssea. A associação do Bio-Oss® com PRF-L não apresentou aumento da formação de tecido mineralizado. Concluiu-se que a associação do PRF-L com Bio-Oss® não promoveu aumento da formação do tecido mineralizado e mostrou que a utilização do Bio-Oss® é uma técnica segura e clinicamente previsível sendo uma alternativa viável para enxerto de osso autógeno.

Palavras chave: Fibrina Rica em Plaquetas. Implantes. Osso bovino desproteínizado. Biomaterial.

## ABSTRACT

Currently, the treatment of edentulous patients with dental implants has become safe and effective, however, one of the challenges in bone reconstruction implants prior to installation is the presence of bone defects in the alveolar ridges. For this reason, much research has contributed to the development of new biomaterials. This study aimed to evaluate the rich Plasma effect on fibrin and leukocytes (PRF-L) with deproteinized bovine bone (Bio-Oss ®) on bone formation in rabbit tibia using computed microtomography. The methodology were created bone defects in the tibia of 20 New Zealand rabbits breed. The experiment was divided into 4 groups: Blood PRF-L Bio-Oss ® and Bio-Oss ® associated with PRF-L and evaluated at two periods, 30 and 60 days. The results of computed microtomography shown in relation to the volume of mineralized tissue and bone mineral density, there was no significant difference between the groups in the thirty day period, however the 60-day period, Bio-Oss ® and Bio-Oss ® groups associated with the G-FRP, obteveram increased formation of mineralized tissue and bone density. The combination of Bio-Oss® with PRF-L showed no increased formation of mineralized tissue. It was concluded that the association of PRF-L Bio-Oss ® did not cause increased formation of mineralized tissue, and showed that the use of Bio-Oss ® is a clinically safe and predictable technique being a viable alternative to autogenous bone graft.

Key words: Fibrin Platelet Rica. Implants. Deproteinized bovine bone. Biomaterial.

## Lista de Ilustrações

Figura 1 - Tricotomia .....	28
Figura 2 - Acesso Venoso .....	28
Figura 3 - Punção na Jugular .....	29
Figura 4 - Centrífuga Intra Spin – Intra-Lock® .....	29
Figura 5 - PRF-L .....	29
Figura 6 - Obtenção PRF-L .....	29
Figura 7 - Preparo da Membrana de PRF-L .....	30
Figura 8 - Membrana de PRF-L Padronizada .....	30
Figura 9 - Descrição do conteúdo do tubo após centrifugação .....	30
Figura 10 - Esquema das dimensões dos defeitos ósseo que foram criados nas tíbias dos coelhos .....	31
Figura 11 - Representação esquemática do preenchimento dos defeitos padronizados pelos biomateriais que compõem os grupos de estudo .....	32
Figura 12 - Incisão inicial .....	32
Figura 13 - Defeitos criados cirurgicamente .....	32
Figura 14 - Preenchimento com biomaterial .....	33
Figura 15 - Membrana PRF-L recobrindo os defeitos .....	33
Figura 16 - Sutura em planos .....	33
Figura 17 - DataViewer: visualização da microtomografia computadorizada .....	35
Figura 18 - CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium: marcações morfométricas de interesse (ROI) .....	36
Figura 19 - CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium: Análise dos resultados.....	37
Figura 20 - PRF-L após compressão.....	38

Figura 21 A e B - Imagens reconstruídas pelo software DataViewer dos grupos de 30 dias. 21-A Grupo sangue, 21-B Grupo Bio-Oss® .....	39
Figura 21 C e D – Imagens reconstruídas pelo software Data Viewer dos grupos de 30 dias. 21-C Grupo PRF-L, 21-D Grupo Bio-Oss® + PRF-L .....	40
Figura 22 A, B e C - Imagens reconstruídas pelo software DataViewer dos grupos de 60 dias. 22-A Grupo sangue, 22-B Grupo Bio-Oss®, 22-C Grupo PRF-L.....	41
Figura 22D – Imagem reconstruída pelo software DataViewer do grupo de 60 dias. 22-D Grupo Bio-Oss® + PRF-L .....	42
Figura 23 - Média e desvio padrão em porcentagem do Volume de Tecido Mineralizado e Volume Tecido Total (BV/TV) entre os grupos – Análise MicroCT....	43
Figura 24 - Média e desvio padrão em $\text{cm}^3$ da Densidade Mineral Óssea (BMD) entre os grupos – Análise MicroCT.....	44
Figura 25 - Análise histológica.....	45

## Lista de Abreviaturas

$\mu$ A	Microampère
$\mu$ CT	Microtomografia computadorizada
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Bio-Oss®	Osso bovino desproteínizado
BMSC	Célula óssea estaminal mesenquimatosa
BV	Volume de tecido mineralizado
CD	Receptores membranários
CT	Tomografia computadorizada
EM	Microscopia eletrônica de varredura
FDP	Produto de degradação do fibrinogênio
g	Grama
HA	Hidroxiapatita
Kg	Kilograma
kV	Kilovolt
mA	Miliampère
min.	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
PBBM	Partículas de osso bovino desproteínizado
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PDLF's	Fibroblastos do ligamento periodontal
PPP	Sobrenadante
PRF-L	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos
RBC	Corpúsculos de Base Vermelho
ROI	Região de interesse
Rpm	Rotação por minuto
TMA	Área total mineralizada
TV	Volume de tecido total
UA	Tensão anódica

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular  
Mc Micrômetro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVO.....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3.1 Osso Bovino Desproteínizado - Bio-oss®.....	14
3.2 PRF-L.....	17
3.3 PRF-L associado com Bio-oss®.....	24
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 Processamento da Membrana .....	37
4.7 Análise estatística .....	38
5 RESULTADOS .....	39
5.1 Análise de Microtomografia Computadorizada.....	39
5.1.1 Volume de Tecido Total (TV) e Volume de Tecido Mineralizado (BV) .....	42
5.1.2 Densidade Mineral Óssea.....	43
5.2 Análise Histológica .....	44
5.2.1 Membrana de PRF-L .....	44
6 DISCUSSÃO .....	46
7 CONCLUSÃO.....	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
9 Anexo 1 - Registro no Comitê Ética e Pesquisa.....	58
10 Anexo 2- Resultados das amostras do Volume de Tecido Mineralizado e Densidade Mineral Óssea .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são utilizados com grande previsibilidade, alto índice de sucesso e comprovada osseointegração. Um dos grandes desafios nas reconstruções ósseas para instalação de implantes é a presença de defeitos ósseos nos maxilares. A fim de superar tais limitações, vários biomateriais foram pesquisados e utilizados para restaurar a forma e a função dos rebordos alveolares<sup>1,2,3</sup>.

Dentre os materiais biológicos, os enxertos de origem autógena são os que apresentam melhor previsibilidade por possuírem propriedades osteogênica, osteocondutora e osteoindutoras, além da biocompatibilidade, sendo considerados o padrão ouro das técnicas de reconstrução óssea<sup>4,5</sup>. Entretanto, não são todos os pacientes que aceitam duas cirurgias (área doadora e receptora). Além disso, a área doadora pode apresentar limitações quanto a quantidade possível de osso à ser retirado, principalmente em situações que requeiram um grande volume de enxerto<sup>6</sup>.

Biomateriais tem sido utilizados para modular a inflamação, reduzir a morbidade cirúrgica e aumentar a velocidade do processo de reparo<sup>7</sup>. A principal característica de um biomaterial é sua biocompatibilidade, ou seja, com composição semelhante ao tecido hospedeiro e que não cause uma resposta negativa do receptor<sup>8</sup>.

Uma grande variedade de biomateriais, como osso bovino desproteínizado, osso humano desmineralizado, congelado e seco, hidroxiapatita (HA), vidro bioativo, tricálcio-fosfato e polímeros, foram desenvolvidos como alternativas ao osso autógeno para promover a formação óssea<sup>9</sup>.

Os biomateriais de origem bovina têm sido estudados desde a década de 60<sup>10</sup>. O osso bovino desproteínizado é um biomaterial amplamente utilizado nos procedimentos de reconstrução para aumento de volume ósseo<sup>11</sup>. É uma hidroxiapatita bovina inorgânica desproteínizada, biocompatível, com propriedade osteocondutiva e de reabsorção lenta<sup>12</sup>. Porém, trata-se de um material acelular, não possuindo capacidade osteogênica ou osteoindutora, propriedades estas necessárias para ser considerado um substituto ósseo ideal. Sua resistência biomecânica é similar ao do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas. Pode ser usado para substituir o enxerto ósseo autógeno em muitos casos. Atuam como arcabouço sobre a qual as células osteogênicas e vasos sanguíneos se interagem

para a formação de novo osso<sup>13,14,15</sup>. Ocorre então, neoformação de capilares, de tecido perivascular e migração de células oriundas do leito receptor. O osso bovino desproteínizado têm sido relatado no tratamento de defeitos periodontais, defeitos ósseos maxilares e no levantamento do assoalho do seio maxilar<sup>16,17,18</sup>.

O aumento ósseo, utilizando concentrados de plaquetas associados ou não a biomateriais, tem sido alvo de diversos estudos e uma considerável atenção sobre o potencial de aplicação de fatores de crescimento para melhorar o processo de cicatrização de feridas. A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (PRF-L) tem sido evidenciada nas diversas áreas da medicina devido ao seu potencial para acelerar e melhorar o processo de cicatrização<sup>19</sup>. O PRF-L, que foi descrito pela primeira vez por Choukroun em 2000, é uma segunda geração de concentrados de plaquetas que pode ser utilizado para promover a cicatrização de feridas e regeneração do osso, estabilização de enxertos, selamento de feridas e a hemostasia<sup>20,21</sup>. O PRF-L consiste em uma matriz densa de fibrina entremeada de células, citocinas, fatores de crescimento, constituindo um reservatório com potencial osteogênico. A fibrina é um elemento fundamental para a hemostase, que constitui o primeiro momento da cicatrização, e também para as fases que se seguem à recuperação estrutural e funcional dos tecidos lesados<sup>25</sup>.

Trabalhos sobre PRF-L demonstraram que este biomaterial possui inúmeras características promissoras e vantajosas quando se faz a comparação com os outros concentrados de plaquetas disponíveis no mercado. Biomateriais à base de fibrina, conhecidos como colas ou vedantes fibrinogênicos, têm sido utilizados por mais de 30 anos como hemostático cirúrgico e agentes de vedação, demonstrando benefícios em praticamente todos os campos cirúrgicos, incluindo a cirurgia plástica reparadora e tratamento de feridas<sup>21,23</sup>.

Em reconstruções ósseas de pequeno porte ou grandes traumas, o PRF-L têm indicações clínicas específicas e quando usados isolados e/ou em conjunto com osso bovino desproteínizado, aumentando a possibilidade de tratamentos com implantes<sup>21</sup>.

Por esta razão, torna-se interessante avaliar a associação do osso bovino desproteínizado com PRF-L, em defeitos ósseos criados em tíbias de coelho, observando a formação óssea, qualidade e tempo necessários para a cicatrização.

## **2 OBJETIVO**

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da associação do PRF-L com osso bovino desproteínizado na formação óssea em tíbias de coelho por meio de análise de microtomografia computadorizada.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O uso de implantes ósseo integrados vem crescendo amplamente devido sua grande taxa de sucesso, como uma alternativa para a reabilitação de dentes ausentes, satisfazendo os critérios mínimos de sucesso em torno de 90% na maxila e 85% para os implantes colocados na mandíbula<sup>27</sup>.

Os enxertos de origem autógena são os que apresentam melhor previsibilidade por possuírem propriedades osteogênicas, osteocondutoras, osteoindutoras e são biocompatíveis, sendo considerados o padrão ouro das técnicas de reconstrução óssea. Entretanto, não são todos os pacientes que aceitam duas cirurgias (área doadora e receptora). Além disso, a área doadora pode apresentar limitações quanto a quantidade possível de osso à ser retirado, principalmente em situações que requeiram um grande volume de enxerto<sup>28</sup>.

Na tentativa de encontrar um substituto ósseo ideal, diversos materiais aloplásticos têm sido pesquisados. Estes biomateriais devem apresentar as seguintes propriedades físico-químicas: biocompatibilidade, reabsorbilidade, degradação controlada e substituição simultânea por novo osso formado, osteocondução e integridade mecânica, a fim de suportar a cicatrização após os procedimentos de regeneração óssea guiada<sup>29</sup>.

Piattelli et al. (1999) <sup>30</sup>, descreveram que as células derivadas dos tecidos enxertados e da região receptora, para desempenharem a função de produzir tecido ósseo, necessitam de uma propriedade específica dos biomateriais ósseos, que é a sua estrutura física responsável pelo suporte das células. A forma como estes biomateriais desempenham a função de arcabouço também é uma das características que os diferencia. Desta forma, os enxertos xenógenos estão sendo cada vez mais considerados para a terapia celular do tecido ósseo, pois podem fornecer esta sustentação mecânica, tanto na apresentação particulada quanto na apresentação em blocos. Desta forma em seu estudo, aplicaram na região posterior de maxila severamente reabsorvidas, enxerto sinusal com Bio-Oss® (osso bovino desproteinizado). Concluíram que este material pode ser utilizado como substituto ósseo em enxerto de seio maxilar, gerando osseointegração satisfatória de implantes.

A presença de defeitos ósseos têm resultado em certa limitação para a instalação de implantes dentários. Devido a falta de espessura e/ou altura os

cirurgiões necessitam muitas vezes lançar mão de enxertos para a reconstrução dos rebordos ósseos. O osso com melhor resultado para enxerto é o autógeno, porém, frequentemente pode ocasionar riscos de complicações e morbidade pós-operatória. Além disso, pouca quantidade de osso pode ser retirada a partir de uma área doadora intraoral<sup>31</sup>. Portanto, apesar de estabelecida a rica capacidade osteogênica do enxerto autógeno, outros biomateriais têm sido estudados para substituí-lo.

### **3.1 Osso Bovino Desproteínizado - Bio-Oss<sup>®</sup>**

Osso bovino desproteínizado (Bio-Oss<sup>®</sup>- Geistlich-Pharma, Wolhusen, Suíça) é um biomaterial amplamente utilizado nos procedimentos de reconstrução para aumento de volume ósseo, tratamento de defeitos periodontais e no levantamento do assoalho do seio maxilar. Vem sendo estudado desde a década de 60. É uma hidroxiapatita bovina inorgânica desproteínizada, biocompatível, com propriedade osteocondutiva e de reabsorção lenta. Sua resistência biomecânica é similar a do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas. Pode ser usado para substituir o enxerto ósseo autógeno em muitos casos. Têm sido relatados no tratamento de defeitos periodontais, defeitos ósseos maxilares e no levantamento do assoalho do seio maxilar. Atua como um arcabouço sobre o qual as células osteogênicas e vasos sanguíneos se interagem para a formação de novo osso. Ocorre então, neoformação de capilares, tecido perivascular e migração de células oriundas do leito receptor <sup>32</sup>.

Berglundh e Lindhe (1997) <sup>33</sup>, observaram por meio de um estudo em cães, a reparação óssea após 3 a 7 meses em defeitos ósseos preenchidos com osso mineral bovino esponjoso e compararam com a reparação ao redor de implantes em osso normal e defeitos preenchidos com osso bovino mineral. Foram utilizados 5 cães da raça beagle. Foi realizada a extração dos pré-molares inferiores direito e esquerdo. Os alvéolos do lado esquerdo foram imediatamente preenchidos com osso mineral bovino esponjoso particulado (Bio-Oss<sup>®</sup>, Geistlich Sons Ltda Wolhusen, Suíça). Após três meses, 2 cães (Grupo I) foram eutanasiados e biópsias da região de pré-molares obtidas e preparadas para análise histológica. Os três cães restantes (grupo II) foram sujeitos nesse intervalo de tempo (3 meses) à instalação de implantes na região de pré-molares inferior direita e esquerda (dois de cada

lado). Os implantes no lado de teste foram colocados na área de defeito previamente enxertada, enquanto os implantes no lado de controle foram instalados na área de extração reparada normalmente. As biópsias foram coletadas e 4 amostras de tecidos foram produzidas por cão, cada uma incluindo o implante e os tecidos peri-implantares mole e duro adjacentes. As biópsias foram submetidas a avaliação histológica. Foi possível observar que o volume de tecido duro ocupado por partículas de Bio-Oss® claramente identificadas foi reduzido entre os intervalos de 3 e 7 meses. Isso indica que, com o tempo, o Bio-Oss® é integrado e subsequentemente substituído por osso neoformado. Em outras palavras, esse enxerto xenógeno atende aos critérios para um material osteocondutivo. Também foi observado que 4 meses após à instalação do implante, a interface titânio/tecido duro demonstrou, tanto pelo aspecto quantitativo quanto qualitativo, um nível semelhante de osseointegração.

Artzi et al. (2000) <sup>34</sup>, estudaram a influência de partículas de osso bovino desproteínizado (PBBM) enxertadas sobre o osso alveolar e avaliaram histomorfometricamente o sítio da extração enxertada aos 9 meses pós-exodontia. Observou-se que a média do preenchimento ósseo recém formado dos alvéolos enxertados foi de 82,3%. Este foi caracterizado pela abundância de tecido ósseo do tipo celular na área coronal, enquanto arranjos lamelares foram identificados apenas na região mais apical. Análises histomorfométricas mostraram um aumento da área média de tecido ósseo ao longo dos cortes histológicos de 15,9% na parte coronal para 63,9% apicalmente (média 46,3%). Concluíram que o material é biocompatível para prevenir a reabsorção óssea pós-extração, porém a efetividade deste material não poderia ser conhecida com um período de 9 meses.

Sartori et al. (2003) <sup>35</sup>, em um estudo de dez anos de acompanhamento em aumento do seio maxilar utilizando osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) mostrou que Bio-Oss® possui propriedades osteocondutoras e ausência de respostas inflamatórias ou efeitos adversos. Apesar desses resultados positivos, os dados histológicos sobre o aumento do osso usando Bio-Oss® em humanos é escasso. O objetivo deste estudo foi analisar a quantidade de Bio-Oss® na ossificação em caso de aumento do seio maxilar. A avaliação foi feita pela comparação dos dados histomorfométricos em 8 meses, 2 e 10 anos após a cirurgia. Foi realizada avaliação histológica das amostras, comparando medidas histomorfométricas em momentos diferentes. Oito meses após a cirurgia observou-se em 20 diferentes cortes finos do

espécime uma quantidade média de tecido ósseo (incluindo espaços medulares) de 29,8% (e 70,2% de Bio-Oss®). Aos 2 anos, o tecido ósseo aumentou para 69,7%, e 10 anos após a cirurgia foi 86,7%. A comparação das médias de cada tempo tem mostrado uma tendência de aumento altamente significativo na formação óssea associada a reabsorção do Bio-Oss®: aos 8 meses, 2 e 10 anos.

Maiorana et al. (2005) <sup>36</sup>, afirmaram que o Bio-Oss® proporciona regeneração óssea em espaços aéreos, tendo uma reabsorção lenta em médio prazo e promovendo estabilidade primária aos implantes instalados tanto em uma como em duas etapas cirúrgicas.

Canullo et al. (2006) <sup>37</sup>, através de um relato de caso, avaliaram a capacidade do Bio-Oss® utilizado em conjunto com um politetrafluoretileno, membrana reforçada com titânio expandido, para restaurar um defeito ósseo vertical. Bio-Oss® serviu como um material de preenchimento. Após a remoção da membrana de titânio, os implantes foram instalados e durante esta fase, as amostras cilíndricas de osso foram obtidas a partir da área aumentada para avaliação histológica. As amostras de biópsia foram compostas de osso trabecular de baixa densidade com numerosas partículas de enxerto intercaladas. Os resultados clínicos e histológicos demonstraram que Bio-Oss® associado com membrana de titânio provou ser um meio clinicamente bem sucedido para restauração de um defeito ósseo vertical. A previsibilidade da técnica depende de um protocolo cirúrgico meticuloso. A utilização da matriz de osso bovino como material de preenchimento resultou no osso vital recém-formado capaz de acomodar os implantes.

Acocella, Bertolai e Sacco (2010) <sup>38</sup>, fizeram um estudo onde foi realizada inserção de implantes imediatos em sítios de primeiros molares recém-extraídos. O acompanhamento foi realizado por um período de três anos. Para isso, os autores realizaram os procedimentos em 68 pacientes, onde foram realizadas a extração e a imediata instalação do implante, com preenchimento de osso bovino desproteínizado (Bio-Oss® - Geistlich Pharma group) realizado quando as dimensões do defeito horizontal entre a parede alveolar e a superfície do implante excedesse 3 mm. Após um período de cicatrização de 3 meses, os implantes foram reabertos e restaurados com coroas unitárias. Apenas 3 implantes falharam em um período de 12 meses resultando em 97,96% de sobrevivência. A combinação de extração atraumática, suficiente osso residual inter-radicular e o uso de material regenerativo apropriado no momento da inserção do implante representam um tratamento previsível em

longo prazo.

Valentini et al. (2010) <sup>39</sup>, avaliaram 43 implantes imediatos unitários inseridos em área estética, aproximadamente 3 mm abaixo da margem gengival livre e o *gap* circunferencial preenchido com substituto ósseo (Bio-Oss®, Geistlich Pharma group) de partículas entre 0,25 e 1 mm. Após uma semana, coroas provisórias foram instaladas sem carga oclusal. A taxa de sobrevivência dos implantes, reabsorção óssea marginal e preservação de papila foram avaliadas no período de um ano. Os resultados mostraram que a taxa de sobrevivência foi de 95,3% e a perda de osso marginal não foi estatisticamente significativa quando comparado à altura no momento do implante. Em 78% dos pacientes, a papila estava completamente preservada.

Zhan Ya-Lin et al. (2015) <sup>40</sup>, avaliaram por meio de um estudo *in vivo*, 18 pacientes que se submeteram à instalação de implantes após extração dentária em região de molar. No grupo controle, os alvéolos foram preenchidos apenas com o coágulo e no grupo teste foi utilizado Bio-Oss® e membrana de colágeno reabsorvível (Bio-Guide®) no local da extração após o implante. Após seis meses foi realizada tomografia computadorizada, inspeção e medições, para avaliar a altura e largura alveolar. Os resultados do grupo experimental após seis meses mostram que a diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa (0,05), mas as diferenças em relação à alteração da largura óssea não era estatisticamente significativa. A presença de osso bovino e recobrimento com membrana de colágeno em alvéolos frescos, após implantes em região molar, pode aumentar significativamente a altura da crista em 1 mm e 4 mm a largura do osso alveolar.

Na busca por um biomaterial que mais se aproxima das características do osso autógeno e que supra a deficiência de osteoindução que o osso bovino desproteínizado possui, muitos estudos atuais avaliaram os concentrados de plaquetas. Observaram que existem fatores de crescimento que podem ser liberados para atrair células osteogênicas e acelerar o processo de cicatrização e formação óssea.

### **3.2 PRF-L**

Choukroun et al. (2001) <sup>20</sup>, descreveram método para obtenção da membrana de PRF-L, de modo que o sangue venoso é recolhido em sistema de vácuo, para

tubos de 10 ml de vidro ou plástico seco (sem anticoagulante) e centrifugado a 2700 rpm a baixa velocidade por 12 minutos (Protocolo Process, Nice, França), gerando um coágulo de PRF-L. Este coágulo é prensado por 10 minutos e drenado um sobrenadante, que resultará em uma membrana de PRF-L. Este método ou técnica foi desenvolvido primeiramente para utilização em cirurgia oral e maxilofacial, sendo que hoje as diversas áreas da medicina a utilizam. Este protocolo é muito simples, comparado aos demais protocolos de concentrados plaquetários.

O aumento do osso alveolar e a colocação dos implantes na maioria das vezes podem ocorrer em dois tempos cirúrgicos distintos, levando a um aumento do tempo para se reabilitar definitivamente o paciente. Por isso uma das necessidades na reabilitação com implantes é o encurtamento do período entre as duas cirurgias. O uso do PRF-L demonstra benefícios na aceleração do reparo ósseo podendo ser associado a outros biomateriais, tendo a capacidade de osteoindução e modular a inflamação<sup>21</sup>.

Estudos de Choukroun et al. (2006) demonstraram um concentrado de plaquetas (PRF-L) de nova geração com preparação simplificada sem manipulação bioquímica de sangue. A arquitetura tridimensional da fibrina é profundamente dependente de processos de polimerização clínicos artificiais. A polimerização lenta durante a preparação PRF-L parece gerar uma rede de fibrina muito semelhante ao natural. Tal rede conduz a uma migração de células e proliferação mais eficiente que regula o aumento da cicatrização e diminuição da inflamação. Embora o uso de adesivos de fibrina, em muitos protocolos esteja bem documentada a partir dos últimos 30 anos, ainda há controvérsas devido a complexidade dos protocolos de produção. O PRF-L pertence a uma nova geração de concentrados de plaquetas. O modo de polimerização lenta confere à membrana de PRF-L uma arquitetura fisiológica particularmente favorável para apoiar o processo de cicatrização. No entanto, é necessário estudos para o entendimento da função plaquetária e de células inflamatórias. Apenas um perfeito entendimento de seus componentes e sua importância permitirá compreender os resultados obtidos clinicamente e, posteriormente, estender os campos de aplicação terapêutica do presente protocolo. Os autores também estudaram os efeitos biológicos benéficos da rede de fibrina formada no PRF-L. A fibrina e os produtos de degradação do fibrinogênio (FDP) estimulam a migração de neutrófilos e crescem a expressão dos receptores membranários CD11e CD18, que promovem a migração dos neutrófilos por meio dos

tecidos, permitindo a adesão dos mesmos ao endotélio e às moléculas de fibrinogênio. Já os FDPs estimulam a fagocitose por parte dos neutrófilos e os processos de degradação enzimática. A fibronectina, juntamente com a fibrina e com os fatores quimiotáticos que retém, estimula também a colonização de feridas com macrófagos<sup>21,22,23,24</sup>.

Evidencia-se a importância da polimerização lenta da rede de fibrina e a homogeneidade da rede obtida. Esta polimerização progressiva possibilita a incorporação de inúmeras citocinas na rede de fibrina, tornando-se estas intrínsecas à estrutura tridimensional. Este grau de ligação entre as citocinas e as fibrilhas de fibrina garante uma maior longevidade das citocinas no local de aplicação, além de resultar numa liberação faseada e mais fisiológica dessas moléculas <sup>21</sup>.

Ehrenfest et al. (2009) <sup>42</sup>, realizaram um estudo sobre os efeitos do PRF-L, o qual foi cultivado fibroblastos gengivais, pré queratinócitos, pré adipócitos e osteoblastos, sendo que para cada tipo celular foram feitas quatro culturas em membranas de PRF-L. Foi demonstrado uma estimulação crescente da proliferação celular das quatro culturas primárias de células, acentuada para os osteoblastos, cujo desenvolvimento foi 5,5 vezes superior à registrada no grupo controle, ao fim de 7 dias. Demonstrou-se ainda um efeito dependente da dose nas culturas de osteoblastos com 2 membranas de PRF-L, efeito esse menos exuberante nas culturas de fibroblastos. Isso se dá pela presença de fatores de crescimento e de citocinas liberadas de forma gradual e fisiológica, existindo em enormes quantidades ligadas a uma matriz de fibrina de características ideais para a indução e condução de migração e multiplicação celular.

Simonpieri et al. (2009) <sup>43</sup>, utilizaram PRF-L como material de enxerto no levantamento do assoalho do seio maxilar em 20 pacientes. Nesse estudo, foi analisada radiograficamente a espessura de osso alveolar, juntamente com o ganho ósseo pela elevação do assoalho do seio maxilar, cujos resultados evidenciaram que após dois a três meses da aplicação de PRF-L o ganho ósseo já permitia a instalação de implantes, o que antecede o prazo de seis meses estabelecido na literatura. Os autores concluíram que a aplicação de PRF-L, sem a associação de outros biomateriais, permite entre outros benefícios, o de evitar os enxertos de osso esponjoso ou cortico esponjoso e morbidade associada. Em um segundo momento, os referidos autores investigaram a colocação de 184 implantes em 20 pacientes aos quais aplicaram este protocolo de enxerto, o resultado foi avaliado

radiograficamente, sendo que o sucesso do processo foi medido analisando a mobilidade dos implantes aplicados, a radiopacidade do osso adjacente aos implantes e pela observação de sinais neuropáticos, de dor ou inflamação. E ponderaram todas as reabilitações bem-sucedidas, independente do tipo ou número de implantes usados. O crescimento e maturação dos tecidos gengivais foi positivo, no momento da perfuração a resistência óssea ao final de 3 meses já estava consolidada e a hemorragia óssea durante a cirurgia comprovou a presença de irrigação farta. Foi avaliado pelo período médio de seguimento de 2 anos e 36 dias. Diante disso, concluiu que o uso exclusivo de PRF-L como material de enxerto foi bem sucedido, possibilitando a instalação dos implantes com reabilitação mastigatória, merecendo especial atenção, tendo em vista as vantagens teóricas supramencionadas da não utilização de osso autólogo, heterólogo, xenoimplantes ou de matrizes sintéticas como materiais de enxerto.

Mazor et al. (2009) <sup>44</sup>, investigaram a viabilidade da utilização exclusiva de PRF-L em elevações do assoalho do seio maxilar com colocação simultânea de implantes. Para isso, foi realizado um estudo radiológico e histológico, em que 25 elevações do seio maxilar foram efetuadas com realização de radiografias simples e tomografias computadorizadas aos seis meses de pós-operatório. No mesmo momento, realizaram biópsias ósseas em nove pacientes. Os resultados apontaram ganhos de osso residual significativo em média 10,1 mm com preservação da integridade da membrana sinusal e sem perda de nenhum dos 41 implantes aplicados. Histologicamente, em média, 33% da área das biópsias da região do enxerto com PRF-L eram compostas por tecido ósseo neoformado. A análise histológica também mostrou a presença de osso trabecular normal, osteoblastos e osteócitos. Concluiu-se, então, que o tecido ósseo gerado só poderia ser consequência da capacidade osteocondutora e osteoindutora deste biomaterial.

Del Corso, Toffler e Ehrenfest (2010) <sup>41</sup>, apontam que a fibrina rica em plaquetas (PRF-L) de Choukroun pode ser considerada um material bom para cicatrização autóloga, incorporando leucócitos, plaquetas e uma ampla gama de proteínas chave dentro de uma matriz de fibrina densa. A fibrina tem lenta liberação de fatores de crescimento e glicoproteínas ao longo de vários dias e esta membrana natural bioativa pode proteger os locais cirúrgicos e materiais enxertados das agressões externas. O PRF-L pode ser utilizado como um material de preenchimento em avulsões dentárias (ou extrações) sozinho ou associado com um

biomaterial. Pode ser usado também como membrana de revestimento para a regeneração óssea guiada, protegendo o material enxertado e acelerando o fechamento da ferida, particularmente em uma sutura onde as margens da ferida não é possível, ou seja, é um biomaterial com diferentes possibilidades de aplicações clínicas.

Chang et al. (2010) <sup>25</sup>, afirmaram que a ausência de anticoagulante leva a um processo de ativação das plaquetas por meio do contato com as paredes do tubo, contato esse que ativa a cascata da coagulação. A centrifugação induz a concentração do fibrinogênio na parte superior do tubo, onde logo é convertida em fibrina pela trombina circulante. Desta maneira, é adquirido um coágulo de fibrina na porção central do tubo, acima de uma camada de glóbulos vermelhos e abaixo de uma camada de sobrenadante constituída por plasma acelular, praticamente. Nesta área central estão aprisionados as plaquetas. Os leucócitos, na porção mais inferior do coágulo de fibrina. O coágulo de fibrina, que tem origem pela agregação plaquetária junto com as reações de coagulação, atua como matriz para o recrutamento de células ao local onde se encontra a lesão nos tecidos, e ainda menciona que a fibrina, juntamente com a fibronectina, opera como matriz provisória para o afluxo de monócitos, células endoteliais e fibroblastos, que usam as suas integrinas para estabelecerem ligações com a fibrina, fibronectina e vitronectina. Essa interação das células com o coágulo modificam o seu fenótipo e a sua expressão genética.

Em meados de 2010 foi publicado importante estudo de Ehrefest et al, que mostravam que o PRF-L causava tanto a proliferação quanto a diferenciação celular em culturas de osteoblastos. Ehrenfest et al. (2010) observaram células mesenquimais ósseas (BMSC), e cultivaram com ou sem PRF-L obtido a partir dos mesmos doadores de BMSC. Ao fim de 7 dias, as membranas de PRF-L foram retiradas e paralelamente foram feitas culturas com 2 membranas (para averiguar a presença de efeito dependente da dose aplicada). Efetuaram contagens celulares, testes de citotoxicidade, doseamentos de fosfatase alcalina e análises histológicas após aplicação da coloração de Von Kossa e contagens dos nódulos de mineralização aos 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados mostraram que o PRF-L estimulou amplamente a proliferação e diferenciação das culturas de BMSC ao longo do estudo. Este efeito positivo era dose dependente de PRF-L aplicada durante as primeiras semanas nas culturas em condições normais e ao longo do

ensaio nas culturas em condições de diferenciação. As culturas sem PRF-L e em condições de diferenciação atingiram o mesmo grau de diferenciação que as culturas de PRF-L em condições normais, sendo esse efeito também positivamente afetado pelo número de membranas de PRF-L aplicadas<sup>49</sup>.

Os benefícios clínicos para o uso do PRF-L na prática diária são muitos. Com custo reduzido e simples manuseio, esta técnica leva à produção de uma grande quantidade de membranas autólogas com um poderoso poder de reparo, em potencial em tecidos moles e duros. Sua gama de aplicações clínicas em cirurgia oral é vasta, como um material de preenchimento ou de membrana de proteção, e, muitas vezes, como ambos. Utilizado como uma membrana de cobertura, PRF-L acelera a cicatrização. Ele geralmente proporciona uma redução perceptível no tempo de cicatrização do tecido superficial, e os pacientes muitas vezes declaram que reduziu a dor pós-operatória. Misturado com material de enxerto, PRF-L serve como cimento biológico entre as partículas e melhorar a neoangiogênese e regeneração do osso, particularmente na proliferação e diferenciação dos osteoblastos. No entanto, este material é apenas um coágulo de sangue otimizado e utilizável. As suas aplicações potenciais são amplas, mas um conhecimento de estudos e trabalho sobre o biomaterial, sua biologia, eficiência e limites são necessários para otimizar a sua utilização. Portanto, estudos adicionais avaliaram a utilização e o desempenho do PRF-L e são garantidos<sup>41</sup>.

As características físico-químicas da rede tridimensional de fibrina, assim como a presença de elementos quimiotáticos e de fibronectina, dominam a invasão do coágulo por parte dos macrófagos, e assim, os fibrinopeptídeos, que derivam da clivagem do fibrinogênio pela trombina, ocorrem toda vez que se forma um coágulo, sendo fatores quimiotáticos para os neutrófilos e monócitos. Os elementos desta matriz tecidual provisória caracterizam-se por proporcionarem baixa resistência à migração de células (ácido hialurônico), para além de constituírem um reservatório há uma série de fatores de crescimento e citocinas<sup>45</sup>.

De acordo com Tatullo (2012) <sup>46</sup>, a formação de um coágulo de fibrina, que é um produto da cascata de coagulação, numa zona do tubo em que não se deparam plaquetas, pode ser elucidada pelo novo modelo de coagulação em discussão. Este modelo celular denomina-se de *cell-based model*. Esta doutrina se sustenta mediante várias observações *in vivo*, uma das quais se constata que a formação do trombo plaquetário e a polimerização de fibrina acontecem em sentido simultâneo

no processo de coagulação. Segundo o modelo dessa cascata de coagulação, a ativação plaquetária se daria primeiro e só então aconteceria a subsequente formação do coágulo de fibrina para estabilização do agregado plaquetário. O segredo para a realização eficaz e bem sucedida da técnica de Choukroun se dá inteiramente na velocidade de transferência do sangue, após a coleta para a centrífuga. A carência de anticoagulante faz com que o sangue coagule quase instantaneamente quando entra em contato com o revestimento interno do tubo, sendo imprescindíveis apenas alguns minutos para que a centrifugação concentre ao meio do tubo o fibrinogênio. Cabe destacar que a comprovação de que acima de metade dos leucócitos ficam também retidos na malha de fibrina, sobretudo quando representados por linfócitos. Demonstra-se que a quantidade de leucócitos embebidos no PRF-L é significativa, sublinhando ainda o papel que os linfócitos têm como imunomoduladores. Sublinham ainda a importância de um manuseamento extremamente cuidadoso dos coágulos para preservação de seu componente celular.

Dohan et al. (2013) <sup>42</sup>, após experimentos para confecção do PRF-L, entenderam que somente uma coleta rápida e uma manipulação também rápida dos tubos permitem a obtenção de um coágulo com utilidade cirúrgica. Se houver um atraso entre a coleta do sangue e a centrifugação, a fibrina vai polimerizar numa maneira difusa e o coágulo final será pequeno e de consistência demasiado branda. Esta polimerização lenta da fibrina no tubo é um dos fatores que distingue este concentrado de plaquetas dos restantes. Ao oposto do que acontece com outras técnicas, em que há adição de enormes quantidades de trombina exógena para que a coagulação se dê, o protocolo de Choukroun implica uma coagulação com concentrações de trombina praticamente fisiológicas, o que influencia a estrutura tridimensional da malha de fibrina obtida.

Outras características demonstradas na literatura científica, segundo Dohan et al. (2006) foi o componente imunológico do PRF-L. Toda vez que, após uma agressão prévia aos tecidos, se inicia uma resposta inflamatória, há um afluxo de células inflamatórias no local da lesão. Essa concentração de leucócitos tem por objetivo não só contrariar o aparecimento de infecção, como também modelar a resposta inflamatória, recrutar fibroblastos para o estabelecimento de uma matriz cicatricial, induzir proliferação celular, estimular a biossíntese de proteínas estruturais e de proteases. O PRF-L é também um biomaterial com atributos

imunomoduladores, pela capacidade anti-infecciosa, propriedades quimiotáticas e angiogênicas<sup>21</sup>.

Chang et al. (2011)<sup>47</sup>, estudaram os efeitos do PRF-L em cultura de fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF's). Os níveis de fosfatase alcalina apresentaram elevados ao longo dos 5 dias do ensaio. A fosfatase alcalina é uma glicoproteína membranária que é considerada um dos indicadores da presença de osteoblastos e da formação de novo osso. Logo, a expressão aumentada de fosfatase alcalina demonstrou que o PRF-L contribui para a diferenciação dos PDLF's em osteoblastos, um resultado que sustenta sua aplicação para aumento ósseo mandibular e maxilar, previamente à colocação de implantes dentários.

Wu, et al. (2012)<sup>48</sup>, avaliaram a utilização de membranas PRF-L em 168 alvéolos pós-extração sem alteração da terapêutica anticoagulante em curso. Apenas dois pacientes apresentaram hemorragia (4%) solucionada em poucas horas com aplicação de materiais hemostáticos e de compressão. Dez pacientes (20%) exibiram hemorragia ligeira, cuja resolução foi espontânea ou para a qual bastou a aplicação de compressão nas duas horas pós-cirurgia. Os restantes, 38 pacientes (76%) mostraram uma hemostase adequada após as extrações dentárias a que foram sujeitos. A cicatrização que se seguiu à utilização de PRF-L para preencher os alvéolos pós-extração foi rápida, sem registro de dor e sem surgimento de infecção, tendo sido possível a remoção de suturas após uma semana da cirurgia.

### **3.3 PRF-L associado com Bio-Oss®**

Inchingolo et al. (2010)<sup>50</sup>, apresentaram um experimento com PRF-L e Bio-Oss® usado como enxerto no tratamento da atrofia óssea maxilar através da avaliação clínica e radiológica. Foram estudados 23 pacientes que necessitavam de levantamento do assoalho do seio maxilar, a fim de colocar os implantes na região posterior da maxila. Os casos selecionados possuíam altura do osso residual superior a 5 mm, podendo ser adotados para procedimentos cirúrgicos de estágio único. Antes da inserção do implante, uma pequena quantidade de material de preenchimento foi colocada na cavidade. Para este efeito, os fragmentos ósseos, armazenados em solução salina, foram misturados com Bio-Oss® e PRF-L depois de serem moídos. O estudo mostrou que em todos os pacientes ocorreu um

aumento significativo na densidade óssea ao redor do implante. Conclui-se que em todos os casos incluídos neste protocolo foi realizada uma reabilitação protética-implante bem sucedido, de acordo com critérios Albrektsson. De forma que o exame radiológico, realizado após seis meses, permitiu notar a presença de tecido ósseo recém-formado, bem semelhante com o osso residual também revelando um aumento médio na densidade óssea ao redor do implante de 31%. Na região apical, os autores também verificaram contato próximo dos implantes com o osso recém-formado.

Tatullo et al. (2012) <sup>46</sup>, em cirurgias reconstrutivas de maxilas atrofiadas, avaliaram clínica e histologicamente o efeito do PRF-L associado com osso bovino desproteinizado (Bio-Oss®) como materiais de enxerto. Foram recrutados 60 pacientes e os critérios para inclusão foram atrofia maxilar com rebordo residual < 5 mm, no qual 72 levantamentos de seio maxilar foram realizados. Os resultados histológicos mostraram que as amostras coletadas após 106 dias (protocolo precoce) com a adição de PRF-L foram constituídas por tecido ósseo lamelar com um estroma interposto e ricamente vascularizado. Concluíram que a utilização de PRF-L reduz o tempo de cicatrização em comparação com os 150 dias descritos na literatura, favorecendo a regeneração óssea. Tanto pela estabilidade dos implantes quanto pela imagem histológica obtida, os autores concluíram que ao fim de 106 dias de pós-operatório do levantamento do seio maxilar com utilização de PRF-L no enxerto, já era admissível e viável a colocação de implantes, não sendo, porém, com a funcionalidade completa. Desta maneira, confirmou-se um tempo de cicatrização inferior aos 120-150 dias, comprovando novamente o poder osteocondutor e osteoindutor do PRF-L e os benefícios da sua utilização.

Tunali et al. (2013) <sup>51</sup>, 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), com a 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 fibrina rico em plaquetas (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 colhidas para a formação de t-PRF-L. Avaliou-se morfologicamente T-PRF-L e coágulos através de microscopia eletrônica de varredura (EM). O sangue coletado foi centrifugado durante 15 min a 3500 rpm. 15 dias após a colocação da

membrana, observaram que houve formação de tecido conjuntivo e de tecido ósseo. Estes resultados mostram que o t-PRF-L pode induzir a formação de tecidos ósseos e tecidos mole no prazo de 30 dias de tratamento.

Oliveira et al. (2014) <sup>52</sup>, publicaram um estudo de avaliação histomorfométrica da regeneração óssea com a utilização de PRF-L associado ou não a osso bovino em defeitos ósseos na calvária de ratos. O experimento utilizou 56 ratos divididos nos seguintes grupos: coágulo autógeno, coágulo homogêneo, PRF-L-a (PRF-L autógeno), PRF-L-h (PRF-L homogêneo), Bio-Oss® e Bio-Oss® associado ao PRF-L, sendo que 4 ratos de cada grupo foram eutanasiados após 30 e 60 dias pós-operatórios. A área de formação óssea foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A maior média percentual de novo osso foi observada no Bio-Oss® associado ao PRF-L ( $58,8200\% \pm 4,8042$ ) que apresentou-se significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que os grupos coágulo homogêneo ( $26,8800\% \pm 4,8042$ ), coágulo autógeno ( $18,6262\% \pm 4,8042$ ), PRF-L-a ( $22,4062 \pm 4,8042$ ) e PRF-L-h ( $37,9387\% \pm 4,8042$ ). Ausência de diferença estatística foi notada na avaliação entre os grupos, entre Bio-Oss® associado ao PRF-L ( $58,8200\% \pm 4,8042$ ) e Bio-Oss® ( $41,7175 \pm 4,8042$ ); e entre os períodos, de 60 dias, entre o Bio-Oss® associado ao PRF-L ( $63,5875\% \pm 4,8042$ ) e Bio-Oss® ( $57,3450 \pm 4,8042$ ) mostraram semelhança estatística ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos nos permitem concluir que o PRF-L apresentou um efeito positivo sobre a regeneração óssea principalmente quando associado ao Bio-Oss®.

Yoon, J-S et al. (2014) <sup>53</sup>, pesquisaram a influência de PRF-L sobre a angiogênese e osteogênese na regeneração óssea guiada usando substitutos ósseos xenogênicos. Foram realizados defeitos cranianos em dez coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia. Cada um dos preparos receberam Bio-Oss® como grupo controle e osso bovino + PRF-L no grupo experimental. Biópsias foram feitas e encaminhadas para análise histomorfométrica e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi determinada pela imunohistoquímica. A expressão de VEGF foi mais intensa no grupo experimental do que no grupo controle, porém, após análises histomorfométricas e imunohistoquímicas os dois grupos não tiveram diferença estatística. Os resultados deste estudo sugerem que a PRF-L pode aumentar o número de células da medula. No entanto, a PRF-L juntamente com substitutos ósseos xenogênicos não mostra um efeito significativo na regeneração

óssea.

Seung-Mim et al. (2014) <sup>55</sup>, estudaram na elevação do assoalho do seio maxilar com instalação simultânea de implantes usando PRF-L como material de enxertia único. Tem-se demonstrado pelas pesquisas que a elevação do seio maxilar simultâneo à implantação usando PRF-L como material único é um procedimento confiável que promove aumento ósseo no seio maxilar. Um implante foi colocado após a elevação da membrana sinusal no seio maxilar de seis cães fêmeas adultas e permaneceram no local durante seis meses. Após este período foi realizado a eutanásia e o material enviado para análise tomográfica e morfométrica. Os achados deste estudo sugerem que a elevação do seio maxilar 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 sinusal.

Inchingolo et al. (2015) <sup>54</sup>, apresentam um estudo com objetivo de avaliar histologicamente o resultado de indivíduos submetidos ao aumento do assoalho do seio maxilar utilizando PRF-L como um material de preenchimento, em associação com a Bio-Oss® e Sint-Oss (Beta Tricálcio Fosfato Puro), comparativamente com grupo controle e colocação do implante simultâneo. O estudo foi feito em 64 pacientes de ambos os gêneros e na faixa etária de 55 a 73 anos, totalizando em 175 implantes dentários. Os implantes foram avaliados após cerca de 1 ano da instalação. Todos os pacientes reportaram nenhuma dor à percussão e nenhum sinal de sofrimento para os tecidos peri-implantares, com presença de uma estabilidade primária ótima dos implantes inseridos e o aumento na densidade de osso periimplantar. Em conclusão, o uso de PRF-L reduziu o tempo de cicatrização favorecendo a regeneração óssea e permitindo que a integridade da membrana do seio maxilar possa ser mantida durante procedimentos cirúrgicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (anexo 1), da Universidade de Santo Amaro - Unisa, com o número de processo 28/2013. Para a realização do trabalho foram utilizados 20 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, com peso aproximado de 3,0 kg. Permaneceram mantidas no biotério da Universidade de Santo Amaro durante o período da pesquisa. Os animais 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) –0,06 ml/kg, IM;
- Xilazina 2,3% (Anasedan - Ceva®, Paulínia, SP, Brasil) – 0,1 ml/kg, IM;

Em seguida foi feita a tricotomia da região de membro superior direito ou esquerdo (Figura 1 e 2) para colocação de acesso venoso para anestesia. A anestesia foi obtida com:

- Centra® (Cetamina 10 g, Tramadol 2 g, Midazolan 1 g – Ouro Fino, Uberaba-MG ) – 10 ml, IV;
- Propovet® (Propofol, Ouro Fino, Uberaba-MG) – 10 mg/ml, IV;



**Figura 1. Tricotomia**



**Figura 2. Acesso Venoso**

### 4.1 Obtenção do PRF-L

O plasma rico em fibrina foi preparado seguindo protocolo descrito por Choukroun et al. (2001). Após Tricotomia e acesso venoso (Figuras 1 e 2), foram coletados 8 ml de sangue total obtido pelo acesso venoso na jugular do animal, que

foi centrifugado a 2700 rpm por 12 min. Após a cetrifugação era possível observar a separação do sangue em sobrenadante, coágulo de fibrina e no fim do tudo um acúmulo de células vermelhas (Figura 9). Em seguida era preparada a membrana de PRF-L seguindo uma padronização em relação a separação da fibrina com a série vermelha e o tamanho usado nos defeitos(Figuras 3 a 8).



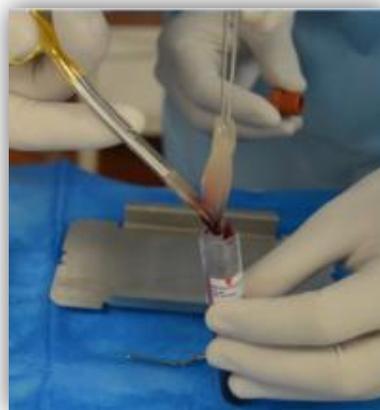
**Figura 3. Punção na Jugular**



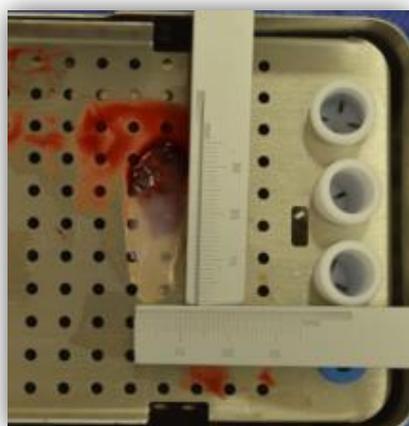
**Figura 4. Centrifuga Intra Spin – Intra-Lock®**



**Figura 5. PRF-L**



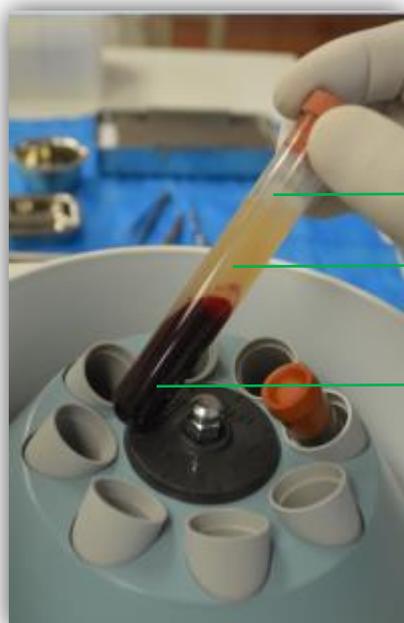
**Figura 6. Obtenção PRF-L**



**Figura 7. Preparo da Membrana de PRF-L**



**Figura 8. Membrana de PRF-L Padronizada**



PPP (Sobrenadante)

Coágulo de Fibrina (PRF)

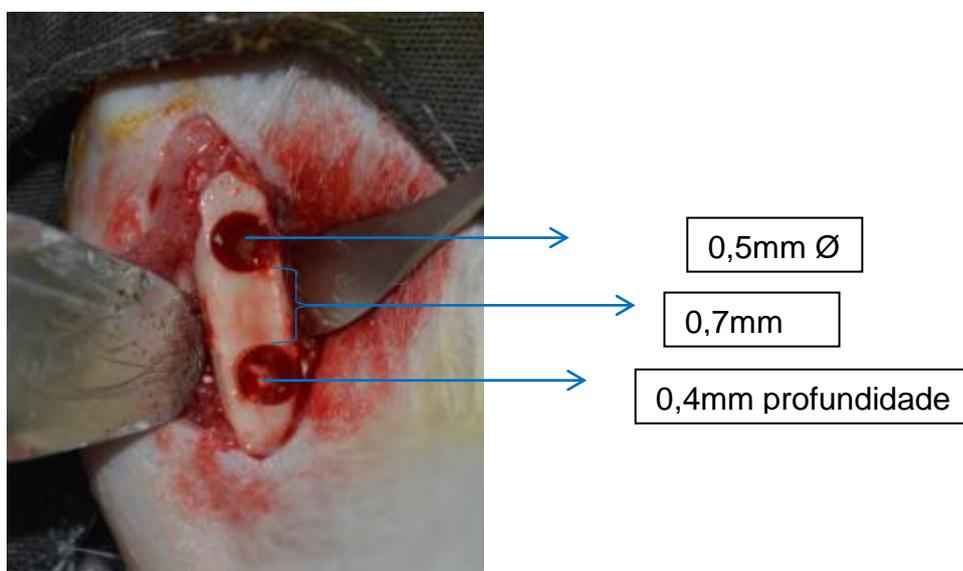
Células Vermelhas

**Figura 9. Descrição do conteúdo do tubo após centrifugação**

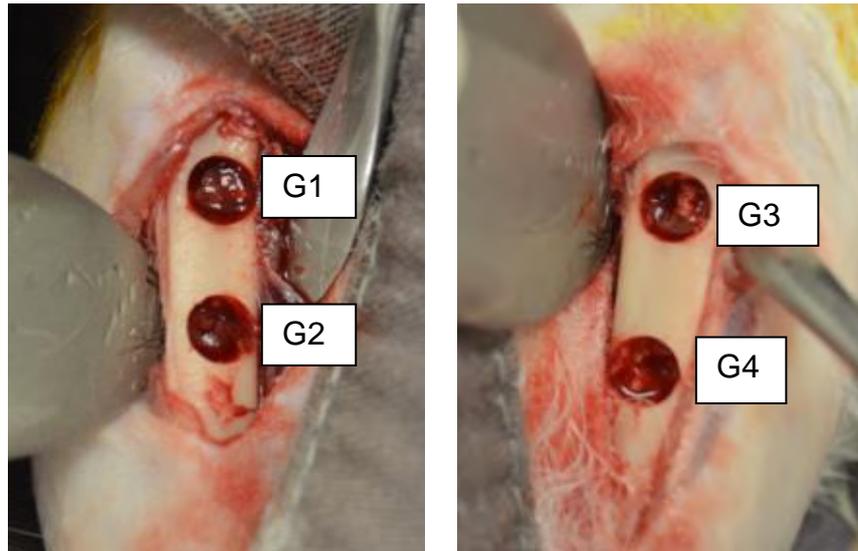
#### **4.2 Técnica cirúrgica / Criação do defeito ósseo**

Inicialmente foi realizada anestesia troncular dos membros bloqueando os nervos isquiático e femoral nas regiões inguinal e sacral, utilizando o aparelho neuro localizador (DL250, DeltaLife, São José dos Campos - SP), com o anestésico Neocaína® 0,50% (Bupivacaína + epinefrina 1:200.000 com glicose 8% – Cristália, Itapira-SP).

A região da tíbia foi tricotomizada e desinfetada com álcool iodado (Vic Pharma®, 0,1% Taquaritinga-SP). Foi realizada anestesia infiltrativa com anestésico local lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000 (DFL®, Rio de Janeiro, Brasil) na região com uso de bisturi de lâmina nº 15 foi realizada uma incisão vertical onde os tecidos foram rebatidos e 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 10). As lesões ósseas foram divididas em quatro grupos experimentais de acordo com o biomaterial de preenchimento (Tabela 1). Foi realizado aleatorização no tratamento das lesões, sendo que cada animal recebeu todos os quatro tratamentos (Figura 11). O biomaterial Bio-Oss® usado para o preenchimento das lesões foi padronizado na proporção de 0,02 mg por defeito. A pesagem foi realizada com auxílio de balança de precisão (Marte AL200c) O PRF-L teve a proporção por lesão de 0,5 mm x 0,5 mm, e foi condicionado no defeito após ser picotada. Após o tratamento, os retalhos foram suturados com fio de nylon 4-0 e suturas removidas após 14 dias do procedimento cirúrgico.



**Figura 10. Esquema das dimensões dos defeitos ósseos que foram criados nas tíbias dos coelhos**



**Tíbia Direita**

**Tíbia Esquerda**

**Figura 11. Representação esquemática do preenchimento dos defeitos padronizados pelos biomateriais que compõem os grupos de estudo**

**Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais de acordo com biomateriais de preenchimento (Randomizados).**

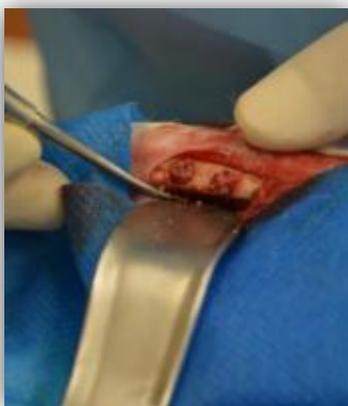
<b>Grupo</b>	<b>Biomaterial de Preenchimento</b>
G1	Sangue
G2	PRF-L
G3	Bio-Oss®
G4	Bio- Oss® + PRF-L



**Figura 12. Incisão inicial**



**Figura 13. Defeitos criados cirurgicamente**



**Fig. 14. Preenchimento com biomaterial**



**Fig. 15. Membrana PRF-L recobrindo os defeitos**



**Fig. 16. Sutura em planos**

### **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) – 0,2 mg/kg, (SC), 2x/dia por 7 dias.
- Eurofloxacina (Enrofloxacina® 10%, Vencofarma, Londrina, Brasil) – 5 a 10 mg/kg, (SC) 2x/dia por 7 dias.

### **4.4 Eutanásia dos coelhos**

Os períodos de biópsia foram 4 e 8 semanas após a cirurgia. Os animais foram eutanasiados pelo aprofundamento anestésico de acordo com o seguinte protocolo:

Ketamina (Vetanarcol, König, Buenos Aires, Argentina) – 30mg/kg/IM;

Xilazina (Xilazin 2%, Syntec, São Paulo, Brasil) – 3mg/kg/IM;

Tiopental;

Cloreto de Potássio;

Após a eutanásia, 8 ml de sangue de 5 animais foram coletados e processados para obtenção da membrana de PRF-L e encaminhados para

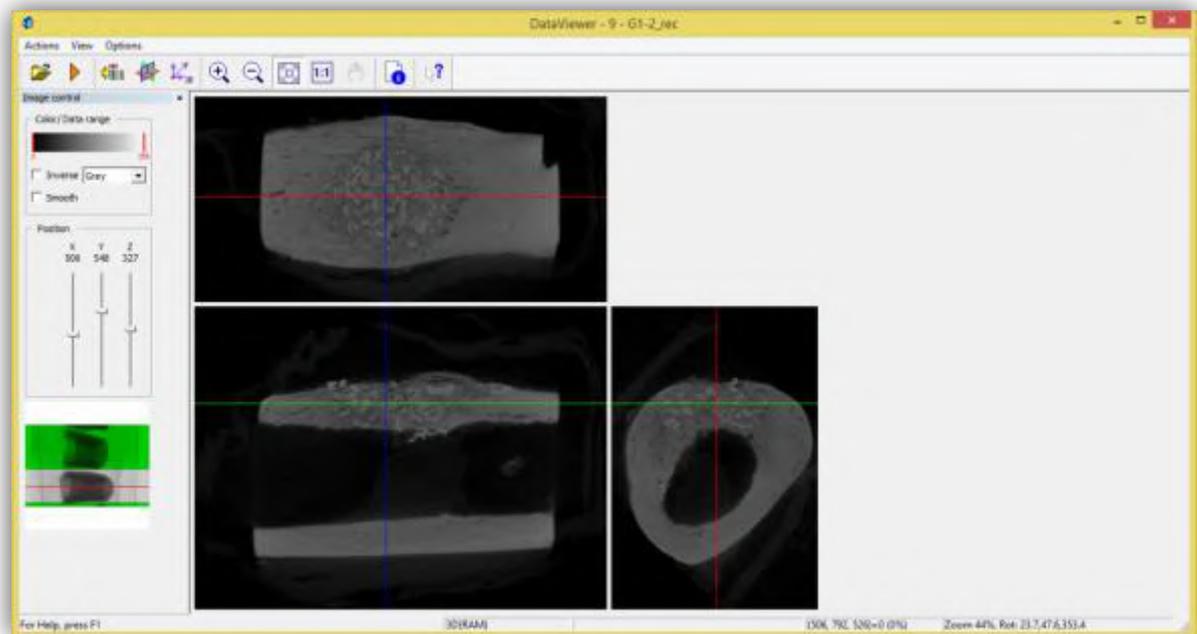
processamento histológico. Em seguida, foram realizadas tricotomia, incisão, dissecação dos tecidos moles e exposição da tíbia. Cada defeito foi removido com utilização de um disco diamantado (KG Soresen, Cotia, Brasil) sob irrigação constante com soro fisiológico 0,9% (Figura 3). As amostras obtidas de cada material de preenchimento foram fixadas em solução de paraformaldeído neutro 4% por 48 horas e depois foram transferidas para uma solução de álcool 70% sendo 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).

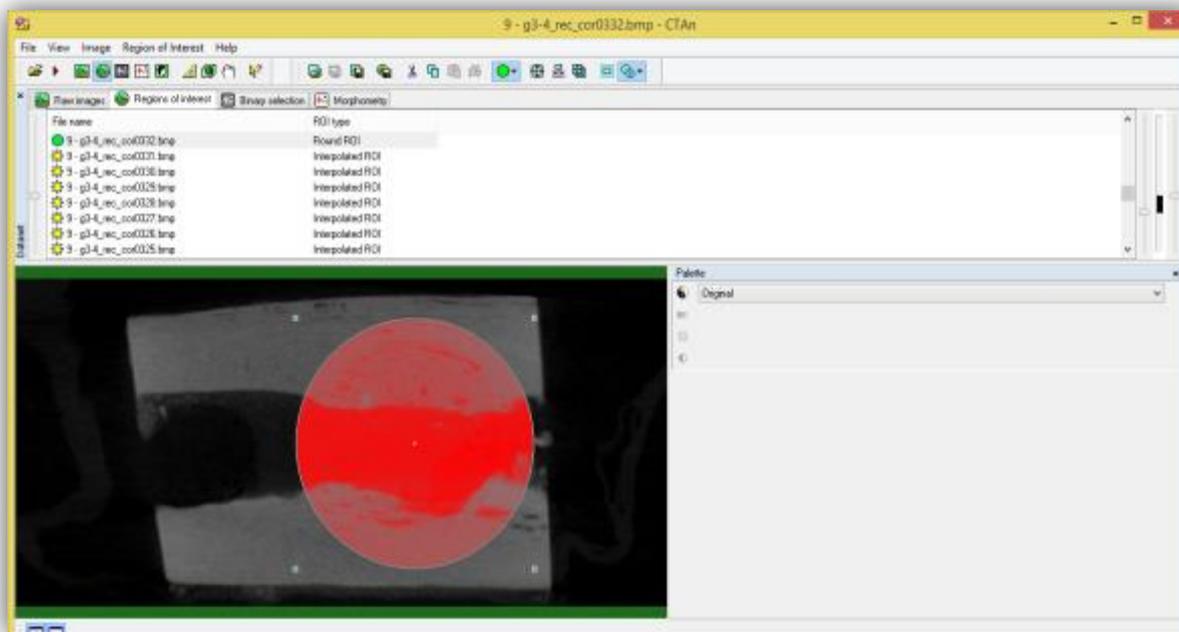
*Método de escaneamento:* Os parâmetros utilizados da tomografia computadorizada foram os seguintes: o tamanho da imagem em pixel foi de 2000 x 1336; a espessura dos cortes foi de 12  $\mu$ m; a magnificação da imagem foi de 10x; a voltagem do tubo de raios-X foi de 50 kV e o feixe foi de 496  $\mu$ A e a corrente elétrica foi ajustada para 0.1 mA. 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): Nesta etapa foi utilizado um software bidimensional (Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Belgium) para possibilitar a visualização e a quantificação da formação óssea em um computador. Foi realizado apenas o alinhamento das amostras, de modo a obter um padrão em todas as amostras.



**Figura 17. DataViewer: Posicionamento e alinhamento das imagens 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 da região operada através de uma área de interesse (ROI – region of interest) tridimensional. O examinador seguiu as marcações morfométricas durante o desenho do ROI.



**Figura 18. 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, um ROI circular 3D foi criado, abrangendo toda a área da tíbia onde foi confeccionado o preparo cirúrgico, como mostra na figura 18, utilizando um software (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium) baseado na resultante do contorno 2D. A área do ROI foi de 5 mm Ø, que corresponde ao diâmetro da trefina utilizada na cirurgia. A partir daí, os parâmetros de fração do volume ósseo foram determinados para o cálculo das informações de acordo com as etapas requeridas pelo software. Os resultados anotados foram o Volume de tecido mineralizado (TV), volume ósseo (BV) e porcentagem de volume ósseo (BV/TV) conforme figura 19. As análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado.

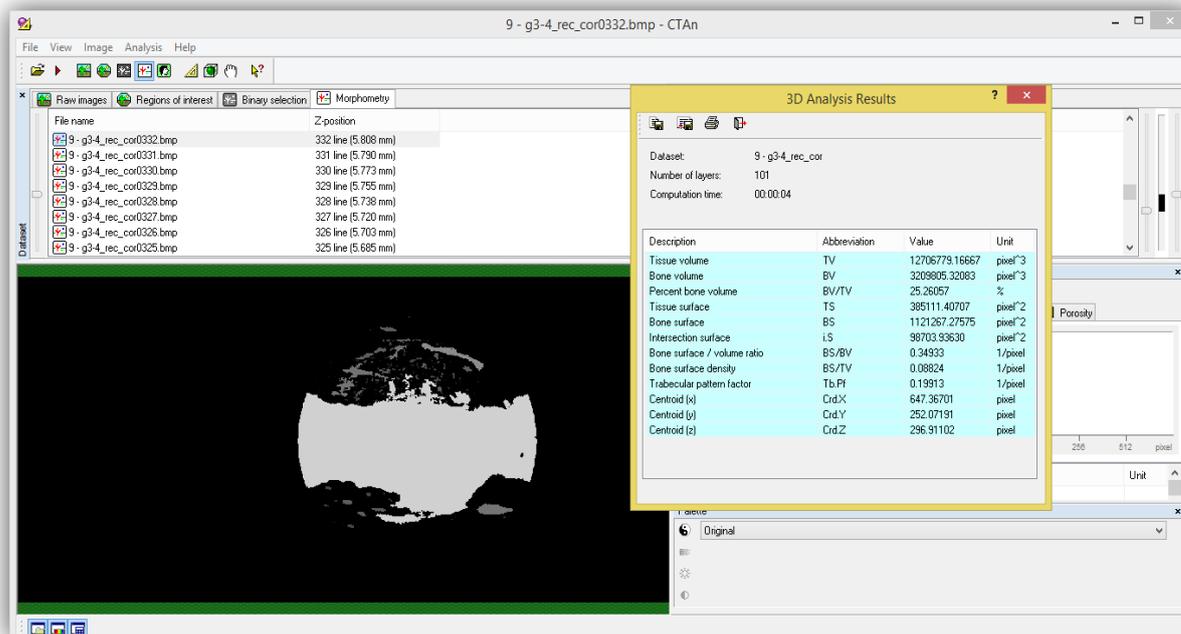


Figura 19. CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium: Análise dos resultados

#### 4.6 Processamento da Membrana

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 encaminhado 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 20 – PRF-L após compressão**

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

Nas reconstruções, as imagens dos cortes microtomográficos foram analisadas quanto a quantidade óssea pela relação entre o Volume Total e Volume de Tecido Mineralizado. A análise foi realizada individualmente para cada variável.

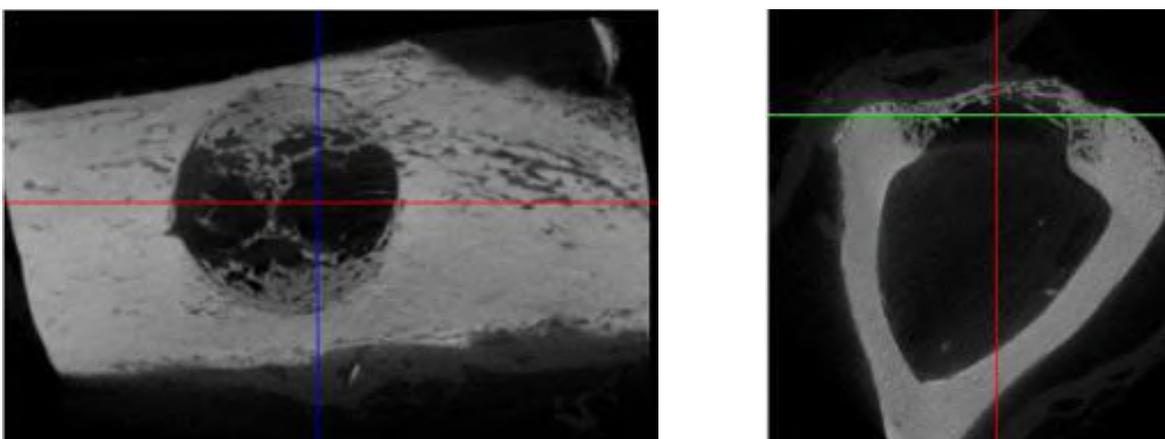


Figura 21 – A

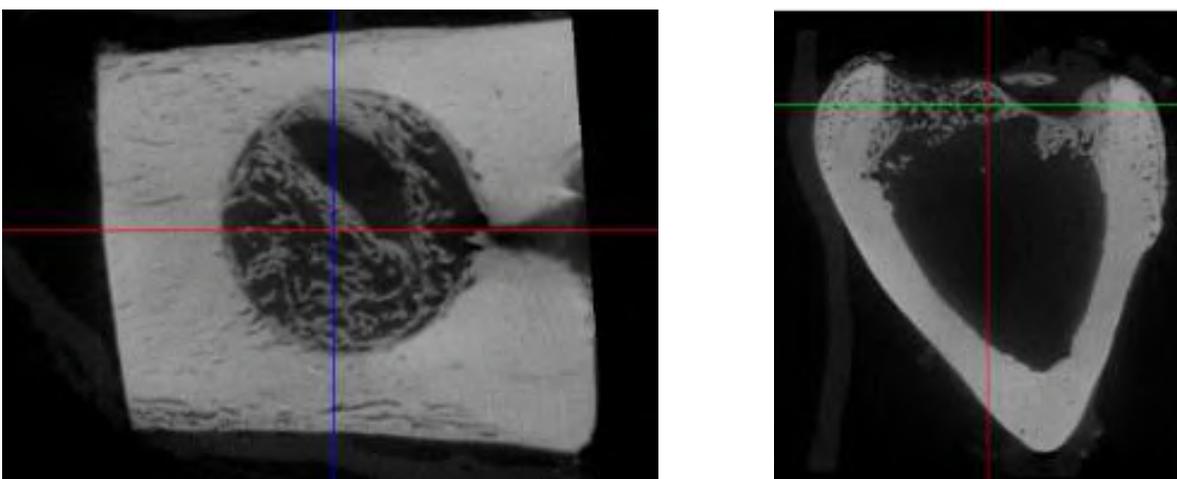
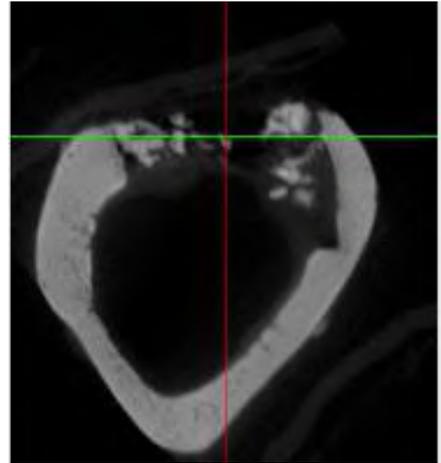
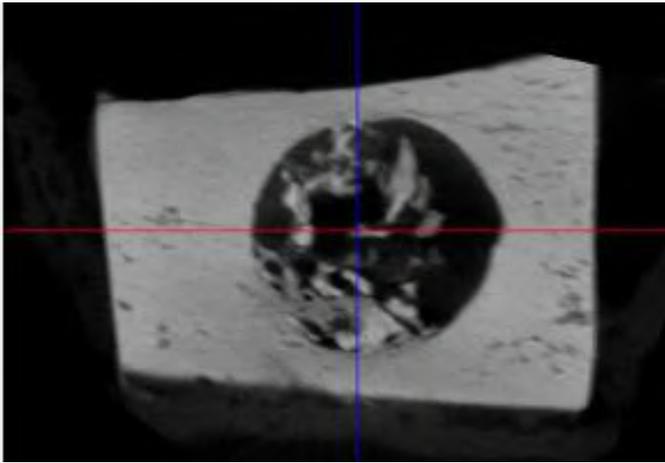
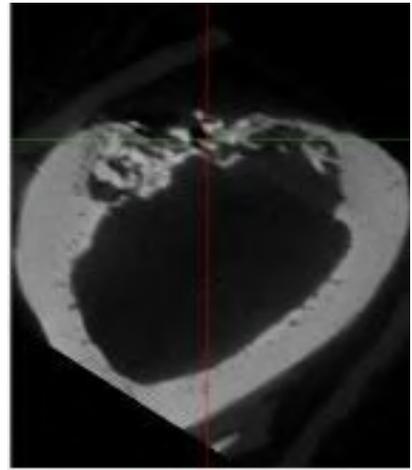
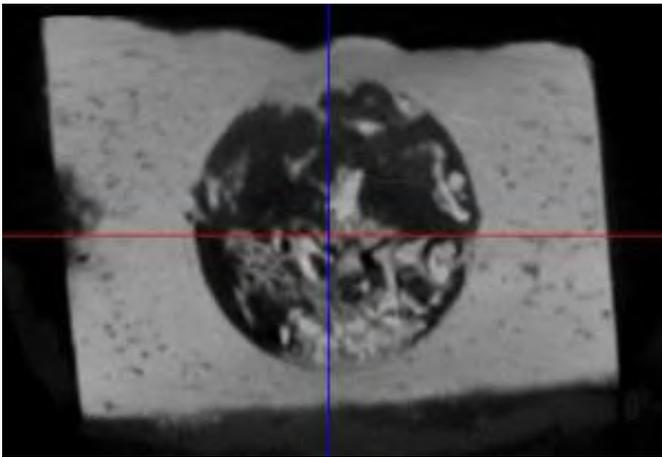


Figura 21 – B



**Figura 21- C**



**Figura 21 – D**

**Figura 21. Imagens reconstruídas pelo software DataViewer dos grupos de 30 dias. 21-A Grupo controle, 21-B Grupo PRF-L, 21-C Grupo Bio-Oss®, 21-D Grupo Bio-Oss® + PRF-L, evidenciando a área analisada após alinhamento dos cortes microtomográficos.**

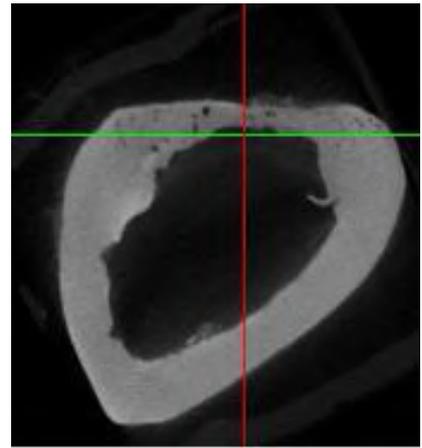
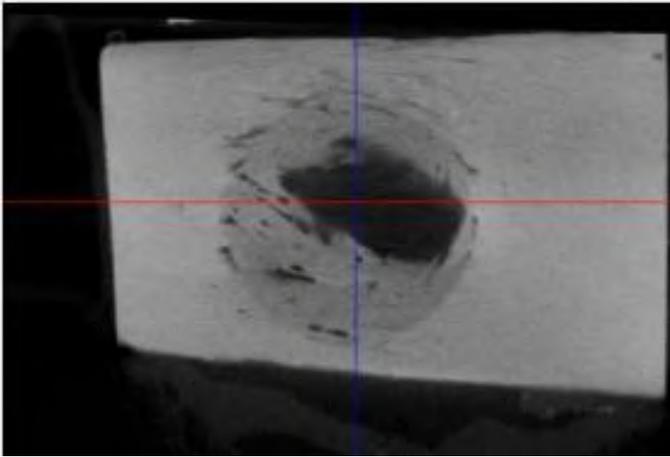


Figura 22-A

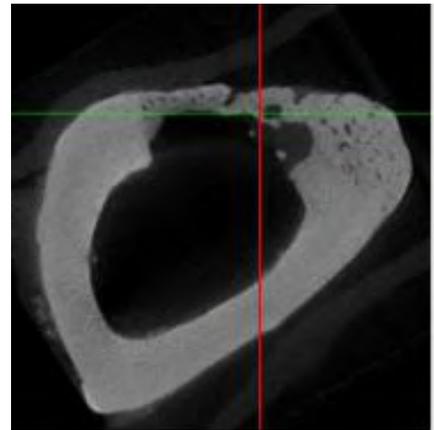
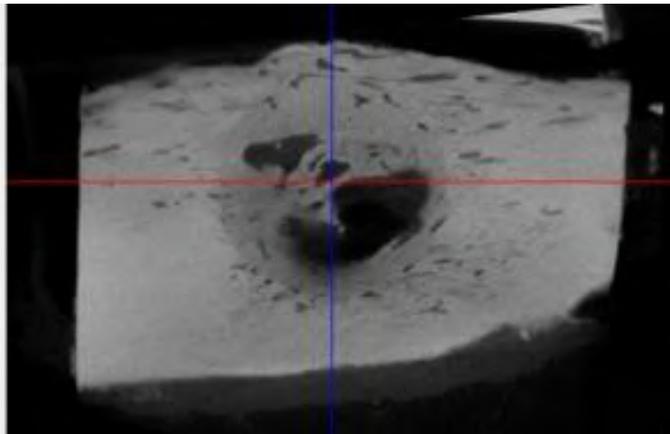


Figura 22-B

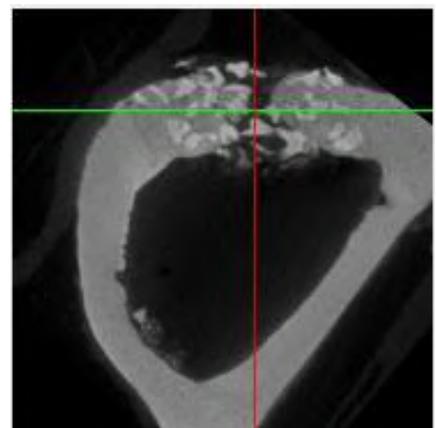
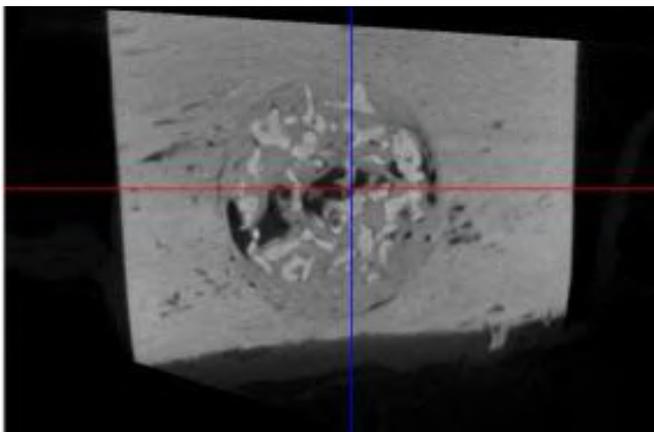
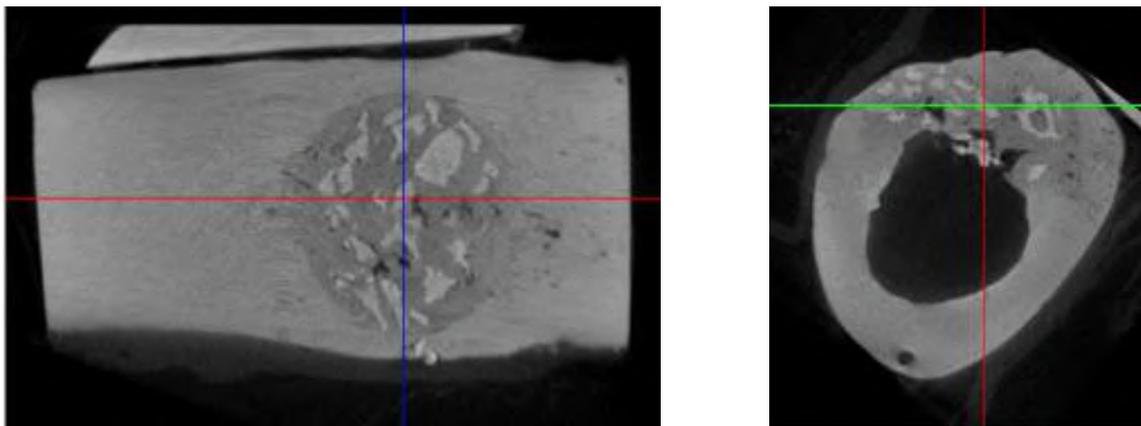


Figura 22-C



**Figura 22-D**

**Figura 22. Imagens reconstruídas pelo software DataViewer dos grupos de 60 dias. 22-A Grupo controle, 22-B Grupo PRF-L, 22-C Grupo Bio-Oss®, 22-D Grupo Bio-Oss® + PRF-L, evidenciando a área analisada após alinhamento dos cortes microtomográficos .**

### **5.1.1 Volume de Tecido Total (TV) e Volume de Tecido Mineralizado (BV)**

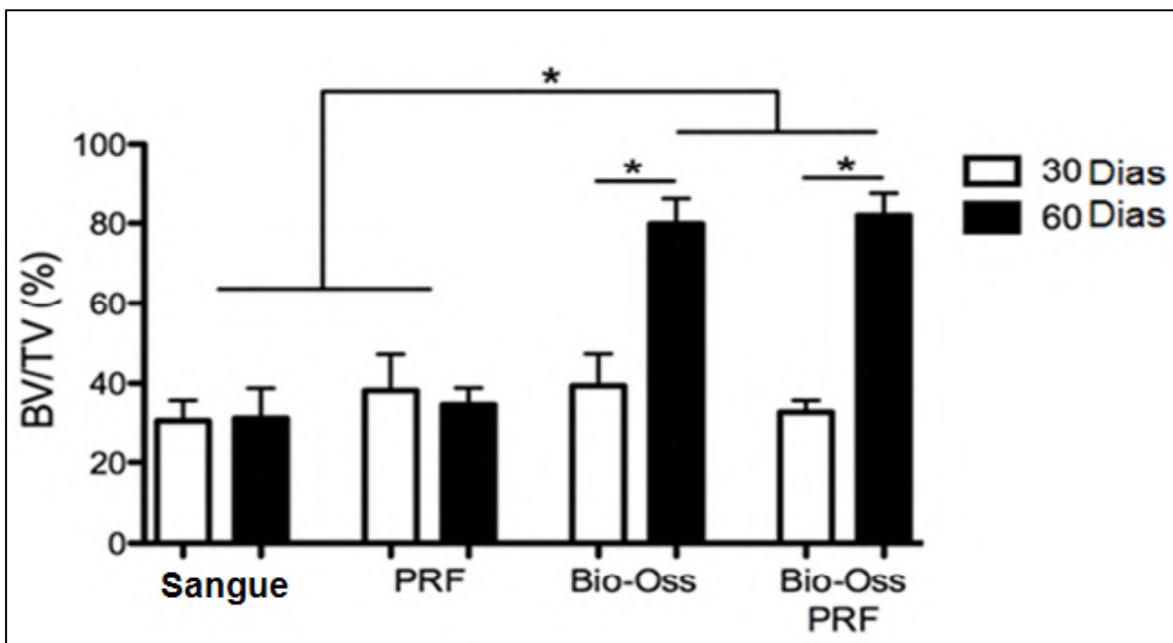
As reconstruções das imagens dos cortes microtomográficos foram analisadas quanto à quantidade de tecido mineralizado pela relação do Volume de Tecido Total (TV) e Volume de tecido Mineralizado (BV).

O Volume de Tecido Total (TV) é uma variável com valor expresso em  $\text{mm}^3$  e está exposto na figura 23, 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 23, que aponta todos os grupos em relação à variável.

Desta forma, o  $\text{BV}/\text{TV}$  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 (figura 18).

Aos 30 dias não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos em relação a quantidade de volume tecido mineralizado.

No período de 60 dias, os grupos Bio-Oss® e Bio-Oss® + PRF-L apresentaram maior formação de tecido mineralizado quando comparado ao grupo controle e grupo PRF-L do mesmo período. Além disso, observou-se maior formação de tecido mineralizado nesses grupos aos 60 dias quando comparado aos 30 dias.



\*  $p < 0,0001$  diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

**Figura 23 – Média e desvio padrão em porcentagem do Volume de Tecido Mineralizado e Volume Tecido Total (BV/TV) entre os grupos – Análise MicroCT**

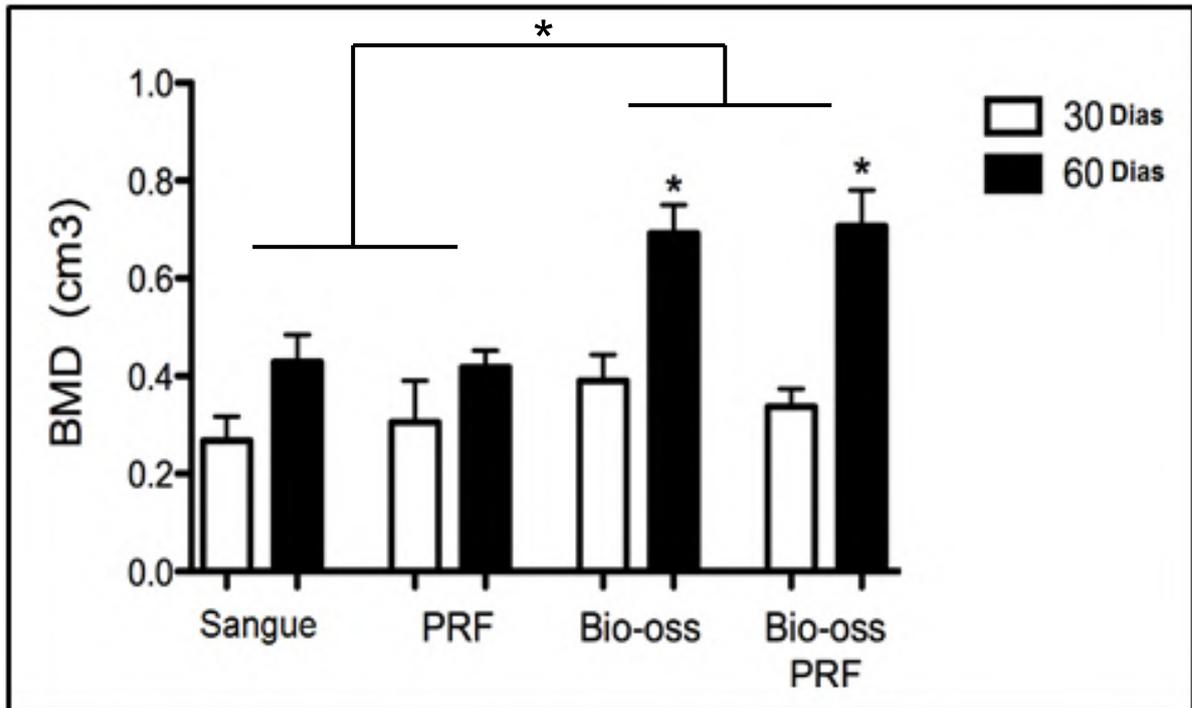
### 5.1.2- Densidade Mineral Óssea (BMD)

A densidade mineral óssea (BMD) é o resultado de um processo dinâmico de formação e reabsorção do tecido ósseo em um determinado volume de osso<sup>65</sup>.

Densidade Mineral Óssea é uma variável expressa em  $\text{cm}^3$  e está exposto na figura 24, demonstrando os seus valores obtidos nas amostras dos 20 coelhos.

No período de 30 dias não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos em relação a Densidade Mineral Óssea.

No período de 60 dias, os grupos Bio-Oss® e Bio-Oss® + PRF-L apresentaram maior Densidade Mineral Óssea quando comparado ao grupo controle e grupo PRF-L do mesmo período. Além disso, observou-se maior formação de tecido mineralizado nesses grupos aos 60 dias quando comparado aos 30 dias.



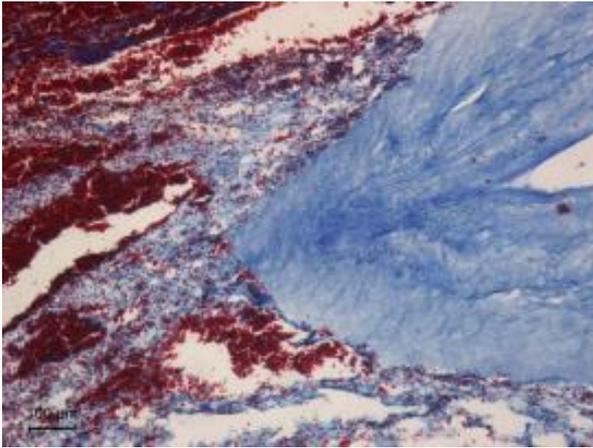
\*  $p < 0,0001$  diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

**Figura 24 – Média e desvio padrão em  $\text{cm}^3$  da Densidade Mineral Óssea (BMD) entre os grupos – Análise MicroCT**

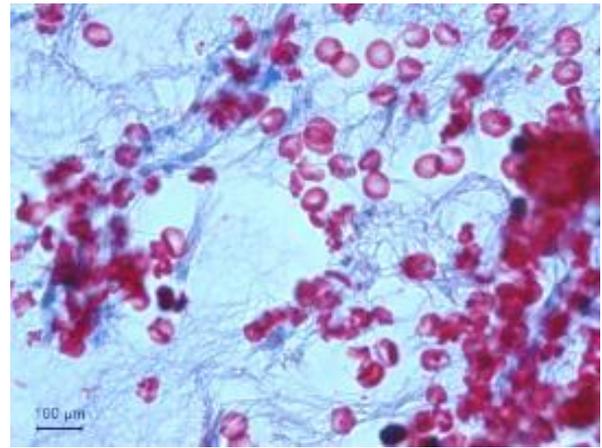
## 5.2 Análise Histológica

### 5.2.1 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 (Figuras 25-C e 25-D), dentre eles uma grande quantidade de leucócitos retidos nela e também linfócitos que possuem um papel importante na imunomodulação. Na região próxima ao coágulo (Figuras 25-A e 25-B) observou-se maior quantidade de plaquetas e leucócitos. Foi possível observar também que o PRF-L comprimido mantém a sua composição celular. Desta forma existe semelhança com outro trabalho publicado na literatura (Enhrifest et al, 2010). Sendo assim, é possível afirmar que o protocolo utilizado para obtenção do PRF-L em coelhos foi satisfatório.



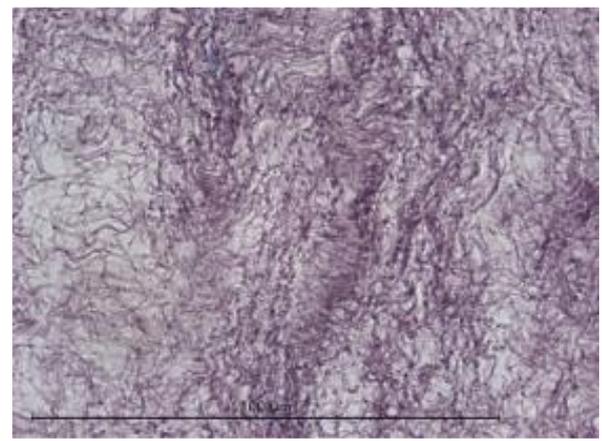
**Figura 25 – A**



**Figura 25 – B**



**Figura 25 - C**



**Figura 25 – D**

**Figura 25- Fotomicrografia da membrana de PRF-L, coradas com tricrômico de Masson. 25-A Imagem da membrana de PRF-L após obtenção e compressão, 25-B Imagem da união coágulo/fibrina com aumento de 20X, 25-C Imagem da união coágulo/fibrina com aumento 100X, 25-D Imagem da fibrina com aumento de 20X,**

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente, uma nova geração de concentrados de plaquetas vem sendo utilizadas com o intuito de acelerar o processo de reparo nas cirurgias reconstrutivas ósseas. Dentre estes, o PRF-L, introduzido por Choukroun em 2001<sup>20</sup>, tem mostrado sucesso no processo de reparo, como a redução do tempo entre fases cirúrgicas, redução dos processos inflamatórios/infecciosos e grande compatibilidade com o leito receptor<sup>25,26,30,34,36</sup>. Apesar do uso do PRF-L ter crescido muito, ainda não se conhece o mecanismo de ação na aceleração dos processos de reparo ósseo. Sendo assim, é de grande interesse investigar a associação do Bio-Oss® com PRF-L, tendo em vista que o Bio-Oss® atende aos critérios para um material osteocondutivo sendo um biomaterial extensivamente utilizado na Odontologia e que apresenta bons resultados a longo prazo<sup>8,11,36,39</sup>.

O Modelo animal utilizado neste estudo é eficiente e aceitável para avaliação de materiais de enxertos ósseos. Diversas pesquisas utilizaram o coelho para investigar osseointegração de implantes e biomateriais<sup>56,31,57, 58</sup>. A escolha da tíbia como local receptor foi na tentativa de simular o ambiente encontrado nos defeitos atróficos em humanos, alvéolos de extração, defeitos ósseos de 3 paredes, seio maxilar devido à semelhança óssea e vascularização dos sítios operados, além de permitir o preenchimento com biomaterial de modo estável sem a necessidade de colocação de membranas, telas e outros aparatos de manutenção de espaço.

Nesse estudo, a avaliação por microtomografia comprovou a eficácia do biomaterial Bio-Oss® na formação óssea, na qual o grupo Bio-Oss® e o grupo Bio-Oss® associado com PRF-L obtiveram a maior porcentagem de tecido mineralizado aos 60 dias sugerindo maior neoformação óssea nestes grupos. Porém, o PRF-L não mostrou efeito adicional, não observando diferenças entre os grupos do mesmo período em relação ao volume do tecido mineralizado e volume tecidual total.

Ultimamente, tem-se utilizado de forma ampla o exame microtomográfico, fornecendo imagens de tecido mineralizado com boa resolução. São inúmeras as aplicações, visto que os softwares nos possibilitam diversas formas possíveis de análises. A microtomografia é um exame radiológico de realização rápida, derivada da tomografia convencional<sup>59</sup>. Com a tomografia cone beam, e devido à alta resolução micrométrica ( $\mu\text{m}$ ), possibilita-se visualização de imagens até 10 mil vezes menores que o convencional<sup>60</sup>. A principal característica da micro CT é que ela

preserva a amostra no processo de aquisição das imagens, permite realizar inúmeras repetições no mesmo setor, não é invasivo, e os equipamentos permitem escaneamentos de animais vivos <sup>60,61</sup>. É possível observar com exatidão informações de volume de tecido mineralizado, no entanto, não nos possibilita a avaliação da qualidade do tecido mineralizado, sendo necessário a avaliação histológica para confirmar os dados apresentados na microtomografia.

Tal relevância da micro CT vem permitir a realização de diversas pesquisas em conjunto com a histologia e histomorfometria na análise de estruturas ósseas, apesar dos resultados ainda necessitarem de mais pesquisas. Dessa forma, após análise de microtomografia, as amostras foram encaminhadas para exames histológicos, de modo que esses resultados se completam.

A membrana de PRF-L combina muitos fatores de reparo e imunidade. Sua arquitetura de fibrina parece responsável pela liberação lenta de fatores de crescimento e glicoproteínas da matriz durante mais ou menos sete dias. No seu interior possui considerável quantidade de leucócitos. Além disso, a composição celular da membrana de PRF-L demonstra que é um tecido vivo e pode ser considerado um biomaterial<sup>49</sup>. Intencionalmente foi preservada uma pequena camada de RBC no final da membrana de PRF-L para recolher o máximo de plaquetas e leucócitos possíveis, indo de encontro ao trabalho de Dohan e Li <sup>49, 63</sup>. Esta atividade anti-inflamatória e imunológica, promovida pelas células presentes na membrana de PRF-L, também foram observadas nesse experimento. Dessa forma foi possível observar que quando associado o PRF-L com o Bio-Oss® não causou prejuízo ao biomaterial nem na formação

Os resultados observados neste estudo estão de acordo com estudos prévios na literature <sup>55,52,62</sup>. Demonstraram que o PRF-L teve um efeito positivo sobre a formação óssea quando usado sem associações ou combinado com osso autógeno, mas o mesmo benefício não foi visto quando adicionado ao Bio-Oss®. Da mesma maneira Jong-Suk et al.<sup>53</sup> também não observaram efeito adicional significativo na regeneração óssea em seu estudo avaliando a influência do PRF-L sobre a angiogênese e osteogênese na regeneração óssea usando substitutos ósseos xenogênicos.

Estudos semelhantes na literatura apresentaram efeito adicional do PRF-L na formação óssea, observando uma diminuição do tempo de cicatrização e pós operatório favorável <sup>41, 52, 51, 46, 44, 43</sup>. Neste trabalho o uso do PRF-L não apresentou

efeito significativo quando associado ou não ao biomaterial Bio-Oss® nas análises de Volume de Tecido Mineralizado e Densidade Mineral Óssea, sendo assim, 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<sup>20</sup>, 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 <sup>64</sup>. 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 2010<sup>49</sup>, 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.

Outro ponto a ser considerado 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 <sup>44, 43, 48, 52,</sup> 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 fim do processo de reparo do coelho, que por sinal tem o metabolismo seis vezes mais rápido em comparação com o humano, uma avaliação intermediária seria interessante para avaliar se o grupo PRF-L sozinho ou associado ao Bio-Oss® 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 com Bio-Oss® não promoveu aumento da formação do tecido mineralizado e densidade mineral óssea neste modelo experimental.

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

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - 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.
- 2 - Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. J Clin Periodontol 2003; 30(9): 809–818.
- 3 - Carvalho VAP , Darcy OT, Salgado MAC, Gomes MF. Histomorphometric Analysis of Homogenous Demineralized Dentin Matrix as Osteopromotive Material in Rabbit Mandibles. Intjoral Maxillofac Implants. 2004;19:679-686
- 4 - Eugena B, Jiang SD, Lynch S, Bush P and Dziak R. Anorganic Bovine Bone Supports Osteoblastic Cell Attachment and Proliferation. J Periodontol 1999;70:364-369.
- 5 - Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes.Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2007 Nov;19(4):513-21, vi.
- 6 - Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. Reconstruction of the Maxilar Alveolar Defects With Mandibular Symphysis Grafts for Dental Implants: A Prelimnary Procedural Report. Int Oral Maxillofac Impants, v.7, p.360-366, 1992.
- 7 - Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Mar;101(3):e37-44. Epub 2006 Jan 19.
- 8 - Boss JH, Shajrawi I, Aunullah J, Mendes DG. The Relativity of Biocompatibility. A critical of the concept of biocompatibility. Israel Journal Medical Science, v. 31, n. 4, p- 203-209, 1995.
- 9 - Sendyk CL, Sendyk WR, 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.
- 10 - Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. J Periodontol. 2007 May; 78(5): 955–961.
- 11 - Jensen T. ,Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2012; 41: 114–120. 2011 International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

- 12 – Hallman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L, A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Clin. Oral Implants Research. 2001.
- 13 - Misch CM, Use of the Mandibular Ramus as a Donor Site for Onlay Bone Grafting. Journal of Oral Implantology: January 2000, Vol. 26, No. 1, pp. 42-49.
- 14 - Antunes AA. Tratamento de defeitos ósseos cervicais com materiais osseocondutores porosos imediatamente à instalação de implantes: Estudo histológico, histométrico, micro-tomográfico e de análise de frequência de ressonância em cães. 2013. 119 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.
- 15 - Valentini P, Abensur D, Densari D, Graziani JN, Hämmerle C, Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. Clinical Oral Implants Research [1998, 9(1):59-64]
- 16 - Su-gwan K, Hak-Kyun K, Sung-Chul L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss®) for bone regeneration in rats. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, Volume 29, Issue 5, October 2001, Pages 282–288.
- 17 - Camelo M, Nevins ML, Schenk R, Simion M, Rasperini G, Lynch S & Nevins M. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gides. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry 18, 1998, 321–331.
- 18 - Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP, Schüpbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry [2001, 21(3):288-295].
- 19 - Dohan ED, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, 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.
- 20 - Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie: Le PRF. Implantodontie. 2001;42:55–62.
- 21 - Choukroun J, Dohan S, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff D, Fioretti F, Dohan D. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. Paris. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006.
- 22 - Choukroun J, Dohan S, Dohan A, Donsimoni JM, 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. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006.

23 - 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

24 – Choukroun J ,Dohan S, Dohan A, Donsimoni JM, Gabrieleff DF. Fioretti, Korb G and Dohan D. Platelet Rich Fibrin (PRF): un nouveau biomateriau de cicatrisation. 2e me partie: Plaquettes et cytokines. *Implantodontie* 2004;13:99-108. Published in the French journal *Implantodontie*, Elsevier SAS. 2006.

25 - Chang CI, Tsai CH, Chang YC, Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signalregulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblastos. *Journal of biomedical materials research a* | oct 2010 vol 95a, issue 1.

26 - Simonpieri A, Choukroun J, Corso MD, Sammartino G, Ehrenfest DMD. Simultaneous Sinus-Lift and Implantation Using Microthreaded Implants and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material: A Six-Year Experience. *The International Journal of Oral Implantology*, February 2011 - Volume 20 - Issue 1 - pp 2-12.

27 - Albrektsson T, Jansson T, Lekholm V. Osseointegrated dental implants. *Dental clinics of North America*, v 30, n.1; p 151-174,jan/1986.

28 - Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. 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.

29 - 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.

30 - Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G & Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 14, 1999, 835–840.

31 - Pelegriani AAC, Sorgi CE, Sendyk WR, Gromatzky A. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. Springer Science + Business Media B.V. 2010.

32 - Margolin MD, Cogan AG, Taylor M., Buck, D, McAllister TN, Toth . & McAllister BS. Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: a comparative radiographic and histologic study between recombinant human osteogenic protein-1 and natural bone mineral. *Journal of Periodontology*, 1998, 69, 911–919.

- 33 - Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. Na experimental study in the dog. Clin Oral Impl Res 1997;8:117-124. Munksgaard 1997.
- 34 - Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous Bovine Bone Mineral in Healing of Human Extraction Sockets. Part 1: Histomorphometric Evaluations at 9 Months. Journal of Periodontology, June 2000, Vol. 71, No. 6, Pages 1015-1023.
- 35 - Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation Clin. Oral Impl. Res, 14, 2003; 369–372.
- 36 - Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry 2005, 25(1):19-25.
- 37 - Canullo L, Trisi P, Simion M. Clinical and histologic results demonstrated that this surgical technique could be a successful and predictable procedure for rebuilding a resorbed ridge to place implants. Int J Periodontics Restorative Dent 2006;26:355–361.
- 38 - Acocella A, Bertolai R, Sacco R. Modified Insertion Technique for Immediate Implant Placement into Fresh Extraction Socket in the First Maxillary Molar Sites: A 3-Year Prospective Study. Implant Dentistry: June 2010 - Volume 19 - Issue 3 - pp 220-228.
- 39 - Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M & Schenk R. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2000, 20:245–253.
- 40 - Zhanyan H, Zhenmn XL. Desproteinizada matriz óssea bovina e membrana de colágeno reabsorvível local da extração molar avaliação preservação de imagem. Beijing jornal da escola universitária (Ciências Médicas), Journal of Pekin University (HealthSciences) Vo1.47 No.1 Feb.2015.
- 41 - Del corso M, Toffler M, Dohan ED. 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.
- 42 - Dohan EDM. 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
- 43 - Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary

rehabilitations using bone allograft. Part II: Implant surgery, prosthodontics, and survival. *Implant Dent.* 2009;18:220–9.

44 - Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, 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.

45 - Dohan Ehrenfest D, Sammartino G, Shibli JA, Wang HY, De-Rong Z and Bernard JP. 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, 2013.

46 - Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, Dipalma G, Pacifici L, Inchingolo F. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in Reconstructive Surgery of Atrophied Maxillary Bones: Clinical and histological evaluation, *International Journal of Medical Sciences*, 2012; 9(10):872-880.

47 - Chang YC, Zhao JH. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects, *Australian Dental Journal* 2011; 56: 365–371.

48 - Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal* 2012; 57: 207–212.

49 - Ehrenfest DMD, Corso MD, Diss A, Mouhyi J. Charrier, J. B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*, April 2010, Vol. 81, No. 4, Pages 546-555.

50 - Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo M, Scacco S, Inchingolo AD, Dipalma G, Vermesan D, Abbinante A, Cagiano R. Trial with Platelet-Rich Fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillary bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2010; 14: 1075-1084.

51 - Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı 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.

52 - Oliveira MR, A. de C. Silva, S. Ferreira, C.C. Avelino, I.R. Garcia Jr., R.C. Mariano: Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2014.

53 - Jong-Suk Y, Sang-Hwa L, Hyun-Joong Y. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* xxx (2014) 1e7.

54 - Inchingolo F, Ballini A, Mura SA, Farronato D, Cirulli N, Pettini F, Gheno E, Vermesan D, Pederzoli P, Resta G, Caprio M, Muollo F, Marinelli G, Inchingolo AD, Malcangi G, Cantore S, Del Corso M, Debenedittis M, Inchingolo AM, Serafini M, Diteodoro S, Schinco F, Cagiano R, De Vito D, Cortelazzi R and Dipalma G. Use of plasma rich fibrin and Bio-OSS/SINT-Oss for implant-prosthetic rehabilitation in maxillary atrophy with sinus pathology: A 48-month follow-up. *European Journal of Inflammation* 1–8, 2015.

55 – Seung-Mi J, Chun-ui L , Jeong-SS, Ji HO, Yiqin F, Byung-Ho C. Simultaneous Sinus Lift and implantation using Platelet-rich fibrin as sole grafting material. *Journal of Cranio Maxilo Facial Surgery*, 42, 2014, 990-994, 993p.

56 - Daftari TK, Whitesides TEJ, Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC. Nicotine on the Revascularization of Bone Graft: An Experimental Study in Rabbits. April 15, 1994 - Volume 19 - Issue 8.

57- Takauti CAY, Futema F, Junior RBB, Aline CA, Costa C, Queiroz CS. Assessment of Bone Healing in Rabbit Calvaria Grafted with Three Different Biomaterials, *Brazilian Dental Journal*. (2014) 25(5): 379-384.

58 - Paknejad M, AmirReza R, Nina R, Mohadeseh H, Azadehzeinab T, Mohammad JK, Ali M. Histologic Evaluation of Bone Healing Capacity Following Application of Inorganic Bovine Bone and a New Allograft Material in Rabbit Calvaria. *Journal of Dentistry*, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, 2015; Vol.12 N°1.

59 - Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt MA, Jesion 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.

60 - Huang H, Hsu J, Chen MYC, Liu C, Chang C, Li Y, Chen KTC. 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.

61 - Vandeweghe S, Coelho PG, 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.

62 - Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Phurisat K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112, Thailand *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 41, 2013.

63 - Li Qi, Shuang Pan, Smit J. Dangaria, Gokul Gopinathan, Antonia Kolokythas, Shunli Chu, Yajun Geng, Yanmin Zhou, and Xianghong Luan. Platelet-Rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Augmentation.

Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, Volume 2013, Article ID 638043, 13 pages.

64- Taborda C, Mehenert U, Silva C A. Manual de Normas Técnicas, Biotério de Experimentação Animal – Departamento de Microbiologia – Instituto de Ciências Biomédicas - USP, pg 17.

65 – Cadore EL, Brentano MA, Krueel LFM. Efeitos da atividade física na densidade mineral óssea e na remodelação do tecido ósseo, Rev Brasileira Med Esporte – Vol 11, n° 6 – Nov/Dez, 2005.

PARECER N.º 28 /2013

REGISTRO CEP UNISA N.º 28 /2013 – PROJETO DE PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** "Avaliação do efeito do plasma rico em fibrina associado aos substitutos ósseos na neoformação óssea em calvária de coelho".

**Pesquisadores Responsáveis:** Yeon Jung Kim

**Curso:**

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

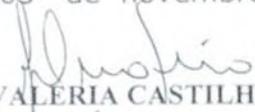
O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), esta de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca) que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, manifestando-se pela **APROVAÇÃO da Alteração da Coleta de Sangue Após Eutanásia** do Projeto "Avaliação do efeito do plasma rico em fibrina associado aos substitutos ósseos na neoformação óssea em calvária de coelho".

**\* Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

- Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.
- Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia informada no Projeto de Pesquisa.

*Yeon Jung Kim*  
17/11/14

São Paulo, 05 de novembro de 2014.

  
**PROFA. DRA. VALÉRIA CASTILHO ONOFRIO**  
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA  
UNISA - Universidade de Santo Amaro

**Anexo 2-**

**Tabela 2 – Resultado obtido das amostras do percentual do volume de tecido mineralizado na ROI (BV/TV):**

Percentual do volume de tecido mineralizado na ROI- BV/TV (%)								
Grupos de Amostras	30 dias				60 dias			
	Sangue n=4	Bio oss n=4	PRF- L n=4	Bio oss + PRF-L n=4	Sangue n=10	Bio oss n=7	PRF- L n=9	Bio oss + PRF-L n=8
<b>Média</b>	34,51	45,53	39,98	36,59	45,28	85,91	42,25	83,15
<b>Mediana</b>	32,56	45,98	42,14	36,84	45,91	86,59	42,67	84,09
<b>Desvio Padrão</b>	11,24	12,95	17,82	4,23	14,79	8,93	10,98	11,46

**Tabela 3 – Resultado obtido das amostras na Densidade Mineral Óssea (BMD)**

Densidade Mineral Óssea em Cm <sup>3</sup> (BMD) – Análise Microtomografia								
Grupos de Amostras	30 dias				60 dias			
	Sangue n=4	Bio oss n=4	PRF- L n=4	Bio oss + PRF-L n=4	Sangue n=10	Bio oss n=7	PRF- L n=9	Bio oss + PRF-L n=8
<b>Média</b>	0,267	0,39	0,305	0,336	0,428	0,707	0,417	0,692
<b>Mediana</b>	0,243	0,413	0,337	0,325	0,446	0,702	0,391	0,730
<b>Desvio Padrão</b>	0,009	0,107	0,169	0,074	0,177	0,208	0,102	0,164