

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LÉLIO FERNANDO FERREIRA SOARES

**USO ISOLADO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) NA FORMA DE
MEMBRANA E DA PRF INJETÁVEL ASSOCIADA AO OSSO BOVINO
PARTICULADO EM DEFEITOS NÃO CRÍTICOS NA TÍBIA DE RATOS:
FORMAÇÃO ÓSSEA E EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES**

ALFENAS/MG

2023

LÉLIO FERNANDO FERREIRA SOARES

**USO ISOLADO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) NA FORMA DE
MEMBRANA E DA PRF INJETÁVEL ASSOCIADA AO OSSO BOVINO
PARTICULADO EM DEFEITOS NÃO CRÍTICOS NA TÍBIA DE RATOS:
FORMAÇÃO ÓSSEA E EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciências
Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof. Dra. Suzane Cristina Pigossi

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Soares, Lélío Fernando Ferreira.

Uso isolado da fibrina rica em plaquetas (PRF) na forma de membrana e da PRF injetável associada ao osso bovino particulado em defeitos não críticos na tíbia de ratos : Formação óssea e expressão de biomarcadores / Lélío Fernando Ferreira Soares. - Alfenas, MG, 2023.

83 f. : il. -

Orientador(a): Suzane Cristina Pigossi.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Fibrina rica em plaquetas. 2. Substitutos ósseos. 3. Regeneração óssea. I. Pigossi, Suzane Cristina, orient. II. Título.

LÉLIO FERNANDO FERREIRA SOARES

USO ISOLADO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) NA FORMA DE MEMBRANA E DA PRF INJETÁVEL ASSOCIADA AO OSSO BOVINO PARTICULADO EM DEFEITOS NÃO CRÍTICOS NA TÍBIA DE RATOS: FORMAÇÃO ÓSSEA E EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES

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

Aprovada em: 08 de fevereiro de 2023

Profa. Dra. Suzane Cristina Pigossi
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia - MG

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli
Instituição: Universidade Estadual Paulista - SP

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Araújo Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Suzane Cristina Pigossi, Usuário Externo**, em 13/02/2023, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joni Augusto Cirelli, Usuário Externo**, em 13/02/2023, às 14:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0903232** e o código CRC **646DFBD0**.

Este trabalho é dedicado à minha família e todos que estiveram presentes em minha vida durante essa jornada. Em especial, aos meus pais, Lélío e Tarcinari, e minha irmã, Thalita. Minha base e meu suporte incondicional para que mais essa etapa pudesse ser concluída.

AGRADECIMENTOS

Ao meu suporte incondicional, minha base e fonte de inspiração. Agradeço imensamente, por tudo, aos meus pais, Lélío e Tarcinari e minha irmã, Thalita. Sem eles, essa conquista um dia tão sonhada, seria impossível de se realizar.

A minha companheira, amiga e namorada, Gabriela. Gratidão por todo suporte, paciência e motivação. Dona do sorriso que ilumina meus dias.

Aos meus caros companheiros de pós-graduação e professores, a quem tenho a honra de chamá-los de amigos (Bloco do et al.). Gratidão por todo incentivo, suporte e amizade durante esse período. Colegas dentro e fora da academia que levarei por toda vida: Daniel Almeida, Henrique Felizardo, Hugo Gaêta, Jovânia Alves, Marcela Iunes e Thaisa Carrera.

Aproveito esse e estendo meus agradecimentos a todos amigos e colegas que estiveram presentes em minha vida durante esta caminhada. Meu singelo muito obrigado por todo companheirismo!

Agradecimentos especiais a minha querida amiga, professora e orientadora, Profa. Dra. Suzane Cristina Pigossi. Gratidão por toda paciência, compreensão, generosidade e carinho ao ensinar e orientar. Pedra fundamental nessa minha carreira que se inicia e minha maior inspiração. Levarei por toda vida todos ensinamentos!

Agradeço a todas parcerias acadêmicas e colaborações que fizeram com que este trabalho pudesse ser concluído. Pela minha própria, e sempre querida, UNIFAL-MG, agradeço a colaboração dos Cirurgiões-Dentistas e ex-alunos de iniciação científica, Henrique Assis Valadares Tavares e Roberta de Oliveira Alves. Aos professores, Dra. Juliana dos Santos Neves, Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior e Dr. Ronaldo Célio Mariano. Pela colaboração dos estimados, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli e Dra. Camila Chiérici Marcantonio, da minha futura casa, FOAr/UNESP. E também, pelos caros colegas da UFU, Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares e Tassio Edno Atanasio Pitorro. Este trabalho não seria possível sem vocês, meu muito obrigado por toda parceria!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da UNIFAL-MG e todos docentes envolvidos. Gratidão por todos ensinamentos que contribuíram em minha formação e estarão sempre presentes em minha mente, como futuro professor. Agradeço também por todo suporte e incentivo na realização deste estudo e obtenção deste título.

A Faculdade de Odontologia da UNIFAL-MG e todos docentes envolvidos, minha fonte de aprendizagem e inspiração acadêmica e profissional. Muito obrigado por todos ensinamentos e carinho durante todos esses anos de graduação e pós-graduação!

A todos funcionários e técnicos do Biotério Central e do Laboratório de Histologia da UNIFAL-MG por todo suporte na condução deste estudo e ensinamentos que guiarão futuros trabalhos.

A minha Universidade, à qual carinhosamente chamo de casa, UNIFAL-MG. Por todos incentivos a realização de atividades de Ensino, Pesquisa e Extensão, pelo ambiente formador/transformador que possibilitaram minha obtenção do grau de Bacharel e Mestre. Meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 - e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Brasil (FAPEMIG).

Minha gratidão a todos.

RESUMO

A fibrina rica em plaquetas (PRF) tem sido amplamente proposta em procedimentos regenerativos. Em particular, o uso de protocolos de baixa força de centrifugação que conferem maior concentração de células osteoprogenitoras e fatores de crescimento ao concentrado leucoplaquetário tem se destacado. A PRF injetável (i-PRF), bem como a PRF na forma de membrana, obtida por meio do Protocolo Fibrin, fazem parte desse grupo. Ademais, estudos recentes têm investigado o potencial regenerativo de um material formado pela associação entre o osso bovino desproteinizado (OBD) e a i-PRF, denominado como “sticky bone”. No entanto, a eficácia deste material ainda não foi avaliada, por meio de estudos pré-clínicos e clínicos, em modelos de preservação do rebordo alveolar (PRA). O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia da membrana de fibrina rica em plaquetas (PRF) isolada e da i-PRF associada ao OBD no tratamento de defeitos não críticos na tíbias de ratos. Defeitos ósseos não críticos nas tíbias (3,5mm x 1,5mm) de sessenta e quatro ratos foram confeccionados e preenchidos com diferentes materiais de acordo com cada grupo experimental: CO: defeitos ósseos preenchidos com coágulo sanguíneo; PRF: Membranas de PRF obtidas pelo Protocolo Fibrin; BO: OBD isolado e SB: i-PRF misturada ao OBD. Análises de microtomografia computadorizada (μ CT), histológica/histomorfométrica e expressão de marcadores moleculares foram realizadas após 15 e 45 dias. Na área cortical do defeito a PRF exibiu resultados semelhantes aos demais grupos investigados para as análises de espessura e formação óssea por μ CT em todos os períodos analisados. A mesma análise demonstrou superioridade dos grupos BO e SB para formação óssea em relação ao grupo controle após 45 dias ($p < 0.05$). A adição do OBD (grupos BO e SB) promoveu maior formação óssea, maior número de trabéculas, além de menor espaço entre as trabéculas em comparação aos grupos PRF e CO em ambos períodos analisados ($p < 0.05$) considerando a área cortical e medular na análise microtomográfica. A análise histomorfométrica demonstrou porcentagem semelhante de osso neoformado entre os grupos experimentais aos 15 e 45 dias ($p > 0.05$). A i-PRF associada ao OBD não resultou em aumento na formação óssea em comparação ao OBD isolado nas análises de μ CT e histomorfometria em nenhum dos períodos analisados. Menor porcentagem de partículas residuais de biomaterial foram observadas no grupo SB em comparação ao BO na análise histomorfométrica para o período de 45 dias ($p < 0.05$). A expressão de marcadores moleculares ósseos demonstrou maior expressão dos genes *Alpl*, *Bglap* e *Runx2* para o grupo BO em comparação aos demais grupos investigados ($p < 0.05$). Em conclusão, o uso isolado do OBD resultou em maior formação óssea e expressão de marcadores moleculares em comparação aos grupos PRF e CO em defeitos ósseos não-críticos. Ademais, a adição de i-PRF ao OBD não aumentou seu potencial de formação óssea nas análises realizadas.

Palavras-chave: fibrina rica em plaquetas; substitutos ósseos; regeneração óssea.

ABSTRACT

Platelet-rich fibrin (PRF) has been widely proposed in regenerative procedures. In particular, low centrifugation force protocols have been highlighted by confer a higher concentration of osteoprogenitor cells and growth factors to the leukoplatelet concentrate. Injectable PRF (i-PRF) as well as PRF in form of membrane obtained through the Fibrin Protocol are part of this group. Furthermore, recent studies have investigated the regenerative potential of a material formed by the association between deproteinized bovine bone mineral (DBBM) and i-PRF, known as “sticky bone”. However, the effectiveness of this material has not yet been evaluated, through preclinical and clinical studies, in alveolar ridge preservation (ARP) models. The aim of this study was to investigate the efficacy of platelet-rich fibrin membrane (PRF) alone and i-PRF mixed with deproteinized bovine bone mineral (DBBM) in the treatment of non-critical tibial defects in rats. Non-critical bone defects in tibiae (3.5mm x 1.5mm) of sixty-four rats were made and filled with different materials according to each experimental group: CO: bone defects filled with blood clot; PRF: PRF membranes obtained by fibrin protocol; BO: DBBM alone and SB: i-PRF mixed with DBBM. Computed microtomography (μ CT), histological/histomorphometric analysis and expression of molecular markers were performed after 15 and 45 days. In the defect cortical area PRF showed similar results to the other investigated groups for the thickness and bone formation analysis by μ CT in all analyzed periods. The same analysis demonstrated the superiority of the BO and SB groups for bone formation in relation to the control group after 45 days ($p < 0.05$). The addition of OBD (BO and SB groups) promoted greater bone formation, a greater number of trabeculae, in addition to a smaller space between the trabeculae compared to the PRF and CO groups in both analyzed periods ($p < 0.05$), considering the cortical and medullary area in the microtomographic analysis. Histomorphometry analysis showed a similar percentage of newly formed bone between all experimental groups at 15 and 45 days ($p > 0.05$). i-PRF associated with OBD did not increase bone formation compared to OBD alone in both histomorphometry and μ CT analyses for all analyzed periods. The SB group showed a lower percentage of residual biomaterial particles compared to the BO group in the histomorphometry analysis for the 45-day period ($p < 0.05$). The expression of bone molecular markers showed higher expression of *Alpl*, *Bglap* and *Runx2* genes for the BO group compared to the other investigated groups ($p < 0.05$). In conclusion, the isolated use of OBD resulted in greater bone formation and expression of molecular markers compared to the PRF and CO groups in non-critical bone defects. Furthermore, the addition of i-PRF to OBD did not increase its bone formation potential in the performed analyses.

Keywords: platelet-rich fibrin; bone substitutes; bone regeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ CT	<i>Micro-computed tomography</i>
Alpl - <i>Alpl</i>	Fosfatase alcalina - <i>Alkaline Phosphatase</i>
A-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas Avançada
Bglap - <i>Bglap</i>	Osteocalcina - <i>Osteocalcin</i>
BM	<i>Bone marrow</i>
BMP-1 - <i>BMP-1</i>	Proteína morfogenética óssea-1 - <i>Bone morphogenetic protein-1</i>
BV	<i>Blood vessel</i>
BV/TV	<i>Bone volume / Tissue volume</i>
cDNA - <i>cDNA</i>	DNA complementar - <i>Complementary DNA</i>
COI	Contato osso-implante
<i>Ct.Th</i>	<i>Cortical thickness</i>
DBP	<i>Deproteinized bone particle</i>
EDTA - <i>EDTA</i>	Ácido etilenodiamino tetra-acético - <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
GAPDH- <i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HE - <i>HE</i>	Hematoxina e Eosina - <i>Hematoxylin & Eosin</i>
IGF - <i>IGF</i>	Fator de crescimento semelhante à insulina - <i>Insulin-like growth factor</i>
IL - <i>IL</i>	Interleucina - <i>Interleukin</i>
i-PRF - <i>i-PRF</i>	Fibrina rica em plaquetas injetável - <i>Injectable platelet-rich fibrin</i>
L-PRF - <i>L-PRF</i>	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos - <i>Leucocyte platelet-rich fibrin</i>
Ob	<i>Osteoblast</i>
OBD - <i>DBBM</i>	Ossos bovinos desproteinizados - <i>Deproteinized bovine bone mineral</i>
Oc	<i>Osteoclast</i>
PDGF - <i>PDGF</i>	Fator de crescimento derivado de plaquetas - <i>Platelet-derived growth factor</i>
PRA - <i>ARP</i>	Preservação do rebordo alveolar - <i>Alveolar ridge preservation</i>
PRF - <i>PRF</i>	Fibrina rica em plaquetas - <i>Platelet-rich fibrin</i>
RCF	<i>Relative centrifugation force</i>

ROG	Regeneração óssea guiada
ROI	<i>Region of interest</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
Tb.N	<i>Trabecular number</i>
Tb.Sp	<i>Trabecular separation</i>
Tb.Th	<i>Trabecular thickness</i>
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
TGF-B1 - <i>TGF-β1</i>	Fator de crescimento transformador-b1 - <i>Transforming growth factor beta 1</i>
Tr	<i>Bone trabeculae</i>
VEGF - <i>VEGF</i>	Fator de crescimento endotelial vascular - <i>Vascular endothelial growth factor</i>
$\Delta\Delta C\tau$ - $\Delta\Delta C\tau$	Método comparativo $C\tau$ - <i>Comparative method $C\tau$</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	ARTIGO	24
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICE A: Metodologia detalhada da pesquisa	62
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	62
4.2	OBTENÇÃO DA PRF	63
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	65
4.4	AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA	66
4.5	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA	68
4.6	EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES ÓSSEOS.....	70
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
4.8	REFERÊNCIAS DA METODOLOGIA EXPANDIDA	72
	APÊNDICE B: Checklist ARRIVE	73
	ANEXO A: Parecer de aprovação do CEUA para realização do estudo.....	75
	ANEXO B: Normas da revista Clinical Oral Investigations.....	76

1 INTRODUÇÃO GERAL

A exodontia devido a traumas, cárie ou doença periodontal avançada é um dos procedimentos mais amplamente realizados na clínica odontológica (ANWANDTER *et al.*, 2016). Todavia, a perda dentária traz prejuízos estéticos e funcionais ao paciente. Além disso, alterações volumétricas marcantes do rebordo alveolar são observadas nos primeiros 2-3 meses pós-exodontia sendo mais pronunciadas na parede vestibular onde a tábua óssea é geralmente mais fina (CHEN; DARBY, 2016). Isso ocorre, pois a exodontia é seguida pela remodelação óssea que leva a uma perda de aproximadamente 40 a 60% do volume total do osso alveolar durante os primeiros 2-3 anos e continua a uma taxa de 0.25 a 0.5% ao ano (KUMAR *et al.*, 2018). Tan *et al.* (2011) em sua revisão sistemática, relatou que uma reabsorção óssea alveolar horizontal de em média 3.8 mm e uma reabsorção vertical de 1.2 mm ocorre nos primeiros 6 meses após a exodontia em humanos. Isso corresponde a 29-63% de perda de dimensão óssea em espessura e 11-22% em altura.

Em 2005, Araújo e Lindhe realizaram um estudo experimental em cães para avaliar as alterações dimensionais do rebordo alveolar ocorridas após a exodontia, bem como os processos de remodelação óssea associados a tais alterações. Na primeira semana, observou-se que o tecido mole cobria o alvéolo, sendo que o lado coronal apresentava grande quantidade de matriz provisória seguida da formação de um coágulo sanguíneo e pequena reabsorção da parede vestibular. Após duas semanas, os osteoclastos se acumularam na crista óssea da parede vestibular e lingual e, em quatro semanas, o osso vestibular apresentou maior reabsorção do que o osso lingual. Após oito semanas, a parede vestibular estava cerca de 2 mm apical em relação a parede lingual (ARAÚJO; LINDHE, 2009). Este fenômeno pode ser atribuído à menor espessura da parede óssea vestibular em comparação com a parede lingual/palatina da cavidade alveolar (CHAPPUIS; ARAÚJO; BUSER, 2017).

A instalação de implantes dentários, para substituição dos elementos dentários ausentes, tornou-se uma modalidade de tratamento reabilitador comum e bem aceita uma vez que garante o restabelecimento da função e estética dos pacientes parcial e totalmente desdentados (BUSER *et al.*, 1997). Contudo, as alterações pós-operatórias nos tecidos moles e duros pós-exodontia podem dificultar o posicionamento tridimensional adequado do implante dentário, principalmente quando se deseja uma reabilitação estética e conduzida proteticamente (DE ANGELIS *et al.*, 2019). Portanto, é fundamental manter as dimensões originais do rebordo alveolar após a exodontia, principalmente em casos em que o tratamento reabilitador proposto envolve a instalação de implantes dentários (PAN *et al.*, 2019). Nesse

contexto, diferentes procedimentos regenerativos têm sido propostos para neutralizar os processos de reabsorção alveolar e preservar o leito ósseo para sua posterior reabilitação (GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2020). Esses procedimentos incluem a abordagem sem retalho, a colocação imediata do implante e procedimentos de preservação do rebordo alveolar (PRA) usando uma combinação de várias técnicas cirúrgicas e biomateriais (FICKL; ZUHR; WACHTEL; BOLZ; *et al.*, 2008; FICKL; ZUHR; WACHTEL; STAPPERT; *et al.*, 2008; PAOLANTONIO *et al.*, 2001).

Especificamente, os procedimentos de PRA visam minimizar a reabsorção da crista e maximizar a regeneração óssea por meio da colocação imediata de um biomaterial dentro do alvéolo (DE ANGELIS *et al.*, 2019). A manutenção do volume dos tecidos moles e duros após a exodontia facilita a colocação do implante em uma posição conduzida proteticamente e mantém um contorno aceitável da crista em áreas com elevada exigência estética (CLARK *et al.*, 2018). A PRA é considerada uma opção terapêutica válida, pois reduz significativamente as alterações dimensionais da crista pós-exodontia. Garcia-Gonzalez *et al.* (2020) realizou uma revisão sistemática com meta-análise incluindo sete estudos clínicos descrevendo alvéolos pós-exodontia com perda de parede vestibular em que a PRA foi realizada no grupo teste e cicatrização espontânea da cavidade foi considerada no grupo controle. A meta-análise mostrou uma perda óssea adicional significativa de 2.37 mm em espessura de 1.10 mm de altura na ausência da PRA.

Uma variedade de materiais e/ou agentes biológicos têm sido utilizados para preencher o alvéolo e estimular a regeneração dos defeitos ósseos (CLARK *et al.*, 2018). Esses materiais podem ser classificados de acordo com sua ação biológica como osteoindutores, osteocondutores e/ou osteogênicos. São considerados materiais osteocondutores aqueles que permitirem o crescimento ósseo diretamente em contato com a superfície do biomaterial e osso circundante. Os materiais osteoindutores são capazes de recrutar células osteoprogenitoras, induzir sua diferenciação em osteoblastos e possibilitando o crescimento ósseo ectópico. Já os materiais osteogênicos são aqueles que possuem células, fatores de crescimento e biomoléculas capazes de promover formação óssea no defeito (ARTAS *et al.*, 2018; GARCIA-GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015; GROSSI-OLIVEIRA *et al.*, 2020; SHAMSODDIN; HOUSHMAND; GOLABGIRAN, 2019).

Dentre os materiais utilizados na PRA, o enxerto autógeno é considerado o “padrão ouro” para qualquer procedimento ósseo regenerativo (KUMAR *et al.*, 2018). Isso se deve a suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras. Todavia, o uso do enxerto autógeno apresenta como desvantagens a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, maior

dor pós-operatória e risco de infecção aumentado, além da disponibilidade limitada. Essas desvantagens resultam em maior morbidade pós-operatória e resistência do paciente em relação ao tratamento proposto (GROSSI-OLIVEIRA *et al.*, 2020). Afim de superar essas desvantagens, a utilização de enxertos alógenos, aloplásticos e xenógenos tornaram-se uma alternativa ao enxerto autógeno nos procedimentos de PRA. Entretanto, assim como o osso autógeno, essas diferentes fontes de enxertos ósseos também apresentam limitações mecânicas e/ou biológicas que limitam suas indicações (ARTAS *et al.*, 2018). Os enxertos ósseos alogênicos apresentam risco de transmissão de doenças e reação de hipersensibilidade (KUMAR *et al.*, 2018). Já o enxerto aloplástico, por ser sintético, apresenta capacidade osteocondutora, fácil disponibilidade e não oferece risco de infecção. Contudo, além da ausência das propriedades osteogênicas e osteoindutoras, apresenta propriedades mecânicas limitadas e taxas imprevisíveis de bioabsorção (ARTAS *et al.*, 2018; PICHOTANO *et al.*, 2019).

Os enxertos xenógenos são usualmente comercializados como biomateriais substitutos ósseos de origem bovina. Entre eles, o osso bovino desproteínizado (OBD) (Bio-Oss®; Geisttlich Pharma, Wolhusen, Suíça) é o substituto ósseo mais utilizado. Sua composição consiste em osso bovino inorgânico livre de patógenos contendo uma hidroxiapatita com estrutura cristalina, relação cálcio/fósforo, composição química e estrutura física muito semelhantes ao osso humano (DO LAGO *et al.*, 2019). O OBD fornece suporte para migração celular e desenvolvimento de osso lamelar no interior do defeito ósseo. A formação óssea ocorre devido a síntese de matriz osteóide pelos osteoblastos preexistentes do osso adjacente que migram para o interior dos poros das partículas do enxerto (DO LAGO *et al.*, 2019). Estudos histológicos demonstraram uma área óssea neoformada em estreita associação com as partículas de OBD, apoiando seu amplo uso para aumento ósseo em cirurgias periodontais dentoalveolares, em combinação com implantes e/ou outros tipos de enxertos (DAHLIN; SIMION; GALINDO-MORENO *et al.*, 2010; HATANO, 2010; JENSEN *et al.*, 2012; MLADENOVIC *et al.*, 2013; ORSINI *et al.*, 2005).

As principais vantagens da utilização do OBD como substituto ósseo são a disponibilidade ilimitada e a ausência de um segundo sítio cirúrgico para coleta do enxerto. Estudos investigando o potencial de regeneração do OBD demonstraram que sua excelente capacidade osteocondutora e baixas taxas de reabsorção garantem a formação de novo tecido ósseo no interior dos alvéolos após a exodontia (ARAUJO; LINDHE, 2009; BARONE *et al.*, 2012). No entanto, além do alto custo, uma das principais desvantagens do OBD é a reabsorção muito lenta e incompleta de suas partículas, o que resulta em um volume

considerável do enxerto que não pode ser substituído por osso novo (KOLERMAN *et al.*, 2012; LEE; CHEN; DARBY, 2012; MORDENFELD *et al.*, 2010). Mordenfeld *et al.* (2010), por exemplo, avaliaram espécimes obtidos de enxertos ósseos realizados em procedimentos de elevação dos seios maxilares com OBD e constataram que a porcentagem média de partículas residuais foi de 17,3% após 11 anos de acompanhamento.

Essas partículas de enxerto remanescentes diminuem a densidade óssea, o que pode afetar a estabilidade primária do implante dentário (MARQUEZAN *et al.*, 2012). Um estudo em humanos de Norton *et al.* (2003) demonstraram que a porcentagem de encapsulamento de xenoenxerto bovino no tecido conjuntivo é de cerca de 60-70%, razão pela qual os implantes devem ser ancorados no osso nativo apicalmente aos locais enxertados para atingir estabilidade primária. Embora a taxa de sobrevivência de implantes em alvéolos preservados com enxertos ósseos (93%) tenha sido relatada como semelhante a locais não enxertados (97%) após 5 anos de acompanhamento (ZITZMANN; SCHÄRER; MARINELLO, 2001), o contato entre osso e implante (COI) pode diminuir na presença de partículas de enxerto encapsuladas (ZITZMANN; SCHÄRER; MARINELLO, 2001), porém mais estudos que confirmem essa hipótese são necessários.

Com os avanços na biotecnologia e o aumento do conhecimento na regeneração óssea, novos métodos biologicamente ativos foram desenvolvidos para superar as desvantagens de materiais não vitais e dos autoenxertos. Os agentes biológicos são mediadores moleculares com propriedades osteoindutivas típicas para promover a formação óssea (CLARK *et al.*, 2018). Dentre eles estão os concentrados de plaquetas de primeira e segunda geração (ANWANDTER *et al.*, 2016). O primeiro grupo envolve o gel de plasma rico em plaquetas (PRP). Durante a sua preparação, aditivos artificiais são utilizados para manipular o processo de coagulação (por exemplo, anticoagulantes, trombina e/ou cloreto de cálcio). O PRP apresenta alto conteúdo de plaquetas e uma malha de fibrina fina (DOHAN *et al.*, 2010) e caracteriza-se por apresentar uma rápida degranulação das plaquetas, o que pode explicar seu menor poder regenerativo (ANWANDTER *et al.*, 2016). Além disso, o uso adicional de anticoagulantes mostrou ter um impacto negativo na cicatrização de feridas pois dificulta a formação de coágulos que é essencial para a cura dos tecidos (FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017).

Os concentrados de plaquetas de segunda geração compreendem a Fibrina Rica em Leucócitos e Plaquetas (L-PRF do inglês *leukocyte- and platelet-rich fibrin*), descritos pela primeira vez na França por Dohan *et al.* (2010). A PRF é preparada a partir do plasma, após centrifugação do sangue total coletado em tubos revestidos de vidro sem a adição de nenhum

coagulante. A centrifugação é realizada a 2700–3000 rpm por 12–15 min, com força de centrifugação de aproximadamente 400g (DOHAN *et al.*, 2006a). O sangue sofre uma coagulação lenta e espontânea, como o coágulo sanguíneo natural formado no local do defeito, aprisionando as plaquetas e leucócitos ativados em uma matriz rica em fibrina. Ao final da centrifugação é obtido um agregado consistente composto por uma parte inferior vermelha, que corresponde às hemácias e uma parte superior amarela referente à fibrina, plaquetas e leucócitos (KARIMI; ROCKWELL, 2019; STRAUSS; STAHLI; GRUBER, 2018).

A L-PRF que consiste em uma rede densa de fibrina lentamente polimerizada com quase todas as plaquetas e mais de 50% dos leucócitos (especialmente linfócitos) da amostra de sangue inicial (DOHAN *et al.*, 2018; GHANAATI *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2018). As plaquetas secretam fibrinogênio, fibronectina e vitronectina, que se comportam como uma matriz para o tecido conjuntivo e moléculas de adesão, facilitando o recrutamento de células para a área da ferida e a vascularização (BROUWERS *et al.*, 2019). Já os leucócitos são benéficos, não apenas por causa de seu potencial imunológico e antibacteriano, mas também são a base do processo de cicatrização de feridas (BIELECKI *et al.*, 2012). Essas células são capazes de liberar um grande número de citocinas relacionadas à regulação imunológica no processo de fibrinólise, e esse processo é persistente e progressivo (CELOTTI *et al.*, 2006; TEE *et al.*, 2016). Dessa forma, a rede de fibrina tem um papel fundamental na cicatrização precoce de feridas e funciona como um arcabouço para células em crescimento e como um reservatório de citocinas.

Estudos *in vitro* revelaram que as células aprisionadas na malha de fibrina da L-PRF liberam de maneira progressiva e lenta uma quantidade significativa de fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) AB, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), proteína morfogenética óssea-1 (BMP-1), glicoproteínas de matriz (ou seja, trombospondina-1, fibronectina, vitronectina) e citocinas pró e anti-inflamatórias (Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-4) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por pelo menos 7 dias (DOHAN *et al.*, 2018; GHANAATI *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2018). Por meio desses moduladores, a L-PRF é capaz de estimular por pelo menos 28 dias a proliferação e diferenciação de diferentes linhagens celulares (isto é, fibroblastos, pré-queratinócitos, pré-adipócitos, osteoblastos, células-tronco mesenquimais), incluindo as células ósseas (DOHAN *et al.*, 2018; GHANAATI *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2018). Assim, a L-PRF atua como um modulador da migração e proliferação celular e da organização

imunológica, melhorando e acelerando a cicatrização dos tecidos moles e duros (DOHAN *et al.*, 2006b; a; DOHAN *et al.*, 2010).

Especificamente para a regeneração óssea, o TGF- β 1 liberado pode promover a formação de novo osso ao estimular a síntese de colágeno e fibronectina (NIZAM *et al.*, 2018). O colágeno é um componente importante do tecido ósseo, enquanto a fibronectina pode aumentar a adesão e migração celular e promover a diferenciação osteogênica ao regular a via de sinalização Wnt/ β -catenina (COMERT KILIC; GUNGORMUS; PARLAK, 2017; TATULLO *et al.*, 2012). O VEGF influencia a angiogênese; portanto, é essencial para o desenvolvimento esquelético (GURLER; DELILBASI, 2016) e a BMP-1 está envolvida na deposição da matriz extracelular (WALLACE; FROUM, 2003). Por fim, verificou-se que o PDGF e IGF-I aumentam a proliferação e diferenciação de osteoblastos (DOHAN *et al.*, 2006c; SALUJA; DEHANE; MAHINDRA, 2011). Dessa forma, a L-PRF é capaz de modular a resposta inflamatória reparadora, aumentar a eficácia da regeneração, angiogênese e neovascularização do tecido ósseo, e diminuir a dor pós-operatória e o edema (CHOUKROUN *et al.*, 2006). Essas características tornam a L-PRF um enxerto biologicamente adequado para PRA, principalmente considerando o baixo custo e sua obtenção simples e atraumática (ANWANDTER *et al.*, 2016).

Todavia os resultados dos estudos clínicos avaliando o uso isolado da L-PRF na PRA ainda são controversos. Hauser *et al.* (2013) compararam, em um estudo clínico randomizado, a cicatrização de alvéolos com ou sem a aplicação de L-PRF em 23 pacientes em um curto período de acompanhamento (2 meses). Na análise radiográfica, o grupo L-PRF mostrou claramente menos reabsorção horizontal (0,06 mm) em relação ao grupo controle (0,43 mm). Além disso, a análise de tomografia micro computadorizada das biópsias mostrou melhor consolidação óssea alveolar e maior preservação da arquitetura óssea no grupo tratado com L-PRF. No mesmo modelo de estudo clínico, Alzahrani; Murriky, Shafik (2017) selecionaram vinte e quatro indivíduos com necessidade de exodontia de um único dente. Os alvéolos foram divididos em grupo teste (PRF, n=12) e grupo controle (coágulo n=12). Os resultados mostraram que a mudança da dimensão da crista no grupo teste foi estatisticamente menor do que no grupo controle. Além disso, o preenchimento ósseo radiográfico médio foi maior no grupo PRF (88.80%) do que no controle (80.34%) após 8 semanas.

Temmerman *et al.* (2016) avaliaram a eficácia da L-PRF em um estudo de modelo boca dividida em que vinte e dois pacientes com necessidade de exodontias bilaterais e estreitamente simétricas na maxila ou mandíbula foram incluídos. Os exames de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) demonstraram que maior preservação da dimensão

horizontal e vertical do rebordo foi obtida nos alvéolos tratados com L-PRF após 3 meses de cicatrização. Diferenças significativas foram encontradas para a redução da largura total entre os alvéolos tratados com L-PRF (-22,84%) e aqueles tratados com coágulo (-51,92%). Além disso, maior preenchimento do alvéolo com osso mineralizado visível foi observada no grupo L-PRF (94,7%) em comparação ao coágulo (63,3%). De maneira semelhante, Singh; Kohli, Gupta (2012) também realizaram um estudo clínico modelo boca dividida em que 20 pacientes foram submetidos a exodontia bilateral dos terceiros molares inferiores e uma cavidade pós-exodontia foi tratada com L-PRF e outra sem L-PRF. Os resultados demonstraram melhor cicatrização e menor dor nos alvéolos tratados com L-PRF. Ademais, a avaliação da densidade óssea por avaliação radiológica mostrou que todos os pacientes apresentaram formação de osso trabecular e valor do nível de cinza mais alto no alvéolo tratado com L-PRF (146,9) em comparação ao sem L-PRF (123).

Por outro lado, Suttapreyasri, Leepong (2013), realizaram um estudo, utilizando o modelo boca dividida, em que 20 cavidades simétricas de pré-molares após a exodontia foram tratadas aleatoriamente com L-PRF ou sem L-PRF (coágulo). O grupo L-PRF mostrou clinicamente a cura precoce do tecido mole cobrindo os orifícios da cavidade nas primeiras 4 semanas. Ademais, alterações no contorno na face vestibular no grupo PRF foi significativamente menor ($1,07 \pm 0,31$ mm) que a do controle ($1,81 \pm 0,88$ mm) na análise dos modelos de gesso. No entanto, radiograficamente, a reabsorção geral dos níveis de osso marginal na mesial e distal ao local de exodontia no grupo PRF (0,70; 1,23 mm) foi comparável à do controle (1,33; 1,14 mm) após oito semanas. Segundo os autores, embora o grupo PRF tenha demonstrado uma cicatrização mais rápida em comparação com o controle, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada na formação óssea dos alvéolos.

Areewong; Chantaramungkorn, Khongkhunthian (2019) compararam a formação óssea entre o uso da L-PRF e o coágulo na PRA após dois meses por meio de análise histomorfométrica. Trinta e seis pacientes foram incluídos sendo que 18 pacientes foram tratados com L-PRF e 18 pacientes com coágulo. A taxa de formação de osso novo foi maior no grupo PRF do que no grupo controle ($31,33 \pm 18\%$ e $26,33 \pm 19,63\%$, respectivamente) porém sem diferença significativa. Semelhantemente, Zhang et al. (2017) avaliaram a eficácia clínica da L-PRF na PRA em um total de 28 pacientes que foram divididos em dois grupos: o grupo L-PRF e o grupo coágulo (n = 14 cada). TCFC e análise histomorfométrica foram feitas após três meses. Uma área de osso novo significativamente maior foi observada no grupo PRF em comparação com o grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças

estatisticamente significativas no valor médio da altura do rebordo alveolar vestibular, altura do rebordo alveolar lingual/palatino e largura do rebordo alveolar entre os dois grupos. Dessa forma, a análise histológica da nova formação óssea confirmou que a PRF aumentou a qualidade do novo osso e aumentou a taxa de formação óssea, apesar do seu efeito não ter sido significativo para reduzir a reabsorção do osso alveolar no alvéolo pós-exodontia.

As medições de torque de remoção dos implantes dentários indicam o grau de integração óssea do implante, que está positivamente correlacionado com o tamanho da área de contato osso-implante, ou seja, um maior torque de remoção indica maior integridade óssea ao implante (JOHANSSON; ALBREKTSSON, 1987). Nesse contexto, Cho *et al.* (2014) realizaram um estudo experimental em coelhos para avaliar se o uso da L-PRF pode acelerar a integração óssea dos implantes dentários. Defeitos ósseos artificiais foram preparados em tíbias de coelhos. Os defeitos do grupo experimental foram preenchidos com L-PRF e do grupo controle com coágulo. Quatro (Grupo A) ou seis (Grupo B) semanas depois, implantes usinados foram instalados nas tíbias de coelhos. O torque de remoção dos implantes foi avaliado seis semanas após a instalação dos implantes. No grupo A, os implantes foram removidos com um torque médio de 45,81 e 69,00 Ncm no controle e no grupo experimental, respectivamente, sugerindo um efeito positivo significativo da L-PRF na integração óssea. No entanto, no grupo B, a remoção dos implantes exigiu um torque médio de 13,49 e 15,51 Ncm no grupo controle e experimental, respectivamente. Diferenças significantes foram observados entre o grupo controle e experimental no grupo A, mas não houve diferença significativa entre o grupo controle e experimental no grupo B.

Por outro lado, Faot *et al.* (2017) avaliaram a aplicação isolada das membranas de L-PRF em defeitos não-críticos em tíbias de coelhos e demonstraram que as membranas de L-PRF tiveram uma influência temporária negativa na microarquitetura óssea e na expressão de RUNX2 e VEGFA. Nesse estudo foram analisados formação óssea e características ósseas estruturais por meio de microtomografia computadorizada (μ CT) e expressão de marcadores moleculares (*Runx2*, *Vegfa*, *Coll* e *Bmp2*) por RT-qPCR em períodos de análise precoces (7, 14 e 28 dias). Os resultados evidenciaram que o preenchimento dos defeitos com L-PRF não afetou as características microestruturais do tecido ósseo reparado, exceto por uma redução na conectividade trabecular (Tb.Pf) a nível cortical após 14 dias. Ademais, os níveis expressos de *Runx2* e *Vegfa* foram significativamente menores nos defeitos tratados nesse período, porém foram restabelecidos após 28 dias.

Mais ainda, a literatura demonstra que a degradação relativamente rápida da L-PRF, com a redução subsequente na liberação de citocinas (DOHAN *et al.*, 2009), poderia interferir

negativamente na manutenção do espaço necessário para a formação óssea no interior do alvéolo (MORASCHINI; BARBOZA EDOS, 2016). Por outro lado, um material de enxerto de reabsorção lenta pode ser benéfico ao fornecer uma boa manutenção do espaço durante todo o período de cicatrização. No entanto, a cicatrização adequada requer neovascularização e crescimento interno de novos tecidos no espaço da ferida que o material de enxerto ocupa (CLARK *et al.*, 2018). Com isso tem sido proposto o uso combinado do OBD e da L-PRF (CORTELLINI *et al.*, 2018; DE ANGELIS *et al.*, 2019) uma vez que a L-PRF agrega propriedades osteoindutivas ao enxerto xenógeno, por meio da liberação lenta e gradual de fatores de crescimento, proporcionando características ideais para a regeneração do tecido ósseo (LI *et al.*, 2013).

Oliveira *et al.* (2014) e Do Lago *et al.* (2019) avaliaram a aplicação de L-PRF associada ou não ao OBD em calvárias de ratos. O trabalho de Oliveira *et al.* (2014) mostrou maiores porcentagens de neoformação óssea após 30 dias (54,05% \pm 5,78) nos defeitos tratados com OBD associado ao grupo PRF em comparação ao uso isolado dos materiais. Entretanto, após 60 dias, o grupo com a associação L-PRF e OBD tiveram resultados semelhantes ao grupo tratado com OBD isolado. Do Lago *et al.* (2019) também revelaram que associação da L-PRF com o OBD promoveu maior formação óssea em comparação aos grupos L-PRF, OBD e osso autógeno após 4 e 8 semanas. Além disso, as expressões OC, RUNX 2 e VEGF analisados por imuno-histoquímica apresentaram aspecto favorável na formação de osso novo para os defeitos tratados com L-PRF e OBD. Outros estudos confirmam os mesmos resultados (YOON; LEE; YOON, 2014; YOU *et al.*, 2019).

De Angelis *et al.* (2019) realizaram um estudo retrospectivo comparativo para avaliar os resultados clínicos e radiográficos do uso da L-PRF associada ou não ao OBD na PRA. Quarenta e cinco indivíduos com um dente posterior extraído foram divididos em três grupos (n=15): L-PRF, OBD, ou L-PRF associada ao OBD. O grupo L-PRF experimentou significativamente maior reabsorção óssea horizontal e vertical. Por outro lado, o grupo tratado com L-PRF associada a OBD apresentou menores alterações dimensionais nas dimensões horizontal (18,9%) e vertical (11,42%) em comparação ao grupo OBD. Além disso, o uso da L-PRF sozinha ou combinada com o OBD resultou em menos desconforto e dor pós-operatória. No entanto, nenhum dos procedimentos utilizados nos 3 grupos do presente estudo foi capaz de compensar totalmente as alterações que ocorreram após a exodontia.

Diferentes protocolos de centrifugação têm sido atualmente propostos para obter vários outros tipos de concentrados de plaquetas com comportamentos específicos. Embora a L-PRF

padrão seja centrifugada a 2700 rpm por 12 minutos, é possível obter um material utilizando uma velocidade mais lenta (1500 rpm por 14 minutos) conhecido como fibrina rica em plaquetas avançada (A-PRF do inglês *advanced platelet-rich fibrin*). A velocidade mais lenta resulta em um aumento no número de células plaquetárias e uma maior presença de granulócitos neutrofilicos na parte distal do coágulo, o que pode contribuir para a diferenciação de monócitos em macrófagos (FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017; GHANAATI *et al.*, 2014). Os macrófagos são capazes de aumentar a diferenciação dos osteoblastos e desempenham um papel fundamental na promoção da integração do biomaterial e da formação de novo osso (FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017). Kobayashi *et al.* (2016) investigaram os fatores de crescimento liberados ao longo do tempo, com os resultados indicando que o PRP demonstrou a capacidade de liberar níveis significativamente maiores de fatores de crescimento bem no início do processo de cura. Em contraste, o uso de PRF e A-PRF resultou em uma liberação mais gradual de fatores de crescimento por até 10 dias, com A-PRF mostrando liberação de fator de crescimento significativamente maior ao longo do tempo, o que poderia ser clinicamente benéfico (KOBAYASHI *et al.*, 2016). To *et al.* (2019) avaliariam a eficácia da A-PRF em alvéolos de cachorros após a extração dentária e demonstraram taxas mais altas de formação óssea e expressões de osteocalcina e osteopontina no grupo A-PRF em comparação ao coágulo.

Ademais, diferentes tipos de centrífugas também têm sido desenvolvidas para aprimorar os concentrados plaquetários. Dentre os tipos de centrífuga disponíveis no mercado, a Centrífuga Digital FibrinFUGE25 (MontSerrat®) tem se destacado por apresentar um ângulo exclusivo de 25° e nível de vibração abaixo de 0.50 m/s². Segundo o fabricante, o baixo nível de vibração e a rampa de aceleração lenta dessa centrífuga diminui o impacto dos elementos figurados contra a parede dos tubos, fazendo com que haja melhor acomodação destes à medida em que a centrífuga alcança sua rotação ideal. A centrífuga FibrinFUGE25 vem de fábrica com um protocolo denominado Protocolo Fibrin (1659rpm, 200g por 10 min) que consiste em um método de centrifugação de baixa rotação que aumenta o aproveitamento do volume sanguíneo e da concentração celular no agregado na zona do pelet leucoplaquetário (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). No entanto, até o momento não foram encontradas publicações que demonstrem a eficácia da matriz de fibrina obtida com esse protocolo na formação óssea.

De maneira semelhante, uma fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF) foi desenvolvida em 2014 por meio da modificação da força de centrifugação (WANG *et al.*, 2017b). Para sua obtenção são utilizados tubos de plástico não revestidos por sílica e a centrifugação é feita em velocidades mais baixas (700 rpm, 60g) por apenas 3 minutos. A i-

PRF deve ser utilizada dentro de 15 minutos antes da formação do coágulo de fibrina. Ao diminuir a força G, uma maior porcentagem de células, incluindo plaquetas e leucócitos, permanecem no compartimento superior dos tubos de centrifugação onde a i-PRF é coletada, fornecendo assim mais células capazes de auxiliar na regeneração de tecidos e na liberação de moléculas pró-cicatrização de feridas (WANG *et al.*, 2019). Wang *et al.* (2017a) demonstraram em um estudo *in vitro* que a i-PRF foi capaz de induzir maior migração, proliferação e diferenciação dos osteoblastos humanos quando comparada ao PRP.

Assim, o uso da i-PRF em combinação com enxertos ósseos particulados tem sido utilizada para promover as propriedades biológicas e físicas dos materiais (KYYAK *et al.*, 2020). A mistura da i-PRF com grânulos de enxerto ósseo resulta em um material chamado de “sticky bone”. Nesses casos, o fibrinogênio líquido humano na i-PRF é lentamente convertido em fibrina que atua como um aglutinante que promove a aglomeração ou revestimento dos biomateriais (MOURAO *et al.*, 2015). Assim, o “sticky bone” pode ser facilmente moldado na forma desejada, o que facilita o manuseio/compactação no leito cirúrgico e também evita a dispersão dos grânulos de biomateriais (THANASRISUEBWONG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017a).

Boia *et al.* (2022) avaliaram o desempenho de diferentes OBD, associados ou não, ao i-PRF em defeitos críticos criados em calvárias de ratos. Após quatro e oito semanas, análises histológicas e histomorfométricas avaliaram o potencial de formação óssea dos grupos tratados com coágulo (CG), osso autógeno (AG), Bio-Oss® (BO), Cerabone® (CB), i-PRF (i-PRF), Bio-Oss + i-PRF (BOPRF) e Cerabone + i-PRF (CBPRF). Dentre os substitutos ósseos investigados, CBPRF ($18,79 \pm 5,98$) apresentou as maiores médias em relação ao BO ($10,20 \pm 2,82$) e ao CG ($6,96 \pm 3,29$). Porém, os grupos i-PRF ($17,07 \pm 4,95$), BOPRF ($16,86 \pm 6,14$), BO ($10,20 \pm 2,82$) e CB ($16,15 \pm 4,72$) não foram significativos entre si.

Por fim, o uso clínico da i-PRF também se demonstrou promissor em procedimentos de modificação do fenótipo e ganho em espessura gengival, redução de profundidade a sondagem de bolsas periodontais e em maiores ganhos de inserção clínica durante procedimentos de regeneração periodontal (OZSAGIR *et al.*, 2020; UCAK TURER *et al.*, 2020). Entretanto, ainda não foram encontrados estudos pré-clínicos ou clínicos avaliando potencial regenerativo do “sticky bone” na PRA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo pré-clínico foi avaliar o uso isolado da fibrina rica em plaquetas (PRF) na forma de membrana e da PRF injetável associada ao osso bovino desproteínizado (OBD) na formação óssea de defeitos não-críticos na tíbia de ratos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar tridimensionalmente, por meio de análise microtomográfica, as características estruturais das áreas corticais e medulares, bem como a porcentagem de neoformação óssea e de partículas residuais de biomateriais nos defeitos não-críticos criados;
- b) Avaliar as características do osso neoformado, porcentagem de neoformação óssea e de partículas residuais de biomateriais nos defeitos reparados por meio de análise histológica e histomorfométrica;
- c) Avaliar a expressão gênica de biomarcadores relacionados a neoformação óssea por meio da análise de PCR em tempo real.

3 ARTIGO

Platelet-rich fibrin (PRF) low-speed centrifugation protocols and particulated deproteinized bovine bone mineral (DBBM) in rat tibiae non-critical defects healing¹

Lélio Fernando Ferreira Soares¹, Thaisa Macedo Iunes Carrera², Roberta de Oliveira Alves², Camila Chiérici Marcantonio³, Joni Augusto Cirelli³, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira², Juliana dos Santos Neves¹, Ronaldo Célio Mariano¹, Suzane Cristina Pigossi*³

1 School of Dentistry, Alfenas Federal University (UNIFAL/MG), Alfenas, Minas Gerais, Brazil

2 Department of Periodontology and Implantodontology, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

3 Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State of University (FOAr/UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil

***Corresponding author:** Dr. Suzane Cristina Pigossi, Federal University of Uberlândia (UFU), School of Dentistry, Department of Periodontology and Implantodontology, Umuarama Campus, Bloco UMU4L, Pará Avenue, 1720, 38405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, +55 34 3225-8106, E-mail: suzane.pigossi@ufu.br

¹ Artigo científico elaborado e submetido de acordo com as normas do periódico internacional Clinical Oral Investigations.

Introduction

Tooth extraction due to trauma, caries, or advanced periodontal disease is one of the most widely performed procedures in clinical dentistry. However, tooth loss brings aesthetic and functional damage to the patient [1]. In addition, marked volumetric changes of the alveolar ridge are observed in the first 2-3 months post-extraction, being more pronounced in the buccal wall where the bone plate is generally thinner [2]. This occurs because tooth extraction is followed by bone remodeling that leads to a loss of approximately 40 to 60% of the total alveolar bone volume during the first 2-3 years and continues at a rate of 0.25 to 0.5% per year [3].

In this context, the use of dental implants to replace missing teeth has become a common and well-accepted rehabilitation treatment modality. The dental implant placement ensures the restoration of function in partially and completely edentulous patients, as well as hard and soft tissue maintenance, especially in aesthetic areas [1, 4]. However, post-extraction changes in soft and hard tissues prevent the adequate dental implant three-dimensional position, especially when aesthetic and prosthetically conducted rehabilitation is desired [5]. Therefore, it is essential to maintain the original dimensions of the alveolar ridge after tooth extraction, especially in cases where the proposed rehabilitation treatment includes dental implant placement [6].

Different regenerative procedures have been proposed to neutralize alveolar resorption processes and preserve the bone for subsequent rehabilitation. Alveolar ridge preservation (ARP) using a combination of various surgical techniques and biomaterials is considered a valid therapeutic option that significantly reduces post-extraction ridge dimensional changes [7]. Specifically, ARP procedures aim to minimize crestal resorption and maximize bone regeneration through the immediate placement of a biomaterial within the socket [5]. Among the biomaterials and biological agents investigated in the literature, the use of platelet concentrates, associated or not with bone grafts or membranes, offers safe and favorable results [8-10].

Described as the second generation of platelet concentrate, Platelet Rich Fibrin (PRF) is prepared from plasma, after centrifugation of whole blood without the addition of any coagulant. The blood clots slowly and spontaneously, similar to the natural blood clot formed at the defect site, trapping the activated platelets and white blood cells in a fibrin-rich matrix [11]. In vitro studies showed that PRF progressively and slowly releases a significant amount of growth factors, including transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), platelet-derived

growth factor AB (PDGF-AB), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF), bone morphogenetic protein-1 (BMP-1), matrix glycoproteins (i.e., thrombospondin-1, fibronectin, vitronectin), and pro- and anti-inflammatory cytokines [Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-4, and tumor necrosis factor alpha] for at least 7 days [12-14]. That way, the PRF acts as a modulator of cell migration/proliferation and immune organization, improving and accelerating the healing of soft and hard tissues [11, 15, 16].

Although standard leucocyte PRF (L-PRF) is centrifuged at 2700 rpm for 12 minutes, different centrifugation protocols have currently been proposed to obtain various other types of platelet concentrates in different physical presentations (membrane and liquid) with specific behaviors. The Fibrin® protocol (1659rpm, 200g for 10 min) using the FibrinFuge25 centrifuge (MontSerrat®) has been proposed to obtain a PRF membrane and consists of a low-speed centrifugation method to increase the cellular concentration in the leukoplatelet pellet zone. The FibrinFuge25 centrifuge (MontSerrat®) has a unique angle of 25° and a vibration level below 0.50 m/s². According to the manufacturer, the low level of vibration and the slow acceleration ramp of this centrifuge reduce the impact of the formed elements against the wall of the tubes. However, no studies evaluating the efficacy of this protocol in ARP were published until now.

Similarly, an injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) was also developed by decreasing the G-force (700 rpm, 60g for 3 min). With this protocol, a greater percentage of cells, including platelets and leukocytes, remain in the upper compartment of the centrifuge tubes where i-PRF is collected, providing more cells and molecules capable of assisting in tissue regeneration [17]. The i-PRF mixed with bone graft granules formed a “sticky bone” material. In these cases, the liquid fibrinogen in i-PRF is slowly converted into fibrin that acts as a binder that promotes agglomeration or coating of biomaterials [18]. Thus, the “sticky bone” can be easily molded into the desired shape, facilitating handling/compaction in the surgical bed and preventing biomaterial granules' dispersion [19, 20]. Recently, Ribeiro de Albuquerque Boia, Ferreira Soares, Passos, dos Santos Neves, Célio Mariano and Junior Vital Ribeiro [21] showed that i-PRF mixed with bone graft favored the bone regeneration process in critical defects size.

Based on the advantages of the low-speed PRF protocols, this study aimed to investigate the efficacy of both PRF membrane isolated (Fibrin® protocol) and injectable-PRF mixed with deproteinized bovine bone mineral (DBBM) in the treatment of rat tibiae non-critical defects.

Materials and Methods

Study design

A total of 64 rats were utilized in this study [n= 16 animals in each group divided into two periods of analysis (15 and 45 days)]. The animals were randomly distributed into 4 groups according to the type of biomaterial used to fill the defects:

CO: blood clot-filled bone defects;

PRF: bone defects filled with PRF membranes (Fibrin® protocol) isolated;

BO: bone defect filled with DBBM isolated;

SB: bone defects filled with *Sticky bone* (i-PRF + DBBM).

Sample

The number of animals required was estimated based on the bone formation percentage (%) obtained by histomorphometry analysis in a previous study [22]. A minimum sample size of 7 animals per group was defined for the application of statistical tests with a type α error of 0.05 and β power of 0.90 applying the One-Way Anova test for comparisons among the groups. Due to the risk of unexpected animal loss during the experimental protocol, 8 animals per group were utilized in this study.

Experimental animals

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animals Use in Research of our institution (Protocol 0015/2021) (ANNEX A). All methods in this study were performed following the relevant guidelines and regulations as provided by this committee. The manuscript was prepared according to ARRIVE guidelines [23] (APPENDIX B).

The 64 male rats (4-month-old, *Rattus norvegicus*, Wistar, 400 – 450g) used in the study were kept in an environment with controlled temperature ($21\pm 1^\circ\text{C}$), humidity (65-70%), and cycles of light (12 hours). Appropriate food and water *ad libitum* were offered and the maximum of 4 animals were maintained in each cage.

Experimental procedures

PRF obtention

The present study used donor rats for PRF obtention. To obtain PRF in membrane form, one donor rat was used to produce 4 PRF membranes [enough to fill 4 defects]; for PRF in injectable form, one donor rat was used to obtain a volume of i-PRF [on average 800 μL] sufficient to fill 8 defects in combination with DBBM (2 defects per animal, totaling 4

animals). Considering that two bone defects were performed in each animal, a total of 16 donor rats were used for filling the defects in PRF (12 donors) and SB (4 donors) groups.

The donor animals were anesthetized with a combination of Ketamine (Agener União Ltda, São Paulo, Brazil) 90 mg/kg body weight and Xylazine (Rompum, Bayer S.A., São Paulo, Brazil) 10 mg/kg body weight. Subsequently, a vertical midline incision was performed along the sternum with a scalpel and an osteotomy of the sternum was performed with scissors (median sternotomy). During the osteotomy, the thoracic cavity was lifted upwards to avoid injury to the animal's heart.

Approximately 7mL of cardiac blood was collected through direct cardiac puncture of the left ventricle using a 23 g BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set scalp, and a 9 ml Vacuette® tube. A white blood collection tube (without anticoagulants) was used to prepare the i-PRF, and a red blood collection tube (with a siliconized clot activator) to prepare the PRF membranes. The whole blood, without anticoagulants, was immediately centrifuged (Centrifuge FibrinFuge25®, Montserrat, China) after collection.

PRF membranes were obtained after centrifugation at 1659 rpm for 10 min (200 g) [24]. After centrifugation, the upper polymerized layer was removed from the tube using tweezers and separated from the lower portion using scissors. The material was placed in a specific case and compressed for 2 minutes to remove the plasma and form the membrane.

For i-PRF preparation, a low-speed centrifugation and relative centrifugation force (RCF) protocol, described by Ghanaati, Al-Maawi, Herrera-Vizcaino, Alves, Calasans-Maia, Sader, Kirkpatrick, Choukroun, Bonig and Mourao [25] was applied, at 700 rpm for 8 min (44g). After centrifugation, 1 mL of the upper layer was aspirated using a syringe, and the i-PRF was agglutinated to the DBBM granules (0.25mm – 1mm; Bio-Oss®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland) to form the Sticky bone [18].

Due to the blood collection method, a humane endpoint was applied to the animals after the collection by CO₂ inhalation.

Surgical procedure

The animals were anesthetized following the previous protocol and an incision of approximately 10 mm was made, in planes, over the right and left tibial tuberosity. After delicate dissection, the bone tissue was subjected to osteotomy, using a spherical drill (diameter 3.3 mm) mounted in a contra-angle with the aid of an electric motor set at 1200 rpm (BLM 600 – Driller, São Paulo, SP, Brazil) under abundant irrigation with sterile saline solution. The defect presented the following configurations: 3.5 mm in length and width and

1.5 mm in depth [26, 27]. Markings performed 2 mm from both margins of the bone defect, filled with gutta-percha, were created for later identification of the site of the bone defect. A periodontal probe was used to measure defects that were later filled with biomaterials. The tissue was sutured by planes internally with resorbable wire 5.0 (Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil) and externally with silk thread 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brazil) (Figure 1).

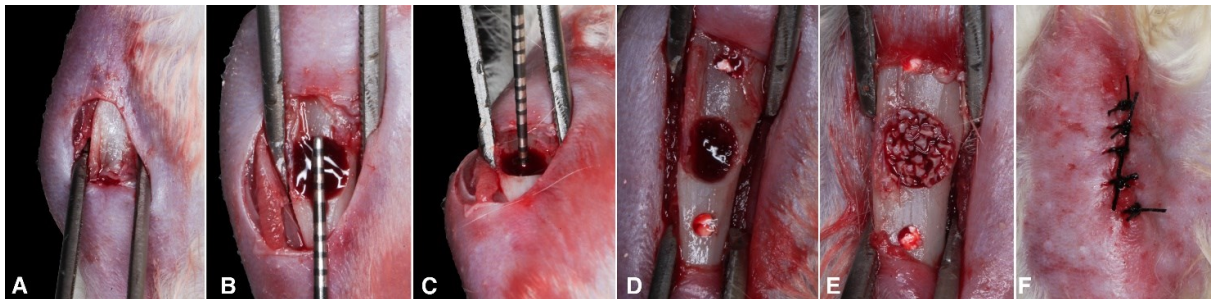


Figure 1: Sequence of preparation of surgical defects. A: Exposure of the tibia. B: Circular defect with a diameter of 3.5mm. C: Depth of 1.5mm of the defect created. D: Adjacent markings. E: Defect filled with bone xenograft granules. F: Suture of the animal's cutaneous plane.

In the postoperative period, the animals received a single dose of Streptomycin-associated penicillin 0.1 ml/kg of weight (Multibiótico Small, Vitalfarma, São Sebastião do Paraíso, MG, Brazil), Meloxicam 1 mg/kg body weight (Maxican 0.2%, Ourofino, Cravinhos, Brazil) once a day for three days, and Tramadol 12.5 mg/kg, 8/8 hours for 2 days, diluted in saline solution (Tramal, União Química, São Paulo). The animals were isolated in each cage for 72 hours after surgery to avoid injuries caused among them.

After the grafting procedures, the animals were euthanized by CO₂ inhalation after 15, and 45 days. The right tibiae were separated for microtomographic, histomorphometry, and histological analysis; the left tibiae were separated for bone molecular markers expression.

Outcome measures

Micro-computed tomography (μ CT) analysis

The right tibiae that were used for microtomographic analysis were fixed in 10% formaldehyde for 48 h and later stored in 70° alcohol. These samples were scanned by the micro-CT device (Skyscan 1272, Aatselaar, Belgium) with the following parameters: pixel of the camera, 7.4; power of the X-ray tube, 65 kVP; X-ray intensity, 385 μ A; integration time,

300 ms; filter, Al-1 mm; and voxel size, 18 μm . The images were reconstructed, spatially repositioned, and analyzed by specific softwares (NRecon, Data Viewer, CTAnalyser, Aatselaar, Belgium).

Two different regions of interest (ROI) were analyzed: the circular ROI 1 corresponded to the total volume of the defect considering only the cortical area (3.5 mm x 0.54 mm); the rectangular ROI 2 corresponded to the total volume of the defect considering both cortical and medullary area (ROI 2: 3.5 mm x 1.08 mm) (Figure 2). Thirty transaxial slices were selected for cortical bone area analysis, while sixty transaxial slices (1080 μm in depth) were selected for cortical and medullary bone area analysis.

The following bone micro-structural parameters of newly formed bone were evaluated at the cortical level (transaxial slices): mineralized new bone tissue volume/tissue volume percentage ratio (BV/TV 1), residual graft particles/tissue volume percentage ratio (BV/TV 2) and average cortical thickness (Ct.Th, mm) [28]. For BV/TV 1 analysis only the volume of new bone tissue formed in the cortical defect area was considered in the analysis. For separating the new bone tissue from the remaining graft particles, a grayscale threshold of 40-60 / 30-70 was applied in the samples of 15 and 45 days, respectively. To calculate BV/TV 2, a grayscale threshold of 70-140 / 80-200 was applied in the samples of 15 and 45 days, respectively. The grayscale threshold varied between the periods of analysis due to the differences in the bone maturation. Ct.Th analysis considered the average cortical thickness of six serial slices from thirty coronal slices in the most central region of the defect. The ROI defined for this analysis included the cortical limits of the defects (coronal slices) (Figure 2).

At cortical and medullary levels were evaluated: BV/TV (%), trabecular thickness (Tb.Th, mm); trabecular separation (Tb.Sp, mm), and trabecular number (Tb.N, mm^{-1}) [28]. BV/TV ratios included both mineralized new bone tissue volume and residual graft particles. In this analysis, a grayscale threshold of 40-120 was applied (newformed bone and residual bone graft particles were not differentiated in this analysis).

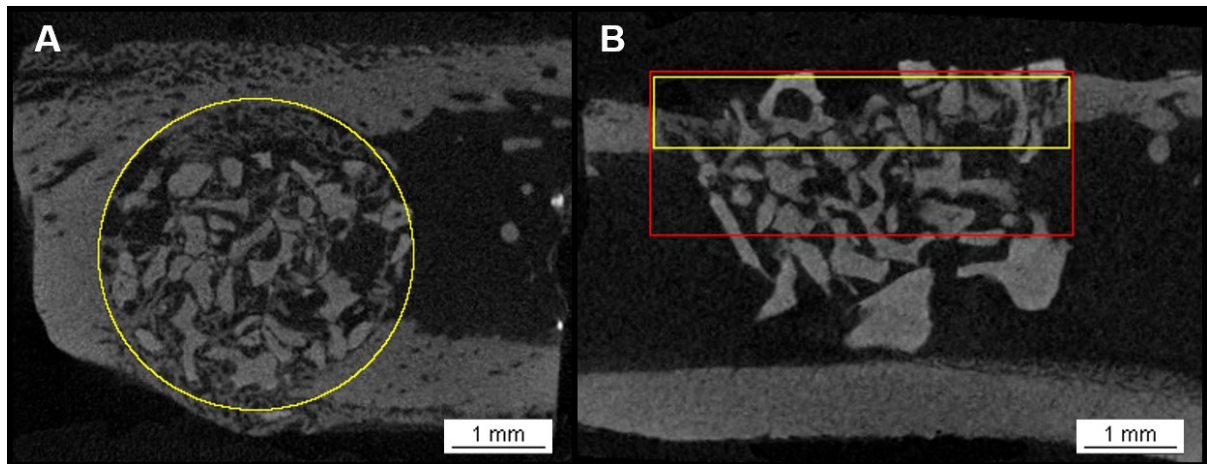


Figure 2: Regions of interest defined for bone micro-structural parameters analysis by micro-CT. A: Circular ROI 1 defined around the defect. B: Rectangular ROI 2 including both cortical and medullary area (red). The yellow rectangle corresponds to the cortical area assessed in the Ct.Th evaluation.

Descriptive histology and histomorphometric analysis

After scanning, the right tibiae were demineralized in a 7% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (changed every 48 h for 3 months). Subsequently, the samples were washed and dehydrated in alcohol, diaphanized in xylol, and embedded in paraffin.

Specimens were prepared with semi-serial sections of 5 μm for staining in Hematoxylin & Eosin (HE) for descriptive histology and histomorphometry analysis. After reaching the central region of the defect (875 μm in depth), 12 equally distant sections (70 μm of the distance) were obtained per sample and stained with hematoxylin-eosin (H&E).

The sections were analyzed under an optical microscope (DIASTAR – Leica Reichert & Jung products, Germany) with a 2.5/10x magnification objective and 10x magnification eyepieces. Images were captured and sent to a microcomputer, with the aid of a 10x magnification camera video DXC-1107A/107AP (Sony Electronics Inc, Japan). Mineralized bone quality, graft particle aspect, evidence of fibrotic tissue formation within the defect site, angiogenesis, and inflammatory reaction were evaluated in the histological description.

For the histomorphometry analysis, a total of 3 randomized sections, with a distance of 210 μm between them, were analyzed from each sample. Mineralized new bone tissue volume/tissue volume ratio (BV/TV1) and residual graft particles /tissue volume ratio (BV/TV2) were analyzed considering only the cortical area (ROI 1) and both cortical and medullary area (ROI 2). An image software analysis (Image J, Jandel Scientific San Rafael, USA) was used to perform these analyses. In order to calculate the area of new bone tissue

and remaining graft particles in the defect area, a threshold of 115-180 / 205-255, respectively, was applied to the images converted to 8-bit including the tissue volume of interest inside the defined ROI (Figure 3).

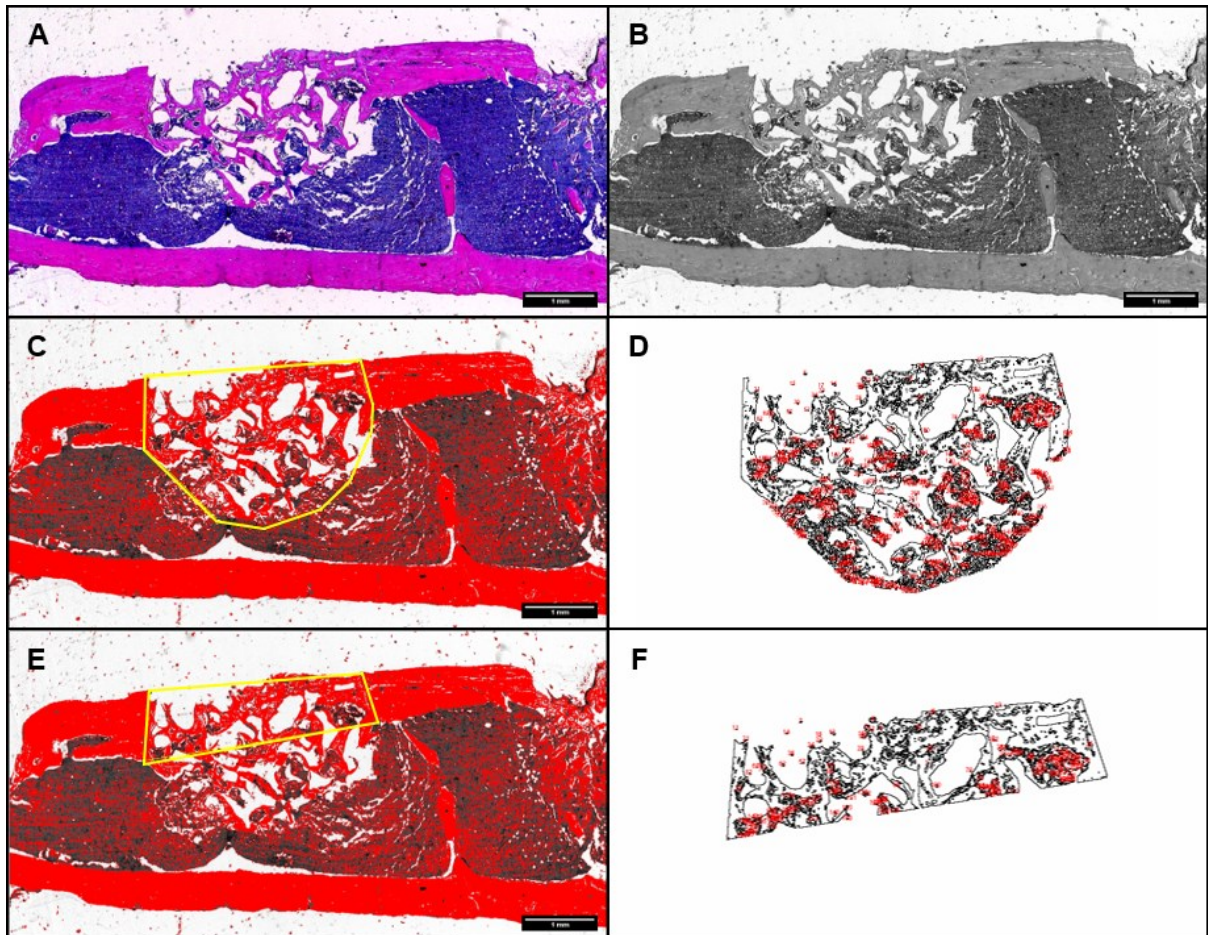


Figure 3: Description of histomorphometry analysis. A: Representative image, BO at 15 days. B: Converted 8-bit image. C: Threshold and ROI defined/drawn for a cortical and medullary bone analysis (yellow line). D: Reconstruction of the analyzed cortical and medullary areas. E: Threshold and ROI defined/drawn for a cortical bone analysis (yellow line). F: Reconstruction of the analyzed cortical area.

Bone molecular markers expression (RT-qPCR)

After euthanasia, a trephine measuring 4.1 mm in diameter (Neodent®, Curitiba, Brazil) was centered in the region of the bone defect in order to obtain sufficient tissue for gene expression analyses. From each group, only samples with 15 days of postoperative were analyzed. This tissue was quickly transferred to RNAlater (AMBION) for the conservation of RNA integrity. The tissue was macerated in liquid nitrogen, and the RNA extraction was

performed using TRIzol (Invitrogen™, Carlsbad, USA) according to the protocol recommended by the manufacturer.

The concentration of RNA extracted from each sample was measured by optical density using the Nanodrop (ThermoScientific). The complementary DNA (cDNA) of all the gene sequences expressed was synthesized through RT-PCR using the OligodT(20) with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Invitrogen™), according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR (RT-qPCR) reactions were performed using the TaqMan™ system (Applied Biosystems, Foster City, USA), which consists of a pair of primers and a probe labeled with a fluorophore. The gene for endogenous control of the reaction was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, cat. n° Mm99999915_g1), whose expression level was used to normalize the expression of the genes of interest, *Alpl* (Alkaline Phosphatase; cat. n° Mm00475834_m1), *Runx2* (RUNX; cat. no. Mm00501584_m1), *Bglap* (Osteocalcin; cat. no. Mm00649782_gH).

For the relative quantification of the selected gene, real-time PCR reactions were performed in duplicate. The relative gene expression values of the genes of interest were analyzed using the Expression Suite software (Applied Biosystems®). After normalization by expression of the endogenous control gene, expression values for each target gene ($\Delta\Delta C_t$) were obtained. The average $\Delta\Delta C_t$ values of each gene of interest (target) referring to the induction of each investigated material were compared.

Statistical analysis

The data generated by the μ CT and bone molecular markers expression analyzes were submitted to outlier identification analysis by the ROUT test considering $Q=1\%$. All data were submitted to the Shapiro-Wilk Normality test, and those which were distributed according to normality (μ CT, histomorphometry analysis) were analyzed using the One-way Anova test and complemented by the Tukey test for comparison between groups. For analysis of data (gene expression analysis) that were not distributed according to normality, the Kruskal-Wallis test complemented by the Dunn test was applied. Unpaired t-test was used to compare BO and SB groups in the residual biomaterial particle analysis. Intragroup analyses among periods were conducted with the Two-Way Anova test complemented by the Tukey test (μ CT, histomorphometry analysis). GraphPad Prism 6 software (San Diego, USA) was

used for the statistical tests. All the tests of this study were applied with a level of significance of 5%.

Results

All the animals survived after the experimental procedures and no side effects events were detected in the animals.

μCT analysis

Cortical defect area analyzes (ROI 1)

In the period of 15 days, a higher percentage of newly formed bone (BV/TV) was observed for the experimental groups [BO (20.21 ± 1.62), PRF (18.14 ± 5.89) and SB (15.22 ± 5.36)] compared to the CO group (12.05 ± 6.00), but without significant differences (Figure 4A). No significant differences were observed between the BO and SB groups (Figure 4A) regarding the percentage of newly formed bone 15 days postoperative.

After 45 days, higher bone formation was observed in the BO (45.49 ± 10.68) and SB (43.82 ± 12.51) groups compared to the CO group (21.66 ± 6.04) ($p < 0.05$) (Figure 4B). Although the PRF group (33.75 ± 9.49) presented a higher percentage of newly formed bone compared to the CO group, no significant differences were found between the groups (Figure 4B). No significant differences were also found between the BO and SB groups after 45 days (Figure 4B).

During the intragroup analysis among the periods, significantly more new-formed bone was observed in the groups PRF (18.14 vs 33.75), BO (20.21 vs 45.49), and SB (15.22 vs 43.82) after 45 days ($p < 0.05$). The CO group (12.05 vs 21.66) did not demonstrate significant differences between the periods of 15 or 45 days ($p > 0.05$).

Regarding the percentage of residual graft particles (BV/TV), after 15 days, a higher percentage of particles was observed in the BO group (35.04 ± 5.93) compared to the SB group (26.90 ± 14.28), but without significant differences between the groups (Figure 4C). After 45 days, no difference in the percentage of biomaterial particles was observed between the BO (20.87 ± 15.58) and SB (22.04 ± 15.84) groups (Figure 4D). The intragroup analysis [BO (35.04 vs 20.87); SB (26.90 vs 22.04)] did not show statistical differences for the analyzed periods ($p > 0.05$).

Ct.Th analysis in the period of 15 days exhibited thicker cortical bone in BO (22.76 ± 5.02) and SB (22.85 ± 12.73) groups in comparison to the CO (17.37 ± 15.47) and PRF (12.89 ± 9.41) groups, however, values were not significant ($p > 0.05$) (Figure 4E). After 45 days,

platelet concentrate groups [PRF (31.60 ± 13.71) and SB (30.59 ± 15.56)] demonstrated a superior thickness compared to the CO (17.53 ± 8.95) and BO (24.11 ± 10.81) groups but without significant difference ($p > 0.05$) (Figure 4F). Intragroup analysis [CO (17.37 vs 17.53); PRF (12.89 vs 31.60); BO (22.76 vs 24.11); SB (22.85 vs 30.59)] was not statistically different between the periods of 15 and 45 days ($p > 0.05$).

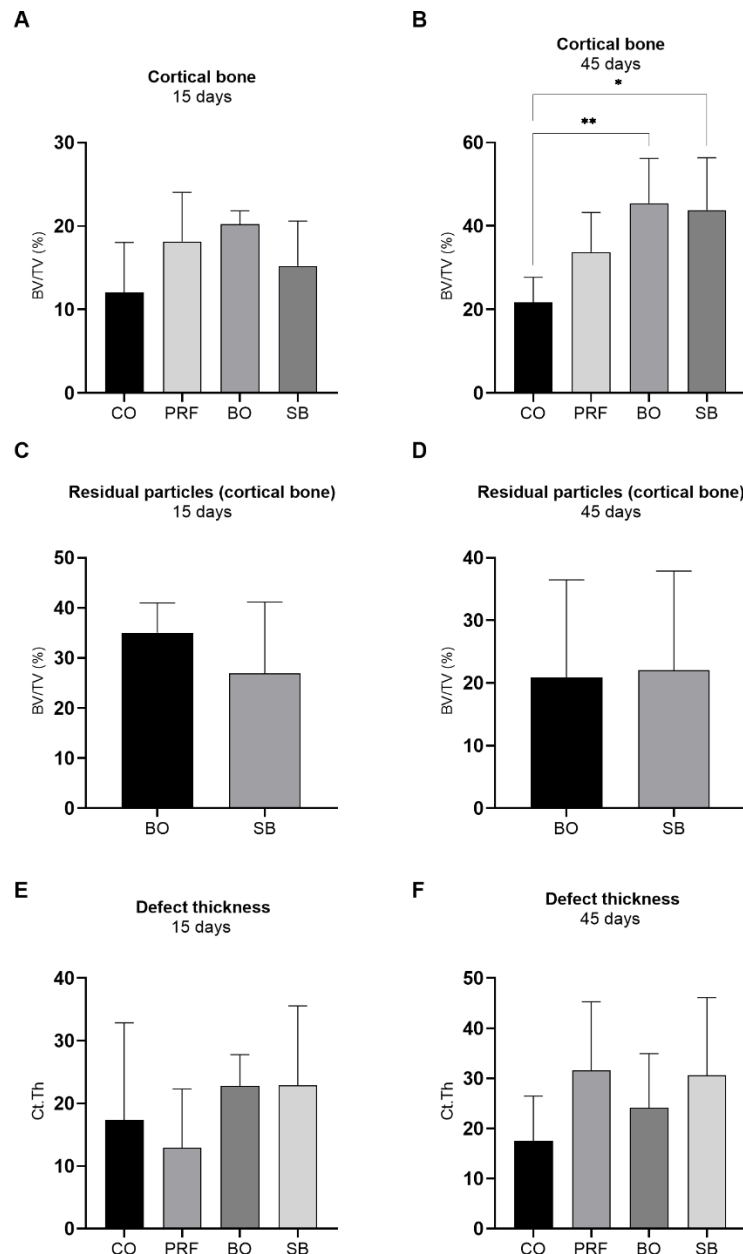


Figure 4: Micro-CT analyses conducted in the cortical defect area. A: % BV/TV (15 days). B: % BV/TV (45 days). C: % residual graft particles (15 days). D: % residual particles (45 days). E: Cortical bone defect thickness (15 days). F: Cortical bone defect thickness (45 days).

Cortical and medullary defect area analyzes (ROI 2)

For both periods of analyses, a higher percentage of newly formed bone (BV/TV) was observed in the BO (15 days: 59.85 ± 2.15 ; 45 days: 68.22 ± 7.17) and SB (15 days: 51.30 ± 12.78 ; 45 days: 63.08 ± 11.62) groups compared to CO (15 days: 26.05 ± 9.16 ; 45 days: 28.34 ± 11.20) and PRF (15 days: 29.09 ± 4.93 ; 45 days: 33.79 ± 10.51) groups ($p < 0.05$) (Figures 5A and 5E). Conducted intragroup analysis did not show differences between the periods ($p > 0.05$).

Furthermore, Tb.N analysis exhibited significantly higher values in the BO (15 days: 0.070 ± 0.012 ; 45 days: 0.059 ± 0.014) and SB (15 days: 0.069 ± 0.020 ; 45 days: 0.059 ± 0.016) groups compared to the CO (15 days: 0.037 ± 0.004 ; 45 days: 0.027 ± 0.009) and PRF (15 days: 0.038 ± 0.006 ; 45 days: 0.025 ± 0.001) groups ($p < 0.05$) (Figures 5B and 5F). The intragroup analysis did not demonstrate significant differences between the periods in any of the groups ($p > 0.05$).

Tb.Th values were similar among all groups [15 days: CO (6.91 ± 2.34), PRF (7.52 ± 0.99), BO (8.71 ± 1.62), SB (7.58 ± 1.61) ($p > 0.05$); 45 days: CO (10.73 ± 3.91), PRF (15.08 ± 7.07), BO (11.29 ± 2.42), SB (11.13 ± 2.73)] (Figures 5C and 5G). Only the PRF group demonstrated more newformed bone after 45 days ($p < 0.05$), other groups analyzed remained similar during the intragroup analysis between periods ($p > 0.05$).

Conversely, trabecular separation (Tb.Sp) was higher in the groups without the addition of bone graft, however, the superiority was significant only for the PRF group (15 days: 13.85 ± 1.66 ; 45 days: 22.81 ± 11.46) in comparison to BO group (15 days: 6.98 ± 2.06 ; 45 days: 8.52 ± 3.62). The Tb.Sp values for the CO group were 12.12 ± 3.08 and 17.25 ± 4.58 after 15 and 45 days, respectively. For the SB group, the values were 8.14 ± 4.93 and 10.95 ± 8.80 after 15 and 45 days, respectively (Figures 5D and 5H). The intragroup analysis did not demonstrate significant differences between the periods in any of the groups ($p > 0.05$).

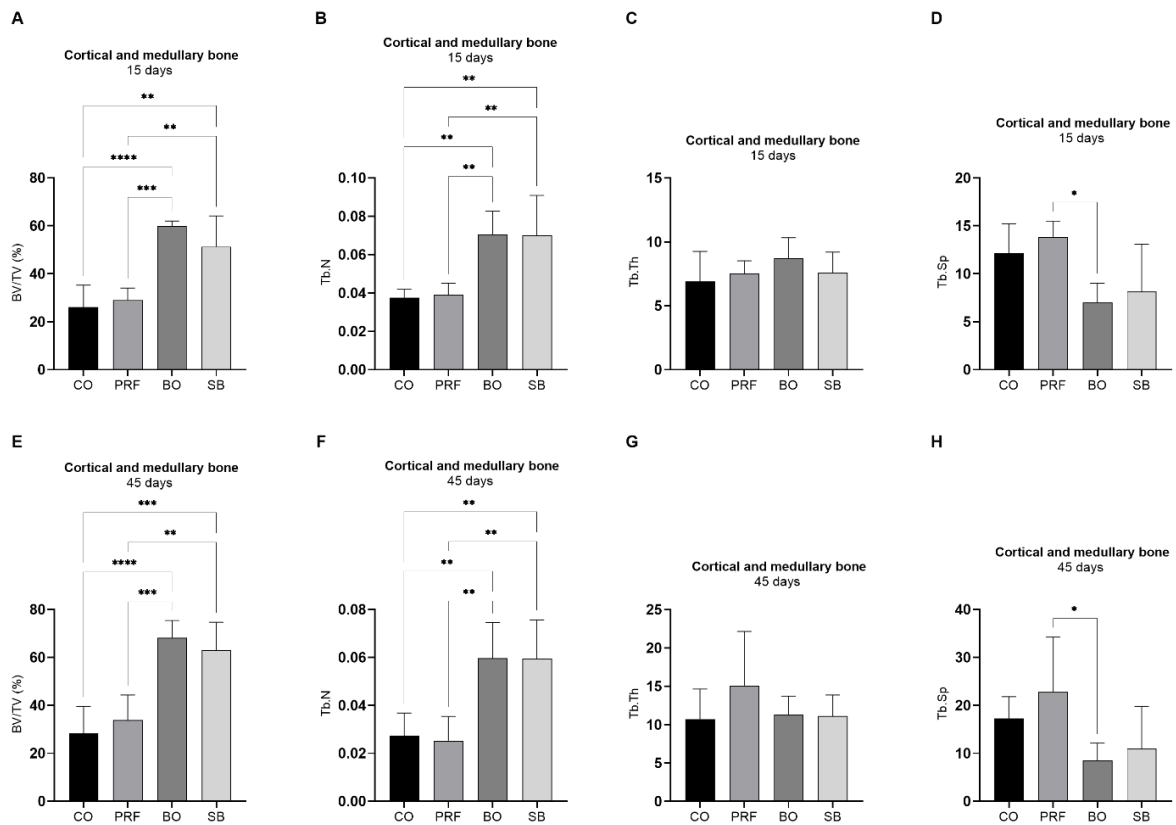


Figure 5: Micro-CT analyses conducted in the cortical and medullary defect area. A: % BV/TV (15 days). B: Trabeculae number (15 days). C: Trabecular thickness (15 days). D: Trabecular separation (15 days). E: % BV/TV (45 days). F: Trabeculae number (45 days). G: Trabecular thickness (45 days). H: Trabecular separation (45 days).

Descriptive histology

Figure 6 showed the histological aspect of the tibia defect for each group after 15 and 45 days. At 15 days, after the repair of the defect made in the tibia, the presence of newly formed bone was observed in all treatments. The bone trabeculae were immature, rich in osteocytes, and occupied the region of the defect from edge to edge; however, the volume of scar tissue varied depending on the material used. In general, no inflammatory infiltrate was observed (Figure 7). After a period of 45 days, the defect was completely closed in all groups, although the volume of bone tissue inside the defect varied. The bone tissue present was of the lamellar type (mature), vascularized, and covered by periosteum (Figure 8).

CO group

After 15 days of repair, newly formed bone was observed from edge to edge of the defect, however, the bone tissue had little volume, showing spaced bone trabeculae, with a

disorganized bone matrix rich in osteocytes. Active and inactive osteoblasts were observed on the trabeculae surface (Figure 7). After 45 days of repair, the presence of compact bone containing harvesian canals was observed. The bone thickness in the cortical area tended to be thinner in comparison to the original bone at the edges of the defect (Figure 8).

PRF group

In the defects treated with the PRF membrane, the bone healing progressed along the membrane but not inside the PRF clot. A mild inflammatory infiltrate was observed in some samples, as well as the presence of residual portions of the PRF membrane. The newly formed bone consisted of thin trabeculae, with a disorganized matrix, rich in osteocytes with active and inactive osteoblasts, as well as some osteoclasts on the bone surface (Figure 7). After 45 days of repair, compact and vascularized lamellar bone tissue was observed connecting the edges of the defect. This bone tissue tends to be thinner than the original bone. At this stage of the repair, no PRF membrane residue was observed in any sample (Figure 8).

BO group

In both periods of repair, it was possible to observe the presence of DBBM particles filling the bone defect. The presence of bone marrow was observed between the graft particles. At 15 days, newly formed immature bone with cuboidal osteoblasts on the bone surface was observed around graft particles, characterizing an active secretion of the bone matrix by osteoblasts (Figure 7). After 45 days, the bone tissue formed around the particles was thicker and had a lamellar appearance. Angiogenesis was observed inside numerous graft particles and a newly formed bone matrix around the blood capillaries was observed inside the graft particles. Concomitantly, some osteoclasts were observed in the region, indicating a process of remodeling and expansion of matrix formation in the defect region filled with DBBM particles (Figure 8).

SB group

After 15 days of repair, a thin layer of immature bone tissue around the SB particles was observed. The bone marrow occupied the space between the SB particles. Osteoblasts were present lining the bone surfaces, but they were more flattened (Figure 7). After 45 days, lamellar bone tissue was observed around the particles, as well as the presence of blood capillaries and bone matrix inside the SB particles. The bone tissue was mainly covered by flat-lining cells, characterizing osteoblasts with low protein synthesis activity (Figure 8).

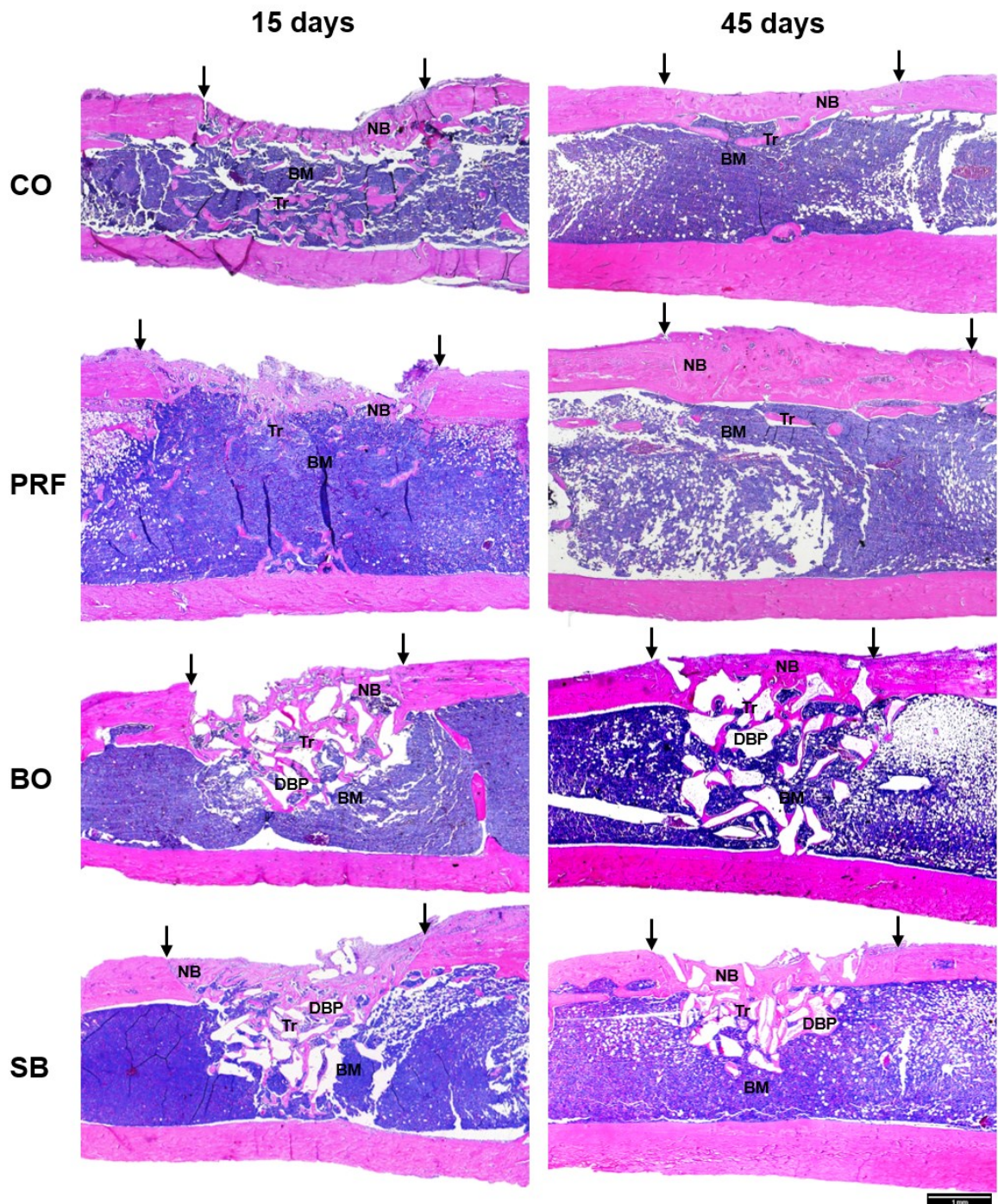


Figure 6: Representative images of histological sections for CO, PRF, BO, and SB groups after 15 and 45 days. Arrows: Defect edges; BM: Bone marrow; DBP: Deproteinized bone particle; NB: New bone; Tr: Bone trabeculae. Hematoxylin and eosin staining. 2.5x magnification.

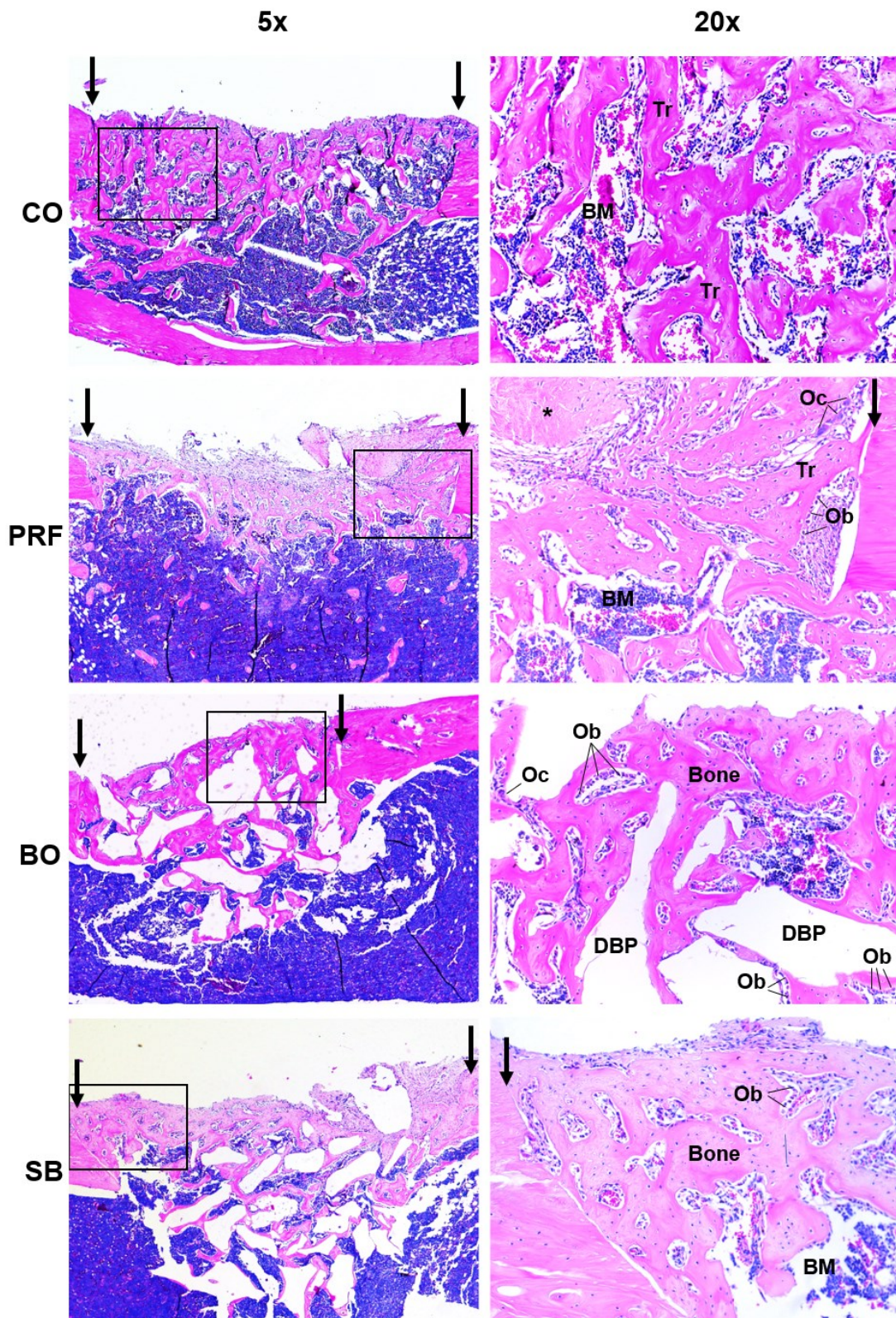


Figure 7: Representative images of histological sections for CO, PRF, BO, and SB groups after 15 days. Arrows: Defect edges; Asterisk: Residual PRF membrane; BM: Bone marrow; BV: Blood vessel; DBP: Deproteinized bone particle; Ob: Osteoblast; Oc: Osteoclast; Tr: Bone trabeculae. Hematoxylin and eosin staining. 5x and 20x magnification.

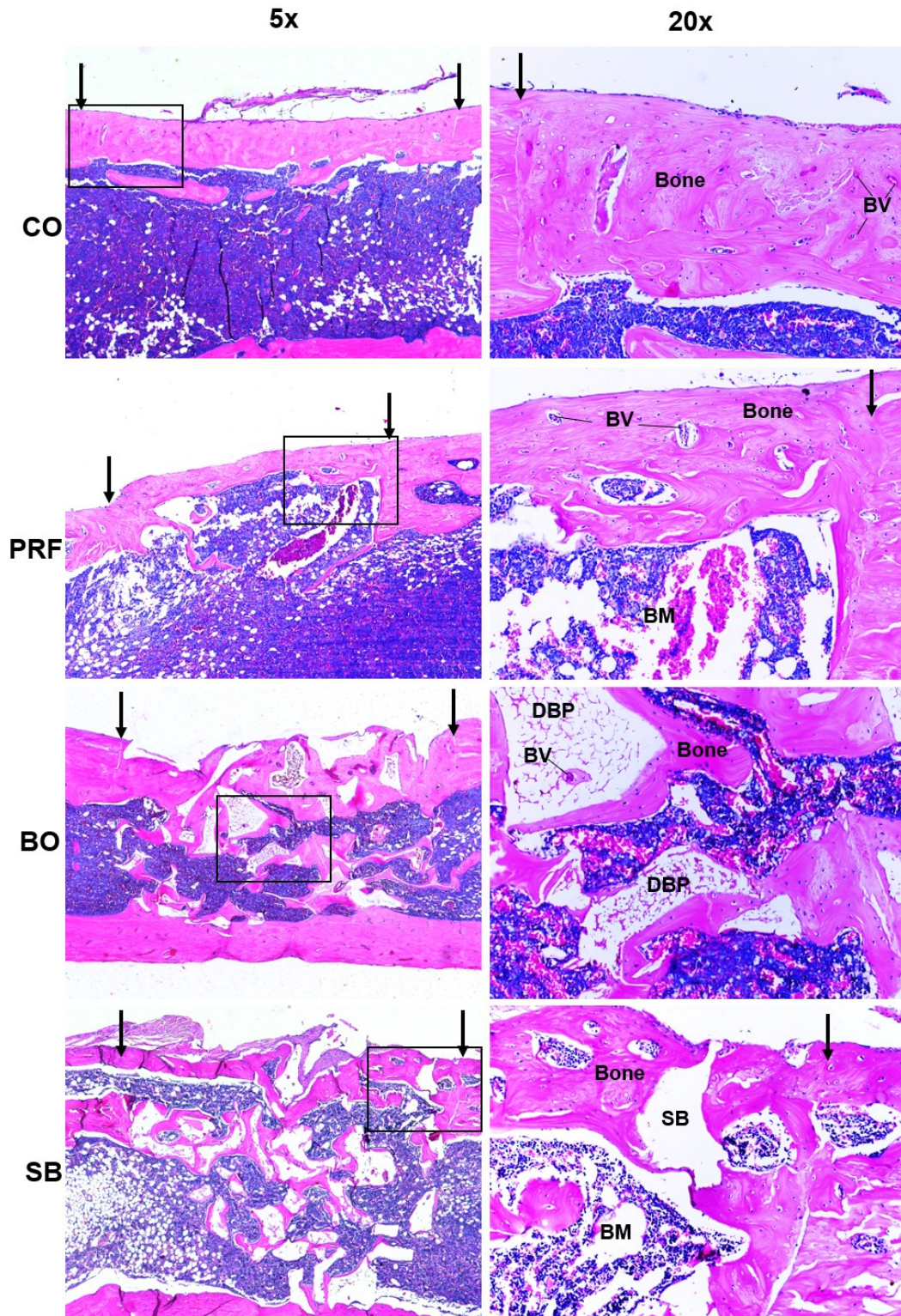


Figure 8: Representative images of histological sections for CO, PRF, BO, and SB groups after 45 days. Arrows: Defect edges; BM: Bone marrow; BV: Blood vessel; DBP: Deproteinized bone particle; Ob: Osteoblast; Oc: Osteoclast; Tr: Bone trabeculae. Hematoxylin and eosin staining. 5x and 20x magnification.

Histomorphometry analysis

Cortical defect area analyzes (ROI 1)

In the period of 15 days, the percentage of newly formed bone (BV/TV) was very similar among the groups [CO (43.24 ± 15.12), PRF (40.72 ± 8.02), BO (48.90 ± 10.82), SB (40.62 ± 15.24)] ($p > 0.05$) (Figure 9A). After 45 days, CO (74.22 ± 9.35) demonstrated a higher percentage of bone formation compared to the other groups [PRF (61.14 ± 12.37), BO (52.21 ± 6.97), SB (53.69 ± 6.19)] ($p < 0.05$) (Figure 9B). Intragroup analysis demonstrated more newformed bone after 45 days ($p < 0.05$) in the groups CO (43.24 vs 74.22) and PRF (40.72 vs 61.14), while BO (48.90 vs 52.21) and SB (40.62 vs 53.69) remained similar between the periods ($p > 0.05$). The percentage of residual graft particles (BV/TV) at 15 days did not exhibit significant differences among BO (32.89 ± 8.27) and SB (36.47 ± 17.71) groups (Figure 9E). After 45 days, more residual biomaterial particles were present in the BO (34.32 ± 5.91) group than in the SB (25.92 ± 6.96) group (Figure 9F). The intragroup analysis did not demonstrate significant differences between the periods in both groups ($p > 0.05$).

Cortical and medullary defect area analyzes (ROI 2)

Considering the full defect, BV/TV (%) were similar among all groups in both periods of analyses ($p > 0.05$) [15 days: CO (34.90 ± 5.34), PRF (38.81 ± 6.63), BO (36.91 ± 5.47), SB (40.09 ± 7.48); 45 days CO (38.07 ± 7.24), PRF (42.83 ± 8.53), BO (39.09 ± 4.85), SB (45.83 ± 8.53)] (Figures 9C and 9D). Residual graft particles analyses (BV/TV) at 15 and 45 days were, again, very similar among the groups ($p > 0.05$) [15 days: BO (30.32 ± 5.28), SB (29.10 ± 10.21); 45 days: BO (34.83 ± 4.85); SB (34.20 ± 3.52)] (Figures 9G and 9H). The intragroup analysis did not demonstrate significant differences between the periods in any of the groups or analyses of newly formed bone and residual graft particles ($p > 0.05$).

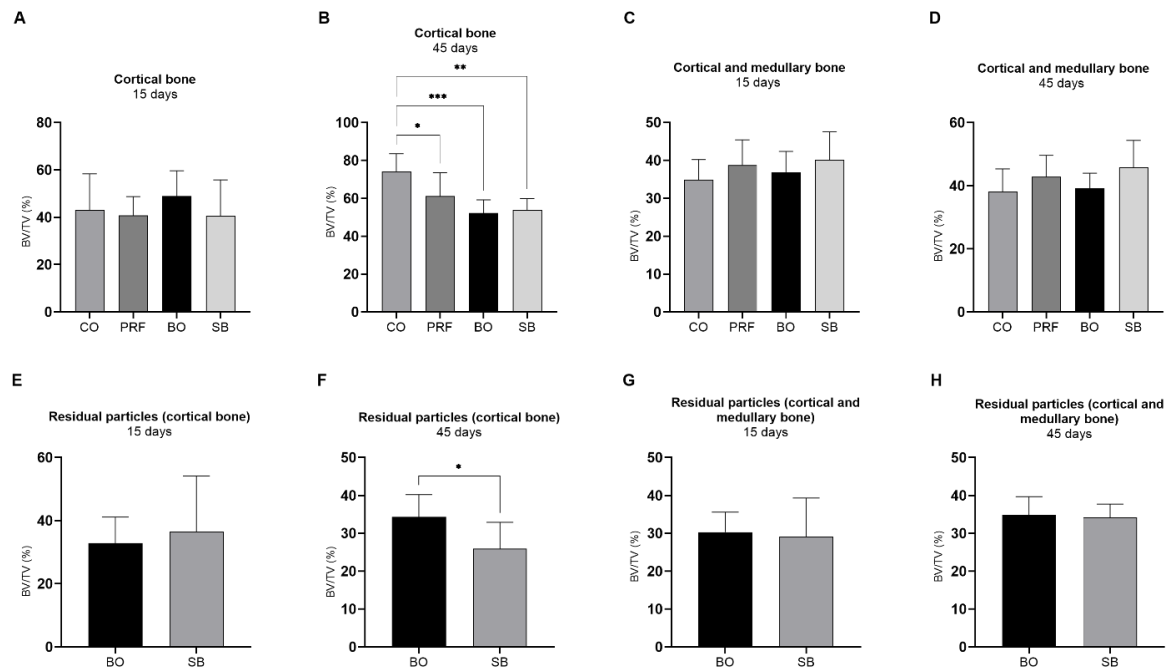


Figure 9: Histomorphometry analysis. A-B: Cortical bone % BV/TV (15 and 45 days). C-D: Cortical and medullary bone % BV/TV (15 and 45 days). E-F: Cortical bone % residual particles (15 and 45 days). G-H: Cortical and medullary bone % residual particles (15 and 45 days).

Bone molecular markers expression (RT-qPCR)

The analysis of the expression of the *Alpl*, *Bglap*, and *Runx2* genes was carried out in the period of 15 days. For the *Alpl* gene, significantly higher levels were observed in the BO group (531.0 ± 393.1) compared to the SB (30.58 ± 30.52) group ($p < 0.05$) (Figure 10A). Furthermore, higher gene expression was observed in the BO (531.0 ± 393.1) and PRF (241.3 ± 258.7) groups, and lower levels of the *Alpl* gene were observed in the CO (102.7 ± 112.1) and SB (30.58 ± 30.52) groups, but without significant difference between groups (Figure 10A).

Similarly, higher gene expression was observed in the BO group (15.646 ± 11.274) compared to the SB (1.617 ± 2.132) for the *Bglap* gene ($p < 0.05$) (Figure 10B). The BO (15.646 ± 11.274) and PRF (9.085 ± 11.537) groups had higher levels of the *Bglap* gene, while lower gene expression was observed in the CO (5.207 ± 6.033) and SB (1.617 ± 2.132) groups, with no significant difference between the groups (Figure 10B).

The same gene expression pattern was also observed for the *Runx2* gene. Higher *Runx2* levels were observed in the BO group (151.1 ± 101.6) compared to the SB (20.01 ± 25.50) group ($p < 0.05$) (Figure 10C). Higher *Runx2* levels were observed for the BO (151.1 ± 101.6)

and PRF (132.9 ± 132.5) groups, while lower levels were observed for the CO (91.03 ± 82.3) and SB (20.01 ± 25.50) groups, with no significant difference between the groups (Figure 10C).

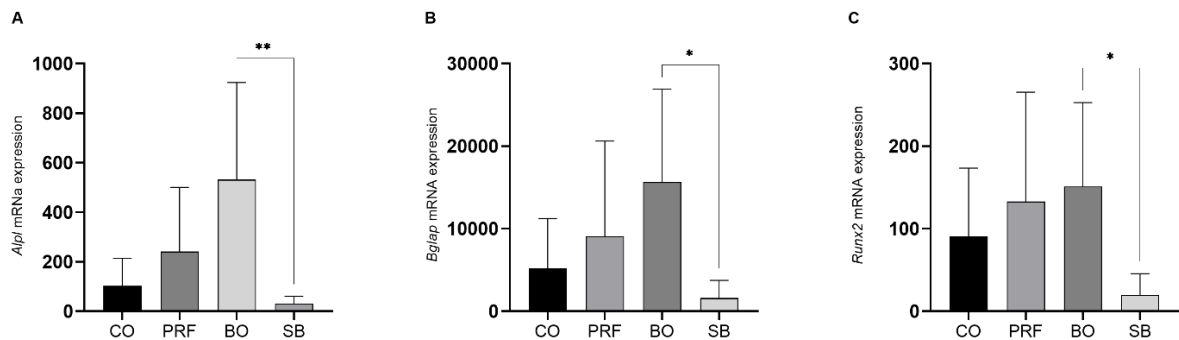


Figure 10: Bone molecular markers expression (15 days). A: *Alpl*. B: *Bglap*. C: *Runx2*.

Discussion

This study produced insights about the use of modified protocols for obtaining PRF by a low-speed concept which has been associated with more concentration of growth factors and better results than standard PRF protocol [29, 30]. It is also noteworthy that, to the authors' best knowledge, this is the first pre-clinical study that evaluates the efficacy of PRF membranes produced by the Fibrin Protocol [24] on bone repair. In addition, the association of i-PRF and DBBM in non-critical size bone defects created in rat tibiae was also first investigated.

The scientific rationale for the use of PRF preparations is that both platelets and leukocytes are a reservoir of many growth factors, adhesion molecules, and pro- and anti-inflammatory cytokines that play essential roles in hard and soft tissue repair mechanisms [31]. By the slow- and long-term secretion of these mediators, PRF is able to stimulate cell migration and proliferation of different cell lines, including bone cells [32-34]. In addition, the use of PRF includes clinical advantages such as low cost when compared to bone substitute materials, as well as the facility of obtention and lack of biochemical handling of blood that makes this preparation strictly autologous [8]. However, as the results from this study demonstrated, the potential of PRF membranes, as a filling material, remains controversial [35-41].

In the present study, cortical analyses by μ CT performed during 15 and 45 days showed superior results in the percentage of bone formation and cortical thickness in PRF membrane

obtained by Protocol Fibrin in comparison to the control group. Previous studies also described superior bone formation in calvaria bone defects filled with standard PRF membrane compared to blood clot [35, 40]. In addition, To, Su, Hidaka, Okudera and Matsuo [37] also showed superior bone formation in dogs sockets filled with A-PRF membrane (200g for 8 min) in comparison to the blood clot. However, other pre-clinical studies reported no additional effect of standard membrane PRF in critical defects bone formation [36, 38, 39, 41].

Comparably, analyses conducted in the cortical and medullary areas demonstrated similar results to those defects filled with blood clot/spontaneous healing (CO). Moreover, the same group exhibited the highest trabeculae bone separation among the groups, indicating the formation of a more medullary bone. Faot, Deprez, Vandamme, Camargos, Pinto, Wouters, van den Oord, Quirynen and Duyck [8] also reported similar findings regarding the reduction of trabecular connectivity (Tb.Pf) during early bone healing periods in tibiae of rabbits treated with standard PRF membranes. The fact of PRF had a limited effect on bone repair can be associated with the significant decrease of release growth factors, such as TGF- β 1, and PDGF, after 3, 7, and 14 days, which does not seem to be long enough to stimulate the bone defect environment [41, 42]. Moreover, the histological description of PRF group samples showed that bone healing occurs along the membrane but not inside the PRF clot. It's can suggest that the high density of PRF seems to block cell penetration as described previously by Knapen, Gheldof, Drion, Layrolle, Rompen and Lambert [41].

The isolated use of PRF exhibited comparable results with BO and SB groups for bone formation and cortical thickness (evaluated by μ CT) in early periods. However, the addition of a DBBM seems to promote more new bone formation in later periods. Similar results were also reported in previous studies [36, 38, 41]. This finding could be explained by considering the degradation rate of PRF membranes. While PRF clot can be quickly degraded, DBBM particles demonstrate slow resorption acting as a support for the cell's migration and new blood vessel formation during bone regeneration [43].

Regarding cortical and medullary bone areas, also analyzed by μ CT (without excluding the DBBM graft particles), the BO and SB groups promoted higher bone formation with higher number of trabeculae (Tb.N) and less trabeculae space (Tb.Sp) in comparison to CO and PRF group after 15 and 45 days. Its results can be associated with the porous structure of the bone graft particles. A more trabecular structure is advantageous because the trabecular structure provides a rigid framework, and forms a good basis for further calcification [8]. Conversely, in histomorphometry analyses considering cortical and cortical/medullary bone

areas, CO exhibited a higher percentage of bone formation in the cortical area in comparison to all experimental groups after 45 days, which was expected considering that total bone healing is predictable to occur in non-critical sized defects [44].

DBBM acts providing support for cell migration and the development of lamellar bone [35]. The preexisting osteoblasts from the adjacent bone migrate to the DBBM particle pores and synthesized the osteoid matrix [35]. Similar to the present study, other histological studies have already reported a neoformed bone area around its particles, supporting its wide use for bone augmentation [45-49]. However, one of the main disadvantages of DBBM graft is the very slow and incomplete reabsorption of its particles, which results in a large volume of the graft that cannot be substituted by new bone [50]. In the present study, both μ CT and histomorphometry analyses showed the presence of residual particles inside the defect area for both BO and SB groups.

The addition of bioactive materials has been extensively proposed to improve the osteoinductive properties of the DBBM graft [35, 36, 38-41, 51, 52]. Studies evaluating the DBBM graft mixed with PRF membrane obtained by standard protocol showed superior bone formation in comparison to DBBM or PRF alone in calvaria [35], tibia [39], and femur [52] bone defects. However, other studies in calvaria [36, 40, 41, 51] or tibia [38] defects reported that DBBM mixed with PRF did not provide any additional effect on bone formation in comparison to DBBM alone.

In the present study, the addition of the PRF obtained by low-speed concept in injectable form (i-PRF) to DBBM bone, did not seem to enhance the bone formation in comparison to DBBM alone in both μ CT and histomorphometry analyses. The standard i-PRF centrifugation protocol described in the literature is 700 rpm for 3 min (60 g) [30], however, in a more recent study [25], an even lower RCF concept is described [700 rpm for 8 min (44 g)]. In this case, the lower-speed centrifugation concept developed in rodents, reports higher concentration and release of regenerative cells and growth factors than higher RCF protocols, instigating its investigation.

The association between i-PRF and DBBM (SB) was proposed by clinicians to promote an agglomeration or coating of graft particles to enhance wound healing [53]. Clinically, i-PRF maintains the particulate bone together without the need for an additional membrane for graft particle stabilization [54]. Moreover, *in vitro* studies showed that i-PRF induced the mobilization and growth of bone regenerative cells [19] and significantly increased human gingival fibroblast cell migration, proliferation, and spreading [17]. Furthermore, i-PRF on titanium surfaces promoted the release of pro-wound healing growth factors PDGF and TGF,

as well as collagen synthesis [17]. Also, a previous study has shown that i-PRF continuously released growth factors for 14 days [19]. Boia, Soares, Passos, Neves, Mariano and Ribeiro Junior [55] showed a tendency for more bone formation in i-PRF plus DBBM in comparison to the DBBM group alone in critical-size defects.

The bone molecular markers, such as *Alpl*, *Bblap*, and *Runx2* genes, are indicators of osteoblastic differentiation and bone formation/remodeling. In addition, these biomarkers can influence multiple pathways that are involved in the repair process. In the present study, the RT-PCR analysis of these molecular markers was made in order to identify early modifications in gene expression when the biomaterials investigated are used. The results showed that the DBBM group, followed by the PRF group, promoted higher biomarkers expression (by RT-qPCR) in comparison to the other investigated groups after 15 days, confirming the osteoinductive potential of these materials reported in previous immunofluorescence examinations [35, 37]. Conversely, the i-PRF application resulted in significantly lower expression of all biomarkers after 15 days. Associated with that, the bone tissue in the SB group was mainly covered by flat-lining cells, characterizing osteoblasts with low protein synthesis activity. Our results support the previous findings of Faot, Deprez, Vandamme, Camargos, Pinto, Wouters, van den Oord, Quirynen and Duyck [8] in which the PRF reduced the *Runx2* and *Vegfa* gene expression after 14 days.

It is hypnotized by some researchers that the healing process in the PRF-treated group was already in an advanced phase, requiring fewer biomarkers [56, 57]. Other authors suggested that the growth factors released from PRF matrices are already at the needed level locally and no additional production would be necessary by the host tissue [58, 59]. Previous studies investigating recombinant growth factors [58, 59] have shown that the dose or release kinetics themselves might inhibit bone formation. However, it is important to consider that, in the present study, the lower levels of biomarkers expression appear not to affect the percentage of bone formation obtained after 15 and 45 days in the SB group. Therefore, the SB efficacy investigation by other study models can be encouraged since a previous study suggested that the addition of i-PRF in the particulate bone graft material can increase the biomaterial stability, mainly in case of extensive bone defects that the handling of bone grafts for bone augmentation can become a challenge [60]. However, this higher biomaterial stability was not evaluated/confirmed yet. So, future studies using other animal models and investigating the interference of diseases and conditions that affect bone healing are encouraged.

Some limitations of this study should be considered for data interpretation and the conduction of new investigations. Firstly, the method used for blood collection, i.e., cardiac puncture, is a non-survival method, making unfeasible the obtention of an autologous material; therefore, donor rats were used for PRF membrane and i-PRF confection in this study. Similarly, Oliveira, de, Ferreira, Avelino, Garcia and Mariano [36] compared the autogenous and homogeneous PRF in critical-size rat bone defects, and no differences in bone formation between both PRF sources were observed. Second, the total bone repair of the non-critical defect model is an expected outcome that can limit the effect of biomaterials evaluated in the present study. Third, the i-PRF effect in biomarkers expression was not investigated after 15 days and we cannot determine whether this trend continues past 15 days. Finally, the protein levels of the investigated growth factors were not possible due to the limited availability of sample tissue.

Conclusion

In conclusion, the isolated use of OBD resulted in greater bone formation and expression of molecular markers compared to the PRF and CO groups in non-critical bone defects. Furthermore, the addition of i-PRF to OBD did not increase its bone formation potential in the performed analyses.

Acknowledgement

We would like to thank Professor Priscilla Barbosa Ferreira Soares and the doctoral student Tassio Edno Atanasio Pitorro from Federal University of Uberlândia for their collaboration in scanning and microtomographic analysis.

Funding

We declare the support received from the following funding agencies: CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level or Education Personnel; master's scholarship), and FAPEMIG (Foundation for Research Support of Minas Gerais; Grant number: 48670549/2022).

Compliance with ethical standards

Competing interests

The authors hereby certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in this manuscript.

Ethical approval

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) under protocol number 0015/2021.

Informed consent

For this type of study, formal consent is not required.

References

1. Anwandter A, Bohmann S, Nally M, Castro AB, Quirynen M and Pinto N (2016) Dimensional changes of the post extraction alveolar ridge, preserved with Leukocyte- and Platelet Rich Fibrin: A clinical pilot study. *J Dent* 52:23-9. doi: 10.1016/j.jdent.2016.06.005
2. Chen ST and Darby I (2016) The relationship between facial bone wall defects and dimensional alterations of the ridge following flapless tooth extraction in the anterior maxilla. *Clin Oral Implants Res* 28:931-937. doi: 10.1111/clr.12899
3. Kumar NG, Chaudhary R, Kumar I, Arora SS, Kumar N and Singh H (2018) To assess the efficacy of socket plug technique using platelet rich fibrin with or without the use of bone substitute in alveolar ridge preservation: a prospective randomised controlled study. *Oral Maxillofac Surg* 22:135-142. doi: 10.1007/s10006-018-0680-3
4. Guillaume B (2016) Dental implants: A review. *Morphologie* 100:189-198. doi: 10.1016/j.morpho.2016.02.002
5. De Angelis P, De Angelis S, Passarelli PC, Liguori MG, Manicone PF and D'Addona A (2019) Hard and Soft Tissue Evaluation of Different Socket Preservation Procedures Using Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin: A Retrospective Clinical and Volumetric Analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 77:1807-1815. doi: 10.1016/j.joms.2019.05.004
6. Pan J, Xu Q, Hou J, Wu Y, Liu Y, Li R, Pan Y and Zhang D (2019) Effect of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation: A systematic review. *J Am Dent Assoc* 150:766-778. doi: 10.1016/j.adaj.2019.04.025
7. Garcia-Gonzalez S, Galve-Huertas A, Aboul-Hosn Centenero S, Mareque-Bueno S, Satorres-Nieto M and Hernandez-Alfaro F (2020) Volumetric changes in alveolar ridge preservation

- with a compromised buccal wall: a systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 25:e565-e575. doi: 10.4317/medoral.23451
8. Faot F, Deprez S, Vandamme K, Camargos GV, Pinto N, Wouters J, van den Oord J, Quirynen M and Duyck J (2017) The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defects: micro-CT and biomarker results. *Sci Rep* 7:46452. doi: 10.1038/srep46452
 9. Zumaran CC, Parra MV, Olate SA, Fernandez EG, Munoz FT and Haidar ZS (2018) The 3 R's for Platelet-Rich Fibrin: A "Super" Tri-Dimensional Biomaterial for Contemporary Naturally-Guided Oro-Maxillo-Facial Soft and Hard Tissue Repair, Reconstruction and Regeneration. *Materials (Basel)* 11. doi: 10.3390/ma11081293
 10. Stumbras A, Galindo-Moreno P, Januzis G and Juodzbaly G (2021) Three-dimensional analysis of dimensional changes after alveolar ridge preservation with bone substitutes or plasma rich in growth factors: Randomized and controlled clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 23:96-106. doi: 10.1111/cid.12950
 11. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J and Charrier JB (2010) Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol* 81:546-55. doi: 10.1902/jop.2009.090531
 12. Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, Schwarz F, Choukroun J and Sader R (2018) Fifteen Years of Platelet Rich Fibrin in Dentistry and Oromaxillofacial Surgery: How High is the Level of Scientific Evidence? *J Oral Implantol* 44:471-492. doi: 10.1563/aaid-joi-D-17-00179
 13. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM and Quirynen M (2018) Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets* 29:468-475. doi: 10.1080/09537104.2017.1327654
 14. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jimenez P, Corso MD, Kang BS, Nally M, Lanata N, Wang HL and Quirynen M (2018) The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets* 29:171-184. doi: 10.1080/09537104.2017.1293812
 15. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J and Gogly B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:e45-50. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.009

16. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J and Gogly B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:e37-44. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.008
17. Wang X, Yang Y, Zhang Y and Miron RJ (2019) Fluid platelet-rich fibrin stimulates greater dermal skin fibroblast cell migration, proliferation, and collagen synthesis when compared to platelet-rich plasma. *J Cosmet Dermatol* 18:2004-2010. doi: 10.1111/jocd.12955
18. Mourao CF, Valiense H, Melo ER, Mourao NB and Maia MD (2015) Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir* 42:421-3. doi: 10.1590/0100-69912015006013
19. Thanasrisuebwong P, Kiattavorncharoen S, Surarit R, Phruksaniyom C and Ruangsawasdi N (2020) Red and Yellow Injectable Platelet-Rich Fibrin Demonstrated Differential Effects on Periodontal Ligament Stem Cell Proliferation, Migration, and Osteogenic Differentiation. *Int J Mol Sci* 21. doi: 10.3390/ijms21145153
20. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S and Miron RJ (2017) Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. *Int J Mol Sci* 18. doi: 10.3390/ijms18020331
21. Ribeiro de Albuquerque Boia J, Ferreira Soares L, Passos G, dos Santos Neves J, Célio Mariano R and Junior Vital Ribeiro N (2022) Histological and histomorphometrical evaluation of two types of bone substitutes in combination with i-PRF for bone regeneration in critical bone defects: An in vivo study. *J Osseointegr* 14:217-225.
22. Al-Subaie AE, Laurenti M, Abdallah MN, Tamimi I, Yaghoubi F, Eimar H, Makhoul N and Tamimi F (2016) Propranolol enhances bone healing and implant osseointegration in rats tibiae. *J Clin Periodontol* 43:1160-1170. doi: 10.1111/jcpe.12632
23. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthi I, Emerson M and Altman DG (2012) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Vet Clin Pathol* 41:27-31. doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.00418.x
24. de Oliveira LA, Buzzi M, Leão MP, de Andrade PCAR and Kuckelhaus SAS (2018) Caracterização morfológica ultraestrutural da matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga em associação com biomateriais xenógeno e aloplástico para enxertia óssea. *Protocolo Fibrin®. REVISTA CATARINENSE DE IMPLANTODONTIA* 18:25-33.
25. Ghanaati S, Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C, Alves GG, Calasans-Maia MD, Sader R, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Bonig H and Mourao C (2018) A Proof of the Low Speed

- Centrifugation Concept in Rodents: New Perspectives for In Vivo Research. *Tissue Eng Part C Methods* 24:659-670. doi: 10.1089/ten.TEC.2018.0236
26. de Paula LGF, Lopes de Oliveira GJP, Pinotti FE, Grecchi BB, de Aquino SG and Chierici Marcantonio RA (2018) Effect of Avocado/Soybean Unsaponifiables (ASU) on Osseointegration in Rats with Experimental Arthritis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 33:603-612. doi: 10.11607/jomi.6124
 27. de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Pinotti FE, Marcantonio E, Jr. and Marcantonio RAC (2020) Low-level laser therapy (LLLT) in sites grafted with osteoconductive bone substitutes improves osseointegration. *Lasers Med Sci* 35:1519-1529. doi: 10.1007/s10103-019-02943-w
 28. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ and Muller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25:1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141
 29. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y and Choukroun J (2017) Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol* 88:112-121. doi: 10.1902/jop.2016.160443
 30. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S and Choukroun J (2017) Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig* 21:2619-2627. doi: 10.1007/s00784-017-2063-9
 31. Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B and Miron RJ (2016) Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig* 20:2353-2360. doi: 10.1007/s00784-016-1719-1
 32. Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, Landes C, Sader R, Kirkpatrick C and Choukroun J (2014) Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 40:679-89. doi: 10.1563/aaid-joi-D-14-00138
 33. Ge J, Yang C, Wang Y, Zheng J, Hua H and Zhu J (2018) Comparison of different grafting materials for treatment of bone defect distal to the molar in canine. *Clin Implant Dent Relat Res* 20:444-454. doi: 10.1111/cid.12603
 34. Giachelli CM, Scatena M and Wada T (1997) Osteopontin: Potential roles in vascular function and dystrophic calcification. *J Bone Miner Metab* 15:179-183.
 35. do Lago ES, Ferreira S, Garcia IR, Jr., Okamoto R and Mariano RC (2019) Improvement of bone repair with i-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and

- immunohistochemical study. *Clin Oral Investig* 24:1637-1650. doi: 10.1007/s00784-019-03018-4
36. Oliveira MR, de CSA, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Jr. and Mariano RC (2014) 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* 44:649-55. doi: 10.1016/j.ijom.2014.12.005
 37. To M, Su CY, Hidaka K, Okudera T and Matsuo M (2019) Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. *Anat Sci Int* 94:238-244. doi: 10.1007/s12565-019-00479-1
 38. Rezuc A, Saavedra C, Maass R, Poblete C and Nappe C (2020) Histological comparison of DBBM and platelet rich fibrin for guided bone regeneration in a rabbit model. *J Oral Biol Craniofac Res* 10:287-293. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.05.001
 39. Ondur E, Bolukbasi Balcioglu N, Soluk Tekkesin M, Guzel O and Ersanli S (2020) Effects of Platelet-Rich Fibrin on Hard Tissue Healing: A Histomorphometric Crossover Trial in Sheep. *Materials (Basel)* 13. doi: 10.3390/ma13071695
 40. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S and Phurisat K (2013) The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg* 41:e191-200. doi: 10.1016/j.jcms.2013.01.018
 41. Knapen M, Gheldof D, Drion P, Layrolle P, Rompen E and Lambert F (2015) Effect of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) on bone regeneration: a study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* 17 Suppl 1:e143-52. doi: 10.1111/cid.12146
 42. Taysi M, Atalay B, Cankaya B and Yildirim S (2018) Effects of single- and double-layered resorbable membranes and platelet-rich fibrin on bone healing. *Clin Oral Investig* 22:1689-1695. doi: 10.1007/s00784-017-2259-z
 43. Engler-Pinto A, Siessere S, Calefi A, Oliveira L, Ervolino E, de Souza S, Furlaneto F and Messori MR (2019) Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. *Clin Oral Implants Res* 30:962-976. doi: 10.1111/clr.13503
 44. Bigham-Sadegh A and Oryan A (2015) Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Res* 56:175-94. doi: 10.3109/03008207.2015.1027341
 45. Mladenovic Z, Sahlin-Platt A, Andersson B, Johansson A, Bjorn E and Ransjo M (2013) In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. *Clin Oral Implants Res* 24:329-35. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02334.x

46. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H and Holmstrup P (2012) 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* 41:114-20. doi: 10.1016/j.ijom.2011.08.010
47. Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Mesa F, Aguilar M, Wang HL and O'Valle F (2010) Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res* 21:122-8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01814.x
48. Dahlin C, Simion M and Hatano N (2010) Long-term follow-up on soft and hard tissue levels following guided bone regeneration treatment in combination with a xenogeneic filling material: a 5-year prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res* 12:263-70. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00163.x
49. Orsini G, Traini T, Scarano A, Degidi M, Perrotti V, Piccirilli M and Piattelli A (2005) Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74:448-57. doi: 10.1002/jbm.b.30196
50. Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB and Albrektsson T (2010) Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res* 21:961-70. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01939.x
51. Yoon JS, Lee SH and Yoon HJ (2014) The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects. *J Craniomaxillofac Surg* 42:1071-7. doi: 10.1016/j.jcms.2014.01.034
52. You J-S, Kim S-G, Oh J-S and Kim J-S (2019) Effects of Platelet-Derived Material (Platelet-Rich Fibrin) on Bone Regeneration. *Implant Dentistry* 28:244-255. doi: 10.1097/id.0000000000000877
53. Sanz-Sanchez I, Ortiz-Vigon A, Sanz-Martin I, Figuero E and Sanz M (2015) Effectiveness of Lateral Bone Augmentation on the Alveolar Crest Dimension: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res* 94:128S-42S. doi: 10.1177/0022034515594780
54. Kökdere NN, Baykul T and Findik Y (2015) The use of platelet-rich fibrin (PRF) and PRF-mixed particulated autogenous bone graft in the treatment of bone defects: An experimental and histomorphometrical study. *Dental Research Journal* 12:418-24.
55. Boia JRA, Soares LFF, Passos GP, Neves JS, Mariano RC and Ribeiro Junior NV (2022) Histological and histomorphometrical evaluation of two types of bone substitutes in

- combination with i-PRF for bone regeneration in critical bone defects: An in vivo study. *J Osseointegr* 14:1-9. doi: 10.23805/JO.2022.14.33
56. Zhang YG, Yang Z, Zhang H, Liu M, Qiu Y and Guo X (2013) Negative pressure technology enhances bone regeneration in rabbit skull defects. *BMC Musculoskelet Disord* 14:76. doi: 10.1186/1471-2474-14-76
57. Li Z, Liao W, Zhao Q, Liu M, Xia W, Yang Y and Shao N (2013) Angiogenesis and bone regeneration by allogeneic mesenchymal stem cell intravenous transplantation in rabbit model of avascular necrotic femoral head. *J Surg Res* 183:193-203. doi: 10.1016/j.jss.2012.11.031
58. Bai Y, Yin G, Huang Z, Liao X, Chen X, Yao Y and Pu X (2013) Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *Int Immunopharmacol* 16:214-23. doi: 10.1016/j.intimp.2013.04.001
59. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF and Schipper IB (2011) Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 35:1271-80. doi: 10.1007/s00264-011-1301-z
60. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Araujo RF, Jr., Vasconcelos RC, Cavalcante RS, Guedes PM and Araujo AA (2019) Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig* 23:1309-1318. doi: 10.1007/s00784-018-2555-2

REFERÊNCIAS

- AL-SUBAIE, A. E. *et al.* Propranolol enhances bone healing and implant osseointegration in rats tibiae. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 12, p. 1160-1170, 2016.
- ALZHRANI, A. A.; MURRIKY, A.; SHAFIK, S. Influence of platelet rich fibrin on post-extraction socket healing: A clinical and radiographic study. **Saudi Dent J**, v. 29, n. 4, p. 149-155, 2017.
- ANWANDTER, A. *et al.* Dimensional changes of the post extraction alveolar ridge, preserved with Leukocyte- and Platelet Rich Fibrin: A clinical pilot study. **J Dent**, v. 52, p. 23-9, 2016.
- ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, p. 212-8, 2005.
- _____. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: an experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 6, p. 545-9, 2009.
- AREEWONG, K.; CHANTARAMUNGKORN, M.; KHONGKHUNTHIAN, P. Platelet-rich fibrin to preserve alveolar bone sockets following tooth extraction: A randomized controlled trial. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 21, n. 6, p. 1156-1163, 2019.
- ARTAS, G. *et al.* A comparison of different bone graft materials in peri-implant guided bone regeneration. **Braz Oral Res**, v. 32, p. e59, 2018.
- BARONE, A. *et al.* A randomized clinical trial to evaluate and compare implants placed in augmented versus non-augmented extraction sockets: 3-year results. **J Periodontol**, v. 83, n. 7, p. 836-46, 2012.
- BIELECKI, T. *et al.* The Role of Leukocytes from L-PRP/L-PRF in Wound Healing and Immune Defense: New Perspectives. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1153-1162, 2012.
- BOIA, J. R. A. *et al.* Histological and histomorphometrical evaluation of two types of bone substitutes in combination with i-PRF for bone regeneration in critical bone defects: An in vivo study. **J Osseointegr**, v. 14, n. 4, p. 1-9, 2022.
- BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 7, p. 1468-86, 2010.
- BROUWERS, J. *et al.* Implant stability in patients treated with platelet-rich fibrin and bovine bone substitute for alveolar ridge preservation is associated with peripheral blood cells and coagulation factors. **Clin Exp Dent Res**, v. 6, n. 2, p. 236-243, 2019.
- BUSER, D. *et al.* Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analyses of a prospective multi center study with 2359 implants. **Clin Oral Impl Res**, v. 8, p. 161-172, 1997.
- CELOTTI, F. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts: role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. **Wound Repair Regen**, v. 14, n. 2, p. 195-202, 2006.

- CHAPPUIS, V.; ARAÚJO, M. G.; BUSER, D. Clinical relevance of dimensional bone and soft tissue alterations post-extraction in esthetic sites. **Periodontology** 2000, v. 73, p. 73-83, 2017.
- CHEN, S. T.; DARBY, I. The relationship between facial bone wall defects and dimensional alterations of the ridge following flapless tooth extraction in the anterior maxilla. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 8, p. 931-937, 2016.
- CHO, S. A. *et al.* The bone integration effects of platelet-rich fibrin by removal torque of titanium screw in rabbit tibia. **Platelets**, v. 25, n. 8, p. 562-6, 2014.
- CHOUKROUN, J. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. e56-60, 2006.
- CLARK, D. *et al.* Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 89, n. 4, p. 379-387, 2018.
- COMERT KILIC, S.; GUNGORMUS, M.; PARLAK, S. N. Histologic and histomorphometric assessment of sinus-floor augmentation with beta-tricalcium phosphate alone or in combination with pure-platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin: A randomized clinical trial. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 19, n. 5, p. 959-967, 2017.
- CORTELLINI, S. *et al.* Leucocyte- and platelet-rich fibrin block for bone augmentation procedure: A proof-of-concept study. **J Clin Periodontol**, v. 45, n. 5, p. 624-634, 2018.
- DAHLIN, C.; SIMION, M.; HATANO, N. Long-term follow-up on soft and hard tissue levels following guided bone regeneration treatment in combination with a xenogeneic filling material: a 5-year prospective clinical study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 12, n. 4, p. 263-70, 2010.
- DE ANGELIS, P. *et al.* Hard and Soft Tissue Evaluation of Different Socket Preservation Procedures Using Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin: A Retrospective Clinical and Volumetric Analysis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 77, n. 9, p. 1807-1815, 2019.
- DE OLIVEIRA, G. J. P. L. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) in sites grafted with osteoconductive bone substitutes improves osseointegration. **Lasers Med Sci**, v. 35, n. 7, p. 1519-1529, 2020.
- DE OLIVEIRA, L. A. *et al.* Cell and platelet composition assays by flow cytometry: basis for new platelet-rich fibrin methodologies. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 34, n. 4, p. 1379-1390, 2020.
- DE PAULA, L. G. F. *et al.* Effect of Avocado/Soybean Unsaponifiables (ASU) on Osseointegration in Rats with Experimental Arthritis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 33, n. 3, p. 603-612, 2018.
- DO LAGO, E. S. *et al.* Improvement of bone repair with l-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. **Clin Oral Investig**, v. 24, n. 5, p. 1637-1650, 2019.
- DOHAN, D. M. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. e37-44, 2006a.

_____. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. e45-50, 2006b.

_____. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. e51-5, 2006c.

DOHAN EHRENFEST, D. M. *et al.* Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. **Growth Factors**, v. 27, n. 1, p. 63-9, 2009.

DOHAN EHRENFEST, D. M. *et al.* Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. **J Periodontol**, v. 81, n. 4, p. 546-55, 2010.

DOHAN EHRENFEST, D. M. *et al.* The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. **Platelets**, v. 29, n. 2, p. 171-184, 2018.

FAOT, F. *et al.* The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defects: micro-CT and biomarker results. **Sci Rep**, v. 7, p. 46452, 2017.

FICKL, S. *et al.* Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 11, p. 1111-8, 2008.

FICKL, S. *et al.* Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 10, p. 906-13, 2008.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M. *et al.* Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. **J Periodontol**, v. 88, n. 1, p. 112-121, 2017.

GALINDO-MORENO, P. *et al.* Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 122-8, 2010.

GARCIA-GARETA, E.; COATHUP, M. J.; BLUNN, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112-121, 2015.

GARCIA-GONZALEZ, S. *et al.* Volumetric changes in alveolar ridge preservation with a compromised buccal wall: a systematic review and meta-analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 25, n. 5, p. e565-e575, 2020.

GHANAATI, S. *et al.* Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. **J Oral Implantol**, v. 40, n. 6, p. 679-89, 2014.

GHANAATI, S. *et al.* Fifteen Years of Platelet Rich Fibrin in Dentistry and Oromaxillofacial Surgery: How High is the Level of Scientific Evidence? **J Oral Implantol**, v. 44, n. 6, p. 471-492, 2018.

GROSSI-OLIVEIRA, G. *et al.* Comparative Evaluation of Bone Repair with Four Different Bone Substitutes in Critical Size Defects. **Int J Biomater**, v. 2020, p. 5182845, 2020.

GURLER, G.; DELILBASI, C. Effects of leukocyte-platelet rich fibrin on postoperative complications of direct sinus lifting. **Minerva Stomatologica**, v. 65, n. 4, p. 207-12, 2016.

- HAUSER, F. *et al.* Clinical and histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study. **Implant Dent**, v. 22, n. 3, p. 295-303, 2013.
- JENSEN, T. *et al.* Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 1, p. 114-20, 2012.
- JOHANSSON, C.; ALBREKTSSON, T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 2, n. 2, p. 69-75, 1987.
- KARIMI, K.; ROCKWELL, H. The Benefits of Platelet-Rich Fibrin. **Facial Plast Surg Clin North Am**, v. 27, n. 3, p. 331-340, 2019.
- KOBAYASHI, E. *et al.* Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 9, p. 2353-2360, 2016.
- KOLERMAN, R. *et al.* Histomorphometric Analysis of Newly Formed Bone After Bilateral Maxillary Sinus Augmentation Using Two Different Osteoconductive Materials and Internal Collagen Membrane. **INT J PERIODONT REST**, v. 23, n. 1, p. 21-28, 2012.
- KUMAR, N. G. *et al.* To assess the efficacy of socket plug technique using platelet rich fibrin with or without the use of bone substitute in alveolar ridge preservation: a prospective randomised controlled study. **Oral Maxillofac Surg**, v. 22, n. 2, p. 135-142, 2018.
- KYYAK, S. *et al.* Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin - A comparative in vitro study. **J Biomater Appl**, v. 35, n. 1, p. 83-96, 2020.
- LEE, D. Z.; CHEN, S. T.; DARBY, I. B. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 8, p. 918-24, 2012.
- LI, Q. *et al.* Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 638043, 2013.
- MARQUEZAN, M. *et al.* Does bone mineral density influence the primary stability of dental implants? A systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 7, p. 767-74, 2012.
- MLADENOVIC, Z. *et al.* In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 3, p. 329-35, 2013.
- MORASCHINI, V.; BARBOZA EDOS, S. Use of Platelet-Rich Fibrin Membrane in the Treatment of Gingival Recession: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Periodontol**, v. 87, n. 3, p. 281-90, 2016.
- MORDENFELD, A. *et al.* Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 9, p. 961-70, 2010.
- MOURAO, C. F. *et al.* Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. **Rev Col Bras Cir**, v. 42, n. 6, p. 421-3, 2015.
- NIZAM, N. *et al.* Maxillary sinus augmentation with leukocyte and platelet-rich fibrin and deproteinized bovine bone mineral: A split-mouth histological and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, v. 29, n. 1, p. 67-75, 2018.

- NORTON, M. R. *et al.* Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 14, p. 775–783, 2003.
- OLIVEIRA, M. R. *et al.* 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**, v. 44, n. 5, p. 649-55, 2014.
- ORSINI, G. *et al.* Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 74, n. 1, p. 448-57, 2005.
- OZSAGIR, Z. B. *et al.* Injectable platelet-rich fibrin and microneedling for gingival augmentation in thin periodontal phenotype: A randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 47, n. 4, p. 489-499, 2020.
- PAN, J. *et al.* Effect of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation: A systematic review. **J Am Dent Assoc**, v. 150, n. 9, p. 766-778, 2019.
- PAOLANTONIO, M. *et al.* Immediate Implantation in Fresh Extraction Sockets. A Controlled Clinical and Histological Study in Man. **J Periodontol**, v. 72, n. 11, p. 1560-1571, 2001.
- PICHOTANO, E. C. *et al.* Evaluation of L-PRF combined with deproteinized bovine bone mineral for early implant placement after maxillary sinus augmentation: A randomized clinical trial. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 21, n. 2, p. 253-262, 2019.
- PINTO, N. R. *et al.* Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. **Platelets**, v. 29, n. 5, p. 468-475, 2018.
- SALUJA, H.; DEHANE, V.; MAHINDRA, U. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. **Ann Maxillofac Surg**, v. 1, n. 1, p. 53-7, 2011.
- SHAMSODDIN, E.; HOUSHMAND, B.; GOLABGIRAN, M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. **J Adv Pharm Technol Res**, v. 10, n. 2, p. 46-50, 2019.
- SINGH, A.; KOHLI, M.; GUPTA, N. Platelet rich fibrin: a novel approach for osseous regeneration. **J Maxillofac Oral Surg**, v. 11, n. 4, p. 430-4, 2012.
- STRAUSS, F. J.; STAHLI, A.; GRUBER, R. The use of platelet-rich fibrin to enhance the outcomes of implant therapy: A systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 29 Suppl 18, p. 6-19, 2018.
- SUTTAPREYASRI, S.; LEEPONG, N. Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation. **J Craniofac Surg**, v. 24, n. 4, p. 1088-94, 2013.
- TAN, W. L. *et al.* A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. **Clin Oral Implants Res**, v. 23 Suppl 5, p. 1-21, 2011.
- TATULLO, M. *et al.* Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. **Int J Med Sci**, v. 9, n. 10, p. 872-80, 2012.
- TEE, B. C. *et al.* Reconstructing jaw defects with MSCs and PLGA-encapsulated growth factors. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 6, p. 2693-2704, 2016.

TEMMERMAN, A. *et al.* The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 11, p. 990-999, 2016.

THANASRISUEBWONG, P. *et al.* Red and Yellow Injectable Platelet-Rich Fibrin Demonstrated Differential Effects on Periodontal Ligament Stem Cell Proliferation, Migration, and Osteogenic Differentiation. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 14, 2020.

UCAK TURER, O. *et al.* Clinical evaluation of injectable platelet-rich fibrin with connective tissue graft for the treatment of deep gingival recession defects: A controlled randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 47, n. 1, p. 72-80, 2020.

UNIFAL. MANUAL DE ANESTESIA E ANALGESIA DO BIOTÉRIO DA UNIFAL-MG. Disponível em: < <https://www.unifal-mg.edu.br/cebio/wp-content/uploads/sites/45/2018/06/Anestesia-e-Analgesia.pdf> >. Acesso em: 17/05.

WALLACE, S. S.; FROUM, S. J. Effect of Maxillary Sinus Augmentation on the Survival of Endosseous Dental Implants. A Systematic Review. **Ann Periodontol**, v. 8, n. 1, p. 328-343, 2003.

WANG, X. *et al.* Fluid platelet-rich fibrin stimulates greater dermal skin fibroblast cell migration, proliferation, and collagen synthesis when compared to platelet-rich plasma. **J Cosmet Dermatol**, v. 18, n. 6, p. 2004-2010, 2019.

WANG, X. *et al.* Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 2, 2017a.

_____. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. **Platelets**, v. 29, n. 1, p. 48-55, 2017b.

YOON, J. S.; LEE, S. H.; YOON, H. J. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, n. 7, p. 1071-7, 2014.

YOU, J.-S. *et al.* Effects of Platelet-Derived Material (Platelet-Rich Fibrin) on Bone Regeneration. **Implant Dentistry**, v. 28, n. 3, p. 244-255, 2019.

ZITZMANN, N. U.; SCHÄRER, P.; MARINELLO, C. P. Long-term Results of Implants Treated with Guided Bone Regeneration: A 5-year Prospective Study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 16, n. 3, p. 355-366, 2001.

APÊNDICE A - Metodologia detalhada da pesquisa

Esse estudo foi submetido junto a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas (CEUA-UNIFAL) e aprovado sob número de parecer 0015/2021 (ANEXO A). Para esse estudo, foram utilizados 64 ratos (*Rattus norvegicus*, variação Wistar) com 3 meses de idade, peso entre 400-450g, mantidos em um ambiente com temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), humidade (65-70%), e ciclos de luz (12 horas) controlados. Os animais foram alimentados com ração apropriada e foram oferecidos água e ração *ad libitum*. Esse estudo foi conduzido de acordo com o protocolo ARRIVE para conduta de estudos pré-clínicos (APÊNDICE B).

Para o cálculo do tamanho da amostra, foram utilizados dados da análise histomorfométrica de porcentagem de formação óssea, em estudo anterior que avaliou o efeito do uso de propranolol na formação óssea em defeitos realizados no fêmur de ratos (AL-SUBAIE *et al.*, 2016). Foi definido um tamanho amostral mínimo de 7 animais por grupo para aplicação dos testes estatísticos com erro tipo α de 0,05 e poder β de 0,90 por meio da comparação entre grupos com o teste Anova One-Way. Diante do risco de perda de animais durante os protocolos experimentais, utilizou-se 8 animais por grupo.

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, com 16 animais cada, definidos de acordo com o cálculo amostral, para os seguintes materiais utilizados:

Grupo CO: defeitos ósseos preenchidos com coágulo;

Grupo PRF: defeitos ósseos preenchidos com PRF coagulada/polimérica na forma de membranas;

Grupo BO: defeitos ósseos preenchidos com Bio-Oss®;

Após o procedimento de enxertia nas tíbias direitas e esquerdas, os animais foram eutanasiados com os períodos de 15 e 45 dias;

Grupo SB: defeitos ósseos preenchidos com sticky bone (i-PRF + Bio-Oss®).

4.2 OBTENÇÃO DA PRF

O presente estudo utilizou ratos doadores para a preparação da PRF (na forma de membrana e injetável).

Os ratos doadores foram anestesiados através de injeção intraperitoneal com uma combinação de Cetamina (Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 90 mg/kg de massa corporal e Xilazina (Rompum, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 10 mg/kg de massa corporal. A obtenção da PRF na forma monomérica/líquida (i-PRF) foi conduzida com um rato doador para obtenção de um volume de i-PRF [em média 800 μ L] suficiente para o preenchimento de 8 defeitos (2 defeitos por animal, totalizando 4 animais); dessa forma foram necessários o total de 4 ratos doadores para o preenchimento dos defeitos do subgrupo SB.

Para obtenção da PRF na forma polimérica foi utilizado um rato doador para a confecção de 4 membranas de PRF [suficiente para o preenchimento de 4 defeitos (2 ratos)]; dessa forma foram necessários o total de 8 ratos doadores para o preenchimento do defeito do subgrupo PRF. Ao total foram utilizados 12 ratos doadores.

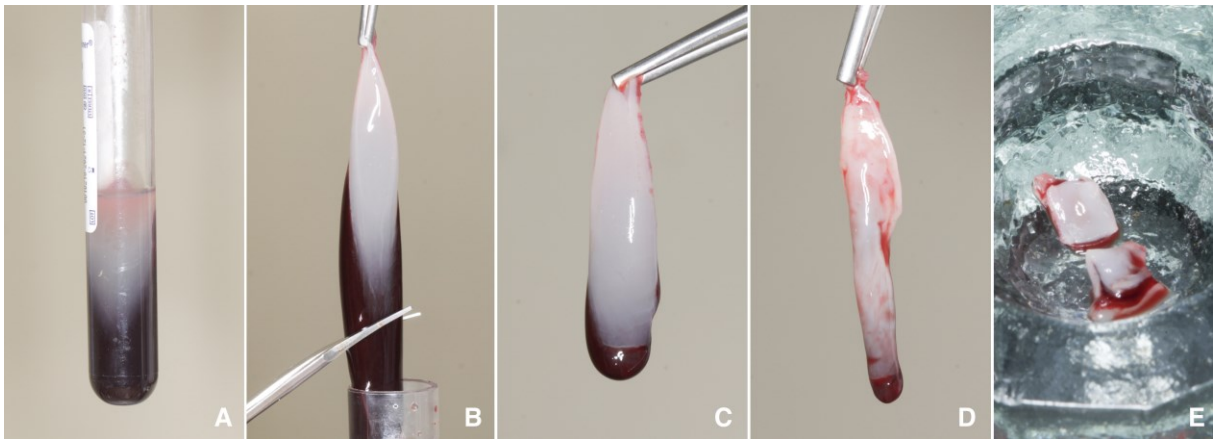
Após anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal e uma incisão vertical na linha média foi realizada ao longo do esterno desde a fúrcula até o apêndice xifóide com bisturi. A incisão foi seguida de osteotomia do esterno com tesoura (esternotomia mediana). Durante a osteotomia, a cavidade torácica foi levantada para cima afim de evitar lesões ao coração.

Uma amostra de em média 7mL de sangue cardíaco foi coletada por animal por meio de punção cardíaca direta do ventrículo esquerdo utilizando um scalp descartável calibre 23g acoplado ao tubo de coleta vácuo [tubo de coleta de sangue branco (sem anticoagulantes) para obtenção da i-PRF; tubo de coleta de sangue vermelho (com ativador de coágulo siliconizado para obtenção da PRF polimérico)].

Para obtenção da PRF na forma de membrana, o sangue total coletado no tubo vermelho foi imediatamente centrifugado utilizando 1659 rotações por minuto por 10 min (200g) (DE OLIVEIRA et al., 2018) utilizando uma centrífuga de bancada (FibrinFuge25; Montserrat, China). Após a centrifugação, a camada superior polimerizada foi retirada do tubo com auxílio de uma pinça e separada da porção inferior com auxílio de uma tesoura. O material foi colocado em um estojo específico e comprimido por 2 minutos para a retirada do plasma e formação da membrana (FIGURA 1).

O sangue total sem anticoagulante foi imediatamente centrifugado utilizando 700 rotações por minuto por 8 min (44g) utilizando uma centrífuga de bancada (Fibrinfuge25; Montserrat, China) para obtenção da i-PRF (GHANAATI et al., 2018). Após a centrifugação, 1 mL da camada superior foi aspirada com ajuda de uma seringa. A i-PRF foi misturado com grânulos de xenoenxerto ósseo (Grânulos 0.25mm – 1mm, Bio-Oss®, Geistlich Pharma AG, Suíça) para formar o “sticky bone” (FIGURA 2).

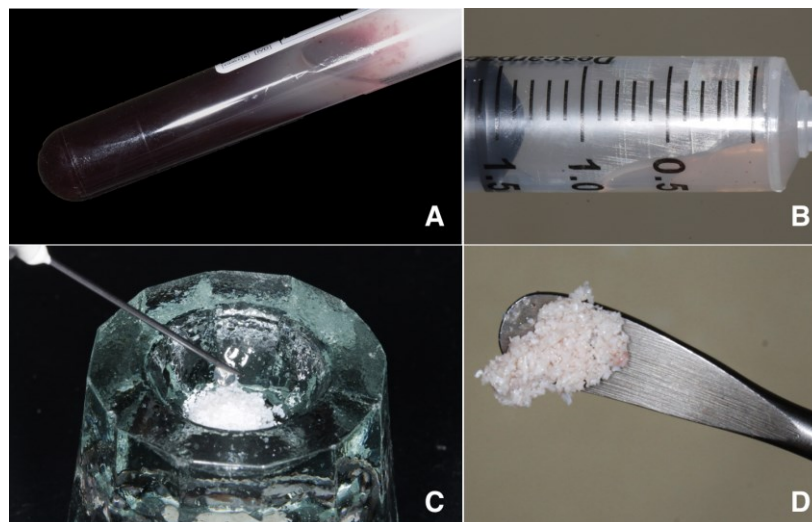
Figura 1 – Preparação da membrana de PRF



Fonte: Do autor.

Legenda: A: Tubo de coleta após centrifugação; B: Pinçamento da PRF em forma polimérica; C: Membrana de PRF antes da compressão; D: após compressão; E: Membranas de PRF picotadas para preenchimento dos defeitos.

Figura 2 - Preparação do *Sticky Bone*



Fonte: Do autor.

Legenda: A: Tubo de coleta após centrifugação; B: i-PRF aspirado em seringa; C: Aglutinação entre i-PRF e grânulos de xenoenxerto ósseo; D: *Sticky Bone*.

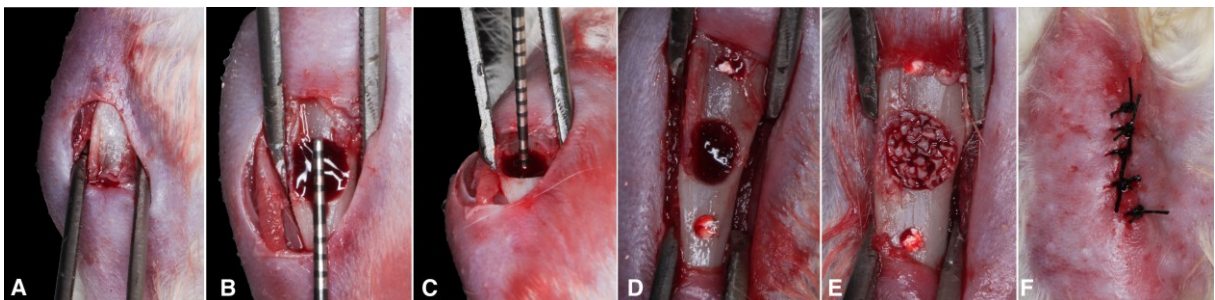
4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular com uma combinação de Cetamina (Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 90 mg/kg de massa corporal com Xilazina (Rompum, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 10 mg/kg de massa corporal.

Uma incisão de aproximadamente 10 mm foi realizada, em planos, sobre a tuberosidade da tíbia direita e esquerda. Após dissecação delicada, o tecido ósseo foi submetido à osteotomia, por meio de uma broca esférica (diâmetro 3.3 mm) montada em contra ângulo com auxílio de um motor elétrico ajustado a 1200 rpm (BLM 600 – Driller, São Paulo, SP, Brasil) sob abundante irrigação com solução salina estéril. O defeito formado teve como medidas finais 3.5 mm de comprimento e de largura e 1.5mm de profundidade (DE PAULA *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Os defeitos foram preenchidos de acordo com os subgrupos: coágulo sanguíneo (grupo CO), sticky bone (i-PRF + Bio-Oss®); Bio-Oss® (Grânulos 0.25mm – 1mm) ou PRF na forma de membrana. Canais confeccionados a 2mm de ambas as margens do defeito ósseo, confeccionados com uma broca esférica acoplada na peça de mão (diâmetro de 2mm), foram preenchidos com guta percha para posterior identificação do local do defeito ósseo. O tecido foi suturado por planos, internamente com fio reabsorvível 5.0 (Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) e externamente com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) (FIGURA 3).

Figura 3 - Sequência de confecção dos defeitos cirúrgicos



Fonte: Do autor.

Legenda: A: Exposição da tíbia; B: Defeito circular com diâmetro de 3,5mm; C: Profundidade média de 1,5mm do defeito criado; D: Defeito confeccionado com marcações adjacentes para posterior identificação; E: Defeito preenchido com grânulos de xenoenxerto ósseo; F: Sutura do plano cutâneo do animal.

Os animais receberam, em dose única, Penicilina associada à Estreptomicina na dosagem 0,1 ml/kg de peso (Multibiótico Small, Vitalfarma, São Sebastião do Paraíso, MG,

Brasil). Além disso foram administrados 1 mg/kg de peso de Meloxicam (Maxican 0,2%, Ourofino, Cravinhos, Brasil) por via subcutânea uma vez ao dia por três dias e Tramadol 12,5 mg/kg p.c. subcutâneo 8/8 horas 2 dias diluído em solução salina (Tramal, União Química, São Paulo). As dosagens foram administradas de acordo com o Manual de Anestesia e Analgesia do Biotério da UNIFAL/MG (UNIFAL).

Os animais foram submetidos a eutanásia por inalação de CO₂ após 15 e 45 dias. As tíbias foram separadas de acordo com o tipo de avaliação (tíbia direita: avaliação microtomográfica, histomorfométrica e imuno-histoquímica; tíbia esquerda: avaliação da expressão gênica).

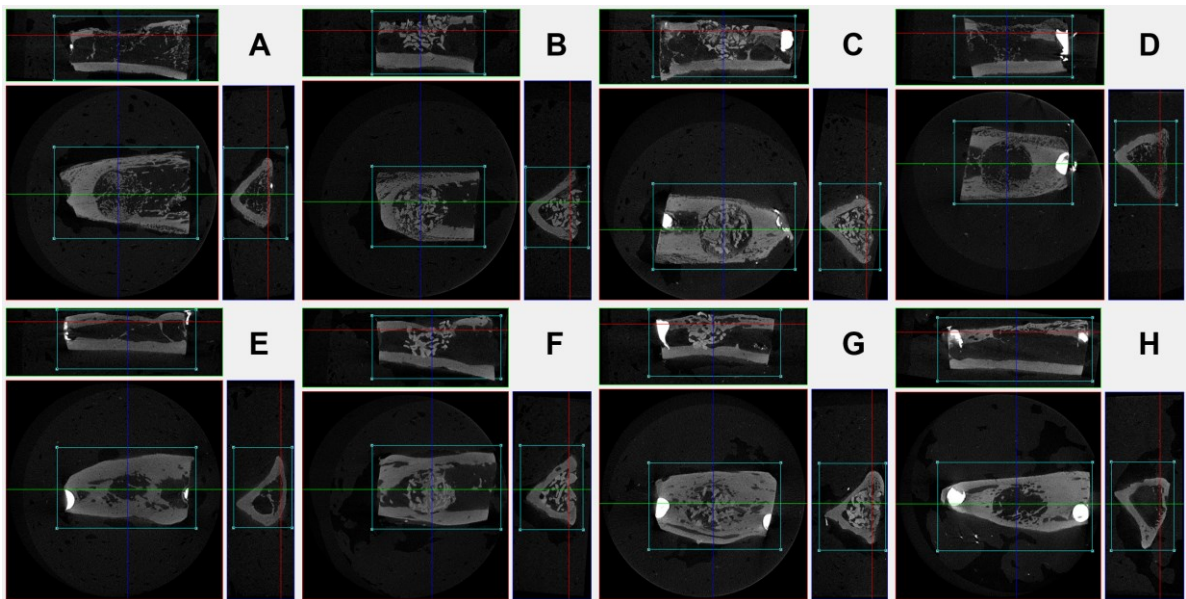
4.4 AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA

Os escaneamentos microtomográficos foram realizados em colaboração com o Centro de Pesquisas Odontológico Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPBIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

As tíbias direitas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas e posteriormente armazenadas em Álcool 70°. Cinco amostras de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente e escaneadas por um microtomógrafo (Skyscan 1272, Aatselaar, Bélgica) com os seguintes parâmetros: Pixel da câmera: 1632 x 1092; potência do tubo de raio-x: 65 kVP, intensidade do raio-x: 385 µA, tempo de integração: 300 ms, filtro: Al-1 mm e tamanho do voxel: 18 µm³.

Após montagem e edição das imagens obtidas pelo escaneamento microtomográfico com o software Nrecon (Kontich, Bélgica), um segundo software (DataViewer, Extron Eletronics, Estados Unidos) foi utilizado para reconstrução tridimensional e reposicionamento espacial das imagens (FIGURA 4).

Figura 4 - Reconstrução tridimensional obtida pelo software Data Viewer



Fonte: Do autor.

Legenda: A: CO (15 dias); B: BO (15 dias); C: SB (15 dias); D: PRF (15 dias); E: CO (45 dias); F: BO (45 dias); G: SB (45 dias); H: PRF (45 dias).

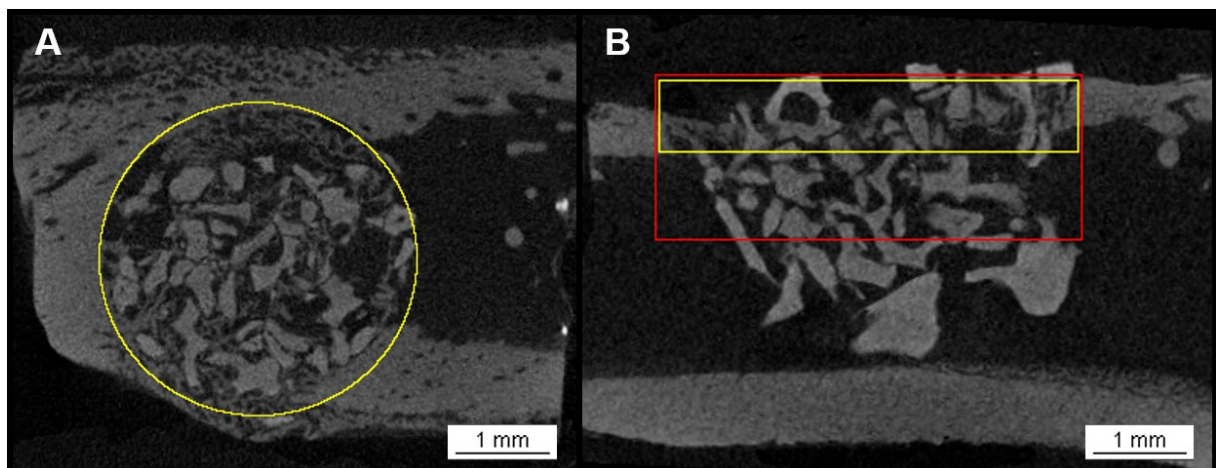
As imagens reconstruídas foram analisadas por um terceiro software (CTAnalyser, Aatselaar, Bélgica). Assim, duas regiões de interesse (ROI) diferentes foram analisadas: a ROI 1 circular correspondeu ao volume total do defeito considerando apenas a área cortical (3,5 mm x 0,54 mm); a ROI 2 retangular correspondeu ao volume total do defeito considerando tanto a área cortical quanto a medular (ROI 2: 3,5 mm x 1,08 mm) (Figura 2). Trinta cortes transaxiais (540 μ m de profundidade) foram selecionados para análise da área do osso cortical, enquanto sessenta cortes transaxiais (1080 μ m de profundidade) foram selecionados para análise da área do osso cortical e medular.

Os seguintes parâmetros microestruturais ósseos de osso neoformado foram avaliados ao nível cortical (cortes transaxiais): proporção de volume de tecido ósseo mineralizado/volume de tecido (BV/TV 1), proporção de partículas residuais de enxerto/volume de tecido (BV/TV 2) e espessura cortical média (Ct.Th, mm) (BOUXSEIN *et al.*, 2010). Para a análise de BV/TV 1, apenas o volume de tecido ósseo novo formado na área do defeito cortical foi considerado na análise. Para separar o tecido ósseo neoformado das partículas remanescentes do enxerto, um *threshold* de escala de cinza de 40-60 / 30-70 foi aplicado nas amostras de 15 e 45 dias, respectivamente. Para calcular BV/TV 2 (partículas remanescentes), um *threshold* de escala de cinza de 70-140 / 80-200 foi aplicado nas amostras de 15 e 45 dias, respectivamente.

A análise Ct.Th considerou a espessura cortical média de seis cortes seriados de trinta cortes coronais na região mais central do defeito. A ROI definida para esta análise incluiu os limites corticais dos defeitos (cortes coronais) (FIGURA 5).

Ao nível cortical e medular foram avaliados: BV/TV (%), espessura das trabéculas (Tb.Th, mm); separação das trabéculas (Tb.Sp, mm) e número das trabéculas (Tb.N, mm^{-1}) (BOUXSEIN *et al.*, 2010). As razões BV/TV incluíram tanto o novo volume de tecido ósseo mineralizado quanto as partículas de enxerto residuais. Nesta análise, um *threshold* de escala de cinza de 40-120 foi aplicado. Osso neoformado e partículas residuais de biomaterial não foram diferenciados nesta análise.

Figura 5 - ROIs definidos pelo CTAnalyser



Fonte: Do autor.

Legenda: A: Corte coronal com ROI englobando todo defeito. B: Em amarelo, ROI definido para análises da região cortical; em vermelho, ROI definido para análises considerando região cortical e medular.

4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

O processamento das amostras e aquisição das imagens para análise histológica e histomorfométrica foram realizados no Laboratório de Histologia e Biologia Celular da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

Após o escaneamento, as tíbias direitas foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 7% (trocada a cada 48 h por 3 meses). Os espécimes foram lavados em água corrente por 24 h e imersos em uma solução de sulfato de sódio a 5% por 48 h para neutralização do excesso de ácido. Em seguida, os espécimes foram novamente lavados em água corrente por mais 6 h e imersos nas seguintes soluções: álcool 70% por 12 h, álcool 90% por 1 h, álcool absoluto por 24 h (realizando trocas a cada 8 h), lavagem rápida

com álcool-xilol (1:1), seguido de imersão em xilol por 3 h (realizando troca a cada 1h) e inclusão final em parafina.

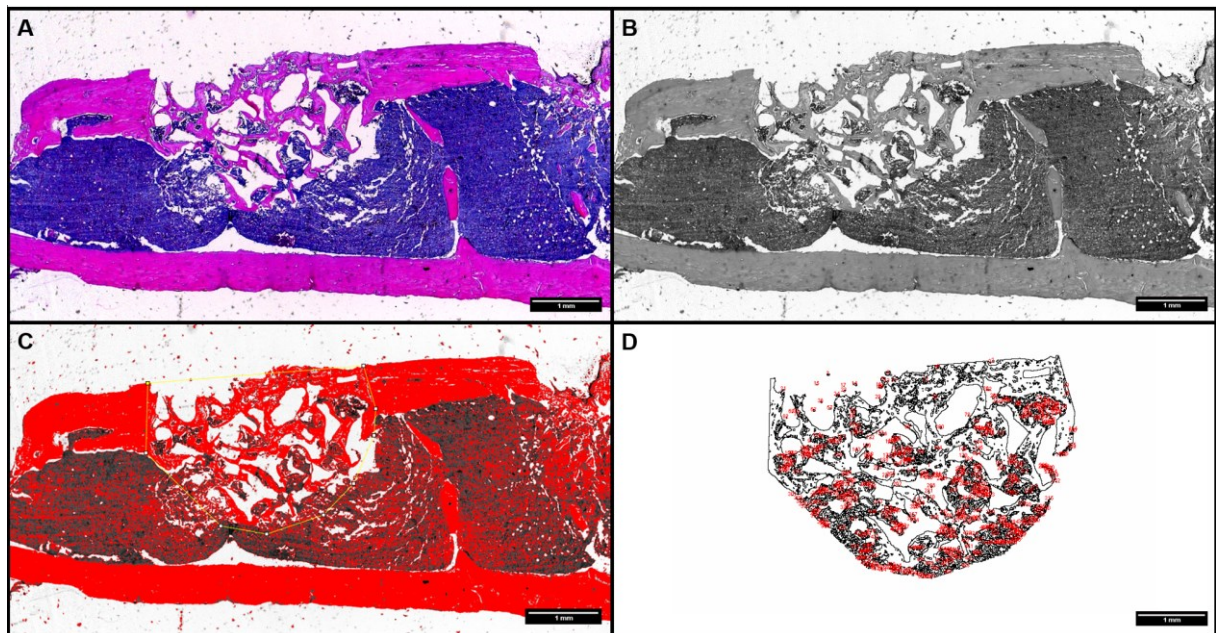
Os espécimes foram preparados com cortes semi-seriados de 5 μm para coloração em Hematoxilina & Eosina (HE) para análise descritiva e histomorfométrica. Após atingir a região central do defeito (875 μm de profundidade), 12 cortes igualmente distantes (70 μm de distância) foram obtidos por amostra e corados com hematoxilina-eosina (H&E).

De cada animal foram analisados 3 cortes no centro do defeito (210 μm de distância entre os cortes) utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (LeicaReichert & Jung products, Germany) com objetiva para aumento de 2,5/10 vezes e oculares com aumento de 10 vezes, as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107^a/107AP (Sony EletronicsInc, Japão).

Os parâmetros analisados na análise histológica foram: qualidade do osso mineralizado, viabilidade dos osteócitos, qualquer evidência de formação de tecido fibroso no interior do defeito, processo de angiogênese, reação inflamatória e degradação das membranas.

Um software de análise de imagem (Image J, Jandel Scientific San Rafael, EUA) foi usado para realizar essas análises. Para identificar e calcular a área de tecido ósseo e remanescentes de biomateriais no tecido reparado, um limiar (115-180 / 205-255, respectivamente) foi aplicado às imagens convertidas para 8 bits englobando o volume do tecido de interesse dentro do ROI definido. Nessas análises, os parâmetros de relação volume de tecido ósseo novo mineralizado/volume de tecido (BV/TV1) e a relação partículas residuais de enxerto/volume de tecido (BV/TV2) foram analisadas considerando apenas a área cortical (ROI 1) e ambas as áreas cortical e medular (ROI 2) (FIGURA 6).

Figura 6 - Análise histomorfométrica pelo software ImageJ



Fonte: Do autor.

Legenda: A: Imagem representativa, BO aos 15 dias. B: Imagem convertida de 8 bits. C: Threshold e ROI definidos/desenhados para análise da cortical e medular. D: Reconstrução da área analisada.

4.6 EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES ÓSSEOS

A análise de expressão gênica foi realizada em colaboração com a Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho.

Após a eutanásia, uma trefina de 4.1 mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, PA, Brasil) foi centralizada na região do defeito ósseo de modo a obter o tecido para as análises de expressão gênica. De cada grupo, foram analisadas apenas amostras com 15 dias de pós-operatório. Esse tecido foi rapidamente transferido para o RNAlater (AMBION) para conservação da integridade do RNA. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido, e em seguida a exodontia do RNA foi realizada utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Em seguida, a concentração do RNA extraído de cada amostra foi medida por densidade óptica por meio do Nanodrop (ThermoScientific). Em seguida foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) de todas as sequências gênicas expressas por meio do RT-PCR utilizando o OligodT(20) com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas pelo sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene para controle endógeno da reação foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH ,cat. N° Mm99999915_g1), cujo nível de expressão foi usado para normalizar a expressão dos genes de interesse, *Alpl* (Alkaline Phosphatase; cat. N° Mm00475834_m1), *Runx2* (RUNX; cat. N° Mm00501584_m1), *Bglap* (Osteocalcin; cat. N° Mm00649782_gH).

Para a quantificação relativa do gene selecionado as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625µL da solução de primers e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (50ng), sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os valores da expressão gênica relativa dos genes de interesse foram analisados utilizando o software Expression Suite (Applied Biosystems®). O software utiliza o método comparativo C_{τ} ($\Delta\Delta C_{\tau}$) e possibilita quantificar com precisão a expressão gênica relativa dos genes analisados. Após normalização pela expressão do gene controle endógeno, foram obtidos os valores de expressão para cada gene alvo ($\Delta\Delta C_t$). A média dos valores de $\Delta\Delta C_t$ de cada gene de interesse (alvo) referente à indução de cada material investigado foram comparadas entre si.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados gerados pelas análises microtomográficas e de expressão gênica foram submetidos à análise de identificação de outliers pelo teste ROUT considerando $Q=1\%$. Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk Normality, e aqueles que se distribuíram segundo a normalidade (μ CT e análise histomorfométrica) foram analisados pelo teste One-way Anova e complementados pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Para análise dos dados que não se distribuíram de acordo com a normalidade (expressão de biomarcadores ósseos), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. O teste t não pareado foi usado para comparar os grupos BO e SB na análise de partículas de biomateriais residuais. As análises intragrupo entre os períodos foram realizadas com o teste Two-Way Anova complementado pelo teste de Tukey (μ CT e análise histomorfométrica). O software GraphPad Prism 6 (San Diego, EUA) foi utilizado para os

testes estatísticos. Todos os testes deste estudo foram aplicados com nível de significância de 5%.

4.8 REFERÊNCIAS DA METODOLOGIA EXPANDIDA

AL-SUBAIE, A. E. *et al.* Propranolol enhances bone healing and implant osseointegration in rats tibiae. **J Clin Periodontol**, [s. l.], v. 43, n. 12, p. 1160-1170, 2016.

BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 1468-86, 2010.

DE OLIVEIRA, G. J. P. L. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) in sites grafted with osteoconductive bone substitutes improves osseointegration. **Lasers Med Sci**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 1519-1529, 2020.

DE OLIVEIRA, L. A. *et al.* Caracterização morfológica ultraestrutural da matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga em associação com biomateriais xenógeno e aloplástico para enxertia óssea. Protocolo Fibrin®. **REVISTA CATARINENSE DE IMPLANTODONTIA**, [s. l.], v. 18, n. 18, p. 25-33, 2018.

DE PAULA, L. G. F. *et al.* Effect of Avocado/Soybean Unsaponifiables (ASU) on Osseointegration in Rats with Experimental Arthritis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 603-612, 2018.

GHANAATI, S. *et al.* A Proof of the Low Speed Centrifugation Concept in Rodents: New Perspectives for In Vivo Research. **Tissue Eng Part C Methods**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 659-670, 2018.

KILKENNY, C. *et al.* Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **Vet Clin Pathol**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 27-31, 2012.

MOURAO, C. F. *et al.* Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. **Rev Col Bras Cir**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 421-3, 2015.

APÊNDICE B - Checklist ARRIVE

NOTE: Please save this file locally before filling in the table, DO NOT work on the file within your internet browser as changes will not be saved. Adobe Acrobat Reader (available free [here](#)) is recommended for completion.

ARRIVE The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting	
Study design	1 For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). 	Materials and Methods Study design Materials and Methods Experimental animals	
	Sample size	2 <ol style="list-style-type: none"> Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done. 	Materials and Methods Study design Materials and Methods Sample
Inclusion and exclusion criteria	3 <ol style="list-style-type: none"> Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group. 	No criteria were set There were no exclusions Materials and Methods Outcome measures	
	Randomisation	4 <ol style="list-style-type: none"> State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly. 	Materials and Methods Study design Confounders were not controlled
		Blinding	5 Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).
Outcome measures	6 <ol style="list-style-type: none"> Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size. 	Materials and Methods Statistical analysis percentage of newly formed bone (BV/TV)	
	Statistical methods	7 <ol style="list-style-type: none"> Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met. 	Materials and Methods Statistical analysis Materials and Methods Statistical analysis
Experimental animals	8 <ol style="list-style-type: none"> Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures. 	Materials and Methods Experimental animals Materials and Methods Experimental animals	
	Experimental procedures	9 For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: <ol style="list-style-type: none"> What was done, how it was done and what was used. When and how often. Where (including detail of any acclimatisation periods). Why (provide rationale for procedures). 	Materials and Methods Experimental procedures Materials and Methods Experimental procedures Materials and Methods Experimental animals Materials and Methods Outcome measures
Results	10 For each experiment conducted, including independent replications, report: <ol style="list-style-type: none"> Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). If applicable, the effect size with a confidence interval. 	Results Materials and Methods Statistical analysis	

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Abstract	11 Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.	Abstract Materials and methods
Background	12 a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.	Introduction Paragraph 5 Discussion
Objectives	13 Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.	Introduction Last paragraph
Ethical statement	14 Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.	Materials and Methods Experimental animals
Housing and husbandry	15 Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.	Materials and Methods Experimental animals
Animal care and monitoring	16 a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. b. Report any expected or unexpected adverse events. c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.	Surgical procedure 2nd paragraph Results Surgical procedure Last paragraph
Interpretation/ scientific implications	17 a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.	Discussion First paragraph Discussion Last paragraph
Generalisability/ translation	18 Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).	Discussion penultimate paragraph
Protocol registration	19 Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.	Ethical approval
Data access	20 Provide a statement describing if and where study data are available.	Competing interests
Declaration of interests	21 a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated. b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.	Compliance with ethical standards Funding

ANEXO A - Parecer de aprovação do CEUA para realização do estudo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação do i-PRF associado ao osso bovino desproteínizado na formação óssea e osseointegração de implantes dentários: Estudo in vivo**, registrada com o nº **0015/2021**, sob a responsabilidade de **Suzane Cristina Pigossi**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **04/06/2021 a 05/12/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Rattus norvegicus, variação wistar	180	180	0	Biotério central da unifal-mg

Alfenas, 27 de Maio de 2021

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

ANEXO B - Normas da revista Clinical Oral Investigations

Instructions for Authors

Types of papers

Papers may be submitted for the following sections:

Research Article

Reviews

Brief Report – with up to 2000 words and up to two figures and/or tables

Correspondence (Discussion paper)

Debate (Letter to the Editor)

Perspective (by Editor invitation only)

Perspective articles are focused articles on topics of interest to a broad audience, but are written from a personal viewpoint. They are intended to provide a forum to be more speculative than Reviews, but should remain balanced and are intended to cover timely and relevant topics. These articles are peer reviewed.

Limited to 1,500-3,000 words (excluding abstract, references and figure legends);

Unstructured abstract 200 words; 4 tables/figures; 60 references

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Objectives (stating the main purposes and research question)

Materials and Methods

Results

Conclusions

Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature's LaTeX template.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation,

and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file sn-basic.bst which is included in the Springer Nature Article Template.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format.

MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black

and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts.

Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1