

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARINA REIS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA
COM A UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF)
ASSOCIADO OU NÃO A OSSO BOVINO EM DEFEITOS ÓSSEOS NA
CALVÁRIA DE RATOS**

Alfenas/MG

2014

MARINA REIS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA
COM A UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF)
ASSOCIADO OU NÃO A OSSO BOVINO EM DEFEITOS ÓSSEOS NA
CALVÁRIA DE RATOS**

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

Alfenas/MG

2014

Oliveira, Marina Reis.

Avaliação histomorfométrica da regeneração óssea com a utilização de plasma rico em fibrina (PRF) associado ou não a osso bovino em defeitos ósseos na calvária de ratos / Marina Reis Oliveira. - 2014.
77 f. -

Orientador: Ronaldo Célio Mariano.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Fibrina. 2. Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas. 3. Transplante Ósseo. 4. Regeneração Óssea. I. Mariano, Ronaldo Célio.
II. Título.

CDD: 617.605



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas-Unifal-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1392 . Fax: (35) 3299-1067



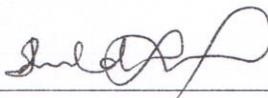
MARINA REIS OLIVEIRA

“AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA COM A UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF) ASSOCIADO OU NÃO A OSSO BOVINO EM DEFEITOS ÓSSEOS NA CALVÁRIA DE RATOS”

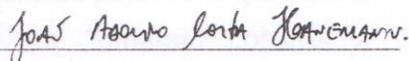
A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 05/02/14

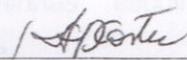
Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano
- UNIFENAS

Assinatura: 

À **Deus**, dedico este trabalho por ter me concedido os dons da perseverança, da fé e da esperança que tornaram possível a conquista de mais essa importante etapa de minha vida. À minha **família**, por compreender minhas escolhas e me apoiarem sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus

Agradeço pelo dom da vida, por minha família e pela capacidade de aprender. Por ter colocado ao meu redor durante estes dois anos pessoas tão especiais, que me incentivaram, apoiaram e conduziram na realização deste trabalho. Agradeço pela fé inabalável em Ti, que me faz seguir em frente nos meus sonhos e objetivos por mais distantes que pareçam estar. Obrigada Senhor, pela paciência nos dias de frustração e pela injeção de ânimo nas horas de abatimento. Sem a certeza de que estavas sempre comigo eu jamais conseguiria chegar até aqui.

“Nem os olhos viram, nem os ouvidos ouviram, nem os corações sentiram o que Deus tem preparado para aqueles que o amam.” (1Coríntios 2,9)

À minha família

Aos meus **pais** e heróis, **Maurício** e **Maria Madalena**, agradeço por todo amor, compreensão, apoio e confiança que sempre depositaram em mim. Agradeço por terem me ensinado desde muito cedo que a felicidade é uma conquista e não uma benção dos céus e que com perseverança e caráter eu consigo alcançar minhas metas. Obrigada também por me ensinarem que a honestidade e os amigos verdadeiros são as maiores riquezas que eu posso acumular ao longo da vida, pois isso tem feito toda a diferença. A vocês, meus pais, aqueles a quem devo tudo o que sou, o meu muito obrigado! Amo vocês!

Aos meus **irmãos**, **Maurício Eduardo**, **Ana Paula** e **Bruno**, agradeço por aceitarem minhas escolhas, mesmo que às vezes não as compreendam. Obrigada por sempre estarem por perto, vocês são muito importantes para mim!

Aos meus **avós**, meus maiores exemplos de força e fé. Agradeço pelas orações e o carinho. Em especial agradeço à vovó **Hilda**, que há pouco nos deixou saudosos de sua doce e amável presença física. Obrigada por ter sido sempre tão presente, amorosa, dedicada e carinhosa e por nunca ter se esquecido de mim, apesar da sua

enfermidade. Agradeço em especial, por sempre ter me aconselhado a seguir nos estudos e por ter se alegrado com cada pequena vitória minha. Esse incentivo foi muito importante. Passe o tempo que passar jamais me esquecerei da senhora.

À querida **tia Vilma**, minha maior inspiração na escolha da Odontologia como profissão. Obrigada pelas palavras de incentivo e por sempre me ajudar.

“Percebe e entende que os melhores amigos são aqueles que estão em casa, esperando por ti. Nos momentos mais difíceis da vida, eles sempre estarão por perto, pois só sabem te amar. E se por acaso a dor chegar, ao seu lado vão estar, para te acolher e te amparar, pois não há nada como um lar.” (Tua Família - Anjos de Resgate)

Às amigas

Amanda, amiga querida e colega de mestrado. Agradeço pela companhia, pela disponibilidade de sempre me ajudar, pelas conversas e pelo incentivo. Sua companhia fez o tempo passar depressa e sua ajuda foi essencial na realização deste trabalho.

Elisa, companheira na graduação e na pós. Foi muito bom ter a oportunidade de conviver com você por mais dois anos. Obrigada pela companhia agradável de sempre e por ser minha parceira em todas as atividades e disciplinas do mestrado, com esta parceria tudo se tornou mais fácil e divertido.

Beatriz e Raiane, amigas com quem dividi minhas alegrias, tristezas e o apartamento nestes dois anos. Obrigada pelo incentivo e carinho de sempre e, é claro, pela paciência infinita de assistirem uma prévia de todos os meus seminários e apresentações nestes anos de mestrado. Adoro vocês!

Larissa e Vanessa, as irmãs que eu escolhi ter. Perto ou longe, sempre presentes. Obrigada por me ouvirem a qualquer hora, pelos conselhos e incentivo. Agradeço especialmente pela torcida verdadeira, sempre me impulsionando a continuar e me fazendo sentir capaz de alcançar esta e outras vitórias.

“Amigo fiel é poderosa proteção: quem o encontrou, encontrou um tesouro. Ao amigo fiel não há nada que se compare, pois nada equivale ao bem que ele é.”

(Eclesiástico 6,14-15)

Agradecimento Especial

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano:

Professor, não tenho nem palavras para agradecer todo o seu esforço e dedicação para a realização deste trabalho e em favor de minha formação nestes dois anos. Sempre tive muita admiração e respeito pelo senhor desde a graduação e estes anos de convivência só fizeram aumentar essa simpatia, pois pude conhecê-lo melhor e percebi que além de excelente docente e profissional, é uma pessoa extremamente bondosa e generosa, sempre disposto a me ajudar e torcendo pelo meu sucesso. Agradeço imensamente por ter aceitado ser meu orientador, ter me acolhido com alegria e me tratado como filha nestes anos do mestrado. Espero ter correspondido as suas expectativas e ter feito por merecer toda a confiança e credibilidade em mim depositadas desde o início e, peço desculpas se em algum momento eu deixei a desejar ou o desapontei. Obrigada pela convivência, amizade, pela sua constante disponibilidade e paciência em me ensinar, e também pelas críticas construtivas que me fizeram crescer como pessoa e profissional. Ter sido sua orientada foi um privilégio e acrescentou muito em minha formação. Muito obrigada pela oportunidade!

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você percebe que alguém acredita e confia em você.”

(Olhai os Lírios do Campo – Érico Veríssimo)

Também agradeço sinceramente, à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. Mânio de Carvalho Tibúrcio** pela oportunidade de realização deste curso e deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann** e todo o corpo docente. Agradeço especialmente, a amiga e **Profa. Dra. Daniela Coelho de Lima** por ter sido a primeira a me incentivar a cursar o mestrado, ainda na época da graduação. Obrigada pelo incentivo e por sempre se preocupar comigo.

Ao professor **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann** e à pós-doutoranda **Marina Lara de Carli** agradeço pela paciência, disponibilidade e ajuda na realização da análise histomorfométrica deste trabalho.

À **Profa. Dra. Cássia Carneiro Avelino**, agradeço por ter nos fornecido todo o suporte necessário para a obtenção do PRF. Obrigada por ter sempre nos atendido prontamente e deixado seus compromissos para nos ajudar.

À **Sabrina Ferreira**, mestranda em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da Unesp (Araçatuba), agradeço pela disponibilidade em realizar o processamento histológico das peças desta pesquisa. Muito obrigada, sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho. Os agradecimentos são extensivos ao seu orientador, **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior** (Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp).

Às amigas e funcionárias da Clínica de Cirurgia, **Nilcelene** e **Valdilene**, agradeço pela companhia agradável, pelas conversas, pela disponibilidade em me ajudar e por sempre se preocuparem comigo e me tratarem com muito carinho.

Aos **funcionários do Biotério Central da Unifal-MG**, sou grata pelo suporte na realização da parte experimental desta pesquisa.

Aos **alunos de graduação** que me permitiram pela primeira vez me ver do outro lado, como um “docente aprendiz” que ainda traz consigo a insegurança da inexperiência. Obrigada pela compreensão e o respeito de vocês.

Aos **pacientes**, que atendi nestes dois anos, agradeço pela confiança depositada e pelo aprendizado conquistado em cada procedimento.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa, que permitiu me dedicar com afinco na realização deste trabalho.

Aos **animais**, que sublimaram à vida, por um bem maior.

“A sabedoria é luminosa e nunca murcha. Facilmente é contemplada por aqueles que a amam, e é encontrada por aqueles que a procuram.” (Livro da Sabedoria – 6,12)

RESUMO

Atualmente muito têm se discutido à cerca da utilização de concentrado de plaquetas para o favorecimento da regeneração tecidual, principalmente óssea. O plasma rico em plaquetas (PRP) ainda é muito utilizado para este fim, embora estudos recentes mostrem que seus efeitos são discretos sobre a regeneração óssea. O plasma rico em fibrina (PRF), descrito como uma segunda geração de concentrados de plaquetas parece apresentar efeitos mais promissores sobre os tecidos em reparação. O presente trabalho objetivou realizar uma avaliação histomorfométrica da regeneração óssea com a utilização do PRF associado ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss) em calvária de ratos. Foram utilizados 56 ratos, sendo 8 ratos doadores e os demais foram distribuídos em 6 grupos de 8 animais cada de acordo com o tratamento recebido: CA (coágulo autógeno), CH (coágulo homogêneo), PRF-a (PRF autógeno), PRF-h (PRF homogêneo), BO (Bio-Oss) e BOPRF (Bio-Oss associado ao PRF). Sendo que, 4 ratos de cada grupo foram eutanasiados após 30 e 60 dias pós-operatórios. A área de novo osso (AO) foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original (AT). Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$). A maior média percentual de novo osso foi observada no BOPRF ($58,8200\% \pm 4,8042$) que apresentou-se significativamente maior ($p < 0,05$) que os grupos: CH ($26,8800\% \pm 4,8042$), CA ($18,6262\% \pm 4,8042$), PRF-a ($22,4062 \pm 4,8042$) e PRF-h ($37,9387\% \pm 4,8042$). Ausência de diferença estatística foi notada na avaliação entre os grupos, entre BOPRF ($58,8200\% \pm 4,8042$) e BO ($41,7175 \pm 4,8042$); e entre os períodos, de 60 dias, entre o BOPRF ($63,5875\% \pm 4,8042$) e BO ($57,3450 \pm 4,8042$) mostraram semelhança estatística ($p > 0,05$). Os resultados obtidos permitem concluir que o PRF apresentou um efeito positivo sobre a regeneração óssea principalmente quando associado ao Bio-Oss.

Palavras-chave: Fibrina. Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas. Transplante Ósseo. Regeneração Óssea.

ABSTRACT

Currently, there is much discussion about the use of platelet concentrate to promote tissue regeneration, especially bone regeneration. Platelet-rich plasma (PRP) is still widely used for this purpose although there are doubts on its real therapeutic ability. Fibrin-rich plasma (PRF), described as a second generation of platelet concentrates, appears to promote more promising effects on tissues under repair. This study aimed to perform a histomorphometric evaluation of bone regeneration using PRF associated or not with bovine bone (Bio-Oss) in the calvaria of rats. It was used 56 rats, being 8 donors rats and others were divided into 6 groups of 8 animals each according to the treatment received: CA (autogenous clot), CH (homogenous clot), PRF-a (autogenous PRF), PRF-h (homogenous PRF), BO (Bio-Oss) and BOPRF (Bio-Oss associated with PRF). And 4 rats in each group were euthanized after 30 and 60 days postoperatively. New bone area (BA) was calculated as a percentage of the total area (TA) of the original defect. Values obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$). The highest mean percentage of new bone was observed in BOPRF group ($58.8200\% \pm 4.8042$) which was significantly greater than the following groups: CH ($26.8800\% \pm 4.8042$), CA ($18.6262\% \pm 4.8042$), PRF-a (22.4062 ± 4.8042) and PRF-h ($37.9387\% \pm 4.8042$). No statistical difference was observed in the assessment among groups, between BOPRF ($58.8200\% \pm 4.8042$) and BO ($41.7175\% \pm 4.8042$); and among periods (60 days), between BOPRF ($63.5875\% \pm 4.8042$) and BO ($57.3450\% \pm 4.8042$). The results obtained indicate that PRF had a positive effect on bone regeneration particularly when associated with Bio-Oss.

Keywords: Fibrin. Platelet-Derived Growth Factor. Bone Graft. Bone Transplantation. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Punção intracardíaca e retirada do sangue.....	35
Figura 2	–	Separação dos componentes do sangue após centrifugação.....	36
Figura 3	–	Separação do PRF dos demais componentes do sangue.....	37
Figura 4	–	Criação do defeito ósseo na calvária do rato.....	38
Figura 5	–	Defeito ósseo.....	39
Figura 6	–	Preenchimento do defeito ósseo com PRF.....	39
Figura 7	–	Esquema do defeito ósseo.....	40
Figura 8	–	AO delimitada dentro dos limites da AT.....	41
Figura 9	–	Visão panorâmica dos defeitos ósseos (30 dias).....	46
Figura 10	–	Visão panorâmica dos defeitos ósseos (60 dias).....	49
Figura 11	–	Gráfico de colunas das médias percentuais de AO (períodos).....	56
Figura 12	–	Gráfico de colunas das médias percentuais de AO (grupos).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias percentuais e erro padrão da AO (períodos).....	51
Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA) para AO (períodos).....	52
Tabela 3 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO (períodos).....	52
Tabela 4 – Médias percentuais e erro padrão da AO (grupos).....	57
Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para AO (grupos).....	57
Tabela 6 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO (grupos).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	– Análise de Variância
AT	– Área Total
AO	– Área de Osso
BO	– Bio-Oss
BPBM	– Bovine Porous Bone Mineral
BOPR	– Bio-Oss associado ao PRF
CA	– Coágulo Autógeno
CEUA	– Comitê de Ética na Utilização de Animais
CH	– Coágulo Homógeno
DFDBA	– Demineralized-Freeze Dried Bone Allograft
FCF-b	– Fator de Crescimento Derivado de Fibroblastos Beta
IGF1	– Fator de Crescimento de Insulina 1
IGF2	– Fator de Crescimento de Insulina 2
PRF	– Plasma Rico em Fibrina
PRF-a	– Plasma Rico em Fibrina Autógeno
PRF-h	– Plasma Rico em Fibrina Homógeno
PPP	– Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	– Plasma Rico em Plaquetas
TGF-b	– Fator de Crescimento de Transformação Beta
VEGF	– Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	CONCENTRADOS DE PLAQUETAS: PRP E PRF.....	19
2.2	SUBSTITUTOS ÓSSEOS: OSSO BOVINO.....	28
3	OBJETIVO.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	34
4.1.1	Grupos Controles.....	34
4.1.2	Grupos Experimentais.....	34
4.2	PROTOCOLO PARA A OBTENÇÃO DO PRF.....	35
4.2.1	Punção intracardíaca e retirada do sangue.....	35
4.2.2	Separação celular.....	35
4.2.3	Isolamento do PRF.....	36
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	37
4.4	EUTANÁSIA.....	39
4.5	PROCESSAMENTO DAS PEÇAS.....	40
4.6	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	41
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS	43
5.1	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 30 DIAS.....	43
5.1.1	Grupo CA.....	43
5.1.2	Grupo CH.....	43
5.1.3	Grupo PRF-a.....	43
5.1.4	Grupo PRF-h.....	44
5.1.5	Grupo BO.....	44
5.1.6	Grupo BOPRF.....	44
5.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 60 DIAS.....	47
5.2.1	Grupo CA.....	47

5.2.2	Grupo CH.....	47
5.2.3	Grupo PRF-a.....	47
5.2.4	Grupo PRF-h.....	47
5.2.5	Grupo BO.....	48
5.2.6	Grupo BOPRF.....	48
5.3	ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA.....	50
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A.....	76
	ANEXO A.....	77

1 INTRODUÇÃO

A utilização de concentrados de plaquetas no reparo tecidual é relativamente recente e a comprovação de sua capacidade terapêutica ainda gera controvérsia. Entretanto, sistemicamente no campo da hematologia, através das transfusões, já são utilizados há mais tempo para a prevenção de episódios hemorrágicos nos pacientes portadores de trombocitopenia grave, leucemia aguda ou nas situações de perda sanguínea excessiva em cirurgias de longa duração. Nestes casos, utiliza-se o plasma rico em plaquetas (PRP), que contém $0,5 \times 10^{11}$ plaquetas por unidade (EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009). Contudo, a utilização tópica do plasma rico em plaquetas é uma biotecnologia promissora devido a sua capacidade de estimulação do reparo de tecidos moles e duros. Por isso, expandiu consideravelmente sua utilização na saúde em geral não se restringindo mais apenas à hematologia, abrangendo várias áreas da medicina, odontologia e cirurgia bucomaxilofacial (ANITUA et al., 2006; LUCARELLI et al., 2010).

A otimização do reparo tecidual é uma busca constante das tecnologias aplicadas à saúde na atualidade (EHRENFEST et al., 2009). No contexto da odontologia e da cirurgia bucomaxilofacial a utilização dos concentrados derivados de plaquetas para potencializar o reparo dos tecidos bucais é interessante (SERNA et al., 2011), principalmente no âmbito da Implantodontia onde condições ósseas satisfatórias são indispensáveis (EHRENFEST et al., 2010). Sabe-se que, tais materiais são ricos em fatores de crescimento e citocinas importantes no processo inflamatório que conduz à cura tecidual e a sua utilização pode acelerar este processo (MESSORA et al., 2007), através da modulação das necessidades fisiológicas dos tecidos em processo de reparação (ANITUA et al., 2006).

No entanto, os efeitos do PRP estão sendo questionados, pois muitos estudos sugerem que devido à rápida liberação dos fatores de crescimento produza um benefício imediato e passageiro, pouco significativo para a

reparação tecidual, principalmente em relação à regeneração óssea (HE et al., 2009; RAO et al., 2012). Porém é preciso considerar que o avanço da medicina está levando a um envelhecimento populacional mundial e com isso o número de desdentados parciais e totais também aumenta. Esta clientela está exigente em relação à sua qualidade de vida e devido às deficiências das próteses removíveis convencionais, cada vez mais buscam por tratamentos odontológicos reabilitadores inovadores que lhe proporcionem maior conforto. Nessa temática, a Implantodontia parece o caminho mais seguro e promissor. Todavia, a maioria dos pacientes que procuram por esta alternativa de reabilitação oral apresentam condições ósseas insatisfatórias (JANG et al., 2010) com presença de defeitos ósseos formados após as exodontias muitas vezes realizadas precocemente (GASSLING et al., 2010; TATULLO et al., 2012) e tal situação contra-indica ou dificulta o tratamento (JANG et al., 2010). Assim, devido à necessidade de desenvolvimento de materiais que realmente contribuam para a regeneração óssea, surgiu uma segunda geração de concentrado de plaquetas denominada plasma rico em fibrina (PRF) (CHOUKROUN et al., 2006a; HE et al., 2009).

O PRF é produzido através do sangue do próprio paciente sem a adição de trombina bovina ou outros componentes exógenos (CHOUKROUN et al., 2006a; TATULLO et al., 2012). Os fatores de crescimento e citocinas ficam presos nas malhas da rede de fibrina formada exercendo um efeito controlável, gradativo e duradouro no processo de reparo tecidual, uma vez que são liberados lentamente. Alguns autores já relatam as vantagens na utilização do PRF no reparo dos tecidos bucais. Estudos *in vitro* já mostram maior proliferação dos osteoblastos em contato com o PRF (HE et al., 2009), e uma maior estimulação da angiogênese também já está comprovada com a utilização deste biomaterial (ROY et al., 2011). Apesar destes resultados positivos na reparação dos tecidos, novos estudos devem ser realizados para que suas características sejam exploradas ao máximo na busca da excelência do reparo tecidual, em especial do tecido ósseo. Novas pesquisas com o PRF talvez preencham a lacuna da regeneração óssea na Odontologia moderna, pois a sua utilização

isolada ou em associação com outros enxertos parece favorecer e acelerar a regeneração óssea.

Além disso, muito têm se discutido sobre a utilização de diferentes enxertos como substitutos ósseos para se evitar a instalação de defeitos nos maxilares. Neste contexto, os enxertos xenógenos, particularmente o osso bovino particulado, tem ganhado destaque como biomaterial de arcabouço, fornecendo local para o tecido ósseo crescer e se fixar biologicamente (LINDHE; KARRING; LANG, 2003). Assim, acredita-se que a associação dos xenoenxertos ao PRF possa permitir a cicatrização de defeitos ósseos de tamanhos críticos de forma promissora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCENTRADOS DE PLAQUETAS: PRP E PRF

O primeiro derivado sanguíneo utilizado para auxiliar na cicatrização de feridas foram as colas de fibrina, constituídas de fibrinogênio concentrado e os primeiros relatos de uso datam de 40 anos atrás. Na atualidade, as colas de fibrina produzidas a partir do plasma humano são amplamente utilizadas e constituem-se numa boa opção para prevenir a contaminação das feridas (EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009; KEYHAN et al., 2013) devido as suas propriedades hemostáticas e adesivas (ANITUA et al., 2006). Contudo, seu uso permanece restrito pelos altos custos e complexidade dos protocolos de obtenção. Por isso, nas últimas décadas ocorreu uma expansão considerável na utilização de concentrados de plaquetas na busca por um biomaterial que favoreça a regeneração tecidual e substitua as colas de fibrina (GUPTA et al., 2011; KEYHAN et al., 2013; KUMAR; SUBHASHINI, 2013).

As plaquetas, por sua vez, são fragmentos citoplasmáticos anucleados derivados de megacariócitos da medula óssea e repletas de grânulos e de algumas mitocôndrias (GARBLING et al., 2009). Apresentam uma vida útil que varia de 8 a 10 dias (DOHAN et al., 2004). Os grânulos apresentam formato oval e formam uma unidade de armazenamento de proteínas fundamentais para a reparação de feridas (ROY et al., 2011). Possuem proteínas plaquetárias específicas como o fator antiplaquetário e a tromboglobulina, como também proteínas não específicas das quais podemos destacar a fibronectina, fatores da coagulação, fibrinogênio, fator de Von Willebrand, fatores de crescimento, inibidores da fibrinólise e imunoglobulinas (DOHAN et al., 2004).

Essa necessidade de um concentrado de plaquetas ideal começou na área da odontologia, que precedeu o aparecimento do plasma rico em plaquetas (PRP) (HE et al., 2009). Isso porque o sucesso de qualquer procedimento cirúrgico é completamente dependente de um processo de reparo satisfatório.

Assim, o maior desafio dos pesquisadores dessa área é o desenvolvimento de materiais que regulem os eventos inflamatórios e promovam um reparo com o mínimo de complicações, rápido e eficaz (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012; DESAI et al., 2013; KUMAR; SUBHASHINI, 2013).

O PRP foi descrito como a primeira geração de concentrados de plaquetas em 1998 (MARX et al., 1998) e ainda é utilizado amplamente para acelerar a regeneração tecidual, principalmente óssea (HE et al., 2009; LUCARELLI et al., 2010). Entretanto, existem dúvidas quanto à sua eficiência (ANITUA et al., 2006; CHOUKROUN et al., 2006a; MESSORA et al., 2007; GARBLING et al. 2009; MARIANO; MELO; AVELINO, 2012) e os resultados de muitos estudos são contraditórios (ZHANG et al., 2012). Pode ser que isso ocorra porque o PRP promove uma rápida liberação dos fatores de crescimento e citocinas para os tecidos, exercendo um efeito descontrolado e de curta duração que resulta em um benefício pouco significativo na reparação (KANG et al., 2011; RAO et al., 2012). Isto ocorre devido à presença da trombina exógena que quando ativada libera a maior parte dos fatores de crescimento no primeiro dia reduzindo drasticamente com 3, 7 e 14 dias. Além disso, a trombina parece exercer um efeito tóxico sobre o corpo celular e em grandes quantidades pode dificultar a proliferação celular e a formação óssea devido à liberação rápida da maior parte dos fatores de crescimento, antes mesmo do início da proliferação osteoblástica. Assim, sobram poucos fatores de crescimento a serem libertados após o início da multiplicação celular, quando realmente são importantes para acelerar o processo de reparo. Também deve ser ressaltado que a utilização de trombina bovina em pacientes coagulopatas pode provocar sangramentos importantes com risco de morte devido à inativação dos fatores da coagulação V e XI (GUPTA et al., 2011; RAO et al., 2012). Por isso a utilização do PRP para potencializar a formação óssea é comprovadamente limitada (HE et al., 2009; KUMAR; SUBHASHINI, 2013), pois devido á rápida liberação dos fatores de crescimento apresenta efeito somente nos eventos iniciais que precedem a cura tecidual (ZHANG et al., 2012). Outra dificuldade na utilização do PRP são suas fracas propriedades mecânicas com tendência à fibrinólise rápida. Utilizado na

maioria das vezes na forma de líquido ou gel, apresenta um manuseio difícil que impede a sua implantação segura em um local específico quando isso é necessário (LUCARELLI et al., 2010; KUMAR; SUBHASHINI, 2013).

Em contrapartida, a regeneração óssea é favorecida com a utilização de materiais que promovam uma liberação prolongada de fatores de crescimento (HE et al., 2009). Entretanto, vários materiais de enxertia utilizados na regeneração óssea, como enxertos xenógenos, homogêneos e aloplásticos, entre outros materiais nem sempre apresentam essa característica. Estes apresentam boas propriedades osteocondutoras, mas o risco de transmissão de doenças e de resultados imprevisíveis impulsionou a busca por materiais que produzam uma reparação tecidual previsível ou que melhore os resultados dos materiais já utilizados (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012).

Nesse contexto, uma segunda linha de concentrado de plaquetas tem sido discutida, o plasma rico em fibrina (PRF) (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011; WU et al., 2012; KIM et al., 2013; LI et al., 2013). Esta nova geração de concentrado de plaquetas foi introduzida por Choukroun et al., na França em 2001 (DOHAN et al., 2004; RAO et al., 2012; SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012; BOLUKBASI et al., 2013; LUNDQUIST et al., 2013), tendo como indicação principal o reparo tecidual em Cirurgia Bucomaxilofacial e Implantodontia (KANG et al., 2011; DOUGLAS et al., 2012), mas estudos atuais já demonstram a sua utilização em várias disciplinas da odontologia (GUPTA, 2011; KUMAR; SUBHASHINI, 2013). Vários trabalhos têm mostrado que o PRF promove uma liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento (DANIELSEN; AGREN; JORGENSEN, 2010; ROY et al., 2011; THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011; ZHANG et al., 2012; WU et al., 2012;) por pelo menos uma semana podendo chegar a 28 dias (DOHAN et al., 2004; CHANG; ZHAO, 2009; KANG et al., 2011). Assim, exerce efeito sobre o processo de reparo tecidual por um período relativamente longo, criando condições favoráveis para que o mesmo ocorra de forma adequada e mais rapidamente (ROY et al., 2011). Algumas aplicações clínicas animadoras do PRF em cirurgias plásticas (EHRENFEST et al., 2010; KUMAR; SUBHASHINI, 2013), em cirurgia oral de implantes dentários e cirurgias

periodontais já são relatadas (CHANG; ZHAO, 2011). Além disso, até então nas pesquisas publicadas nenhum efeito citotóxico do PRF foi notado, demonstrando uma grande biocompatibilidade (HUANG et al., 2010). Entretanto, em relação à regeneração óssea os estudos são escassos embora já existam evidências de crescimento e proliferação de osteoblastos humanos em contato com o PRF (KANG et al., 2011; RAO et al., 2012; WU et al., 2012) e uma capacidade superior de estimulação da mineralização em relação ao PRP já foi evidenciada (HE et al., 2009).

A obtenção do PRF é relativamente simples, através da centrifugação rápida do sangue do próprio paciente sem a adição de anticoagulantes ou trombina exógena para a ativação plaquetária (DOHAN et al., 2004; CHANG; ZHAO, 2011; ROY et al., 2011; DOUGLAS et al., 2012; RAO et al., 2012; BOLUKBASI et al., 2013; SRISURANG et al., 2013; TAJIMA et al., 2013). Além da mínima manipulação bioquímica do sangue (KIM et al., 2013; LUNDQUIST et al., 2013; TUNALI et al., 2013), requer um arsenal mínimo materiais, se restringindo a tubos de ensaio esterilizados, seringas descartáveis e uma centrífuga (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012). O protocolo de obtenção compreende a coleta de 10 ml de sangue do paciente que sem adição de qualquer anticoagulante é imediatamente centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos (DOHAN et al., 2006; EHRENFEST et al., 2009; GUPTA et al., 2011). A ativação da maioria das plaquetas é possível pela ausência de anticoagulante, dando início à cascata de coagulação. Em seguida, a trombina circulante transforma o fibrinogênio concentrado na parte superior do tubo em rede de fibrina (KUMAR; SUBHASHINI, 2013). Assim, no final do ciclo, três partes podem ser vistas no tubo, na parte inferior observa-se as células vermelhas do sangue, na porção central o plasma rico em fibrina (PRF) e na porção superior do tubo o plasma acelular ou plasma pobre em plaquetas (PPP) (GUPTA et al., 2011; TAJIMA et al., 2013).

Em contrapartida o protocolo para a obtenção do PRP é um pouco mais complexo, exigindo a adição de anticoagulantes ao sangue coletado (KANG et al., 2011; THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011; SAMMARTINO et al., 2011) e

uma centrifugação de um ou dois passos (CHANG; ZHAO, 2011; GUPTA et al., 2011; KEYHAN et al., 2013; KIM et al., 2013). São utilizados como ativadores da degranulação plaquetária, o cloreto de cálcio a 10% (RAO et al., 2012) ou a trombina bovina (EHRENFEST et al., 2009). Além disso, uma centrifugação de dois passos deve ser realizada na maioria dos protocolos de obtenção. O próprio protocolo simplificado de obtenção do PRF é vantajoso em comparação com o PRP, pois no primeiro a manipulação sanguínea é mínima (SIMONPIERI et al., 2004; THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011), o processo é rápido, a centrifugação em uma única etapa é simples e a formação da fibrina se dá por vias naturais, sem a necessidade de incorporação de compostos externos (GUPTA et al., 2011; KEYHAN et al., 2013). A produção da fibrina naturalmente impede que os fatores de crescimento sejam degradados por proteolisinas e assim mantêm-se ativos por um período maior promovendo uma estimulação da regeneração tecidual mais prolongada (WU et al., 2012; LUNDQUIST et al., 2013).

Esta estrutura de fibrina tem uma complexa arquitetura e boas propriedades mecânicas servindo de abrigo para células, fatores de crescimento e citocinas, além de funcionar como um veículo para transporte destas substâncias até os tecidos em regeneração. Entre as linhagens celulares presentes no PRF, destaca-se a presença de células-tronco mesenquimais que contribuem para a regeneração e proliferação das células ósseas e de muitos outros tecidos, favorecendo o reparo dos defeitos ósseos (DOHAN et al., 2004; EHRENFEST et al., 2009; GASSLING et al., 2010; ZHANG et al., 2012; WU et al., 2012).

Além disso, esta matriz densa de fibrina faz com que o PRF seja reabsorvido lentamente, característica que pode explicar a liberação gradual dos fatores de crescimento (LEKOVIC et al., 2012). Em acréscimo à isso, a fibrina formada naturalmente fornece boas propriedades mecânicas do PRF, promovendo adesividade e resistência à tração (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012; KEYHAN et al., 2013). Com isso, é possível a obtenção de membranas de fibrina que propiciam uma maior migração celular e funcionam como uma barreira

reabsorvível excelente para a regeneração óssea guiada (SIMONPIERI et al., 2004; CHANG; ZHAO, 2011; GUPTA et al., 2011; KUMAR; SUBHASHINI, 2013; SRISURANG et al., 2013). As características hemostáticas, angiogênicas e de biocompatibilidade deste material são notáveis e capazes de estimular a regeneração das células do periósteo para evitar a instalação de defeitos ósseos nas cirurgias pré-protéticas ou para recobrir sítios de enxertos (RAO et al., 2012). Existem estudos mostrando uma maior proliferação celular com a utilização de membranas de PRF em comparação com membranas de colágeno (GASSLING et al., 2010).

Para melhor compreender o efeito biológico da matriz de fibrina do PRF, precisamos considerar a capacidade de estimulação da angiogênese, de controle imunológico e de proteção da ferida da mesma. O PRF devido à sua estrutura é capaz de dar suporte ao desenvolvimento simultâneo destes três fenômenos, essenciais no processo de reparo tecidual. A atividade angiogênica do material é explicada pelo formato tridimensional da fibrina e pela ação das citocinas presas em suas malhas. A rigidez da rede de fibrina favorece a formação dos capilares sanguíneos pela estimulação das células endoteliais pelos fatores de crescimento de fibroblastos (FCFb) e de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KUMAR; SUBHASHINI, 2013; SRISURANG et al., 2013). Outros fatores de crescimento importantes no processo de cura liberados pelo PRF são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), responsável pela migração e proliferação de células mesenquimais (DOHAN et al., 2004), o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) (DANIELSEN; AGREN; JORGENSEN, 2010; CHANG; ZHAO, 2011; DOUGLAS et al., 2012) que funciona como um mediador da inflamação favorecendo a cicatrização dos tecidos (EHRENFEST et al., 2010) e o fator de crescimento de insulina 1 e 2 (IGF) (GUPTA et al., 2011). Este último está envolvido com a multiplicação e diferenciação celular, determina a apoptose com objetivo de proteção celular e também exerce quimiotaxia para os osteoblastos humanos favorecendo a regeneração óssea (DOHAN et al., 2004). Além disso, o PRF contém interleucinas e fator de necrose tumoral capazes de ativar o sistema de defesa

(GARBLING et al., 2009), que associados à migração de neutrófilos demonstram um papel importante no controle da imunidade (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012). Isso explica uma menor incidência de infecções pós-operatórias quando o alvéolo é preenchido com PRF após as extrações dentárias (GUPTA et al., 2011; HOAGLING; LINES, 2013).

A reparação óssea é mediada por vários acontecimentos intra e extracelulares mediados por proteínas de sinalização. As plaquetas por sua vez, têm grande participação nestes eventos pela secreção de fatores de crescimento e na formação do coágulo (WU et al., 2012). Nessa temática o PRF se destaca, as suas características diferenciadas na liberação dos fatores de crescimento têm mostrado um favorecimento significativo da regeneração do tecido duro e integração de enxertos ósseos (KANG et al., 2011). Tal alternativa terapêutica é animadora, pois a deficiência óssea corresponde ao principal problema da Implantodontia na atualidade e, diante da estabilidade e das taxas de sucesso desse tratamento, tal problema deve ser superado (JANG et al., 2010).

Evidências clínicas de sucesso no reparo ósseo com a utilização do PRF foram mostradas em cirurgias de elevação do seio maxilar (CHOUKROUN et al., 2006a; EHRENFEST et al., 2010; THORAT; PRADEEP; PALLAVI; 2011; KUMAR; SUBHASHINI, 2013), na correção de defeitos ósseos alveolares e preenchimento de alvéolos após a extração para colocação de implantes (SAMMARTINO et al., 2011), na potencialização da cicatrização de enxertos ósseos utilizados em reconstruções maxilofaciais e na estimulação da osteogênese (KANG et al., 2011). Rao et al. (2012) e Singh, Kholi e Gupta (2012) utilizaram o PRF como adjuvante na cicatrização tecidual e óssea após a exodontia de terceiros molares inferiores e notaram uma melhoria na cicatrização das feridas, diminuição da dor e aumento na densidade óssea, comprovando que a utilização do PRF é um meio eficaz de promover e acelerar a regeneração de tecidos moles e duros. Outra situação clínica em que o PRF tem sido utilizado com sucesso é no preenchimento de cavidades ósseas após o tratamento cirúrgico de lesões patológicas que acometem o complexo bucomaxilofacial (PATIL et al., 2013). Apesar dos bons resultados, a regeneração óssea é um

processo complexo que envolve uma série de eventos celulares e o mecanismo pelo qual o PRF favorece este processo ainda não é totalmente compreendido, portanto são necessários novos estudos para aperfeiçoamento desta possibilidade de aplicação terapêutica (WU et al., 2012).

Da mesma forma, algumas aplicações clínicas que podem ser interessantes para o PRF ainda foram pouco investigadas, como é o caso dos defeitos periodontais (RAO et al., 2012). A regeneração periodontal é definida como a reconstrução de uma parte perdida ou lesada do periodonto, restabelecendo sua forma e função e um dos fatores determinantes na regeneração dos tecidos periodontais são as células do ligamento periodontal, ou seja, os fibroblastos (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011). Estes apresentam papel fundamental na formação óssea, pois possuem uma população celular heterogênea na qual algumas células tem a capacidade de se diferenciar em osteoblastos. Estudos recentes mostram que o PRF foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos humanos (CHANG; ZHAO, 2011). Segundo Chang e Zhao (2011), a utilização de PRF em defeitos periodontais infraósseos reduziu a profundidade da bolsa, com ganho de inserção clínica que pode ser traduzida pela regeneração periodontal alcançada. Do mesmo modo, Thorat, Pradeep e Pallavi (2011) observaram melhora significativa na periodontite crônica com ganho de inserção óssea maior nos pacientes tratados com PRF comparados com aqueles pacientes tratados somente pelo procedimento cirúrgico.

Outra alternativa encorajadora da utilização do PRF é no campo da engenharia de tecidos (EHRENFEST et al., 2010; GASSLING et al., 2011; GUPTA et al., 2011). Esta se ocupa da formação de órgãos e tecidos em laboratório para posterior implantação no corpo humano. Na correção dos grandes defeitos ósseos de mandíbula o padrão ouro utilizado é o enxerto autógeno devido as excelentes propriedades osteoindutoras e osteocondutoras. Entretanto, esta conduta apresenta desvantagens relacionadas com a maior morbidade do paciente associada ao desconforto da área doadora no pós-operatório e a restrição no tamanho do transplante ósseo. Por isso, em alguns

casos tem se falado na utilização da engenharia de tecidos. Para tanto, o mecanismo pelo qual ocorre a cicatrização e a integração do enxerto ósseo ao organismo precisa estar bem definido e o uso de materiais que simulem essa situação em laboratório é necessário. Basicamente todo o reparo tecidual ósseo depende da interação do enxerto com as células da matriz extracelular e citocinas e de um suprimento vascular adequado. Tudo isso deve ser considerado na escolha do material que servirá de suporte para a formação óssea *in vitro* e que, portanto deve suprir todas as suas necessidades (GASSLING et al., 2011). Nesse contexto, o PRF com seus constituintes celulares e suas características morfológicas peculiares parece ser um meio de cultura adequado para a proliferação óssea em laboratório, mas novos estudos são necessários para esclarecer melhor o assunto (EHRENFEST et al., 2010).

Além dessas aplicações, já se fala na utilização do PRF como um agente de nivelamento para a formação de dentina reparativa na regeneração do tecido pulpar (HUANG et al., 2010), na regeneração do ligamento periodontal de dentes avulsionados (ZHAO et al., 2013), na regeneração de cartilagens (RAO et al., 2012) e como uma forma de se acelerar a cicatrização de feridas avulsivas de tecidos moles (DESAI et al., 2013). Nesta última aplicação, a utilização do PRF sobre feridas abertas tem favorecido a cicatrização por segunda intenção e Desai et al. (2013) têm chamado o processo de reparo com a utilização desta técnica de reparação por segunda intenção modificada. Além dessas possibilidades, já existem relatos da revascularização pulpar de dentes com ápice aberto com diagnóstico de necrose após 6 e 12 meses do preenchimento da porção apical do canal radicular com PRF (MISHRA; NARANG; MITTAL, 2013).

Além de todas as vantagens mencionadas do uso do PRF e seus efeitos relativamente promissores, trata-se de uma preparação autóloga, ou seja, produzida a partir do próprio sangue do paciente e por isso é de baixo custo (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012). O protocolo de obtenção simples também é vantajoso, pois é de rápida realização consumindo pouco tempo do paciente e do cirurgião (SIMONPIERI et al., 2004), associado com desconforto e risco de complicações mínimos (GUPTA et al., 2011). Somado a isso, podemos destacar

que a técnica de manipulação e inserção deste biomaterial não é sensível, portanto não exige nenhuma habilidade específica do profissional (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011). Nesse aspecto, frente aos inúmeros possíveis benefícios do PRF nas diversas situações clínicas destacadas na literatura, novas pesquisas devem ser realizadas para que o mesmo seja utilizado com segurança nos casos indicados e suas características sejam melhores exploradas para promover um reparo tecidual adequado e em menor tempo, com ênfase em uma regeneração óssea de qualidade.

2.2 SUBSTITUTOS ÓSSEOS: OSSO BOVINO

As perdas dentárias levam à reabsorção óssea progressiva, sendo esta bastante acentuada no primeiro ano, e depois passa a ser gradativa e constante podendo provocar atrofia do rebordo residual. Nestes casos, geralmente são necessários procedimentos cirúrgicos extras para a obtenção de uma quantidade mínima de tecido ósseo alveolar que seja capaz de suportar uma prótese. Para isso, são realizadas as cirurgias ósseas reconstrutivas por meio da utilização de enxertos ósseos. Estes podem ser chamados de substitutos ósseos se apresentam características de biocompatibilidade, boas propriedades biomecânicas e capacidade de devolver a funcionalidade ao osso (TATULLO et al., 2012).

Apesar de o enxerto ósseo autógeno continuar sendo o padrão ouro nas enxertias ósseas, algumas desvantagens na sua utilização tais como, maior morbidade e não aceitação do paciente de uma segunda ferida cirúrgica, impulsionaram o desenvolvimento da engenharia de tecidos (TATULLO et al., 2012). Esta se apresenta como uma alternativa para substituir tecidos ósseos danificados. O grande desafio dessa ciência é desenvolver um *scaffold* (arcabouço) com porosidade suficiente e com alta resistência mecânica para permitir a adesão, migração, crescimento e proliferação celular resultando em uma boa integração com os tecidos vizinhos (AOKI, 1991; LEGEROS, 1991).

Um grande número de materiais vem sendo utilizado para fabricar *scaffolds* para o osso, como polímeros biovidros (AOKI, 1991; LEGEROS, 1991), enxertos ósseos humanos congelados (CHOUKROUN et al., 2006a) e uma grande variedade de fosfatos de cálcio, de origens sintéticas ou bovinas. Por possuir similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos, a hidroxiapatita é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos. Na regeneração óssea, favorece o crescimento ósseo nos locais onde se encontra (osteocondutora) e estabelece ligações de natureza química com o tecido ósseo (bioativa). Com isso, permite a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e de outras células ósseas. Fato interessante é que as células não distinguem a hidroxiapatita da superfície óssea, comprovando a grande similaridade química superficial do material. Além disso, também possui a capacidade de trocar íons com o meio fisiológico promovendo equilíbrio entre o enxerto e o osso (AOKI, 1991; LEGEROS, 1991). A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água e também proteínas e colágeno sejam adsorvidas na superfície, induzindo assim, a regeneração tecidual (HENCH; WILSON, 1993). Entretanto, a grande limitação destes biomateriais essencialmente osteocondutores é a ausência de células vivas. Dessa forma, com a descoberta dos concentrados de plaquetas, têm-se discutido a associação destes materiais (CHOUKROUN et al., 2006a; BOLUKBASI et al., 2013). Estudos já mostram que a associação de enxerto ósseo congelado ao plasma rico em fibrina em cirurgias de elevação do assoalho do seio maxilar reduz o tempo de cicatrização para a colocação de implantes em 4 meses (CHOUKROUN et al., 2006a).

No contexto dos materiais osteocondutores, os xenoenxertos ganham destaque. No que diz respeito aos enxertos de origem bovina, os primeiros relatos de utilização iniciaram nos anos 60, sendo estes os enxertos heterógenos mais utilizados até os dias atuais. Logo após a introdução no mercado a sua popularidade decresceu em virtude das altas taxas de reações autoimunes apresentadas pelos pacientes, devido provavelmente ao sistema precário de processamento do material na época. O desenvolvimento de novas técnicas de

manipulação e tratamento prévio à utilização nos pacientes permitiu a reintrodução destes materiais nos anos 90, agora livres de quaisquer componentes orgânicos, o que praticamente elimina o risco de desenvolvimento de reações alérgicas ou transmissão de doenças do animal ao paciente. Com isso, sua utilização foi amplamente difundida como forma de favorecer a regeneração óssea para a reabilitação com implantes dentários. Bio-Oss®, Laddec®, Bon-Apattite® são alguns exemplos deste material. O processo de purificação do material difere entre os fabricantes, entretanto estudos histológicos mostram que a sua utilização aumenta a quantidade e qualidade óssea obtida (LINDHE; KARRING; LANG, 2003).

Os enxertos de origem animal são constituídos basicamente de matriz mineral óssea purificada e derivados de matriz de esmalte dos germes dentários porcinos. Assim, a hidroxiapatita é seu principal constituinte, sendo isento de células e proteínas (ROSA; SHAREEF; NOORT, 2000). A extração da porção orgânica do osso xenógeno é realizada quimicamente, a porção inorgânica por sua vez, é similar ao osso humano nos aspectos relacionados à sua superfície, porosidade e constituição mineral, proporcionando adequada vascularização e integração ao osso receptor (DALIH et al., 1988). A osteocondutividade do material se deve à estrutura tridimensional e ao grande número de poros interconectados, que permitem a proliferação celular e vascular e a formação de tecido de granulação em seu interior para posterior regeneração óssea (SICCA et al., 2000). Além disso, a estimulação da neoformação óssea com a utilização destes materiais parece melhorada quando associados às membranas de colágeno para a regeneração óssea guiada (DALIH et al., 1988).

A regeneração óssea guiada consiste numa alternativa terapêutica para a recuperação do tecido ósseo perdido através da utilização de barreiras, que correspondem às membranas. Tal conduta impede a proliferação do tecido mole entre as partículas do material por funcionar como barreira física, impedindo assim a formação de defeitos na área a ser recuperada pela neoformação óssea (DAHLIN et al., 1988). Esta técnica tem sido utilizada em associação com

inúmeros materiais de enxerto, incluindo os xenoenxertos (BOLUKBASI et al., 2013).

Estudos mostram que o uso de osso mineral bovino particulado (Bio-Oss®) associado ao osso autógeno em alvéolos em cicatrização precoce concomitante à instalação dos implantes favoreceu a osseointegração (BURSER et al., 2008). Bons resultados também foram obtidos quando tal material é utilizado no preenchimento do alvéolo logo após a extração dentária na tentativa de se evitar a reabsorção óssea alveolar após a exodontia e possibilitar a reabilitação futura com implantes (BARONE et al., 2008). Para o aumento do rebordo alveolar, a associação de osso bovino particulado (Bio-Oss®) com osso autógeno propiciou formação óssea satisfatória (CORINALDESI et al., 2007). Além disso, o aumento horizontal ou lateral ósseo pode ser alcançado com a utilização do xenoenxerto associado às membranas (HAMMERLE et al., 2008). Em contrapartida a regeneração óssea vertical ou em altura constitui-se em um verdadeiro desafio para o cirurgião pela dificuldade de posicionamento do enxerto de forma a favorecer a nutrição, bem como o posicionamento e estabilidade posterior do implante parece ser dificultada nestes tipos de rebordo (FELICE et al., 2009). Apesar destas dificuldades, o trabalho de Felice et al. (2009) mostrou que a utilização de enxertos em bloco de origem autógena e heterógena após 16 meses não apresentaram diferenças significativas na reabsorção óssea periimplantar e no ganho ósseo vertical. Os autores sugerem que o enxerto xenógeno até apresentaria vantagens sobre o autógeno pela menor morbidade.

O enxerto ósseo bovino (Bio-Oss®) tem mostrado resultados favoráveis também nas técnicas de elevação do seio maxilar devido às suas excelentes propriedades osteocondutoras e a resposta inflamatória e/ou alérgica insignificante (SARTORI et al., 2003; TATULLO et al., 2012). Outra aplicação promissora do enxerto xenógeno é na regeneração periodontal, neoformação de cimento e reinserção das fibras de Sharpey (CAMELO et al., 2001). Esses resultados satisfatórios obtidos com a utilização do osso bovino podem ser explicados por sua capacidade de estimular a remodelação óssea e deposição

de osso neoformado. Isso ocorre devido a sua semelhança ao osso humano no que diz respeito às suas propriedades físicas e químicas (TATULLO et al., 2012).

Estudos devem ser realizados com o objetivo de conseguir respostas esclarecedoras sobre as vantagens do PRF na regeneração óssea, suas limitações e indicações específicas e sua ação em associação com substitutos ósseos. A busca por previsibilidade na utilização destes biomateriais passa obrigatoriamente pelos estudos experimentais em animais, onde as respostas sobre sua real ação no reparo ósseo podem ser alcançadas e as suas particularidades conhecidas e melhoradas. Uma vez que, a utilização de materiais de enxerto para a reabilitação de rebordos alveolares é uma necessidade cada vez mais evidente (TATULLO et al., 2012). O plasma rico em plaquetas (PRP), ainda é muito utilizado para acelerar e potencializar a regeneração óssea, mas seus efeitos têm sido muito discutidos (HE et al., 2009). Essa nova geração de concentrado de plaquetas, o PRF, apresenta características e comportamento bem diferentes do PRP na regeneração óssea, e estudos mostram superioridade do mesmo em vários aspectos (EHRENFEST et al, 2010; KUMAR, KUBASHINI, 2013). Assim, o presente estudo se justifica, pois como a diversidade de opções de enxertos é grande, tornam-se pouco evidentes as vantagens de cada material sobre os demais para garantir uma escolha precisa entre eles para o uso clínico.

3 OBJETIVO

O presente trabalho objetivou investigar o comportamento do enxerto de plasma rico em fibrina e de osso bovino particulado, associados ou não, em defeitos de tamanho crítico criados na calota craniana de ratos sistemicamente saudáveis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG pelo número 460/2012 (ANEXO A). Para o presente trabalho foram utilizados 56 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso entre 450 e 550 gramas (Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG). Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental. Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos de 8 animais cada e 8 animais foram utilizados como ratos doadores para a obtenção dos derivados sanguíneos homogêneos. Sendo que 4 animais de cada grupo experimental foram eutanasiados após 30 e 60 dias pós-operatórios. Os grupos estão descritos abaixo.

4.1.1 Grupos Controles

CA: coágulo autógeno;

CH: coágulo homogêneo.

4.1.2 Grupos Experimentais

PRF-a: Plasma Rico em Fibrina autógeno;

PRF-h: Plasma Rico em Fibrina homogêneo;

BO: osso bovino particulado (Bio - Oss®, Geistlich Pharma AG, Suíça);

BOPRF: Bio-Oss associado ao PRF-h.

4.2 PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM FIBRINA

4.2.1 Punção intracardíaca e retirada do sangue

Foi realizada a punção intracardíaca com agulha 25x7 acoplada em seringa de 5 ml (Prolab - Materiais para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil), diretamente no ventrículo esquerdo do animal (FIGURA 1). O volume sanguíneo retirado, aproximadamente 3,5 ml para a produção do PRF autógeno dos ratos que receberam o defeito na calvária e 10 ml de ratos doadores para o PRF homogêneo, foi distribuído em tubos de 5 ml e centrifugado imediatamente.

Figura 1 - Punção intracardíaca e retirada do sangue para obtenção do PRF.



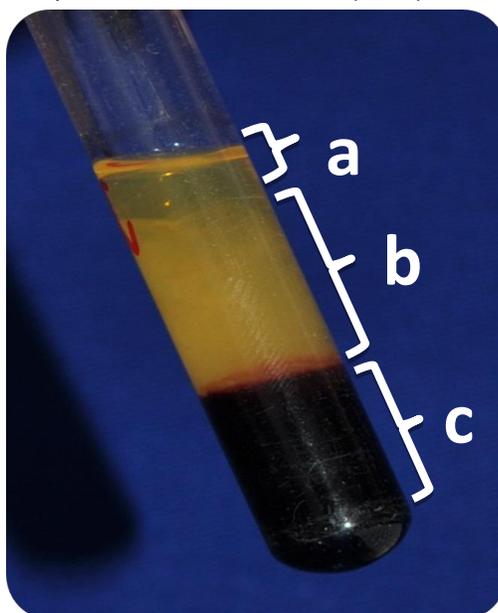
Fonte: Do autor.

4.2.2 Separação celular

A separação dos elementos do sangue foi realizada por centrifugação (Centrífuga de Bancada NT 810, Novatécnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). O sangue coletado foi centrifugado uma única vez a 3000 rpm

por 10 minutos sem a adição de qualquer anticoagulante como preconizado por Dohan et al. (2006) resultando em três componentes básicos: células vermelhas do sangue (fundo do tubo), plasma rico em fibrina - PRF (meio do tubo) e plasma pobre em plaquetas ou componente seroso ou acelular – PPP (parte superior do tubo) como observado na Figura 2.

Figura 2 - Separação dos componentes do sangue após a centrifugação. a: plasma pobre em plaquetas (PPP), b: plasma rico em fibrina (PRF) e c: células vermelhas do sangue.



Fonte: Do autor.

4.2.3 Isolamento do PRF

Após a centrifugação, a porção do meio do tubo (PRF) foi pinçada para separá-lo dos restantes dos componentes do sangue (FIGURA 3).

Figura 3 - Separação do PRF dos demais componentes do sangue por pinçamento.

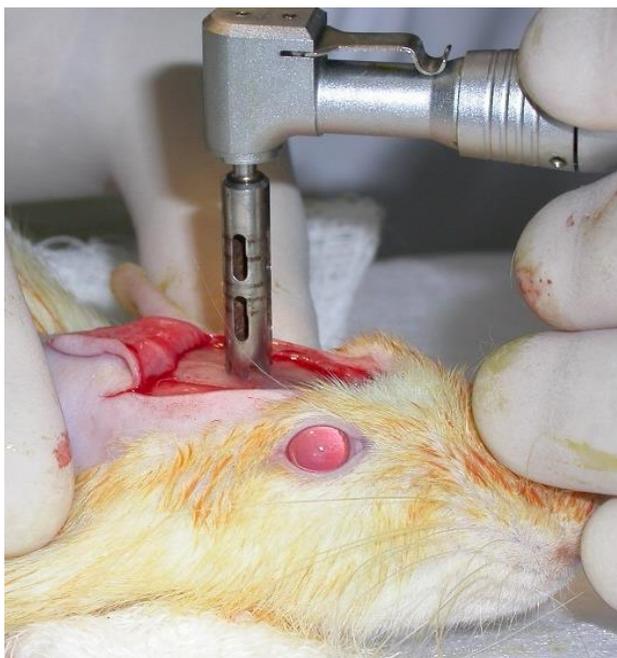


Fonte: Do autor.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6mg/kg) (Rompum®, Bayer, Brasil) e quetamina (70mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brasil). Após tricotomia na região fronto-parietal da calvária dos animais e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine®, Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil), procedeu-se a realização de uma incisão em “U”, com base caudal na calvária do rato e um retalho de espessura total foi rebatido em direção posterior. Com broca trefina de 5mm de diâmetro (3i), acoplada em motor BLM 600 plus (Driller) e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Fisiológico 0,9%, Equiplex®, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), foi realizado um defeito de tamanho crítico na calvária do rato (FIGURA 4).

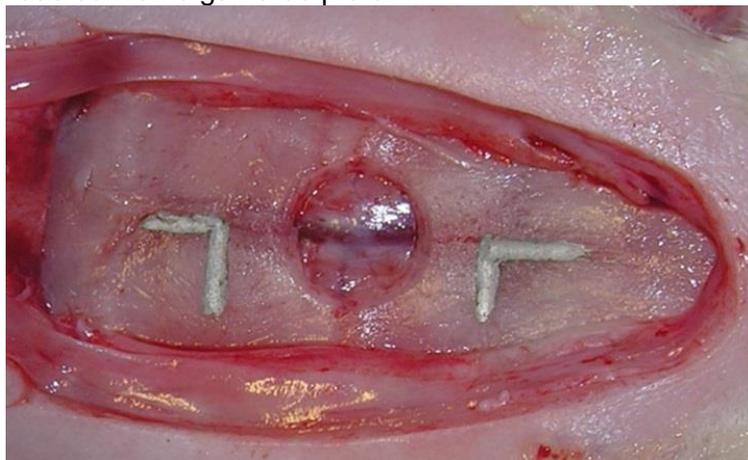
Figura 4 - Criação do defeito ósseo na calvária do rato com broca trefina de 5 mm de diâmetro.



Fonte: Do autor.

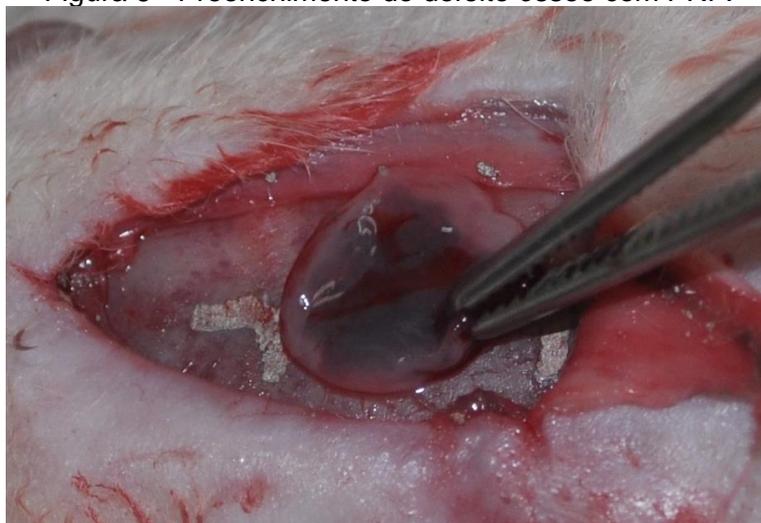
O defeito incluiu uma porção da sutura sagital. Marcações em formato de “L” foram feitas com broca carbide tronco-cônica a 2 mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico e preenchidas com amálgama de prata (Amálgama DFL-ALLOY, Brasil) como preconizado por Messoria et al. em 2007 (FIGURA 5). O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividiu o defeito cirúrgico ao meio. Estas marcações são úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial, permitindo localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histológica. Os animais de cada grupo tiveram os defeitos preenchidos com os respectivos materiais (FIGURA 6) e os tecidos foram voltados em posição e suturados com fio de Seda (4-0 Silk, Ethicon, São Paulo, SP, Brasil).

Figura 5 - Defeito ósseo: canaletas realizadas a 2 mm de ambas as margens do defeito ósseo preenchidas com amálgama de prata.



Fonte: Do autor.

Figura 6 - Preenchimento do defeito ósseo com PRF.



Fonte: Do autor.

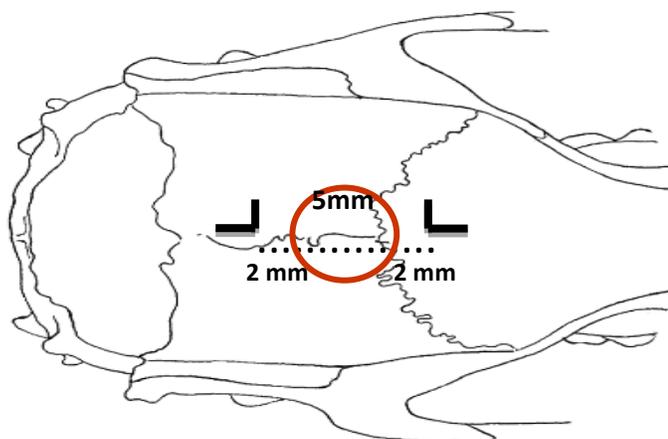
4.4 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados após 30 ou 60 dias pós-operatórios em câmara de CO₂.

4.5 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS

As peças foram fixadas em formol neutro a 10% (Formol Estabilizado sol. 10%, Sciavico Comércio e Indústria Ltd., Sabará, MG, Brasil), lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18% (Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada, RS, Brasil). Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de amálgama com formato de “L” como referência. Foram realizados também cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime apresentasse 9 mm de extensão no sentido longitudinal (FIGURA 7). Assim, foi possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original. Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Cortes seriados no sentido longitudinal da peça com seis micrometros de espessura foram realizados, iniciando a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise microscópica.

Figura 7 - Esquema do defeito ósseo mostrando que o maior eixo de cada L são coincidentes e dividem o defeito ao meio, resultando em um comprimento longitudinal de 9 mm.



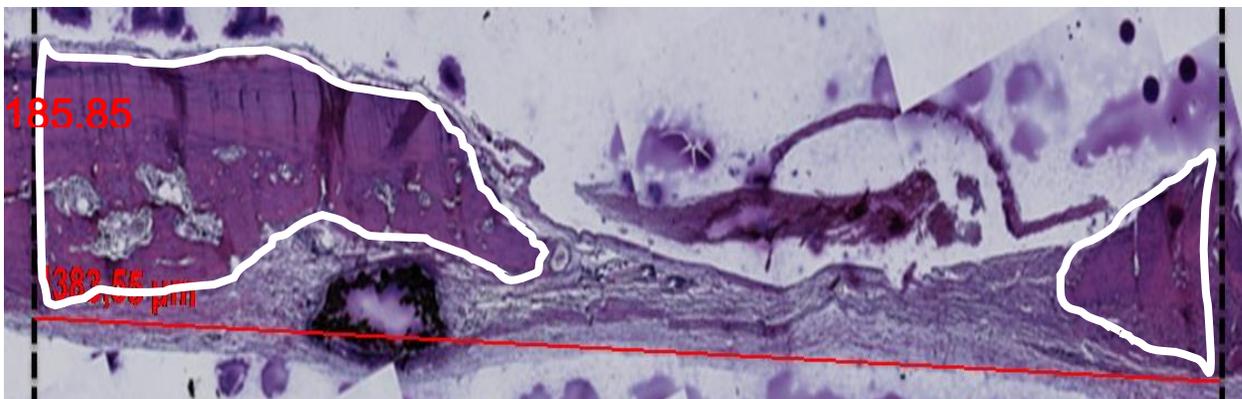
Fonte: Adaptado de Messoria et al. (2007).

4.6 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Os cortes histológicos foram selecionados de maneira que o defeito cirúrgico original pudesse ser avaliado histomorfometricamente em toda a sua extensão. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (Axiocam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada à um microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com um aumento original de 40x (lente objetiva N - Achroplan) e salvas em um computador. A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio de um software “AxioVision Rel. 4.8”. Os seguintes critérios baseados nos trabalhos de Melo et al. (2005) e Messoria et al. (2007) foram utilizados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitalizadas:

- a) A área total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico. Esta área foi determinada pela identificação das superfícies interna e externa da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas curvaturas. Foram então medidos a partir das extremidades dos espécimes 2 mm em direção ao centro do defeito para estabelecer os limites do defeito cirúrgico original. A área de osso (AO) foi delineada dentro dos limites da área total (AT).
- b) A AT foi medida em μm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AO também foi medida em μm^2 e calculada como porcentagem de AT (FIGURA 8).

Figura 8 - Área de osso (AO) delimitada dentro dos limites da área total (AT).



4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A área de neoformação óssea ou área de osso (AO) foi representada pela porcentagem da área de novo osso em relação à área total do defeito cirúrgico, envolvendo os cortes histológicos localizados em toda a extensão do defeito cirúrgico original. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey à 5% de significância.

5 RESULTADOS

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

5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 30 DIAS

A Figura 9 mostra a visão panorâmica dos defeitos ósseos do período experimental de 30 dias.

5.1.1 Grupo CA

Nenhum dos espécimes apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico. A formação óssea observada foi discreta, restrita às margens do defeito, sendo predominante a presença de tecido conjuntivo com um grande número de fibroblastos e poucas fibras colágenas que apresentou espessura menor que a espessura da calvária original. Em alguns pontos pode-se observar a presença de infiltrado inflamatório (FIGURA 9a).

5.1.2 Grupo CH

Foi observada formação óssea ligeiramente maior que no grupo coágulo autógeno com maior quantidade de tecido ósseo neoformado, mas nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. O tecido conjuntivo apresentou-se bem desenvolvido, com maior número de fibras e em alguns pontos observou-se a presença de infiltrado inflamatório. A espessura do tecido de preenchimento mostrou-se bem menor que a espessura da calvária (FIGURA 9b).

5.1.3 Grupo PRF-a

Nenhum espécime apresentou formação óssea ao longo de todo o defeito. Foi notada neoformação óssea em ambas as margens do defeito ósseo, sendo mais

evidente em uma das margens. A formação óssea progrediu das extremidades do defeito para o seu centro de forma que a menor espessura de tecido ósseo foi observada na porção central do defeito cirúrgico e grande parte do mesmo ainda encontrava-se repleto de tecido conjuntivo frouxo com moderada quantidade de fibroblastos e raras células inflamatórias. Em alguns espécimes foram observadas formações ósseas isoladas ao longo do defeito (FIGURA 9c).

5.1.4 Grupo PRF-h

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. Foi percebido um predomínio de tecido conjuntivo com numerosas fibras colágenas paralelas à superfície do defeito e poucos fibroblastos. Algumas trabéculas ósseas isoladas foram observadas ao longo do defeito. A formação óssea observada não acompanhou a espessura da calvária original (FIGURA 9d).

5.1.5 Grupo BO

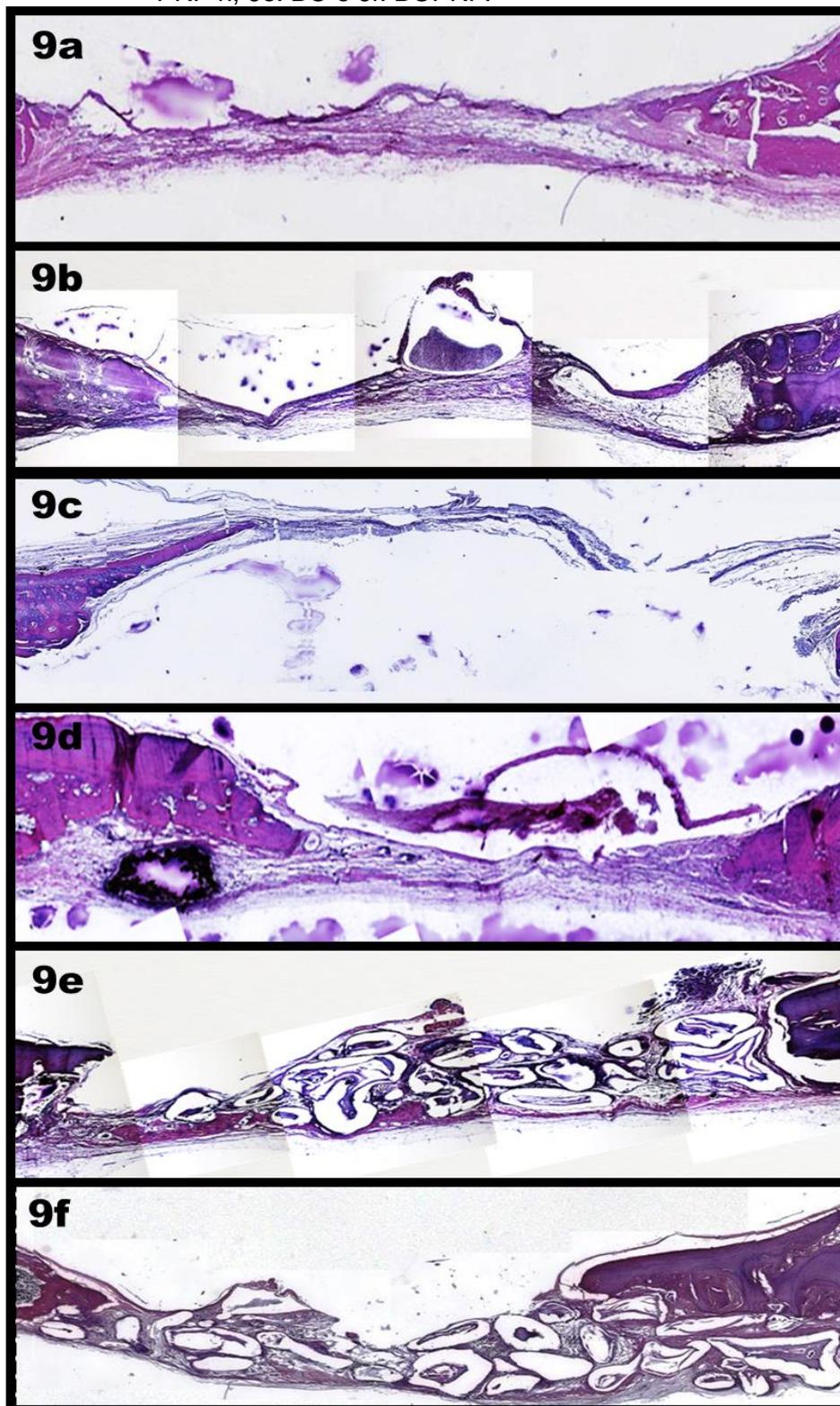
Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. Novo osso bem desenvolvido foi observado restrito às margens do defeito. As partículas de Bio-Oss preenchem a maior parte do defeito, mantendo a espessura da calvária original e apresentaram-se circundadas por tecido conjuntivo rico em fibroblastos, em alguns pontos com características de tecido maduro e bem organizado com presença de matriz osteóide e osteoblastos, e em outras regiões frouxo e desorganizado. A maioria das partículas apresentou-se fissurada com invaginação de tecido conjuntivo em suas fissuras e centros escavados. Em algumas áreas, foi observada a presença de infiltrado inflamatório (FIGURA 9e).

5.1.6 Grupo BOPRF

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. Entretanto, neoformação óssea bem desenvolvida foi observada em todos os espécimes sendo maior em uma das margens do defeito e aproximando-se de sua região central. A espessura do novo osso acompanhou a espessura da calvária original. As partículas de Bio-Oss encontravam-se distribuídas ao longo do defeito e circundadas por tecido

conjuntivo maduro, com muitas fibras colágenas e moderada quantidade de células e vasos sanguíneos associados à grande quantidade de matriz osteóide. O aspecto fissurado das partículas e presença de centros escavados ao redor das mesmas com invaginação de tecido conjuntivo foi percebido em várias regiões (FIGURA 9f).

Figura 9 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos do período experimental de 30 dias. 9a: CA, 9b: CH, 9c: PRF-a, 9d: PRF-h, 9e: BO e 9f: BOPRF.



Fonte: Do autor.

5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 60 DIAS

Na Figura 10 observa-se a visão panorâmica dos defeitos ósseos do período experimental de 60 dias.

5.2.1 Grupo CA

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito, sendo que a formação óssea permaneceu limitada às margens do mesmo. Porém, maior quantidade de trabéculas ósseas foi observada e o tecido ósseo apresentou-se bem desenvolvido. O tecido conjuntivo ao longo do defeito apresentou grande quantidade de fibras colágenas e espessura bem menor que a espessura da calvária original (FIGURA 10a).

5.2.2 Grupo CH

O fechamento completo do defeito não foi observado em nenhum espécime. A formação óssea na maioria dos espécimes permaneceu próxima às margens do defeito, sendo a maior parte do mesmo preenchido por tecido conjuntivo denso e bem organizado com espessura inferior a da calvária original (FIGURA 10b).

5.2.3 Grupo PRF-a

Nenhum espécime apresentou formação óssea ao longo de todo o defeito. Tecido ósseo neoformado bem desenvolvido foi observado próximo às margens do defeito e ao longo do mesmo, trabéculas ósseas isoladas foram vistas entre o tecido conjuntivo denso e organizado. Os tecidos ósseo e conjuntivo depositados ao longo do defeito apresentaram espessura bem inferior à espessura original da calvária (FIGURA 10c).

5.2.4 Grupo PRF-h

Um dos espécimes apresentou formação óssea ao longo de todo o defeito, mas com espessura menor que a da calvária original. Nos outros espécimes foi observada

deposição de novo osso principalmente nas adjacências das margens do defeito, apesar disso, percebeu-se várias formações ósseas isoladas ao longo do mesmo. O tecido conjuntivo apresentou-se bem organizado com grande quantidade de fibras colágenas e poucas células (FIGURA 10d).

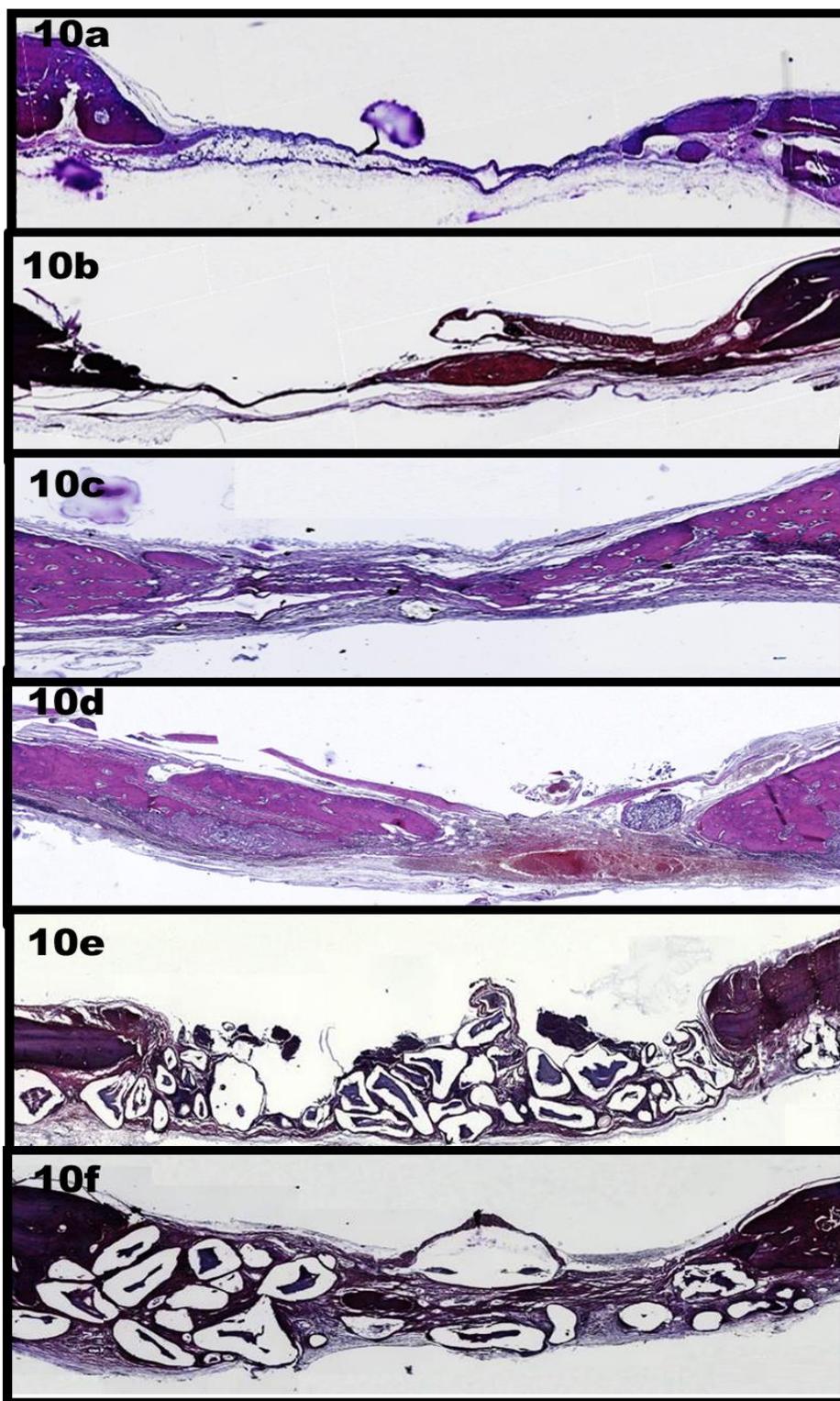
5.2.5 Grupo BO

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. A maior neoformação óssea localizou-se próxima as margens do defeito de ambos os lados, estendendo-se em direção ao seu centro. Em vários pontos foram observadas trabéculas ósseas isoladas ao longo do defeito. As partículas de Bio-Oss apresentaram invaginação de tecido conjuntivo em seus centros escavados e fissuras. Entretanto, foi percebido um tecido conjuntivo mais denso, organizado e com presença de matriz osteóide e maior neoformação óssea neste período experimental do que no período de 30 dias. Uma tendência de manutenção da espessura da calvária original no novo osso depositado e tecido conjuntivo circunjacente foi observada (FIGURA 10e).

5.2.6 Grupo BOPRF

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito ósseo. O novo osso foi depositado das margens do defeito em direção ao seu centro. Em todos os espécimes foi observada uma manutenção da espessura da calvária original no tecido ósseo neoformado. As partículas de Bio-Oss encontraram-se dispersas ao longo do defeito, sendo encontradas em menor número e tamanho quando comparadas ao período experimental de 30 dias. As partículas remanescentes apresentavam-se fissuradas e circundadas por centros escavados com tecido conjuntivo bem organizado invaginado e matriz osteóide em abundância. Em diversos pontos do defeito já havia ausência das partículas de Bio-Oss que deram lugar a formações ósseas isoladas (FIGURA 10f).

Figura 10 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos do período experimental de 60 dias. 10a: CA, 10b: CH, 10c: PRF-a, 10d: PRF-h, 10e: BO e 10f: BOPRF.



Fonte: Do autor.

5.3 ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada. As médias percentuais e os desvios-padrões para todos os grupos e períodos, assim como o resultado da comparação entre os mesmos foram calculados.

A porcentagem de formação óssea levando-se em conta a AT (área total do defeito) e AO (área de osso) de cada espécime segundo os períodos e grupos experimentais estão ilustradas no final do presente trabalho (APÊNDICE A), onde pode-se observar que os espécimes com maior formação óssea pertencem aos grupos BO e BOPRF do período experimental de 60 dias.

Da mesma forma, ao avaliar as médias percentuais da histometria da AO em relação aos períodos experimentais, observa-se que a maior média percentual de formação óssea tanto no período de 30 como no de 60 dias foi observada no grupo BOPRF, correspondendo a 54,0525% e 63,5875% respectivamente (TABELA 1).

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

Nível	n	Média	Erro padrão
Grande média	48	34,4031	1,6704
Períodos			
PRF-a 30d	4	21,7775	5,7867
PRF-a 60d	4	23,0350	5,7867
PRF-h 30d	4	28,1250	5,7867
PRF-h 60d	4	47,7525	5,7867
Bio-Oss 30d	4	26,1500	5,7867
Bio-Oss 60d	4	57,3450	5,7867
Bio-Oss + PRF 30d	4	54,0525	5,7867
Bio-Oss + PRF 60d	4	63,5875	5,7867
Coag.-a 30d	4	16,7000	5,7867
Coag.-a 60d	4	20,5525	5,7867
Coag.-h 30d	4	26,4150	5,7867
Coag.-h 60d	4	27,3450	5,7867

Fonte: Do autor.

Após a submissão dos dados de histometria da AO dos diferentes períodos experimentais à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatística entre os dados ($\alpha < 0,05$) (TABELA 2). Então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para poder observar entre quais períodos ocorreram estas diferenças (TABELA 3).

Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os períodos experimentais

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	α
Histometria X Períodos	11	11829,594	1075,4176	8,029	0,0000
Resíduo	36	4822,0239	133,94511		
Total corrigido	47	16651,618			

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

Fonte: Do autor.

Tabela 3 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos experimentais

(continua)

Períodos	N	Média	Homogeneidade
Coag.-a 30d	4	16,7000	A
Coag.-a 60d	4	20,5525	AB
PRF-a 30d	4	21,7775	AB
PRF-a 60d	4	23,0350	AB
Bio-Oss 30d	4	26,1500	ABC
Coag.-h 30d	4	26,4150	ABC
Coag.-h 60d	4	27,3450	ABC
PRF-h 30d	4	28,1250	ABC
PRF-h 60d	4	47,7525	BCD
Bio-Oss + PRF 30d	4	54,0525	DE
Bio-Oss 60d	4	57,3450	E
Bio-Oss + PRF 60d	4	63,5875	E
Contraste		Diferença	Limite
1-2		-1,2575	28,5656
1-3		-6,3475	28,5656
1-4		-25,9750	28,5656

Tabela 3 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos experimentais

(continuação)

Contraste	Diferença	Limite
1-5	-4,3725	28,5656
1-6	-35,5675	28,5656 *
1-7	-32,2750	28,5656 *
1-8	-41,8100	28,5656 *
1-9	5,0775	28,5656
1-10	1,2250	28,5656
1-11	-4,6375	28,5656
1-12	-5,5675	28,5656
1-13	-5,0900	28,5656
2-4	-24,7175	28,5656
2-5	-3,1150	28,5656
2-6	-34,3100	28,5656 *
2-7	-31,0175	28,5656 *
2-8	-40,5525	28,5656 *
2-9	6,3350	28,5656
2-10	2,4825	28,5656
2-11	-3,3800	28,5656
2-12	-4,3100	28,5656
3-4	-19,6275	28,5656
3-5	1,9750	28,5656
3-6	-29,2200	28,5656 *
3-7	-25,9275	28,5656
3-8	-35,4625	28,5656 *
3-9	11,4250	28,5656
3-10	7,5725	28,5656
3-11	1,7100	28,5656
3-12	0,7800	28,5656
4-5	21,6025	28,5656

Tabela 3 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos experimentais

(continuação)

Contraste	Diferença	Limite
4-6	-9,5925	28,5656
4-7	-6,3000	28,5656
4-8	-15,8350	28,5656
4-9	31,0525	28,5656 *
4-10	27,2000	28,5656
4-11	21,3375	28,5656
4-12	20,4075	28,5656
5-6	-31,1950	28,5656 *
5-7	-27,9025	28,5656
5-8	-37,4375	28,5656 *
5-9	9,4500	28,5656
5-10	5,5975	28,5656
5-11	-0,2650	28,5656
5-12	-1,1950	28,5656
6-7	3,2925	28,5656
6-8	-6,2425	28,5656
6-9	40,6450	28,5656 *
6-10	36,7925	28,5656 *
6-11	30,9300	28,5656 *
6-12	30,0000	28,5656 *
7-8	-9,5350	28,5656
7-9	37,3525	28,5656 *
7-10	33,5000	28,5656 *
7-11	27,6375	28,5656
7-12	26,7075	28,5656
8-9	46,8875	28,5656 *
8-10	43,0350	28,5656 *
8-11	37,1725	28,5656 *

Tabela 3 – Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos experimentais

Contraste	Diferença	(conclusão)
		Limite
8-12	36,2425	28,5656 *
9-10	-3,8525	28,5656
9-11	-9,7150	28,5656
9-12	-10,6450	28,5656
10-11	-5,8625	28,5656
10-12	-6,7925	28,5656
11-12	-0,9300	28,5656

*Denota diferença estatística significante.

Fonte: Do autor.

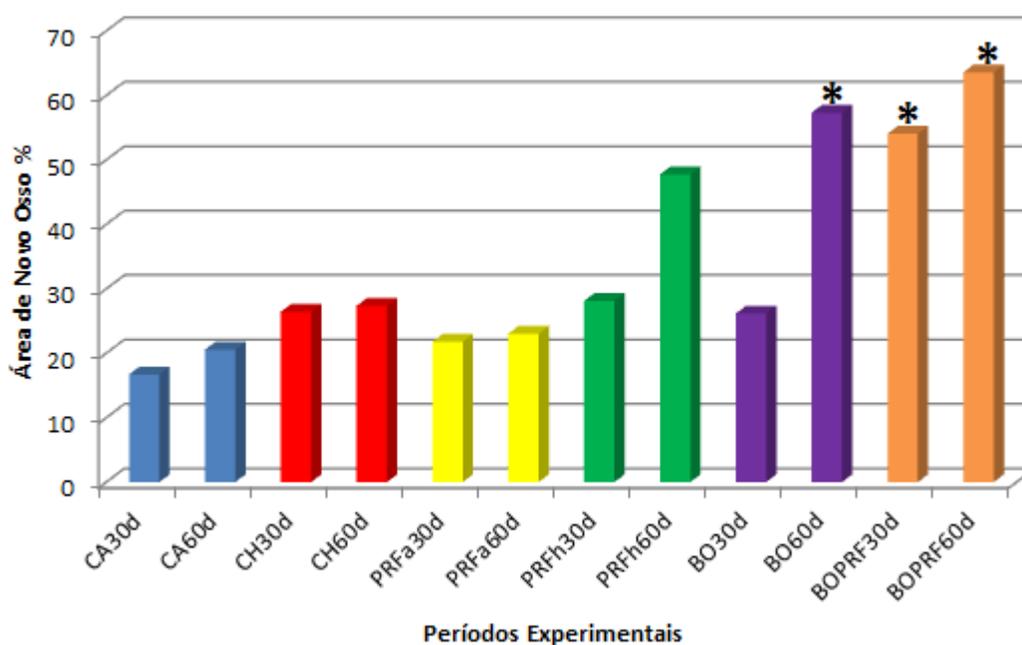
Na avaliação dos períodos separadamente, observou-se que no período experimental de 30 dias a neoformação óssea no grupo BOPRF (54,0525%) foi significativamente maior do que aquela encontrada nos grupos CA e CH (16,7000% e 26,4150% respectivamente), PRF-a (21,7775%) ou PRF-h (28,1250%), como também no grupo BO (26,1500%).

Da mesma forma, no período experimental de 60 dias, a maior média percentual no novo osso foi notada no grupo BOPRF (63,5875%), sendo esta significativamente maior que a média de formação óssea observada nos grupos CA e CH (20,5525% e 27,3450% respectivamente), bem como nos grupos PRF-a (23,0350) e PRF-h (47,7525%). Em relação a considerável formação óssea no grupo BO após 60 dias que apresentou uma média percentual de 57,3450%, notou-se que este valor também foi estatisticamente maior que aqueles observados nos grupos CA, CH, PRF-a e PRF-h. Entre os grupos BO (57,3450%) e BOPRF (63,5875%) não foram notadas diferenças estatisticamente significantes no período experimental de 60 dias ($p > 0,05$), embora numericamente a maior formação óssea tenha sido observada nos espécimes do grupo BOPRF (TABELA 3 e FIGURA 11).

Ao avaliar os dados de histometria, comparando períodos diferentes entre si, a maioria das significâncias apontou valores estatisticamente maiores em períodos mais tardios (60 dias) do que em períodos mais precoces (30 dias). Entretanto, notou-se que, a maior neoformação óssea no grupo BOPRF foi tão discrepante em relação a alguns

grupos experimentais, que mesmo em períodos mais curtos de avaliação (30 dias), cuja média percentual de neoformação óssea neste período foi de 54,0525%, foi considerada estatisticamente maior do que as médias de outros grupos, tais como nos grupos CA (20,5525%), CH (27,3450%) e PRF-a (23,0350%) em períodos mais longos de avaliação (60 dias) (TABELA 3 e FIGURA 11).

Figura 11 - Gráfico de colunas das médias percentuais da AO segundo os períodos experimentais (*Denota diferença estatística significativa).



Fonte: Do autor.

Quanto à análise estatística levando-se em consideração os grupos experimentais, a formação óssea foi maior no grupo BOPRF (58,8200%), seguido pelos grupos BO (41,7175%), PRF-h (37,9387%), CH (26,8800%), PRF-a (22,4062%) e CA (18,6262%) respectivamente. Esses dados estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias percentuais e erro padrão dos dados da histometria de AO segundo os grupos experimentais

Nível	n	Média	Erro padrão
Grande média	48	34,4031	1,9613
Grupos			
PRF-a	8	22,4062	4,8042
PRF-h	8	37,9387	4,8042
Bio-Oss	8	41,7175	4,8042
Bio-Oss + PRF	8	58,8200	4,8042
Coag.-a	8	18,6262	4,8042
Coag.-h	8	26,8800	4,8042

Fonte: Do autor.

Após a submissão dos dados de histometria de AO dos diferentes grupos experimentais à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatística entre os dados ($\alpha < 0,05$) (TABELA 5). Então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para observar-se entre quais grupos ocorreram estas diferenças, como ilustrado na Tabela 6.

Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os grupos experimentais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	α
Histometria X Grupos	5	8896,4518	1779,2904	9,636	0,0000
Resíduo	42	7755,1658	184,6481		
Total corrigido	47	16651,618			

*G.L.: grau de liberdade *S.Q.: soma dos quadrados *Q.M.: média dos quadrados
Fonte: Do autor.

Tabela 6 - Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os grupos experimentais

Grupos	n	Média	Homogeneidade
Coag.-a	8	18,6262	A
PRF-a	8	22,4062	AB
Coag.-h	8	26,8800	AB
PRF-h	8	37,9387	AB
Bio-Oss	8	41,7475	BC
Bio-Oss + PRF	8	58,8200	C

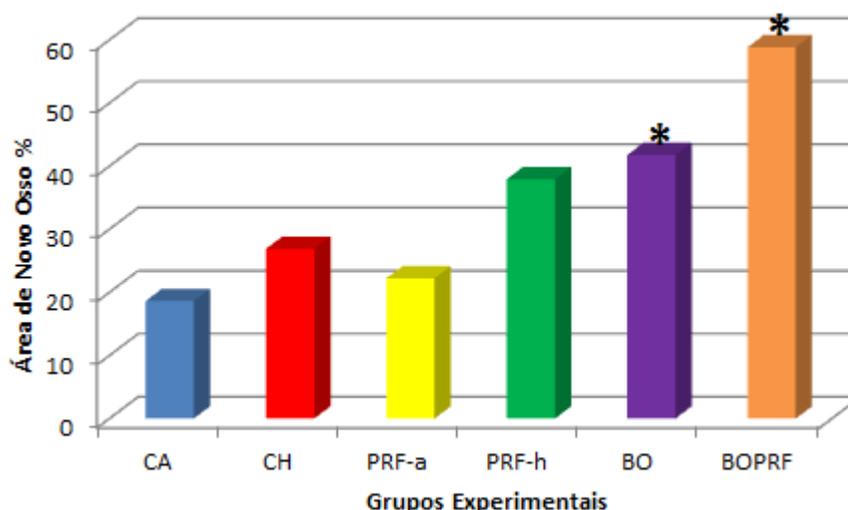
Contraste	Diferença	Limite
1-2	15,5325	20,2839
1-3	19,3412	20,2839
1-4	36,4138	20,2839 *
1-5	3,7800	20,2839
1-6	4,4737	20,2839
2-3	3,8087	20,2839
2-4	20,8813	20,2839 *
2-5	19,3125	20,2839
2-6	11,0587	20,2839
3-4	17,0725	20,2839
3-5	23,1212	20,2839 *
3-6	14,8675	20,2839
4-5	40,1938	20,2839 *
4-6	31,9400	20,2839 *
5-6	8,2537	20,2839

*Denota diferença estatística significante.

Fonte: Do autor.

Quanto aos grupos experimentais foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na média percentual de neoformação óssea do grupo BOPRF (58,8200%) em relação aos grupos CA (18,6262%), CH (26,8800%), PRF-a (22,4062%) e PRF-h (37,9387%). Significância estatística também foi notada em relação ao grupo BO (41,7475%) e o grupo CA (18,6262%). Porém, entre os grupos BO (41,7475%) e BOPRF (58,8200%), não foram apontadas diferenças significantes estatisticamente ($p > 0,05$) (TABELA 6 e FIGURA 12). Sendo que nestes dois grupos foram observadas as maiores médias percentuais de neoformação óssea e apesar de não haver diferenças estatísticas, numericamente observou-se maior quantidade de osso neoformado no grupo BOPRF.

Figura 12 - Gráfico de colunas das médias percentuais da AO segundo os grupos experimentais (*Denota diferença estatística significativa).



Fonte: Do autor.

Em relação aos grupos CA e CH, tanto quando avaliados os valores dos grupos ou dos períodos separadamente, não houveram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Porém, a maior média AO foi observada no grupo do CH (26,8800%). De forma semelhante, não foi observada significância na diferença entre os grupos PRF-a e PRF-h nas avaliações entre os grupos e entre os períodos. Apesar disso, a maior média percentual de AO também foi percebida no grupo do PRF-h, correspondendo a 37,9387%.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou avaliar basicamente o efeito do PRF, associado ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss), em defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de ratos. Apenas um espécime do grupo do PRF-h do período experimental de 60 dias apresentou formação óssea ao longo de toda a extensão do defeito, mas sem acompanhar a espessura da calvária original. Os demais espécimes apresentaram fechamento incompleto do defeito, confirmando que 5 mm correspondem a um tamanho crítico, como já estabelecido por Bosch, Melsen e Vargervik em 1998.

O modelo experimental de defeitos ósseos na calvária de ratos utilizado no estudo em questão pareceu adequado para avaliação da regeneração óssea com a utilização do PRF. Outros autores já utilizaram este modelo experimental para esse fim (KANG et al., 2011). Além disso, os resultados obtidos foram semelhantes a outros estudos que utilizaram animais de maior porte, tais como coelhos (PRIPATNANONT et al., 2013) e porcos (SRISURANG et al., 2013). A escolha dos autores por estes modelos experimentais é compreensível, quando consideramos que em animais maiores é possível a retirada de um maior volume de sangue e conseqüentemente a produção de uma maior quantidade de PRF. Na presente investigação, optou-se por utilizar ratos doadores para a obtenção de um maior volume de sangue e de PRF. Isso porque a quantidade sanguínea possível de ser removida para a produção do PRF autógeno é bastante reduzida devido ao pequeno porte destes animais. Tal conduta é comum na literatura, sendo inúmeros os autores que utilizam ratos doadores para a obtenção de concentrados de plaquetas sem interferências em seus resultados. Isso porque o risco de antigenicidade parece insignificante quando os animais doadores são saudáveis, da mesma idade e espécie dos animais receptores (ASPENBERG; VIRCHENKO, 2004). Assim, pode-se sugerir que a utilização de animais doadores para a obtenção de derivados sanguíneos em pesquisas experimentais com modelos de pequeno porte é viável. No presente estudo, nenhuma reação de antigenicidade foi notada nos ratos receptores e não houve diferenças estatisticamente significantes entre a neoformação óssea obtida nos produtos de origem autógena ou homogênea. Apesar

disso, numericamente a maior formação óssea foi observada nos grupos homogêneos. Os autores acreditam que essa discreta maior formação óssea no grupo PRF-h ocorreu provavelmente pela maior quantidade de sangue utilizada para a produção do PRF, e conseqüentemente pode ter ocorrido uma maior concentração de plaquetas e, portanto, maior disponibilidade de fatores de crescimento.

Quanto ao período experimental, numerosos trabalhos que utilizam materiais de enxerto para avaliar a regeneração de defeitos ósseos mostraram que 30 dias é um período suficiente para a observação da formação óssea e vascular em diversos modelos experimentais (TAMIMI et al, 2006; OZIDEMIR et al., 2013). Entretanto, como o PRF parece exercer um efeito prolongado sobre o reparo tecidual, com liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011), torna-se importante também a avaliação de seu efeito sobre a regeneração óssea após 60 dias pós-operatórios. Além disso, outros autores já utilizaram o período experimental tardio de 60 dias para avaliar o efeito do PRF na regeneração óssea em calvária de coelhos (PRIPATNANONT et al., 2013). Em acréscimo a isso, segundo Sohn et al. (2010), é importante a avaliação da regeneração óssea após 60 dias, pois é considerado um período longo o suficiente para se observar a ação do material sobre a formação óssea, no que diz respeito a incorporação, remodelação e quantidade de regeneração óssea produzida, assim como a reabsorção dos materiais de enxerto pode ser percebida.

A realização destas pesquisas avaliando a ação de diferentes tipos de enxertos na regeneração de defeitos ósseos é cada vez mais frequente e justificável. Tendo em vista que a busca por condições ósseas satisfatórias dos maxilares que permitam reabilitações posteriores é uma busca constante da Odontologia, principalmente no campo da Cirurgia Bucomaxilofacial e Implantodontia (EHRENFEST et al., 2010). A procura por previsibilidade e biocompatibilidade na utilização de materiais substitutos ósseos impulsionou a utilização de derivados sanguíneos nos últimos anos, principalmente no que diz respeito aos concentrados de plaquetas. O PRP, descrito como a primeira geração de concentrado de plaquetas, ainda é amplamente utilizado para o favorecimento da reparação tecidual. Entretanto, estudos atuais mostram que sua capacidade de favorecer a regeneração óssea parece ser pouco significativa (HE et

al., 2009). Assim, mais recentemente surgiu o PRF, com a promessa de um efeito mais significativo sobre o tecido ósseo em reparação por apresentar a característica peculiar de liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento. Além disso, devido a sua simplicidade de obtenção, facilidade de manipulação e boas propriedades físicas, vêm ganhando cada vez mais espaço nas pesquisas relacionadas à otimização da regeneração óssea (CHOUKROUN et al., 2006b). No presente estudo, os autores preferiram utilizar o PRF isolado ou em associação ao Bio-Oss pela sua simplicidade de manipulação e preparo e em virtude da inconsistência de informações a cerca da utilização do PRP na regeneração óssea, como já citado por Pripatnanont et al. (2013). Tanto que já existem alguns estudos comparando o efeito do PRP e do PRF na regeneração tecidual e uma miscelânea de resultados tem sido relatada.

No tratamento de defeitos de furca de molares, Bajaj et al. (2013) relataram resultados semelhantes na utilização de ambos os concentrados de plaquetas, embora numericamente o melhor resultado tenha sido obtido nos sítios tratados com PRF. Quanto aos estudos *in vitro*, os resultados são bastante contraditórios. Enquanto He et al. (2009) mostraram uma maior proliferação de osteoblastos de ratos em contato com o PRF, Garbiling et al. (2009) observaram que o PRP mostrou-se superior ao PRF na liberação de fatores de crescimento. Em virtude desse desencontro de resultados entre os estudos envolvendo o PRP e o PRF, mais estudos devem ser realizados para esclarecer as reais diferenças e efeitos destes materiais na regeneração tecidual.

Vários autores têm pesquisado a ação do PRF na regeneração óssea, seja com a sua utilização isolada ou em associação a outros materiais de enxerto. Kang et al. (2011) notaram uma otimização da regeneração óssea dos defeitos ósseos criados na calota de ratos com a utilização do PRF. De forma semelhante, Tajima et al. (2013) mostraram que a utilização do PRF como único material de enxerto para elevação do assoalho do seio maxilar concomitante à instalação de implantes, permitiu um ganho significativo em altura do rebordo, de $4,28 \pm 1,00$ milímetros (variação de 1,9-6,1 mm) antes da cirurgia para $11,8 \pm 1,67$ milímetros (variação de 9,1-14,1 mm) após cirurgia. Outro trabalho em humanos que ilustra o efeito positivo da utilização isolada do PRF sobre a regeneração óssea envolve o preenchimento de alvéolos pós exodontia de pré-molares com este concentrado de plaquetas. Neste estudo, os autores mostraram maior

manutenção da espessura alveolar, além da obtenção de um tecido ósseo mais organizado e desenvolvido quando o PRF foi utilizado (HAUSER et al., 2013). Em acréscimo, Li et al. (2013), mostraram o favorecimento da mineralização do osso alveolar com a utilização somente do PRF, demonstrando que a fibrina tem ação valiosa na diferenciação osteogênica. Dessa forma, estes trabalhos sugerem que o PRF utilizado isoladamente já é capaz de favorecer a regeneração óssea, situação numericamente também observada no presente estudo (PRF-a: 22,4062% e PRF-h: 37,9387%), mas sem diferenças estatísticas em relação aos grupos CA (18,6262%) e CH (26,8800%).

Contudo, outros autores mostraram que o PRF utilizado isoladamente apresentou ação discreta sobre a regeneração periodontal (SHARMA; PRADEEP, 2011; THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011) e óssea (CHOUKROUN et al., 2006b; PECK; MARNEWICK; STEPHEN, 2011) e que melhores resultados são obtidos pela associação do mesmo a outros materiais de enxerto, como o Bio-Oss ou o osso autógeno (INCHINGOLO et al., 2010; ZHANG et al., 2012). Isso ocorre porque a associação destes biomateriais produz um substituto ósseo altamente biocompatível que apresenta além das características de osteocondução, a capacidade de induzir a formação óssea (LI et al., 2013). Tanto que os melhores resultados obtidos no presente trabalho foram observados no grupo BOPRF. No período 30 dias a média percentual de AO observada neste grupo, que correspondeu a 54,0525%, apresentou-se estatisticamente maior que a AO alcançada em todos os outros grupos experimentais. Da mesma forma, após 60 dias, o grupo BOPRF apresentou diferença significativa estatisticamente em relação aos demais grupos, exceto com o grupo BO (57,3450%), com o qual apresentou semelhança estatística neste período experimental. Apesar disso, numericamente a maior formação óssea foi observada no grupo BOPRF, que apresentou uma média percentual de 63,5875%. Isso pode ter ocorrido pela característica diferenciada do PRF na liberação dos fatores de crescimento e citocinas (KANG et al., 2011) aliada às excelentes propriedades osteocondutoras do Bio-Oss (XUAN et al., 2013), que associadas parecem acelerar e aumentar a quantidade de novo osso em defeitos de tamanho crítico. Entretanto, Pripatnanont et al. (2013) observaram um aumento significativo na regeneração óssea de defeitos na calvária de

coelhos quando o PRF foi associado ao osso autógeno e o mesmo não foi percebido com outros materiais substitutos ósseos.

Em contrapartida, assim como no presente estudo, Tatullo et al. (2012) conseguiram melhores resultados no tratamento da atrofia maxilar severa quando utilizaram o PRF associado ao Bio-Oss em relação a utilização do Bio-Oss sozinho em cirurgias de elevação do assoalho do seio maxilar. Os autores observaram que nos pacientes onde se utilizou os materiais associados houve uma redução no tempo de reparação, sendo possível a instalação mais precoce dos implantes com apenas 106 dias pós-operatórios, quando são recomendados no mínimo 150 dias para só então ser realizada a instalação dos implantes. De forma semelhante, Inchingolo et al. (2010) também relataram sucesso na osseointegração de implantes inseridos em áreas onde foi realizado levantamento do assoalho do seio maxilar pela associação do PRF e Bio-Oss.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os relatos da literatura quanto a maior formação óssea observada quando se utiliza o PRF associado ao Bio-Oss. Uma vez que, tanto na avaliação entre grupos (58,8220%) como entre períodos (63,5875%), a maior média percentual de novo osso foi observada na associação destes materiais (grupo BOPRF). A ausência de diferença estatística foi notada apenas no período experimental de 60 dias em relação ao grupo BO (57,3450%) e na comparação entre grupos, também com o grupo BO (41,7475%). Este, por sua vez, é um dos materiais substitutos ósseos mais utilizados na atualidade por seus bons resultados descritos na literatura e semelhança com o tecido ósseo humano (XUAN et al., 2013). O Bio-Oss tem sido considerado uma alternativa à utilização do enxerto ósseo autógeno, ainda considerado o padrão ouro nas cirurgias ósseas reconstrutivas. Apesar disso, apresenta como principal limitação a característica de ser essencialmente osteocondutor. Entretanto, sua associação ao PRF acrescenta propriedades osteoindutivas pela liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento, fornecendo características ideais para a regeneração do tecido ósseo (LI et al., 2013).

No grupo BO foi observada uma formação óssea bastante considerável no período de 60 dias (57,3450%) e quando se comparou os grupos experimentais (41,7475%). Entretanto, com 30 dias foi observada formação óssea mais discreta

(26,1500%), semelhante estatisticamente aos grupos CA e CH. Isso sugere que, em períodos mais longos de acompanhamento de defeitos ósseos preenchidos com o Bio-Oss tende-se a observar maior quantidade de tecido ósseo neoformado do que em períodos mais curtos. Uma vez que a reabsorção do material vai ocorrendo ao longo do tempo e o espaço vai sendo preenchido com novo osso. Tal situação é ilustrada no trabalho de Sartori et al. (2003), onde avaliaram-se histologicamente espécimes que foram submetidos à cirurgias de elevação do seio maxilar com Bio-Oss em diferentes períodos. Após 8 meses pós-operatórios foi observada uma porcentagem de novo osso de 29,8% e 70,2% correspondeu ao Bio-Oss. Entretanto, após 2 anos, houve um aumento na deposição óssea para 69,7% e com 10 anos este valor subiu para 86,7%, sugerindo que o Bio-Oss é reabsorvido lentamente e substituído por tecido ósseo (SARTORI et al., 2003).

A literatura mostra que não somente a associação do PRF ao Bio-Oss traz resultados promissores na reparação óssea, mas também à sua associação a outros materiais de enxerto. No estudo de Bansal e Bharti (2013), ficou evidenciada uma redução significativamente maior na profundidade de bolsas periodontais quando o PRF foi associado ao osso desmineralizado liofilizado (DFDBA) em comparação com as bolsas tratadas somente com o DFDBA. Outro material de enxerto que apresentou resultados satisfatórios em associação ao PRF é o osso bovino mineralizado poroso (BPBM), apresentando uma redução significativa nos defeitos periodontais quando comparada a utilização isolada do BPBM (LEKOVIC et al., 2012). Quanto à associação do PRF ao osso autógeno também foram evidenciados efeitos positivos sobre a regeneração óssea (PRIPATNANONT et al., 2013). Bolukbasi et al. (2013) associaram o PRF a um fosfato de cálcio bifásico e também notaram o favorecimento do reparo ósseo em defeitos produzidos na tíbia de ovelhas.

Os materiais utilizados como arcabouços, onde se enquadra o Bio-Oss, apresentam função importante na manutenção do espaço para a posterior deposição de tecido ósseo, pois apresentam tendência à reabsorção e substituição (SARTORI et al., 2003). Na avaliação histológica do presente estudo observamos que nos grupos onde foi utilizado o Bio-Oss (grupos BO e BOPRF), as partículas do material e o tecido conjuntivo que as circundavam formaram uma faixa semelhante à espessura da calvária

original na maioria dos espécimes. Essa característica de preenchimento do defeito também já foi observada com outros materiais, tais como o biovidro (SCULEAN et al., 2002). Dessa forma, levando-se em consideração que o espaço disponível abaixo do retalho mucoperiosteal interfere diretamente com o sucesso de qualquer tipo de terapia regenerativa, podemos supor que as partículas de Bio-Oss favoreceram a maior deposição óssea por funcionar como uma barreira física impedindo o colapso do retalho. Isso pode explicar a maior formação óssea observada no grupo BO, no período de 60 dias, e no grupo BOPRF, após 30 e 60 dias. Além disso, a osteocondutividade deste biomaterial foi confirmada pela observação em ambos os períodos experimentais, de tecido conjuntivo fibroso e matriz osteóide em íntimo contato com as suas partículas. A matriz osteóide e fibras colágenas circundantes provavelmente sofrerão invasão celular e diferenciação óssea posteriormente. Tanto que também foram observadas muitas partículas fissuradas com centros escavados circundando-as, onde em alguns pontos já foi notada invasão celular. Essas células possivelmente correspondem a linhagens mesenquimais indiferenciadas como já observadas por outros autores (TADJOEDIN et al., 2002).

Assim, os substitutos ósseos, principalmente aqueles à base de osso bovino, com destaque para o Bio-Oss pelos bons resultados relatados na literatura, são exemplos de bons arcabouços para a regeneração óssea. Uma alternativa interessante pode ser a associação destes materiais de preenchimento com concentrados de plaquetas, em especial o Plasma Rico em Fibrina (PRF), em virtude das inúmeras vantagens já comentadas. Dessa forma, além da propriedade osteocondutora do enxerto bovino, as citocinas e fatores de crescimento disponibilizados pelo PRF tendem a acelerar a migração celular e a resposta inflamatória favorecendo ainda mais o reparo tecidual (MESSORA et al., 2007), por funcionar como uma conexão biológica entre as partículas do enxerto (BANSAL; BHARTI, 2013). Diante destas possibilidades de aplicações terapêuticas na regeneração tecidual óssea, novas pesquisas devem ser realizadas para confirmar as reais propriedades do PRF, seja na sua utilização isolada ou em associação com outros biomateriais substitutos ósseos, bem como realizar estudos com períodos de observações mais longos investigando a total substituição/reabsorção dos substitutos ósseos.

7 CONCLUSÕES

Dentro dos limites deste trabalho, quanto à regeneração óssea observada nos diferentes grupos experimentais, conclui-se que o PRF (autógeno ou homogêneo) utilizado isoladamente não mostrou regeneração óssea significativa em defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos em relação aos grupos coágulos, embora médias maiores de AO tenham sido observadas. O grupo BOPRF apresentou formação óssea significativamente maior que todos os outros grupos experimentais após 30 dias, e após 60 dias apresentou AO semelhante apenas ao grupo BO. Assim, observa-se que o PRF favorece a regeneração óssea, principalmente quando associado ao Bio-Oss.

REFERÊNCIAS

ANITUA, E. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 227-234, May. 2006.

AOKI, H. **Science and Medical Applications of Hidroxiapatita**. Takayama Press System Center Co., Inc.; Tokyo, 1991.

ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon in rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 75, n. 1, p. 93-99, 2004.

BAJAJ, P. et al. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrina and platelet-rich plasma in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology Research**, v. 48, p. 573-581, 2013.

BANSAL, C.; BHARTI, V. Evaluation of efficacy of autologous platelet-rich fibrin with desmineralized-freeze dried bone allograft in the treatment of periodontal intrabony defects. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 3, p. 361-366, 2013.

BARONE, A. et al. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical an histomorphometrical study. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1370-77, 2008.

BLOM, A. Which scaffold for which application? **Current Orthopaedics**, v. 21, n. 4, p. 280-287, 2007.

BOLUKBASI, N. et al. The Use of Platelet-Rich Fibrin in Combination With Biphasic Calcium Phosphate in the Treatment of Bone Defects: A Histologic and Histomorphometric Study. **Current Therapeutic Research**, v. 75, p. 15-21, 2013.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.

BUSER, D. et al. Early implant placement with simultaneous guided bone regeneration following single-tooth extraction in esthetic zone: a cross-sectional, retrospective study in 45 subjects with a 2- to 4-year follow-up. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 9, p. 1773-81, 2008.

CAMELO, M. et al. Periodontal Regeneration with an Autogenous Bone Bio-Oss Composite Graft and a Bio Gide Membrane. **Quintessence Publishing Company**, v. 21, n. 2, p. 109-119, 2001.

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

CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontic**, v. 101, n. 3, p. 299-303, Mar. 2006a.

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

CORINALDESI, G. et al. Histologic and histomorphometric evaluation of alveolar ridge augmentation using bone grafts and titanium micromesh in humans. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 8, p. 1477-84, 2007.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided bone regeneration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 81, n. 5, p. 672-676, 1988.

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

DESAI, C. B. et al. Use of Platelet-Rich Fibrin over Skin Wounds: Modified Secondary Intention Healing. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 6, n. 1, p. 35-37, Jan./Mar. 2013.

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

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 101, n. 3, p. 37-44, 2006.

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

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

EHRENFEST, D. M. D.; RASSMUND, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and

platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.

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

ESCULEAN, A. et al. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 4, p. 401-408, 2002.

FELICE, P. et al. Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with interpositional bloc grafts: bone from the iliac crest vs. bovine anorganic bone. Clinical and histologic results up to oneyear after loading from a randomized-controlled clinical trial. **Clinical Oral Implants Research.**, v. 20, n. 12, p. 1386-93, 2009.

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

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

GASSLING, V. et al. Comparison of platelet-rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 3, p. 1-9, 2011.

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

HÄMMERLE, C. H. F. Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. **Clinical Oral Implants Research.**, v. 19, n. 1, p. 19-25, 2008.

HAUSER, F. et al. Clinical and Histological Evaluation of Postextraction Platelet-rich Fibrin Socket Filling: A Prospective Randomized Controlled Study. **Implant Dentistry**, v.22, n.3, p.295-303, 2013.

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

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to Bioceramics**. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., p. 1-15, 1993.

HERRON, S. et al. Ingrowth of bone into absorbable bone cement: an in vivo microscopic evaluation. **American Journal of Orthopedics**, v. 32, n. 12, p. 581-584, 2003.

HOAGLING, D. R.; LINES, G. K. Prevention of Localized Osteitis in Mandibular Third-Molar Sites Using Platelet-Rich Fibrin. **International Journal of Dentistry**, v.2013, 4 páginas, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijd/2013/875380/abs/>>. Acesso em: 27 dez. 2013.

HUANG, F. M. et al. Platelet-rich fibrin increase proliferation and differentiation of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 1628-1632, Oct. 2010.

INCHINGOLO, F et al. Trial with platelet-rich fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 12, p. 1075–1084, 2010.

JANG, E. S. et al. Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontic**, v. 109, n. 6, p. 831-836, June 2010.

KANG, Y. H. et al. Platelet-rich fibrin is a biscalfold ans reservoir of growth factors for tissue regeneration. **Tissue Engineering**, v. 17, n. 3 e 4, p. 349-359, 2011.

KEYHAN, S. O. et al. Use of Platelet-Rich Fibrin and Platelet-Rich Plasma in Combination With Fat Graft: Which is More Effective During Facial Lipostructure? **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 3, p. 610-621, 2013.

KIM, J. S. et al. Clinical Application of Platelet-Rich Fibrin by the Application of the Double J Technique During Implant Placement in Alveolar Bone Defects Areas: Case Reports. **Implant Dentistry**, v. 22, n. 3, p. 244-249, 2013.

KUMAR, R. V.; SUBHASHINI N. Platelet-rich in Fibrin: a new paradigmin in periodontal regeneration. **Cell Tissue Bank**, v. 14, n. 3, p. 453-463, 2013.

LEGEROS, R. Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. In: LEGEROS R. Z. **Monography in Oral Science**. Myers: Basel, 1991, v. 15, p. 37-58.

LEKOVIC, V. et al. Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. Platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 4, p. 409-417, 2012.

LI Q. et al. Platelet-rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Aumentation. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013. Acesso em: 20 /12/2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/638043/abs/>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Periodontologia Clínica e Implantologia Odontológica**. 4ª ed. São Paulo. Editora: Médica Panamericana, 2003.

LUCARELLI, E. et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. **European Cells and Materials**, v. 20, p. 13-23, 2010. Disponível em: <<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol020/pdf/v020a02.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2012.

LUNDQUIST, R. et al. Characteristics of a autologous leucocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 1, p.66-76, 2013.

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

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

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

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

MIRASH, N.; NARANG, I.; MITTAL, N. Platelet-rich fibrin-mediated revitalization of immature necrotic tooth. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 4, n. 3, p. 412-415, July/Sept. 2013.

OZDEMIR, H. et al. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 5, p. 537-544, 2013.

PARAFIORITI, A. et al. Single injection of platelet-rich plasma in a rat Achilles tendon tear model. **Muscles Ligaments Tendons Journal**, v. 1, n. 2, p. 41-47, 2011.

PATIL, V. A. et al. A Novel Approach for Treatment of an Unusual Presentation of Radicular Cysts Using Autologous Periosteum and Platelet-Rich Fibrin in Combination with demineralized Freeze-Dried Bone Allograft. **Cases Reports in Dentistry**, v. 2013, 5 páginas, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/crim/dentistry/2013/893791/>>. Acesso em: 28 dez. 2013

PRIPATNANONT, P. et al. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, p. 1-10, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395296>>. Acesso em: 25 jul. 2013.

PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 9, p. 966-972, 2005.

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

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. V. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 273-7, 2000.

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

SAMMARTINO, G. et al. Prevention of hemorrhagic complications after dental extractions into open heart surgery patients under anticoagulant therapy: the use of leukocyte and platelet-rich fibrin. **Journal of Oral Implantology**, v. 27, n. 6, p. 681-690, 2011.

SARTORI, S. et al. Case Report: Ten-years follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 3, p. 369-372, 2003.

SERNA, V. M. F. Colocación de plasma rico em factores de crecimiento postextracción de terceiros molares inferiores: Reporte de un caso. **Revista Odontológica Mexicana**, v. 15, n. 2, p. 109-114, Apr./June 2011.

SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 2, p. 1705–1712, 2011.

SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 8, n. 1/2, p. 1-10, 2000.

SIMONPIERI, A. et al. Immediate postextraction implantation: interest of the PRF. **Implantodontie**, v.13, n.3, p.177-189, 2004.

SINGH, A.; KOHLI, M.; GUPTA, N. Platelet-rich fibrin: a novel approach for osseous regeneration. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 11, n. 4, p. 430-434, Apr. 2012.

SOHN, J. Y. et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. **Journal of Periodontal Implant Science**, v. 40, p. 180-187, 2010.

SRISURANG, S. et al. Socket preservation using platelet-rich fibrin in conjunction with epithelialized palatal free graft in minipigs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology**, p. 1-10, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212555812002256>>. Acesso em: 17 jun. 2013.

TADJOEDIN, E. S. et al. High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs autogenous bone for sinus floor elevation. Histomorphometrical observations on three split mouth clinical cases. **Clinical Oral Implants Research**, v. 13, n. 4, p. 428-436, 2002.

TAJIMA, N. et al. Evaluation of Sinus Floor Augmentation with Simultaneous Implant Placement Using Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 28, n. 1, p. 77-83, 2013.

TAMIMI, F.M. et al. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 12, p. 922-928, 2006.

THORAT, M.; PRADEEP, A. R.; PALLAVI, B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects a controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 10, p. 925-932, 2011.

TUNALI, M. et al. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 5, p. 438-443, 2013.

XUAN, F. et al. A comparative study of the regenerative effect of sinus bone grafting with platelet-rich fibrin mixed Bio-Oss® and commercial fibrin mixed Bio-Oss®. An experimental study. **Journal of Cranio Maxillofacial Surgery**, p. 1-4 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23911120>>. Acesso em: 29 dez. 2013.

ZHANG, Y. et al. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with desproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation. A histological and histomorphometric study. **Journal of Cranio Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 4, p. 321-328, 2012.

ZHAO, Y. H. et al. The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. **Biomaterials**, v. 34, n. 22, p. 5506-5520, 2013.

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

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 711 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3288-1000 Fax: (35) 3268-1088



Alfenas, 13 de novembro de 2012.

Prof. Ronaldo Célio Mariano

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, de registro 460/2012, intitulado "Avaliação histológica da regeneração óssea com a utilização de plasma rico em fibrina (PRF) associado ou não com biocerâmicas e colágeno bovino em defeitos ósseos na calvária de ratos" está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA - Unifal-MG