



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PERIODONTIA**

EDUARDO FERRUCIO

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM A FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS E LEUCÓCITOS ISOLADA E ASSOCIADA A
HIDROXIAPATITA + β TRICALCIO FOSFATO: ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE COELHOS**

Curitiba

2016

EDUARDO FERRUCIO

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM A FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS E LEUCÓCITOS ISOLADA E ASSOCIADA A
HIDROXIAPATITA + β TRICALCIO FOSFATO: ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Tramontina.

Curitiba

2016

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

F398a 2016	Ferrucio, Eduardo Avaliação do reparo ósseo com a fibrina rica em plaquetas e leucócitos isolada e associada a hidroxiapatita + β tricalcio fosfato: estudo histomorfométrico em calvária de coelhos / Eduardo Ferrucio; orientador, Vinicius Tramontina. – 2016. 47 f. : il. ; 30 cm Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016. Inclui bibliografias 1.Odontologia. 2. Ossos - Regeneração. 3. Hidroxiapatita. 4. Fibrina. 5. Tratamento dentário. 6. Doença periodontal. I. Tramontina, Vinicius. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título. CDD 20. ed. – 617.6
---------------	--

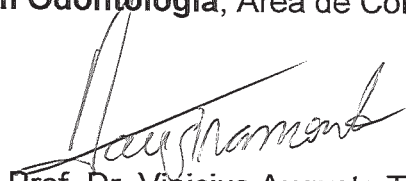
TERMO DE APROVAÇÃO

EDUARDO FERRUCIO

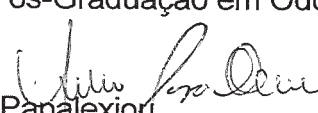
AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM A FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS ISOLADA E ASSOCIADA A HIDROXIAPATITA + β TRICALCIO FOSFATO: ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE COELHOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Periodontia**.

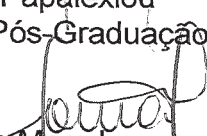
Orientador (a):



Prof. Dr. Vinicius Augusto Tramontina
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



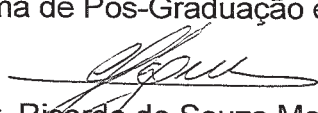
Prof.ª Dr.ª Vula Papalexiou
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof.ª Dr.ª Sônia Mara Luczyszyn
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFSC



Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFSC

Curitiba, 05 de abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que escolheu a Odontologia para meu futuro profissional, assim como permitiu que Eu a executasse da melhor e mais satisfatória maneira;

Agradeço a minha esposa Maria Claudia e aos meus pais Roberto e Arlete pelo apoio, incentivo e ajuda durante estes anos de doutoramento;

Novamente agradeço a minha esposa Maria Claudia e as minhas duas filhas Melissa e Sofia por terem compreendido a minha necessidade de clausura para conseguir silêncio e concentração principalmente nesta final, ao mesmo tempo clamando suas desculpas pela ausência não apenas em alguns dos grandes momentos de família, mas principalmente em momentos importantíssimos na evolução e crescimento das nossas filhas, momentos estes que poderão apenas ser lembrados por imagens;

Agradeço aos Professores do curso pelos ensinamentos passados;

Agradeço ao Sr Mizael Aparecido, do laboratório de técnica operatória, pelo auxílio com o manuseio dos animais;

Agradeço ao Sr Seigo Nagashia e a Sra Ana Paula Camargo Martins, do laboratório de histopatologia da PUCPR, pelo auxílio na confecção das lâminas;

Agradeço à Profa Dra Aline Cristina Batista Rodrigues Yohann e ao Prof Dr Sérgio Aparecido Ignácio pela prontidão e brilhantismo da ajuda dedicada a mim na etapa final deste trabalho;

Agradeço ao meu orientador Prof Dr Vinicius Augusto Tramontina não somente pelo voto de confiança, mas pela sua experiência, paciência e presteza em sua orientação.

Agradeço a toda a equipe da Pós Graduação Odontológica, em especial aos coordenadores Prof Dr Sergio Vieira e a Profa Dra Renata Iani Werneck.

SUMÁRIO

Página Título	01
Resumo	01
Introdução	02
Materiais e Método	04
Resultados	07
Discussão	10
Referências	13
Anexos	16
Versao Ingles para revista International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery	23

1 Avaliação do reparo ósseo com a fibrina rica em plaquetas e leucócitos isolada e
2 associada a hidroxiapatita + β tricalciofosfato: estudo histomorfométrico em
3 calvaria de coelhos
4 Eduardo Ferrucio*, Sung Hyun Kim**, Vula Papalexiou**, Sonia Mara
5 Luczyszyn**, Aline Cristina Rodrigues Yohann***, Sérgio Aparecido Ignacio****,
6 Vinicius Augusto Tramontina**.
7 * Aluno do programa de Doutorado em Odontologia, área de concentração
8 Periodontia, na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-Pr).
9 ** Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de
10 concentração Periodontia (PUCPR).
11 *** Professora do programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de
12 concentração Biociências (PUC PR).
13 **** Professor de Bioestatística da Escola de Saúde e Biociências da Pontifícia
14 Universidade Católica do Paraná (PUCPR).
15 Autor correspondente: Prof. Dr. Vinicius Augusto Tramontina**
16 Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho – Curitiba/PR – CEP: 80242-980
17

18 **Resumo**

19 Dentre os substitutos ósseos disponíveis para procedimentos regenerativos, a
20 hidroxiapatita + β tricalcio fosfato (SBC), como material sintético, e a fibrina rica
21 em plaquetas e leucócitos (LPRF), como material autólogo, tem obtido destaque.
22 O objetivo deste trabalho foi avaliar histomorfometricamente em calvaria de
23 coelhos o potencial de reparo do LPRF isolado e associado ao SBC. Quatro
24 defeitos de 06 mm de diâmetro foram preenchidos com SBC; SBC+LPRF; LPRF
25 e coágulo. Cinco parâmetros foram avaliados após dois meses: área total; área
26 de osso neoformado; porcentagem de osso neoformado; altura do defeito e
27 porcentagem de colágeno tipo I. Os grupos SBC e SBC+LPRF obtiveram os
28 maiores valores para duas variáveis (área total e altura do defeito), diminuindo no
29 grupo LPRF. A variável porcentagem de osso neoformado apresentou valores
30 maiores para o grupo Coágulo, não diferindo do grupo LPRF, mas com valor
31 superior aos grupos SBC+LPRF e SBC. Portanto, conclui-se que o SBC mostrou-
32 se mais favoráveis para manutenção de espaço quando comparado ao LPRF
33 isoladamente, e que a adição do LPRF ao SBC evidenciou uma pequena melhora

1 na porcentagem de osso neoformado e porcentagem de colágeno tipo I, porem
2 sem diferença estatística.

3 Palavras Chave: substituto ósseo bifásico; hidroxiapatita + β tricalcio
4 fosfato; fibrina rica em plaquetas e leucócitos; LPRF.

5 **Introdução**

6 A regeneração do rebordo ósseo reabsorvido tem direcionado as
7 reabilitações implanto suportadas a melhores resultados estéticos e funcionais.
8 Inúmeras técnicas regenerativas estão descritas na literatura ⁽¹⁾. O osso
9 autógeno continua como padrão ouro de escolha para estes procedimentos por
10 funcionar como arcabouço para a angiogênese e deposição da matriz óssea além
11 de possuir osteócitos viáveis e fatores de crescimento (BMP rh2). Porém, a
12 quantidade intra oral limitada e a morbidade decorrente de um segundo local
13 cirúrgico, tem levado os pacientes a optarem por substitutos ósseos de outra
14 origem.

15 Dentre os substitutos ósseos sintéticos indicados para tais procedimentos,
16 o Straumann Bone-Ceramic® (SBC) tem se destacado. É um produto 100%
17 sintético e biocompatível, composto por 60% de hidroxiapatita (HA) e 40% de β
18 tricálcio fosfato (β -TCP). Suas partículas apresentam porosidade de 90%, com
19 estes poros variando entre 100-500 μ m. Segundo Cordaro et al ⁽²⁾, sua
20 biotransformação ocorre através de um processo bifásico: as partículas de β -TCP
21 são geralmente reabsorvidas nos três primeiros meses (fase rápida), enquanto
22 que, as partículas de HA já envoltas pelo osso lamelar neoformado, são
23 reabsorvidas dentro de um período de aproximadamente sete meses (fase lenta).
24 Sua estrutura tridimensional semelhante a do osso humano, expressa uma
25 propriedade osteocondutora favorável, permitindo sua utilização em
26 procedimentos como: regeneração óssea ⁽¹⁾, levantamento de seio maxilar ^(2,3,4,5),
27 preservação alveolar ^(6,7), tratamento de defeitos periodontais intra ósseos ^(8,9).

28 A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF), por sua vez, foi
29 apresentada por Choukroun et al como um substituto ósseo autógeno ⁽¹⁰⁾ obtido
30 através do sangue do próprio paciente, e não mais através de um segundo local

1 cirúrgico para aquisição como necessário para coleta de osso autógeno. Em
2 outro trabalho, Choukroun et al ⁽¹¹⁾ afirmaram que esta membrana de LPRF é
3 considerada uma segunda geração dentre os concentrados plaquetários, por ser
4 centrifugada em procedimento único, a 3000 rpm por 12 minutos, não exigindo a
5 utilização de anticoagulantes, trombina bovina ou agentes de geleificação. Com
6 este processo lento e natural de centrifugação, três camadas são formadas no
7 interior do tubo: no fundo, uma camada de células vermelhas; no topo uma
8 camada sobrenadante de plasma acelular pobre em plaqueta; e na região
9 intermediária a camada de LPRF propriamente dita. Mais de 97% das plaquetas
10 e mais da metade dos leucócitos ficam entremeados nesta rede de fibrina,
11 principalmente localizados nos dois primeiros milímetros próximos a camada
12 vermelha, sendo esta porção, conhecida como “Buffy Coat”, a parte mais
13 importante e funcional ⁽¹²⁾. Sabe-se que a ativação plaquetária e leucocitária
14 libera, por um período médio de 7 a 11 dias, uma gama de fatores de
15 crescimento e citocinas imuno inflamatórias ^(12, 13, 14, 15, 16, 17), principalmente: fator
16 de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento transformador
17 β (TGF β), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento
18 endotelial vascular (VEGF), fator de necrose tumoral (TNF) e Interleucinas (IL).
19 Em função da propriedade cicatricial e moderadora inflamatória oriunda destas
20 citocinas e fatores de crescimento, o LPRF tem sido utilizado na forma de plug e
21 de membrana ⁽¹⁵⁾ nos seguintes procedimentos: preservação de rebordo pós-
22 extração ^(18,19,20); levantamento de seio maxilar ^(21, 22); recobrimentos radiculares
23 ^(23, 24); correção de defeitos periodontais ^(25, 26) e regeneração de rebordo alveolar
24 ^(27,28).

25 Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar histomorfometricamente o
26 potencial de reparo ósseo da fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF)
27 isolada e associada a hidroxiapatita + β tricalcio fosfato (SBC) comparando com o
28 coágulo.

29

30

1 **Materiais e Método**

2 O protocolo utilizado nesta pesquisa foi aprovado pelo CEUA sob parecer
3 Nº 0721/12 – 1ª versão. (Anexo 1). Foram utilizados 12 coelhos albinos da raça
4 “New Zealand” (*Oryctolagus cuniculus*) com aproximadamente 08 meses e peso
5 médio de 3,5 Kg.

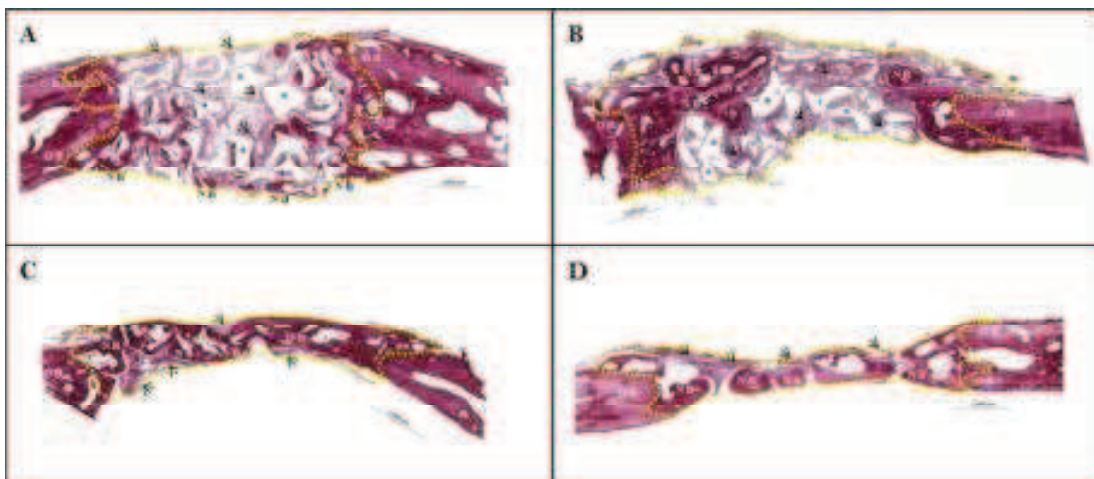
6 Os coelhos receberam inicialmente por via intramuscular Xilazina (08
7 mg/kg) associada a Ketamina (30 mg/kg). Foi realizada a tricotomia externamente
8 à uma orelha e feita assepsia do local. Com um cateter nº 24G realizou-se
9 acesso venoso na veia marginal da orelha e foram retirados 06 ml de sangue
10 venoso. O sangue total foi transferido para um tubo seco de 10 ml *sem*
11 *anticoagulante* e centrifugado a 3000 rpm por 12 min conforme protocolo descrito
12 por Choukroun e Dohan em 2001 ⁽¹¹⁾. Após o término da centrifugação, a porção
13 sobrenadante de plasma pobre em plaqueta foi aspirada com uma seringa estéril
14 e o coágulo de LPRF contido na camada intermediária do tubo foi removido
15 cuidadosamente com uma pinça. A fina camada de células vermelhas aderida à
16 base deste coágulo foi delicadamente removida através de uma simples
17 raspagem com espátula estéril. Este coágulo já limpo foi submetido a
18 procedimento compressivo entre duas gazes estéreis com o intuito de remover o
19 remanescente de plasma criando uma membrana fina, porém resistente (Anexo
20 2). Esta membrana foi mantida em um pote dappen estéril embebida no líquido
21 sobrenadante previamente coletado até o momento de sua utilização.

22 A indução anestésica foi feita com Propofol (10 mg/kg) e sua manutenção
23 com Isoflurano (03%). Para complementação anestésica e controle de
24 sangramento no local do procedimento foi utilizada Lidocaína 02% com
25 Epinefrina (1:100.000). Uma incisão longitudinal de aproximadamente 4 cm foi
26 feita a partir da porção nasal do occipital em direção a orelha, seguida da
27 elevação total do retalho. Quatro defeitos cilíndricos de 6mm de diâmetro foram
28 preparados até a cortical basal com a utilização de broca trefina sob abundante
29 refrigeração e, para evitar danos a duramater, a remoção do fragmento ósseo foi
30 feita delicadamente com um cinzel. Os defeitos foram preenchidos em sentido
31 horário com SBC isolado; SBC + LPRF (1:1); LPRF isolado e Coágulo. Após
32 sutura do periósteo e da pele foi feita aplicação tópica de PVPI sobre a área

1 (ANEXO 3). Os animais receberam por cinco dias analgesia com Ketoprofen (05
2 mg/kg) e controle antimicrobiano com Enrofloxacino (05 mg/kg). Após 10 dias, as
3 suturas foram removidas. Não houve constatação de complicações cirúrgicas.

4 Os coelhos foram sacrificados ao completarem 08 semanas de pós-
5 operatório com aplicação de Tiopental Sódico (180 mg/kg) sendo confirmada a
6 parada cardiorrespiratória. Após nova tricotomia e descontaminação da área
7 cirúrgica, uma incisão longitudinal com aproximadamente 06 cm foi feita a partir
8 da porção nasal do occipital em direção a orelha, com elevação de retalho total
9 para facilitar a remoção de toda a calvária contendo os 04 defeitos, que foram
10 individualizados e colocados em solução de formol a 10% (Anexo 4).

11 Cada uma das 04 porções foi devidamente identificada e descalcificada
12 por 14 dias a temperatura ambiente com EDTA 05%, renovado a cada dois dias.
13 Após a fixação em parafina e regularização dos blocos, todos foram
14 aprofundados em 100 µm para padronização dos cortes transversais. As lâminas
15 coradas com “Sirius Red” foram examinadas através de microscopia ótica e
16 fotografadas, sendo a análise histomorfométrica realizada com o auxílio do
17 software IMAGE PRO PLUS 4.5 (Media Cibernetics Rokville, USA) (Figura 1 e
18 Figura 2).



19

20 Figura 1: corte histológico corado através de Sirius Red. (A) SBC group - Demonstrando abundante tecido de granulação
21 (setas), imagens negativas das partículas de fosfato de cálcio bifásico (SBC) removidas durante o processamento, osso
22 nativo (OB) nas bordas dos defeitos delimitado na imagem pela linha pontilhada amarela, e o osso neoformado (NB)
23 próximo a borda do defeito e na periferia de algumas partículas (*). A variável área total e altura do defeito foram
24 superiores neste grupo quando comparado aos grupos C e D. Achados semelhantes foram encontrados no grupo SBC +
25 LPRF (B), entretanto não foi observada diferença na variável área total e altura do defeito entre os demais grupos. Nos
26 grupos LPRF (C) e Coagulo (D) vemos escasso tecido de granulação e, na extensão do defeito, o osso neoformado.
27 (escala de barra de 1000 micrometros)

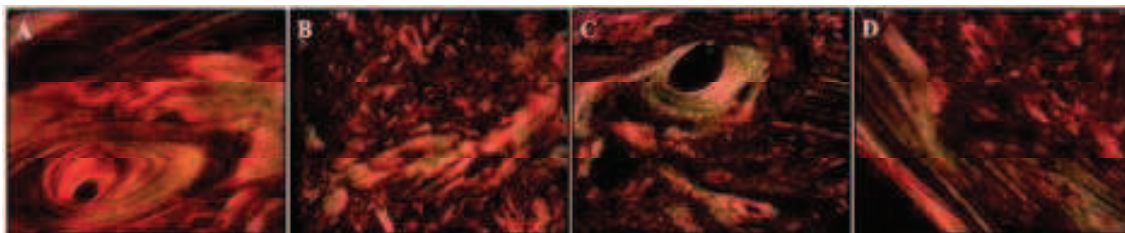


Figura 2: corte histológico corado através de Sirius Red sob luz polarizada na magnificação de 400x, sendo representado em verde o colágeno tipo III e em vermelho o colágeno tipo I não havendo diferença entre os grupos A) SBC isolado; B) SBC + LPRF (1:1); C) LPRF isolado e D) Coágulo.

Cinco variáveis foram analisadas:

Área Total do Defeito – (μm^2) Através do software Image Pro Plus 4.5 o contorno do defeito preenchido foi delimitado manualmente (Anexo 5). Esta medição foi realizada em 02 momentos com intervalo de 20 dias como etapa de calibração, sendo que o Teste de Reprodutibilidade de Dahlberg indicou que o avaliador reproduziu a medida de forma confiável (Anexo 6). Como o teste T de Student indicou não existir diferença estatística significativa entre os valores médios nos dois momentos ($p > 0,05$) (Anexo 7), evidenciando ausência de erro sistemático, optou-se em utilizar os valores da segunda medição.

Área do Osso Neoformado - Com o auxílio do software ADOBE PHOTO SHOP-CS 5.1 (ADOBE USA) foram removidas as áreas externas da amostra, osso velho, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e espaços medulares, mantendo assim, apenas as imagens correspondentes ao novo osso. Através do software IMAGE PRO PLUS 4.5 foi calculada a área deste novo osso. (Anexo 8)

Porcentagem de Formação Óssea - é a proporção matemática entre a variável Área de Osso Neoformado e a variável Área Total do Defeito.

Altura de Preenchimento do Defeito – é a medida linear entre a borda superior e inferior do defeito. Através do software IMAGE PRO PLUS 4.5, foram realizadas 05 medições equidistantes, lineares e paralelas entre as bordas do defeito. Ao final foi gerada uma média entre estes valores. (Anexo 9)

Quantidade de Colágeno Tipo I no Osso Novo - As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico utilizando lente polarizada. Foi desenvolvida

1 uma máscara para evidenciar o colágeno I. Através do software IMAGE PRO
2 PLUS 4.5, carregando esta máscara, foi realizado cálculo quantitativo. (Anexo 10)

3 Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS versão 23.0.
4 Inicialmente, o poder de reprodutibilidade do examinador foi confirmado com o
5 Teste de Reprodutibilidade de Dahlberg, utilizando os dados da variável Área
6 Total do Defeito. A normalidade dos dados coletados nos quatro grupos para as
7 cinco variáveis, foi analisada com o Teste de Normalidade de Kolmogorov-
8 Smirnov. A comparação dos valores médios foi feita com o Teste ANOVA a um
9 critério. Quando o Teste ANOVA indicou diferença nestes valores médios
10 segundo o grupo, a comparação dois a dois foi feita utilizando: Teste de
11 Comparações Múltiplas de Tukey HSD para variâncias homogêneas e o Teste de
12 Comparações Múltiplas de Games Howell para variâncias heterogêneas. A
13 homogeneidade de variâncias entre os grupos foi confirmada com o Teste de
14 Homogeneidade de Variâncias de Levene, adotando 5% como nível de
15 significância.

16 **Resultados**

17 Para a análise neste trabalho, levaram-se em consideração os 04 grupos e
18 as 05 variáveis quantitativas e dependentes. Os resultados descritivos e os
19 resultados dos Testes de Tukey HSD e Games Howel para comparação dois a
20 dois podem ser visualizados na Tabela 1. Os Gráficos 1A, 1B, 1C, 1D e 1E
21 demonstram o intervalo de confiabilidade de 95% para as cinco variáveis
22 analisadas. Os resultados do Teste ANOVA para comparação dos valores
23 médios estão descritos na Tabela 2.

RESULTADOS DESCRITIVOS					
VARIAVEL	GRUPO	MEDIA	DESVIO PADRAO	VALOR P ANOVA	COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ⁽¹⁾
AREA TOTAL DO DEFEITO (µm ²)	SBC	10554327.13	4025844.91	0,0001 ⁽²⁾	A
	SBC + LPRF	7457971.12	1675241.24		AB
	LPRF	6069292.29	1825882.53		B
	COAGULO	5677352.50	2104751.18		B
AREA DE OSSO NEOFORMADO (µm ²)	SBC	3671752.22	1231052.44	0,3742	A
	SBC + LPRF	3130122.98	689758.15		A
	LPRF	3194323.61	662744.46		A
	COAGULO	3752667.48	1482990.17		A
PORCENTAGEM DE OSSO NEOFORMADO	SBC	37.81	13.65	0,0000 ⁽¹⁾	A
	SBC + LPRF	43.06	10.13		AB
	LPRF	54.84	10.15		BC
	COAGULO	66.37	12.91		C
ALTURA DO DEFEITO (µm)	SBC	1864.01	649.20	0,0000 ⁽²⁾	A
	SBC + LPRF	1499.75	218.79		A
	LPRF	1227.68	239.28		BC
	COAGULO	1063.54	225.26		C
PORCENTAGEM DE COLAGENO TIPO I	SBC	73.24	18.68	0,0536	A
	SBC + LPRF	83.88	8.77		A
	LPRF	86.06	6.56		A
	COAGULO	76.51	11.36		A

⁽¹⁾ Comparações múltiplas baseadas no teste de Tukey HSD

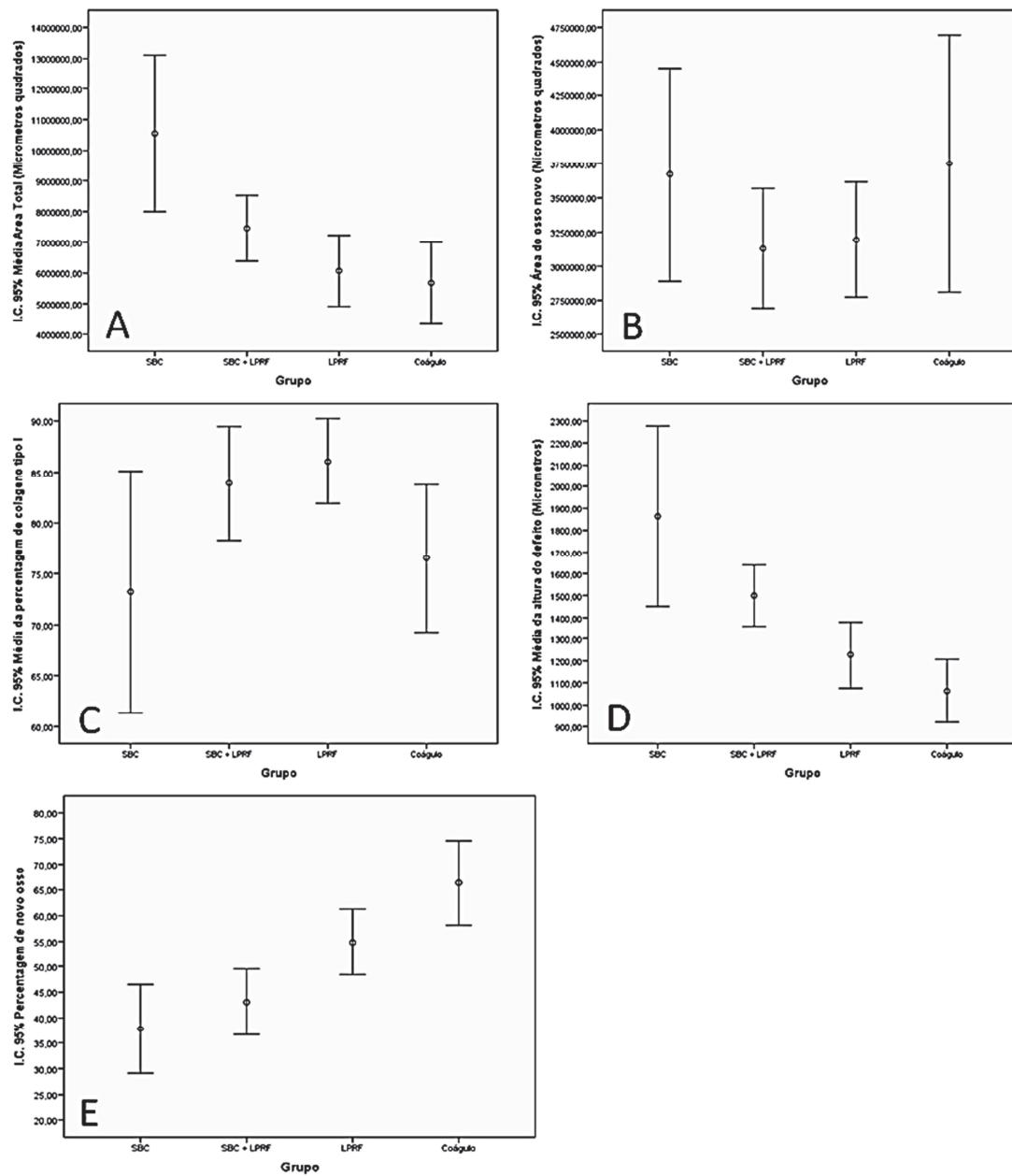
⁽²⁾ Comparações múltiplas baseadas no teste de Games Howell

⁽³⁾ Letras iguais na coluna de comparações múltiplas indicam diferença estatística não significativa

1

2

Tabela 1: resultados descritivos das cinco variáveis para os quatro grupos



1

2
3

Gráfico 1: intervalo de confiança de 95% para as variáveis; A) média da área total; B) área de osso novo; C) média da percentagem de colágeno tipo I; D) média da altura do defeito; E) percentagem de novo osso.

ANOVA								
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	P Value	Observed Power ^b	
AREA TOTAL DO DEFEITO (µm ²)	Between Groups	176,221,463,453,940.0000	3	58.740.487.817.979.9000	8.7745	0.0001	0.9913	
	Within Groups	294,554,535,067,782.0000	44	6.694.421.251.540.5100				
AREA DE OSSO NEOFORMADO (µm ²)	Between Groups	3,693,836,457,860.0700	3	1.231.278.819.286.6900	1.0638	0.3742	0.2682	
	Within Groups	50,927,221,207,702.6000	44	1.157.436.618.356.8800				
PORCENTAGEM DE OSSO NEOFORMADO	Between Groups	5,843.6772	3	1.947.8924	13.9486	0.0000	0.9999	
	Within Groups	6,144.4931	44	139.6476				
ALTURA DO DEFEITO (µm)	Between Groups	4,408,831.0030	3	1.469.610.3343	10.1823	0.0000	0.9970	
	Within Groups	6,350,507.5688	44	144.329.7175				
PORCENTAGEM DE COLAGENO TIPO I	Between Groups	1,235.1946	3	411.7315	2.7550	0.0536	0.5578	
	Within Groups	6,575.7007	44	149.4477				

(b) Computed using alpha = ,05

Tabela 2: comparação dos valores médios feita com o Teste ANOVA a um critério

Como todas as variáveis apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de correlações de Pearson (paramétrico) para medir o grau de associação entre as variáveis (Anexo 14). A variável Área Total do Defeito tem correlação positiva forte com a Altura de Preenchimento do Defeito ($r = 0,88$), positiva regular com a Área do Osso Neoformado ($r = 0,58$) e negativa forte com a Percentagem de Formação Óssea ($r = -0,64$). Isto significa que aumentando a área total do defeito aumentam também a altura de preenchimento do defeito e a área do osso neoformado, porém diminui a porcentagem de formação óssea. A variável Área do Osso Neoformado tem correlação positiva regular com a Altura Total do Defeito e Área Total do defeito ($r = 0,50$), ou seja, aumentos da área de osso neoformado implicam em aumentos da altura do defeito e na área total. A variável Porcentagem de Osso Novo tem correlação negativa regular com a Altura do Defeito ($r = -0,52$). Sendo assim, a porcentagem de osso novo diminui a medida que a altura do defeito aumenta.

Discussão

O Processo de reparo ósseo que ocorre nos procedimentos regenerativos envolve quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação.

Sabemos que os enxertos ósseos autógenos são considerados “gold standard” em função de suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e

1 osteogênicas. Entretanto, a quantidade intra oral limitada e a morbidade
2 decorrente de um segundo local cirúrgico, tem restringido sua indicação.

3 A hidroxiapatita e o β tricalcio fosfato sintéticos são dois substitutos ósseos
4 biocompatíveis, com estrutura tridimensional semelhante ao osso humano,
5 geralmente utilizados em combinação e que apresentam propriedade
6 osteocondutora superior ao osso autógeno ^(29, 30, 31, 32, 33), porém sem capacidade
7 indutora ou gênica. Sendo assim, um dos grandes desafios da engenharia
8 tecidual foi tentar descobrir um aditivo cirúrgico com estas propriedades para ser
9 utilizado de maneira associada.

10 A membrana de LPRF foi descrita por Choukroun et al ⁽¹¹⁾, como sendo
11 uma rede de fibrina polimerizada de maneira lenta e natural contendo fatores de
12 crescimento e citocinas imuno inflamatórias originadas da ativação plaquetária e
13 leucocitária. Estes compostos bioquímicos permanecem ativos e funcionais por
14 um período médio de 7 a 11 dias ⁽¹⁵⁾ tendo o potencial de acelerar o processo
15 cicatricial dos tecidos duros e moles ⁽³⁴⁾, moderando a resposta inflamatória e
16 potencializando a atividade anti-infecciosa ^(14, 16, 17, 18).

17 O objetivo deste trabalho foi avaliar histomorfometricamente o potencial de
18 reparo ósseo da fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF) isolada e
19 associada a hidroxiapatita + β tricalcio fosfato (SBC) comparando com o coágulo,
20 em defeitos de 6mm de diâmetro criados em calvaria de coelhos. Esta medida de
21 defeito permitiu a comparação dos quatro grupos no mesmo animal, evitando o
22 viés da comparação entre animais diferentes. A opção pelo tempo de 2 meses
23 para a eutanásia foi embasada no trabalho de Sohn et al ⁽³⁵⁾ que afirmaram que
24 ilhas ósseas separadas da margem e próximas ao centro do defeito já podem ser
25 visualizadas, tendo este osso neoformado uma quantidade moderada de medula
26 óssea e também osso maduro.

27 Os maiores valores para a variável Área Total do Defeito e para a variável
28 Altura de Preenchimento do Defeito foram identificados nos grupos tratados com
29 o substituto sintético isolado, seguido pela associação com LPRF, diminuindo
30 para o grupo LPRF isolado. Estes resultados corroboram com a informação de

1 que substitutos ósseos sintéticos funcionam positivamente como
2 osteopreenchedores ^(2, 3, 4, 5, 6, 7).

3 Referente à variável Área do Osso Neoformado, não houve diferença
4 estatística significativa entre os quatro grupos. Estes resultados são concordantes
5 com os apresentados por Knapen et al ⁽³⁶⁾ que utilizaram 04 hemi esferas de 08
6 mm em titânio apoiadas sobre defeitos criados em calvaria de coelhos por
7 período de 05 semanas, avaliando grau de formação óssea no interior e
8 velocidade de cicatrização. Pripatnanont et al ⁽³⁷⁾ também não identificaram
9 diferença histomorfométrica e radiográfica significativa em 08 semanas em
10 defeitos de 10mm em calvaria de coelhos preenchidos com substituto xenógeno
11 versus xenógeno + LPRF. Porém, estes resultados foram contrários aos
12 observados por Kim et al ⁽³⁸⁾ que compararam em intervalos de 1, 2, 4, 6 e 8
13 semanas a resposta cicatricial de 02 defeitos de 08 mm criados em calvaria de
14 coelhos e preenchidos com β tricalcio fosfato e hidroxiapatita + LPRF versus
15 coágulo e em todos estes períodos o grupo tratado com a associação evidenciou
16 histologicamente formação óssea mais evoluída. Entretanto o autor não
17 investigou num mesmo animal estes dois materiais de maneira isolada para
18 saber qual deles em específico poderia estar favorecendo a cicatrização ou se a
19 associação dos dois realmente levaria ao benefício.

20 A variável Porcentagem de Osso Neoformado apresentou valores maiores
21 para o grupo Coágulo, sem diferença estatística com LPRF, apenas sendo esta
22 diferença significativa com SBC e SBC + LPRF respectivamente. Estes resultados
23 são coerentes pelo fato de que a área total e altura do defeito são variáveis que
24 apresentam correlação negativa forte com a porcentagem de formação ossea
25 (Tabela 11), ou seja, aumentando a área total ou a altura do defeito diminui o
26 percentual de osso novo. Estes resultados foram contrários aos encontrados por
27 Acar et al ⁽³⁹⁾ que observaram com 08 semanas a superioridade da associação
28 SBC + LPRF, seguida pelo LPRF isolado, SBC isolado e por ultimo o coágulo.

29 Não houve diferença estatística para a variável Porcentagem de Colágeno
30 Tipo I (Tabela 7). Resultado semelhante foi encontrado por Bolukbasi et al ⁽⁴⁰⁾ que
31 mostraram que apesar de os grupos tratados com LPRF evidenciarem em 10
32 dias estagio de maturação óssea superior, aos 40 dias já não havia diferença

significativa entre os grupos SBC e SBC+LPRF, levando a conclusão de que o LPRF seria efetivo apenas nos primeiros estágios da cicatrização.

Sendo assim concluiu-se que a hidroxiapatita + β tricalcio fosfato (SBC) mostrou-se mais favorável como material osteopreenchedor e osteomantenedor quando comparado ao LPRF isoladamente. A adição do LPRF ao SBC evidenciou uma pequena melhora na porcentagem de osso neoformado e porcentagem de colágeno tipo I, porém esta melhora não foi estatisticamente significativa. Isoladamente, o LPRF não evidenciou benefício significativo para neoformação ou maturação óssea. Levando em consideração os limites do presente trabalho, outros estudos precisam ser feitos com distintos intervalos de tempo para a eutanásia, incluindo uma análise histomorfométrica qualitativa e não apenas quantitativa, assim como uma análise por micro tomografia computadorizada.

Referências

- (1) McAllister B, Haghighat K. **Bone augmentation techniques.** Journal of Periodontology, 2007; 78: 377–396.
- (2) Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. **Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumanns Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial.** Clin. Oral Impl. Res. 2008; 19: 796–803.
- (3) Covani U, Orlando B, Giacomelli L, Cornelini R, Barone A. **Implant survival after sinus elevation with Straumann s BoneCeramic in clinical practice: ad-interim results of a prospective study at a 15-month follow-up.** Clin. Oral Impl. Res. 22, 2011; 481–484. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02042.x7-
- (4) Froum SJ, Wallace SS, Cho SC, Elian N, Tarnow DP. **Histomorphometric comparasion of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6 to 8 month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study.** Int J Periodontics Restorative Dent 2008; 28: 273-281.
- (5) Artzi Z, Weinreb M, Carmeli G, LevDor R, Dard M, Nemcovsky CE. **Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans.** Clin Oral Implants Res. 2008 Jul;19(7):686-92.
- (6) Mardas N, D'Aiuto F, Mezzomo L, Arzoumanidi M, Donos N. **Radiographic alveolar bone changes following ridge preservation with two different biomaterials.** Clin. Oral Impl. Res. 2011; 22: 416–423.
- (7) Mardas N. et al. **Socket preservation with synthetic bone substitute or a bovine xenograft.** IADR 2008. Data on file (study CR 03/05)
- (8) Zafiropoulos G.-G. K. et al. **Treatment of intrabony defects using guided tissue regeneration and autogenous spongiosa alone or combined with hydroxyapatite/beta tricalcium phosphate bone substitute or bovine-derived xenograft.** J. Periodontol. 2007; 78: 2216-2225
- (9) Jensen S. S. et al. **Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs.** Clin. Oral. Impl. Res. 2007;18: 752-760
- (10) Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. **Une opportunité en paro-implantologie: le PRF.** Implantodontie. 2001; 42: 55-62.
- (11) Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. **Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E37-44.

- 1 (12) Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. **Platelet-rich fibrin (PRF): A second-**
2 **generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol
3 Endod 2006;101:E45-50.
- 4 (13) Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, Kim ES, Choung PH. **Platelet-Rich Fibrin is a**
5 **Bioscaffold and Reservoir of Growth Factors for Tissue Regeneration.** TISSUE ENGINEERING 2011: Part A, Volume
6 17, Numbers 3 and 4.
- 7 (14) Dohan D, Peppo G, Doglioli P, Sammartino G. **Slow release of growth factors and trombospondin-1 in**
8 **Choukroun's platelets-rich fibrina (PRF): a gold standart to achieve for all surgical platelets concentrates**
9 **technologies.** Growth Factors, February 2009; 27(1): 63–69
- 10 (15) Dohan DM, Corso MD, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. **Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a**
11 **Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane.** J Periodontol 2010;81:546-555.
- 12 (16) Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. **Platelet-rich fibrin (PRF): A second-**
13 **generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates?** Oral Surg
14 Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E51-5.
- 15 (17) Moojen, D *et al.* **Antimicrobial activity of platelets-leukocyte gel against Staphylococcus aureus.** Journal of
16 Orthopedics, 2008; 26: 404-410.
- 17 (18) Fabbro MD, Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Weinstein R. **Autologous platelet concentrate for post-extraction**
18 **socket healing: A systematic review.** Eur J Oral Implantol 2014;7(4):333–344.
- 19 (19) Simon BI, Gupta P, Tajbakhsh S. **Quantitative Evaluation of Extraction Socket Healing Following the Use of**
20 **Autologous Platelet-Rich Fibrin Matrix in Humans.** Int J Periodontics Restorative Dent. 2011 Jun;31(3):285-95.
- 21 (20) Hauser F, Gaydarov N, Badoud I, Vazquez L, Bernard JP, Ammann P. **Clinical and Histological Evaluation of**
22 **Postextraction Platelet-rich Fibrin Socket Filling: A Prospective Randomized Controlled Study.** Implant Dentistry
23 2013 June 22(3): 295–303.
- 24 (21) Mazor Z, Horowitz RA, Corso MD, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan DM. **Sinus Floor Augmentation With**
25 **Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A**
26 **Radiologic and Histologic Study at 6 Months.** J Periodontol 2009;80:2056-2064.
- 27 (22) Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Ehrenfest D. **Simultaneous sinus-lift and implantation**
28 **using microthreaded implants and leukocyte and platelet-rich fibrina as sole grafting material: A six-year**
29 **experience,** 2011; 20(1): 2-8
- 30 (23) Aroca S, Keglevich T, Barbieri B, Gera I, Etienne D. **Clinical evaluation of a modified Coronally Advanced Flap**
31 **Alone or in combination with platelet-rich fibrina membrane for the treatment of adjacente multiple gingival**
32 **recessions: A 6-month study.** Journal of Periodontology, 2009; 80(2): 244-252.
- 33 (24) Jankovic S, Aleksic Z, Klokkevold P, Lekovic V, Dimitrijevic B, Kenney B, Camargo P. **Use of platelet-rich fibrina**
34 **membrane following treatment of gingival recession: A randomized clinical trial.** The International Journal of
35 Periodontics & Restorative Dentistry, 2012; 32(2):41-50.
- 36 (25) Thorat MK, Pradeep AR, Pallavi B. **Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony**
37 **defects: a controlled clinical trial.** Journal of Clinical Periodontology, 2011; 38: 925-932
- 38 (26) Sharma A, Pradeep A. **Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with**
39 **autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial.** Journal of Periodontology, 2011; 82(12): 1705-
40 1712
- 41 (27) Singh A, Kohli M, Gupta N. **Platelet Rich Fibrin: A Novel Approach for Osseous Regeneration.** J Maxillofac Oral
42 Surg. Dec 2012; 11(4): 430–434.
- 43 (28) Kim JS, Jeong MH, Jo JH, Kim SG, Oh JS. **Clinical Application of Platelet-Rich Fibrin by the Application of the**
44 **Double J Technique During Implant Placement in Alveolar Bone Defect Areas: Case Reports.** Implant Dentistry 2013
45 June; 22(3): 244-249.
- 46 (29) Rohn AR, Moslemi N, Eslami B, Abadi HK, Paknejad M. **Histologic Evaluation of Bone Healing Following**
47 **Application of Anorganic Bovine Bone and β -tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria.** Journal of Dentistry, Tehran
48 University of Medical Sciences, Tehran, Iran 2012; 9(1): 35-40.
- 49 (30) Vahabi S, Amirzadeh N, Shokrgozar MA, Mofed R, Mashhadi AF, Aghallo M, Sharifi D, Jabbareh L. **Comparison**
50 **between the Efficacy of Bio-Oss, Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate and Combination of Mesenchymal Stem**
51 **Cells in Inducing Bone Regeneration.** Chang Gung Med J 2012;35:28-37.
- 52 (31) Lindgren C, Mordenfeld A, Johansson CB, Hallman M. **A 3 year Clinical Follow up of Implants Placed in Two**
53 **Different Biomaterials Used for Sinus Augmentation.** Int J Oral Maxillofac Implants 2012; 27: 1151-1162.

- 1 (32) Caubet J, Ramis JM, Murguialday MR, Morey MA, Monjo M. **Gene expression and morphometric parameters of**
2 **human bone biopsies after maxillary sinus floor elevation with autologous bone combined with Bio-Oss or**
3 **BoneCeramic.** Clin Oral Implants Res. 2015 Jun;26(6):727-35.
- 4 (33) Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukan FW, Schlegel KA. **Histological results after maxillary sinus**
5 **augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled**
6 **clinical trial.** Clin. Oral Impl. Res. 2013; 24: 576–585.
- 7 (34) Choukroun J, Diss A, Simompieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. **Platelet-**
8 **rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing.** Oral Surg
9 Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E56-60
- 10 (35) Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. **Spontaneous healing capacity of rabbit cranial**
11 **defects of various sizes.** J Periodontal Implant Sci. 2010 August; 40(4): 180–187.
- 12 (36) Knapen M, Gheldof D, Drion P, Layrolle P, Rompem E, Lambert F. **Effect of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-**
13 **PRF) on Bone Regeneration: A Study in Rabbits.** Clinical Implant Dentistry and Related Research 2015; Volume 17,
14 Supplement 1.
- 15 (37) Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Phurisat K. **The primacy of platelet-rich fibrin on bone**
16 **regeneration of various grafts in rabbit's Calvaria defects.** Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 2013; 41: 191-200.
- 17 (38) Kim BJ, Kwon TK, Baek HS, Hwang DS, Kim CH, Chung IK, Jeong JS, Shin SH. **A comparative study of the**
18 **effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium**
19 **phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol
20 2012;113:583-592.
- 21 (39) Acar AH, Yolcu U, Gul M, Keles A, Erdem NF, Kahraman AS. **Micro-computed tomography and**
22 **histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium.**
23 Archives of Oral Biology 2015; 60: 606-614.
- 24 (40) Bolukbasi N, Yeniol S, Tekkesin MS, Altunatamz K. **The Use of Platelet-Rich Fibrin in Combination With Biphasic**
25 **Calcium Phosphate in the Treatment of Bone Defects: A Histologic and Histomorphometric Study.** Current
26 Therapeutic Research 2013; 75: 15–21.

27

28

29

30



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 02 de agosto de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 721 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da regeneração óssea com o uso da fibrina rica em plaquetas de Choukroun isolada e associada ao strumann bone ceramic

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Eduardo Ferrucio

EQUIPE DE PESQUISA: Eduardo Ferrucio, Vinicius Tramontina

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola da Saúde e Biociências

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelho	Macho	Adultos / 2,5 a 3kg	C	20

O colegiado do CEUA em reunião no dia 02/08/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

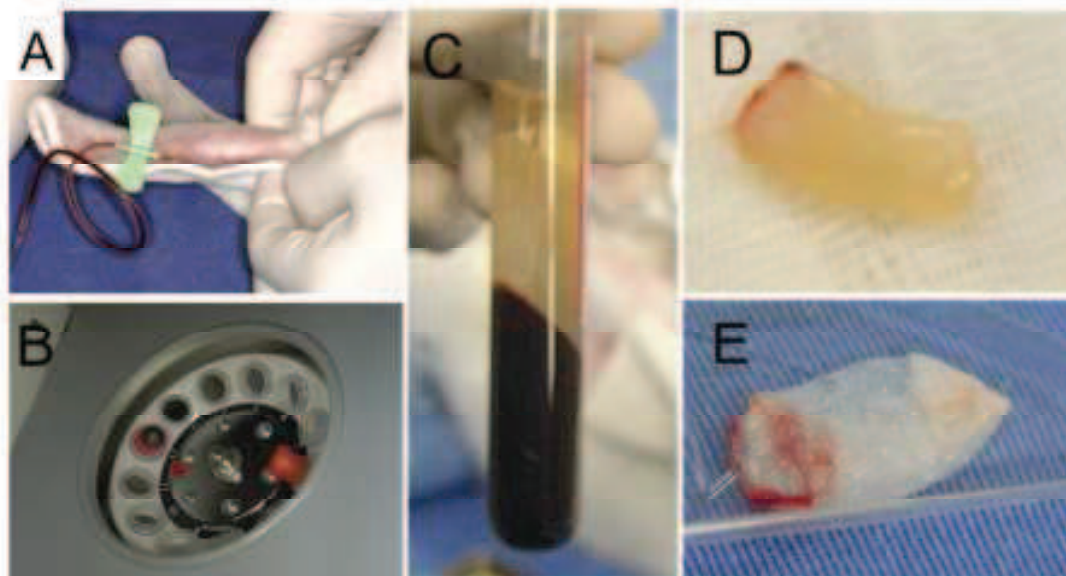
Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,

Prof.ª Gracilene Maria D. Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais





1

2

3

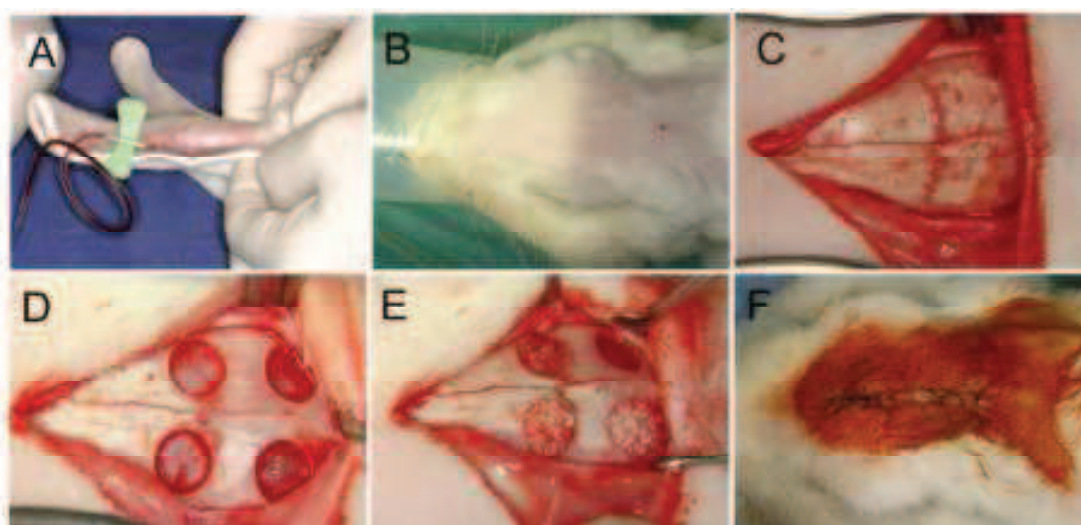
4

5

6

7

ANEXO 2: A) cateter nº24G na veia marginal da orelha para coleta de 06ml de sangue; B) tubo sem anticoagulante contendo sangue posicionado na centrífuga regulada a 3000rpm por 10 minutos; C) após centrifugação, formação de 3 camadas no interior do tubo: na parte inferior uma camada de células vermelhas, na parte superior sobrenadante o plasma pobre em plaquetas e entre elas o LPRF propriamente dito; D) remoção cuidadosa do LPRF na forma de plug do interior do tubo e remoção da camada vermelha aderida a na sua base; E) membrana de LPRF formada após procedimento de compressão entre gazes estéreis.



8

9

10

11

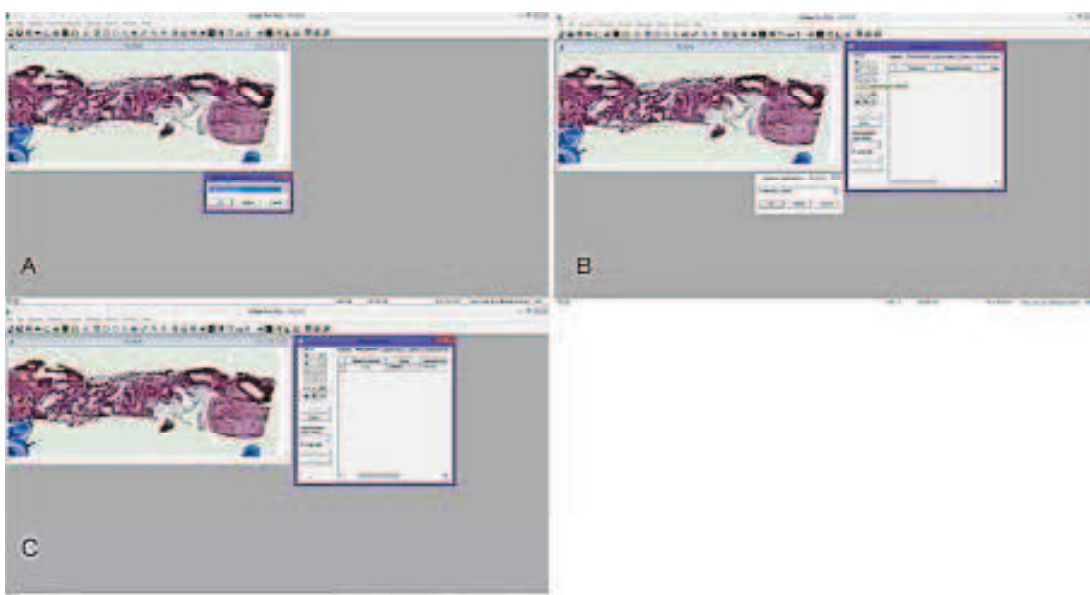
12

13

ANEXO 3: A) cateter nº24G na veia marginal da orelha para procedimento anestésico; B) crânio triclotomizado e descontaminados com digluconato de clorexidina 0,2%; C) incisão longitudinal com elevação de retalho mucoperiosteal e exposição do osso da calvaria; D) criação de quatro defeitos de 6mm; E) defeitos preenchidos em sentido horário com SBC isolado, SBC + LPRF (1:1), LPRF isolado e Coágulo. F) sutura contínua com fio 5.0 mononylon e aplicação tópica de PVPI.



ANEXO 4: A) vista interna da calvaria removida evidenciando a posição dos quatro defeitos; B) vista externa da calvaria removida demonstrando dificuldade de identificação dos defeitos; C) após tomografia, orientado pela vista interna da calvaria, os quatro defeitos foram individualizados e submetidos aos procedimentos laboratoriais de descalcificação, emblocamento, corte e coloração.



ANEXO 5: Software Image Pro Plus 4.5 A) no menu "spacial calibration" foi selecionado "calibração do scanner"; B) no menu "measurements" foi utilizada a ferramenta "Create polygon feature"; C) após delimitar área manualmente o valor em μm^2 aparece automaticamente no campo "value".

TABELA 1 – VARIÂNCIA TOTAL, VARIÂNCIA DO ERRO, ERRO DE DAHLBERG, COEFICIENTE DE CONFIABILIDADE E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA A VARIÁVEL ÁREA TOTAL					
VARIÁVEL	VARIÂNCIA TOTAL S^2	VARIÂNCIA ERRO S_e^2	ERRO DE DALBERG (%)	COEF. CONFIAB. (%)	COEF. CORREL. (%)
Área total	181255506065718,00	695311058,19	0,0004	99,9996	99,9997
FONTE: Dados da pesquisa					

ANEXO 6: Teste de Reprodutibilidade de Dahlberg para calculo da variância total, variância do erro, erro de Dahlberg, coeficiente de confiabilidade e coeficiente correlação de Pearson para a variável Área Total do Defeito

TABELA 2 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA VARIÁVEL AREA TOTAL

Variável	Média	n	Desvio padrão
Area total t1	10718868,9821	56	13469324,5989
Area total t2	10713040,9286	56	13456905,5522

Fonte: dados da pesquisa

TABELA 3 - TESTE T DE STUDENT PARA AMOSTRAS EMPARELHADAS

Variável	Diferença emparelhada				t	G.L.	Valor p
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança (95%) da diferença de médias			
				L.I. L.S.			
Area total t1 - Area total t2	5828,0536	37166,1456	4966,5351	-4125,1052 15781,2124	1,1735	55	0,2457

Fonte: dados da pesquisa

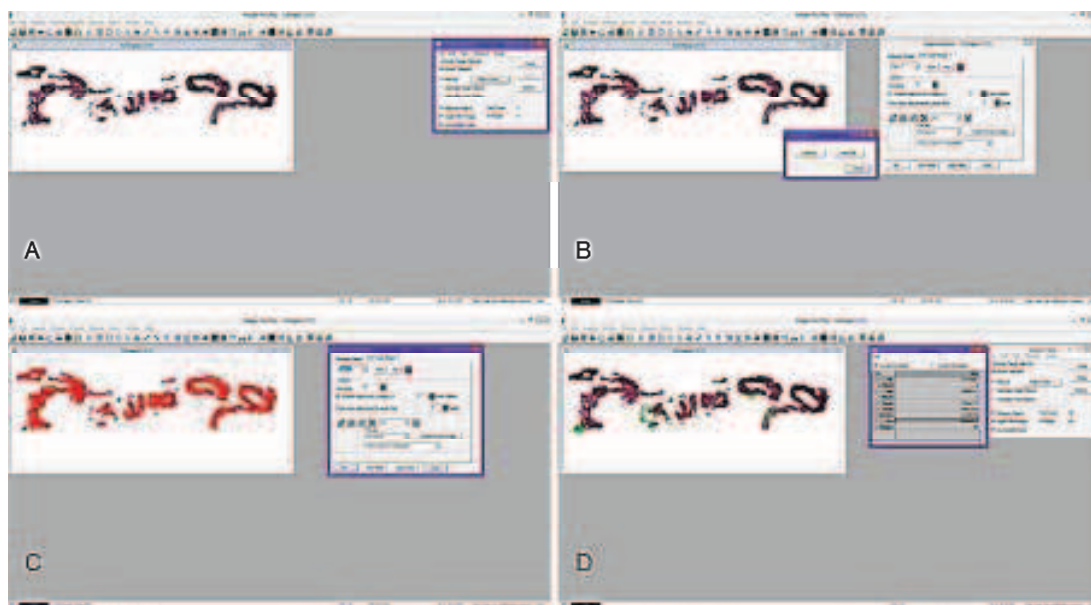
1

2

ANEXO 7: Teste t de Student para amostras emparelhadas avaliando o erro sistemático de uma variável medida em dois momentos distintos

3

4



5

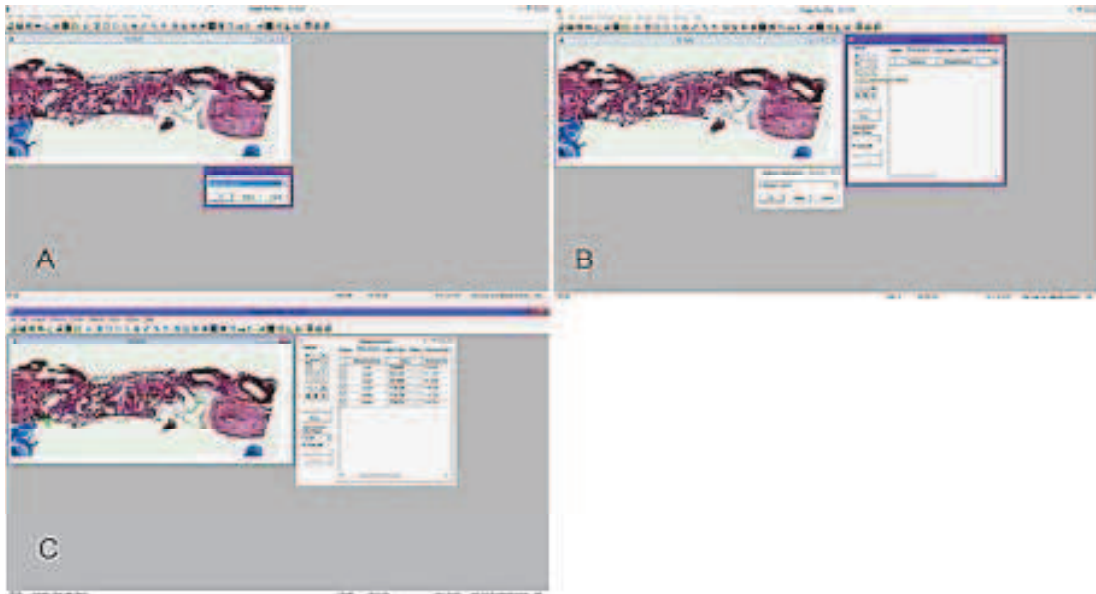
6

ANEXO 8: Software Image Pro Plus 4.5 A) no menu "spacial calibration" foi selecionado "calibração do scanner" no menu "count / size" foi selecionado "select colors"; B) na janela "segmentation" foi clicado em "file" e depois em "load file" para selecionar a máscara previamente criada; C) máscara evidenciando a seleção de toda a área óssea contida na imagem; D) na janela "count / size" foi clicado em "count" e o valor em μm^2 aparece automaticamente no campo "sum".

7

8

9



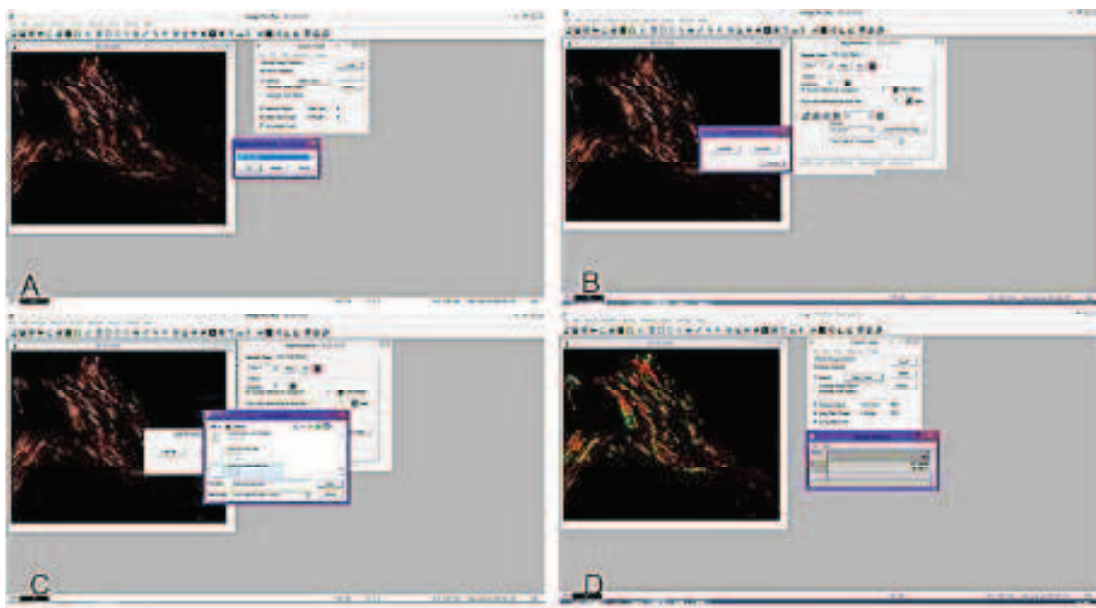
1

2

3

4

ANEXO 9: Software Image Pro Plus 4.5 A) no menu "spacial calibration" foi selecionado "calibração do scanner"; B) no menu "measurements" foi utilizada a ferramenta "create click and drag line feature"; C) após delimitar manualmente 5 linhas paralelas o valor em μm aparece automaticamente no campo "length".



5

6

7

8

9

10

ANEXO 10: Software Image Pro Plus 4.5 A) no menu "spacial calibration" foi selecionado "OBJ 40x LPE" e no menu "count/size" foi selecionado "select colors"; B) na janela "segmentation" foi clicado em "file" e depois em "load file" para selecionar a máscara previamente criada; C) máscara sendo carregada; D) na janela "count / size" foi clicado em "count", evidenciando na imagem em vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III, aparecendo automaticamente a percentagem no campo "% sum".

Tests of Normality							
Grupo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Valor p	Statistic	df	Valor p
Média Area Total (µm²)	SBC	,103	12	,200	,952	12	,873
	SBC + LPRF	,122	12	,200	,953	12	,884
	LPRF	,138	12	,200	,970	12	,914
	Coágulo	,200	12	,200	,900	12	,160
Área do osso novo (µm²)	SBC	,133	12	,200	,931	12	,394
	SBC + LPRF	,220	12	,113	,911	12	,220
	LPRF	,210	12	,151	,890	12	,120
	Coágulo	,215	12	,132	,882	12	,094
Porcentagem de novo osso	SBC	,179	12	,200	,883	12	,096
	SBC + LPRF	,222	12	,106	,890	12	,119
	LPRF	,167	12	,200	,950	12	,836
	Coágulo	,177	12	,200	,879	12	,085
Média da altura do defeito (µm)	SBC	,143	12	,200	,958	12	,756
	SBC + LPRF	,166	12	,200	,948	12	,603
	LPRF	,103	12	,200	,968	12	,886
	Coágulo	,101	12	,200	,930	12	,382
Média da percentagem de colagênio tipo I	SBC	,138	12	,200	,925	12	,328
	SBC + LPRF	,188	12	,200	,917	12	,256
	LPRF	,232	12	,074	,912	12	,228
	Coágulo	,208	12	,159	,915	12	,243

.^a. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

ANEXO 11: testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk evidenciando variáveis com distribuição normal

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Valor p
Média Area Total (µm²)	5,068	3	44	0,0042
Área do osso novo (µm²)	5,769	3	44	0,0020
Porcentagem de novo osso	,553	3	44	0,6489
Média da altura do defeito (µm)	8,604	3	44	0,0001
Média da percentagem de colagênio tipo I	5,817	3	44	0,0019

Valor p < 0,05 indica variâncias heterogêneas

Anexo 12 – teste de Levene realizado para avaliar homogeneidade das variâncias.

Correlações de Pearson

		Média Area Total (μm^2)	Área do osso novo (μm^2)	Percentagem de novo osso	Média da altura do defeito (μm)	Média da percentagem de colágeno tipo I
Média Area Total (Micrometros quadrados)	Correlação de Pearson	1	,578**	-,644**	,875**	-,212
	Valor p		,000	,000	,000	,148
	N	48	48	48	48	48
Área do osso novo (Micrometros quadrados)	Correlação de Pearson	,578**	1	,170	,503**	-,062
	Valor p	,000		,248	,000	,678
	N	48	48	48	48	48
Percentagem de novo osso	Correlação de Pearson	-,644**	,170	1	-,522**	,050
	Valor p	,000	,248		,000	,738
	N	48	48	48	48	48
Média da altura do defeito (Micrometros)	Correlação de Pearson	,875**	,503**	-,522**	1	-,082
	Valor p	,000	,000	,000		,579
	N	48	48	48	48	48
Média da percentagem de colágeno tipo I	Correlação de Pearson	-,212	-,062	,050	-,082	1
	Valor p	,148	,678	,738	,579	
	N	48	48	48	48	48

** A correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

1

2 ANEXO 13 - teste de Pearson realizado para medir o grau de associação entre duas variáveis.

3

4

5



PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ
SCHOOL OF HEALTH BIOSCIENCES
POSTGRADUATION PROGRAM IN DENTISTRY
DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY

EDUARDO FERRUCIO

**EVALUATION OF BONE REPAIR USING THE LEUCOCYTE
AND PLATELET RICH FIBRIN ALONE AND ASSOCIATED WITH
HYDROXYAPATITE + β TRICALCIUM PHOSPHATE:
HISTOMORPHOMETRIC STUDY IN RABBIT CALVARIA**

**Curitiba
2016**

1
2
3
4 **EDUARDO FERRUCIO**
5
6
7
8
9
10
11
12

13 **EVALUATION OF BONE REPAIR USING THE LEUCOCYTE**
14 **AND PLATELET RICH FIBRIN ALONE AND ASSOCIATED WITH**
15 **HYDROXYAPATITE + β TRICALCIUM PHOSPHATE:**
16 **HISTOMORPHOMETRIC STUDY IN RABBIT CALVARIA**
17
18
19
20
21

22 Thesis submitted to the Post
23 Graduation Program in Dentistry of
24 Pontifical Catholic University of Paraná,
25 in part of the fulfillments required for
26 Doctor degree of Dentistry,
27 Concentration in Periodontics.
28

29 Doctoral Advisor: Prof. Dr. Vinicius
30 Tramontina.
31

32 Curitiba
33 2016

ACKNOWLEDGEMENTS

First, I thank God who has chosen Dentistry for my professional future, also has allowed me to perform it the best and most satisfactory way;

I thank my wife Maria Claudia and my parents Roberto e Arlete for their support, encouragement and help through all these years of Doctorate;

One more time, I thank my wife Maria Claudia and my two daughters Melissa and Sofia for their understanding my need to get cloistered in silence and concentration, mainly at this ending phase, also apologizing for the absence not only in some of the greatest family moments, but mainly in the growth and evolution of our daughters, which can only be recalled through images;

I thank Mrs Roseane Dalpiaz Kobren for the help with the language corrections;

I thank the Professors team for the teaching;

I thank Mr Mizael Aparecido, from the Surgical Laboratory, for the help with handling the animals;

I thank Mr Seigo Nagashia and Mrs Ana Paula Camargo Martins, from the histopathology Laboratory of PUCPR;

I thank Prof Dr Aline Cristina Batista Rodrigues and Prof Dr Sérgio Aparecido Ignácio for the readiness and brilliance dedicated to me at the end of this research;

I thank my Doctoral Advisor Prof Dr Vinicius Tramontina, not only for the trust, but also for the experience, patience and promptness in his orientation.

I also thank all the Dentistry Post Graduation team, mainly the Coordinators Prof Dr Sergio Vieira and Prof Dr Renata Iani Werneck.

1
2

TABLE OF CONTENTS

Title Page	27
Abstract	27
Introduction	28
Materials and Method	29
Results	33
Discussion	35
References	38
Appendices	41

3
4
5

English version for the International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery

1 **Title Page**

2 Evaluation of bone repair using Leucocyte and Platelet Rich Fibrin alone and
3 associated with Hidroxyapatite + β Tricalcium Phosphate: histomorphometric
4 study in rabbit calvaria.

5 Eduardo Ferrucio*, Sung Hyun Kim**, Vula Papalexiou**, Sonia Mara
6 Luczyszyn**, Aline Cristina Rodrigues Yohann***, Sérgio Aparecido Ignacio****,
7 Vinicius Augusto Tramontina**.

8 * Student of the Postgraduation Program in Dentistry, Concentration in
9 Periodontics (PUC-Pr).

10 ** Professor of the Postgraduation Program in Dentistry, Concentration in
11 Periodontics (PUCPR).

12 *** Professor of the Postgraduation Program in Dentistry, Concentration in
13 Biosciences (PUCPR).

14 **** Full Professor of Biostatistics of the School of Health Biosciences of
15 Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR).

16

17 Corresponding Author: Prof. Dr. Vinicius Augusto Tramontina

18 1155, Imaculada Conceição Street, - Prado Velho – Curitiba/PR – Zip Code: 80242-980

19

20 **Abstract**

21 Among the bone substitutes available for regenerative procedures,
22 hydroxyapatite + β tricalcium phosphate (SBC), as synthetic material, and the
23 leukocyte and platelet rich fibrin (LPRF) as autologous material, have stood out.
24 The objective of this study was to evaluate histomorphologically, in rabbit calvaria,
25 repair potential of LPRF alone and associated with the SBC. Four defects of 06
26 mm diameters were filled with SBC; SBC+LPRF; LPRF and clot. Five parameters
27 were evaluated after two months: defect area; newly formed bone area;
28 percentage of bone formation; height of filling defect and percentage of collagen I.
29 The SBC and SBC + LPRF groups had the highest values for two variables
30 (defect area and height of filling defect), reducing in the LPRF group. The variable
31 percentage of bone formation showed higher values for Clot group, not differing
32 from the LPRF group, but with higher values for the SBC + LPRF and SBC groups
33 ($p<0.05$). Therefore, it is concluded that the SBC was more favorable for space
34 maintenance, when compared to LPRF alone, and that the addition of LPRF to

1 the SBC showed a slight improvement in the percentage of newly formed bone
2 and percentage of collagen 1, however having no statistic difference.

3 Key words: biphasic bone substitute; β hydroxyapatite tricalcium
4 phosphate; leucocyte and platelet rich fibrina; LPRF.

5

6 INTRODUCTION

7 The regeneration of the resorbed bone ridge has directed the implant
8 rehabilitations to best aesthetic and functional results, where many regenerative
9 techniques have been described in literature (¹). The autogenous bone remains as
10 gold standard of choice for these procedures not only for working as a framework
11 for angiogenesis and deposition of bone matrix, but also for having viable
12 osteocytes and growth factors (BMP rh2). However, the limited intra oral quantity
13 and morbidity resulting from a second surgical site, has led patients to choose
14 bone substitutes rather than other sources.

15 Among the synthetic bone substitutes suitable for such procedures,
16 Straumann Bone-Ceramic® (SBC) has stood out. It is a 100% synthetic,
17 biocompatible product composed of 60% hydroxyapatite (HA) and 40% β
18 tricalcium phosphate (TCP- β). Its particles have porosity of 90%, with these pores
19 ranging between 100-500 μ m. According to Cordaro et al (²), its biotransformation
20 occurs in a two-phase process: the β -TCP particles are generally resorbed within
21 the three first months (fast phase), while the HA particles, already wrapped by
22 newly formed lamellar bone are resorbed in a period of about seven months (slow
23 phase). Its three-dimensional structure similar to that of human bone, expresses a
24 favorable osteoconductive property, allowing its use in procedures such as: bone
25 regeneration (¹), maxillary sinus lifting (^{2,3,4,5}), alveolar preservation (^{6,7}), treatment
26 of intrabony periodontal defects (^{8,9}).

27 The leucocyte and platelet rich fibrin (LPRF), in turn, was shown by
28 Choukroun et al as an autogenous bone graft (¹⁰) obtained out of the patient's own
29 blood, not through a second surgical site, as necessary, to collect autogenous
30 bone. In another study, Choukroun et al (¹¹) state that this LPRF membrane is

1 considered to be a second generation among the platelet concentrates, being
2 centrifuged in a single procedure at 3000 rpm for 12 minutes, not requiring the
3 use of anticoagulants, bovine thrombin or gelling agents. With this slow natural
4 process and centrifugation, three layers are formed inside the tube: the bottom, a
5 layer of red cells; the top a floating layer of acellular plasma poor in platelet; and
6 the middle layer the LPRF itself. More than 97% of the platelets and more than
7 half of the leukocytes get enmeshed in this network of fibrin, located mainly in the
8 first two millimeters, close to the red layer, being this portion known as "Buffy
9 Coat", the most important and functional part (¹²). It is known that platelet and
10 leukocyte activation releases, for an average period of 7 to 11 days, a range of
11 growth factors and immune inflammatory cytokines (^{12, 13, 14, 15, 16, 17}), in particular:
12 platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor β (TGF β),
13 insulin-like growth factor (IGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor
14 necrosis factor (TNF) and interleukin (IL). Due to the healing property and
15 moderating inflammatory deriving from these cytokines and growth factors, the
16 LPRF has been used in the form of plug and membrane (¹⁵) in the following
17 procedures: preserving post-extraction rim (^{18,19,20}); lifting maxillary sinus (^{21, 22});
18 root coatings (^{23, 24}); repair of periodontal defects (^{25, 26}) and alveolar regeneration
19 (^{27,28}).

20 Thus, the objective of this study is to evaluate histomorphometrically the
21 potential of bone repair of leucocyte and platelet rich fibrin (LPRF) alone and
22 associated with hydroxyapatite + β tricalcium phosphate (SBC) compared to the
23 clot, in rabbit calvaria.

24 **Materials and Method**

25 The used protocol in this study was approved by CEUA under number
26 0721/12 - 1st version (Appendix 1). 12 New Zealand white rabbits (*Oryctolagus*
27 *cuniculus*) approximately 08 months old and weighing about 3.5 kg were used.

28 The rabbits received initially Xylazine (08 mg/kg) associated with Ketamine
29 (30 mg/kg) intramuscularly. A trichotomy was performed externally in an ear
30 followed by a local asepsis. With a 24G catheter, venous access was carried out
31 in the marginal ear vein and 06 ml of venous blood were drawn. The whole blood

1 was transferred to a 10 ml dry tube without anticoagulant and centrifuged at 3000
2 rpm for 12 min, following the protocol described by Choukroun and Dohan 2001
3 ⁽¹¹⁾. After centrifugation, with a sterile syringe, the supernatant part containing the
4 plasma which is poor in platelet (serum) was aspirated and, with the aid of a
5 hemostat, the LPRF clot at the middle part was carefully taken up from the tube. A
6 thin layer of red cells, adhered to the base of this clot, was gently removed by
7 simple scraping with a sterile spatula. This clean clot was exposed to a
8 compressive procedure between two sterile gauzes in order to remove the
9 remaining plasma, creating a thin, but resistant membrane (Appendix 2). From
10 this preparation, up to the time of use, this membrane was kept in a sterile dappen
11 pot, soaked in supernatant liquid previously collected.

12 Anesthetic induction was performed with Propofol (10 mg / kg) and its
13 maintenance with Isoflurane (03 %). For anesthetic supplementation and bleeding
14 control, 02% Lidocaine was used together with Epinephrine (1: 100,000). A
15 longitudinal incision, approximately 4 cm, was performed from the nasal part of
16 the occipital toward the ear, followed by the total flap elevation. Four cylindrical
17 critical defects of 6mm were prepared up to the cortical basal by using trefina drill
18 under abundant refrigeration and, to avoid damage to the duramater, the bone
19 fragment was delicately performed with a chisel. Defects were filled in a clockwise
20 direction with SBC alone; SBC + LPRF (1:1); LPRF alone and clot. After
21 periosteum and skin suturing, topical application of PVPI was performed in the
22 area. (APPENDIX 3). For 5 days, the animals received Kertoprofen (05 mg/kg) for
23 pain control and Enrofloxacin (05 mg/ kg) for antimicrobial control with. After 10
24 days, the sutures were removed. There were no findings of surgical
25 complications.

26 The rabbits were euthanized after 08 weeks of healing with application of
27 Thiopental Sodium (180mg/kg) being the cardiorespiratory arrest confirmed. After
28 a new trichotomy and skull asepsis, a longitudinal incision of about 06 cm was
29 performed from the nasal part of the occipital toward the ear, followed by the total
30 flap elevation to facilitate removal of the entire calvarium containing 04 defects,
31 which were individualized and put into 10% formalin solution (Appendix 4).

Each one of the 04 parts had been identified and decalcified for 14 days at room temperature with 05% EDTA, renewed once every other day. After fixation in paraffin and regularization of blocks, all of them were detailed in 100µm for slide standardization. The stained slides with "Sirius Red" were examined by optical microscopy and photographed, and histomorphometrically analyzed with the help of IMAGE PRO PLUS 4.5 software (Media Cibernetics Rokville , USA)(Image 1 and Image 2) .

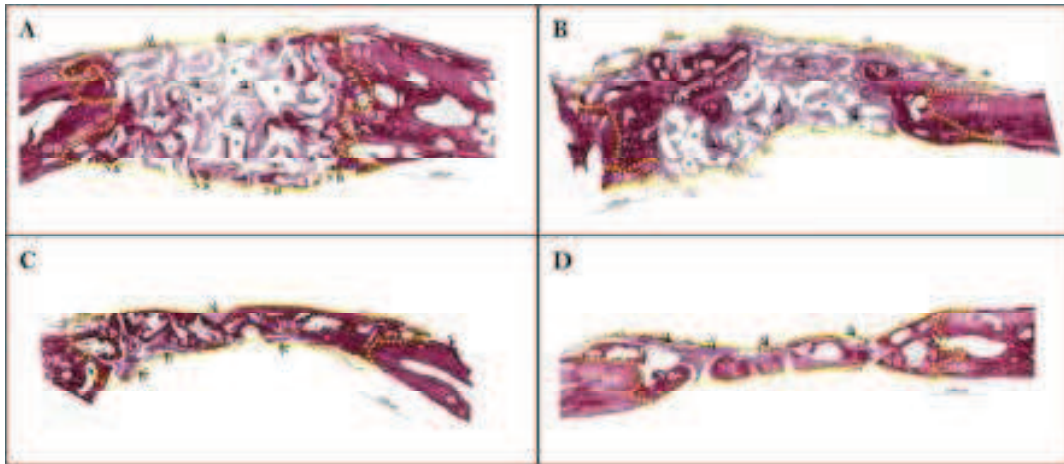


Image 1: histological section stained through Sirius Red. (A) SBC group – showing abundant granulation tissue (arrows), negative images of biphasic calcium phosphate particles removed during processing (stars), old bone (OB) on the rim defect limited in the image by the dotted yellow line, and the newly formed bone (NB) close to the rim defect and the periphery of some particles. The variable total area and the height of the defect were higher in this group compared to groups C and D. Similar findings were found in SBC + LPRF (B) group, however there was no difference in the variable total area and the defect height among the other groups. In LPRF groups (C) and Clot (D) we can notice sparse granulation tissue on the defect length and the newly formed bone. (Bar Scale of 1 000 micrometers)

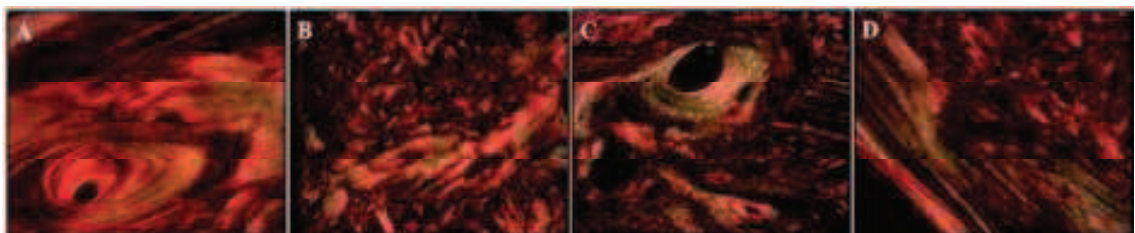


Image 2: histological section stained through Sirius Red under polarized light 400x magnified, being the Collagen III represented by green and in red Collagen I, having no difference between the groups A) SBC alone; B) SBC+LPRF (1:1); C) LPRF alone e D) Clot.

Five variables were analyzed:

Defect Area (µm²) - Through Image Pro Plus 4.5 software, the outline of the filled defect was defined manually (Appendix 5). This measurement was performed in 02 different moments at a 20-day break as a calibration step,

1 wherein the Dahlberg Reproducibility Test indicated that the evaluator reproduced
2 the measure reliably (Appendix 6). As the Student's T test indicated that there
3 was no significant statistical difference between the average values in the two
4 periods ($p > 0.05$) (Appendix 7), showing lack of systematic error, it was decided to
5 use the second measurement values.

6 Newly Formed Bone Area - With the aid of Adobe Photo Shop CS 5.1
7 software (Adobe USA), the slide image was treated by removing the sample outer
8 areas, old bone, connective tissue, blood vessels and medullary spaces, thus
9 keeping only the corresponding images to the newly formed bone. Through
10 IMAGE PRO PLUS 4.5 software, the area of this new bone was calculated.
11 (Appendix 8)

12 Percentage of Bone Formation – it is the mathematical ratio between the
13 variable Newly Formed Bone Area and the variable Defect Area.

14 Height of Filling Defect – it is the linear measure between the top and
15 bottom ridge of the defect. Through IMAGE PRO PLUS 4.5 software, there were
16 05 equidistant, linear and parallel measurements of the defect walls. At the end,
17 an average of these values was generated. (Appendix 9)

18 Quantity of Collagen I in Newly Formed Bone - The slides were
19 photographed under an optical microscope using polarized lens. A mask was
20 developed to show the difference between Collagen I and Collagen III. Through
21 Software IMAGE PRO PLUS 4.5, carrying this mask, quantitative calculation of
22 the Collagen I was conducted. (Appendix 10)

23 For statistical analyses, the software SPSS version 23.0 was used. Initially,
24 the examiner reproducibility power was confirmed with the Reproducibility
25 Dahlberg test, using the data of the variable Defect Area. The normality of the
26 collected data in the four groups for the five variables was analyzed with Normality
27 Test Kolmogorov-Smirnov. The comparison of the average values was done with
28 ANOVA test for one criterion. When the ANOVA test indicated a difference in
29 these average values the two-by-two comparison was made using: Tukey HSD
30 Multiple Comparisons Test for homogeneity of variances and the Comparison
31 Multiple Test of Games Howell for heterogeneous variances. The homogeneity of
32 variances among groups was confirmed with the Levene's Test of Homogeneity
33 Variances, adopting 5 % as level of significance.

34

1 Results

2 For the analysis of this study, 04 groups and 05 quantitative and dependent
 3 variables were taken into account. The descriptive results and the results of Tukey
 4 HSD Tests and Games Howel for pair comparison can be seen in Table 1. The
 5 Graphics 1A, 1B, 1C, 1D and 1E show 95% confidence interval for five analyzed
 6 variables. The ANOVA test results for comparison of average values are reported
 7 in Table 2.

8

DESCRIPTIVE RESULTS					
VARIABLES	GROUP	MEAN VALUE	STANDARD DEVIATION	(P) VALUE ANOVA	MULTIPLE COMPARISONS ⁽³⁾
Defect Area (µm ²)	SBC	10554327.13	4025844.91	0,0001 ⁽²⁾	A
	SBC + LPRF	7457971.12	1675241.24		AB
	LPRF	6069292.29	1825882.53		B
	Clot	5677352.50	2104751.18		B
Newly Formed Bone Area (µm ²)	SBC	3671752.22	1231052.44	0,3742	A
	SBC + LPRF	3130122.98	689758.15		A
	LPRF	3194323.61	662744.46		A
	Clot	3752667.48	1482990.17		A
Percentage of Bone Formation (%)	SBC	37.81	13.65	0,0000 ⁽¹⁾	A
	SBC + LPRF	43.06	10.13		AB
	LPRF	54.84	10.15		BC
	Clot	66.37	12.91		C
Height of Filling Defect (µm)	SBC	1864.01	649.20	0,0000 ⁽²⁾	A
	SBC + LPRF	1499.75	218.79		A
	LPRF	1227.68	239.28		BC
	Clot	1063.54	225.26		C
Percentage of Collagen I (%)	SBC	73.24	18.68	0,0536	A
	SBC + LPRF	83.88	8.77		A
	LPRF	86.06	6.56		A
	Clot	76.51	11.36		A

⁽¹⁾ Multiple comparisons based on Tukey HSD test

⁽²⁾ Multiple comparisons based on Games Howell test

⁽³⁾ Equal letters on the multiple comparisons column indicate a non significant statistical difference

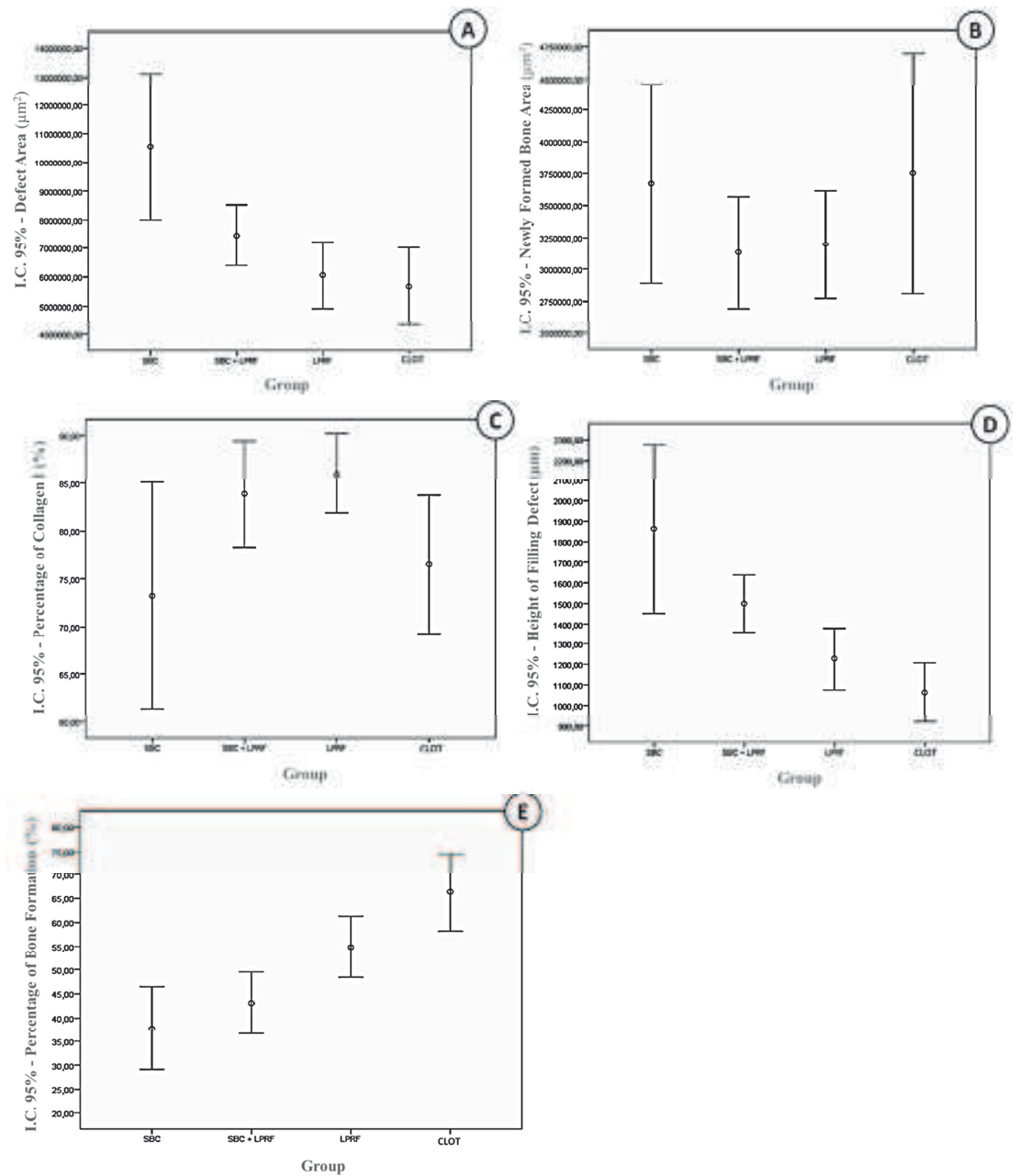
9

10 Table 1: Descriptive results of the five variables for the four groups

11

12

13



1

2 Graph 1: 95% confidence interval for the variables; A) Defect Area; B) Newly
 3 Formed Bone Area; C) Percentage of Collagen I; D) Height of Filling Defect; E)
 4 Newly Formed Bone Percentage.

5

ANOVA								
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	P Value	Observed Power ^b	
Defect Area (µm ²)	Between Groups	176,221,463,453,940.0000	3	58.740,487,817,979.9000	8.7745	0.0001	0.9913	
	Within Groups	294,554,535,067,782.0000	44	6.694,421,251,540.5100				
Newly Formed Bone Area (µm ²)	Between Groups	3,693,836,457,860.0700	3	1,231,278,819,286.6900	1.0638	0.3742	0.2682	
	Within Groups	50,927,221,207,702.6000	44	1,157,436,618,356.8800				
Percentage of Bone Formation (%)	Between Groups	5,843.6772	3	1,947.8924	13.9486	0.0000	0.9999	
	Within Groups	6,144.4931	44	139.6476				
Height of Filling Defect (µm)	Between Groups	4,408,831.0030	3	1,469,610.3343	10.1823	0.0000	0.9970	
	Within Groups	6,350,507.5688	44	144,329.7175				
Percentage of Collagen I	Between Groups	1,235.1946	3	411.7315	2.7550	0.0536	0.5578	
	Within Groups	6,575.7007	44	149.4477				

(b) Computed using alpha = .05

Table 2: comparison of the average values performed by the ANOVA test to one criterion

Since all variables showed normal distribution, Pearson correlation test was used (parametric) to measure the degree of association between variables (Appendix 14). The variable Defect Area has a strong positive correlation with Height of Filling Defect ($r = 0.88$), regular positive with the Newly Formed Bone Area ($r = 0.58$) and strong negative with Percentage of Bone Formation ($r = -0.64$). This means that increasing the defect area also increases the height of filling defect and the newly formed bone area, but decreases the percentage of bone formation. The variable Newly Formed Bone Area has regular positive correlation with the Height of filling defect ($r = 0.50$), that is, increases in the newly formed bone area lead to increases in the height of filling defect and in the defect area. The variable Percentage of Bone Formation has regular negative correlation with the height of filling defect ($r = -0.52$). Thus, the percentage of bone formation decreases as the height of filling defect increases.

Discussion

The bone healing process which occurs in the regenerative procedures involves four phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling.

1 It is known that autogenous bone grafts are considered "gold standard" due
2 to their osteoconductive, osteoinductive and osteogenic properties. However, intra
3 oral limited quantity and morbidity resulting from a second surgical site, has
4 restricted its indication.

5 Hydroxyapatite and β tricalcium synthetic phosphate are both
6 biocompatible bone substitutes, with three-dimensional structure similar to the
7 human bone, generally used in combination and which have osteoconductive
8 property superior to autogenous bone (^{29, 30, 31, 32, 33}), but without inducing or gene
9 capacity. Thus, one of the great challenges of tissue engineering has been trying
10 to figure out a surgical additive with these properties to be used in an associated
11 way.

12 The LPRF membrane was described by Choukroun et al (¹¹), as a
13 polymerized fibrin network in a slow and natural way, containing growth factors
14 and immune inflammatory cytokines originated from platelet and leukocyte
15 activation. These biochemical compounds remain active and functional for an
16 average period of 7 to 11 days (¹⁵) having the potential to accelerate the healing
17 process of hard and soft tissue (³⁴), moderating the inflammatory response and
18 enhancing the anti-infective activity (^{14, 16, 17, 18}).

19 The aim of this study was to evaluate histomorphometric bone repair of
20 the leukocytes and platelets rich fibrin (LPRF) alone and associated with
21 Hydroxyapatite + β phosphate tricalcium (SBC) compared to the clot, in critical
22 defects of 6mm of diameter made in the calvaria of rabbits. The choice of a two-
23 month period for the euthanasia was based on the work of Sohn et al (³⁵) which
24 stated that bone islands separated from the margin and close to the defect center
25 can already be seen, having this newly formed bone a moderate amount of bone
26 marrow and also mature bone.

27 The higher values for the variable Defect Area and defect Height of Filling
28 Defect were identified in the treated groups with isolated synthetic substitute,
29 followed by association with LPRF decreasing to isolated LPRF group. These
30 results corroborate the information that synthetic bone substitutes work positively
31 as osteofillers (^{2, 3, 4, 5, 6, 7}).

1 Referring to the variable Newly Formed Bone Area, there was no
2 statistically significant difference among the four groups. These results are
3 consistent with those presented by Knapen et al ⁽³⁶⁾ that use 04 titanium
4 hemispheres of 08 mm supported on defects created in rabbit calvaria in a 05-
5 week period, evaluating the degree of bone formation inside and also the healing
6 speed. Pripatnanont et al ⁽³⁷⁾ also found no significant difference in radiographic
7 and histomorphometric analysis in 08 weeks when compared xenogeneic
8 substitute versus xenogeneic + LPRF filling critical defects 10mm in rabbit
9 calvaria. These results were contrary to those reported by Kim et al ⁽³⁸⁾ compared
10 to intervals of 1, 2, 4, 6 and 8 weeks healing response of 02 defects of 08 mm
11 created in rabbit calvaria and filled with β tricalcium phosphate and hydroxyapatite
12 + LPRF versus clot and in all these periods the group treated with the combination
13 showed histologically more advanced bone formation. However, the author has
14 not investigated in the same animal these two materials in isolation, to find out
15 which one in particular could be favoring healing or if the combination of the two
16 would really lead to benefit.

17 The variable percentage of bone formation showed higher values for Clot,
18 with no statistical difference with LPRF, just being this difference significant with
19 SBC and SBC + LPRF respectively. These results are consistent to the fact that
20 the defect area and height of filling defect are variables that have a strong
21 negative correlation with percentage of bone formation (Table 11), i.e. increasing
22 the defect area or height of filling defect decreases percentage of bone formation.
23 Anyway, these results were contrary to the findings of Acar et al ⁽³⁹⁾ that observed
24 with 08 weeks the superiority of SBC + LPRF association, followed by LPRF
25 alone, SBC alone and finally the clot.

26 There was no statistical difference for the variable percentage of collagen
27 I (Table 7). A similar result was found in the work of Bölükbaşı et al ⁽⁴⁰⁾ which
28 showed that in 10 days the treated groups LPRF showed higher bone maturation
29 stage, but after 40 days there was no significant difference between groups (SBC
30 and SBC + LPRF), leading to the conclusion that the LPRF would be effective
31 only in the early stages of healing.

1 Therefore, it was found that hydroxyapatite + β tricalcium phosphate
2 (SBC) was more favorable as filling of bone defect material and space
3 maintenance when compared to LPRF alone. The addition of LPRF and SBC
4 showed a slight improvement in the percentage of newly formed bone and
5 percentage of collagen 1, however this improvement was not statistically
6 significant. Alone, LPRF showed no significant benefit for bone new formation or
7 maturation. Taking into account the limits of this research, other studies must be
8 carried out with time intervals for euthanasia, including, a qualitative
9 histomorphometric analysis, not only a quantitative one, as well as micro
10 computed tomography analysis.

11

12 References

- 13 (1) McAllister B, Haghighat K. **Bone augmentation techniques**. Journal of Periodontology, 2007; 78: 377–396.
- 14 (2) Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. **Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or**
15 **Straumanns Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial**. Clin.
16 Oral Impl. Res. 2008; 19: 796–803.
- 17 (3) Covani U, Orlando B, Giacomelli L, Cornelini R, Barone A. **Implant survival after sinus elevation with Straumann s**
18 **BoneCeramic in clinical practice: ad-interim results of a prospective study at a 15-month follow-up**. Clin. Oral Impl.
19 Res. 22, 2011; 481–484. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02042.x7-
- 20 (4) Froum SJ, Wallace SS, Cho SC, Elian N, Tarnow DP. **Histomorphometric comparasion of a biphasic bone ceramic**
21 **to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6 to 8 month postsurgical assessment of vital bone formation.**
22 **A pilot study**. Int J Periodontics Restorative Dent 2008; 28: 273-281.
- 23 (5) Artzi Z, Weinreb M, Carmeli G, LevDor R, Dard M, Nemcovsky CE. **Histomorphometric assessment of bone**
24 **formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium**
25 **phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans**. Clin Oral Implants Res. 2008 Jul;19(7):686-92.
- 26 (6) Mardas N, D'Aiuto F, Mezzomo L, Arzoumanidi M, Donos N. **Radiographic alveolar bone changes following ridge**
27 **preservation with two different biomaterials**. Clin. Oral Impl. Res. 2011; 22: 416–423.
- 28 (7) Mardas N. et al. **Socket preservation with synthetic bone substitute or a bovine xenograft**. IADR 2008. Data on file
29 (study CR 03/05)
- 30 (8) Zafiropoulos G.-G. K. et al. **Treatment of intrabony defects using guided tissue regeneration and autogenous**
31 **spongiosa alone or combined with hydroxyapatite/beta tricalcium phosphate bone substitute or bovine-derived**
32 **xenograft**. J. Periodontol. 2007; 78: 2216-2225
- 33 (9) Jensen S. S. et al. **Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects. A histologic**
34 **and histomorphometric study in the mandibles of minipigs**. Clin. Oral. Impl. Res. 2007;18: 752-760
- 35 (10) Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. **Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF**. Implantodontie.
36 2001; 42: 55-62.
- 37 (11) Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. **Platelet-rich fibrin (PRF): A second-**
38 **generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral
39 Radiol Endod 2006;101:E37-44.
- 40 (12) Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. **Platelet-rich fibrin (PRF): A second-**
41 **generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol
42 Endod 2006;101:E45-50.

- 1 (13) Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, Kim ES, Choung PH. **Platelet-Rich Fibrin is a**
2 **Bioscaffold and Reservoir of Growth Factors for Tissue Regeneration.** TISSUE ENGINEERING 2011: Part A, Volume
3 17, Numbers 3 and 4.
- 4 (14) Dohan D, Peppo G, Doglioli P, Sammartino G. **Slow release of growth factors and trombospodin-1 in**
5 **Choukroun's platelets-rich fibrina (PRF): a gold standart to achieve for all surgical platelets concentrates**
6 **technologies.** Growth Factors, February 2009; 27(1): 63–69
- 7 (15) Dohan DM, Corso MD, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. **Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a**
8 **Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane.** J Periodontol 2010;81:546-555.
- 9 (16) Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. **Platelet-rich fibrin (PRF): A second-**
10 **generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates?** Oral Surg
11 Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E51-5.
- 12 (17) Moojen, D *et al.* **Antimicrobial activity of platelets-leukocyte gel against Staphylococcus aureus.** Journal of
13 Orthopedics, 2008; 26: 404-410.
- 14 (18) Fabbro MD, Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Weinstein R. **Autologous platelet concentrate for post-extraction**
15 **socket healing: A systematic review.** Eur J Oral Implantol 2014;7(4):333–344.
- 16 (19) Simon BI, Gupta P, Tajbakhsh S. **Quantitative Evaluation of Extraction Socket Healing Following the Use of**
17 **Autologous Platelet-Rich Fibrin Matrix in Humans.** [Int J Periodontics Restorative Dent.](#) 2011 Jun;31(3):285-95.
- 18 (20) Hauser F, Gaydarov N, Badoud I, Vazquez L, Bernard JP, Ammann P. **Clinical and Histological Evaluation of**
19 **Postextraction Platelet-rich Fibrin Socket Filling: A Prospective Randomized Controlled Study.** Implant Dentistry
20 2013 June 22(3): 295–303.
- 21 (21) Mazon Z, Horowitz RA, Corso MD, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan DM. **Sinus Floor Augmentation With**
22 **Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A**
23 **Radiologic and Histologic Study at 6 Months.** J Periodontol 2009;80:2056-2064.
- 24 (22) Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Ehrenfest D. **Simultaneous sinus-lift and implantation**
25 **using microthreaded implants and leukocyte and platelet-rich fibrina as sole grafting material: A six-year**
26 **experience,** 2011; 20(1): 2-8
- 27 (23) Aroca S, Koglevich T, Barbieri B, Gera I, Etienne D. **Clinical evaluation of a modified Coronally Advanced Flap**
28 **Alone or in combination with platelet-rich fibrina membrane for the treatment of adjacente multiple gingival**
29 **recessions: A 6-month study.** Journal of Periodontology, 2009; 80(2): 244-252.
- 30 (24) Jankovic S, Aleksic Z, Klokkevold P, Lekovic V, Dimitrijevic B, Kenney B, Camargo P. **Use of platelet-rich fibrina**
31 **membrane following treatment of gingival recession: A randomized clinical trial.** The International Journal of
32 Periodontics & Restorative Dentistry, 2012; 32(2):41-50.
- 33 (25) Thorat MK, Pradeep AR, Pallavi B. **Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony**
34 **defects: a controlled clinical trial.** Journal of Clinical Periodontology, 2011; 38: 925-932
- 35 (26) Sharma A, Pradeep A. **Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with**
36 **autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial.** Journal of Periodontology, 2011; 82(12): 1705-
37 1712
- 38 (27) Singh A, Kohli M, Gupta N. **Platelet Rich Fibrin: A Novel Approach for Osseous Regeneration.** J Maxillofac Oral
39 Surg. Dec 2012; 11(4): 430–434.
- 40 (28) Kim JS, Jeong MH, Jo JH, Kim SG, Oh JS. **Clinical Application of Platelet-Rich Fibrin by the Application of the**
41 **Double J Technique During Implant Placement in Alveolar Bone Defect Areas: Case Reports.** Implant Dentistry 2013
42 June; 22(3): 244-249.
- 43 (29) Rokn AR, Moslemi N, Eslami B, Abadi HK, Paknejad M. **Histologic Evaluation of Bone Healing Following**
44 **Application of Anorganic Bovine Bone and β -tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria.** Journal of Dentistry, Tehran
45 University of Medical Sciences, Tehran, Iran 2012; 9(1): 35-40.
- 46 (30) Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofed R, Mashhadi AF, Aghallo M, Sharifi D, Jabbareh L. **Comparison**
47 **between the Efficacy of Bio-Oss, Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate and Combination of Mesenchymal Stem**
48 **Cells in Inducing Bone Regeneration.** Chang Gung Med J 2012;35:28-37.
- 49 (31) Lindgren C, Mordenfeld A, Johansson CB, Hallman M. **A 3 year Clinical Follow up of Implants Placed in Two**
50 **Different Biomaterials Used for Sinus Augmentation.** Int J Oral Maxillofac Implants 2012; 27: 1151-1162.
- 51 (32) Caubet J, Ramis JM, Murguialday MR, Morey MA, Monjo M. **Gene expression and morphometric parameters of**
52 **human bone biopsies after maxillary sinus floor elevation with autologous bone combined with Bio-Oss or**
53 **BoneCeramic.** Clin Oral Implants Res. 2015 Jun;26(6):727-35.

- 1 (33) Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukan FW, Schlegel KA. **Histological results after maxillary sinus**
2 **augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled**
3 **clinical trial.** Clin. Oral Impl. Res. 2013; 24: 576–585.
- 4 (34) Choukroun J, Diss A, Simompieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. **Platelet-**
5 **rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing.** Oral Surg
6 Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:E56-60
- 7 (35) Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. **Spontaneous healing capacity of rabbit cranial**
8 **defects of various sizes.** J Periodontal Implant Sci. 2010 August; 40(4): 180–187.
- 9 (36) Knapen M, Gheldof D, Drion P, Layrolle P, Rompem E, Lambert F. **Effect of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-**
10 **PRF) on Bone Regeneration: A Study in Rabbits.** Clinical Implant Dentistry and Related Research 2015; Volume 17,
11 Supplement 1.
- 12 (37) Pripatnanont P, Nuntanarant T, Vongvatcharanon S, Phurisat K. **The primacy of platelet-rich fibrin on bone**
13 **regeneration of various grafts in rabbit's Calvaria defects.** Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 2013; 41: 191-200.
- 14 (38) Kim BJ, Kwon TK, Baek HS, Hwang DS, Kim CH, Chung IK, Jeong JS, Shin SH. **A comparative study of the**
15 **effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium**
16 **phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol
17 2012;113:583-592.
- 18 (39) Acar AH, Yolcu U, Gul M, Keles A, Erdem NF, Kahraman AS. **Micro-computed tomography and**
19 **histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium.**
20 Archives of Oral Biology 2015; 60: 606-614.
- 21 (40) Bolukbasi N, Yeniol S, Tekkesin MS, Altunatamz K. **The Use of Platelet-Rich Fibrin in Combination With Biphasic**
22 **Calcium Phosphate in the Treatment of Bone Defects: A Histologic and Histomorphometric Study.** Current
23 Therapeutic Research 2013; 75: 15–21.
- 24
- 25

1 APPENDICES

2



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 02 de agosto de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 721 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da regeneração óssea com o uso da fibrina rica em plaquetas de Choukroun isolada e associada ao struman bone ceramic

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Eduardo Ferrucio

EQUIPE DE PESQUISA: Eduardo Ferrucio, Vinicius Tramontina

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola da Saúde e Biociências

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelho	Macho	Adultos / 2,5 a 3kg	C	20

O colegiado do CEUA em reunião no dia 02/08/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO.**

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Atenciosamente,

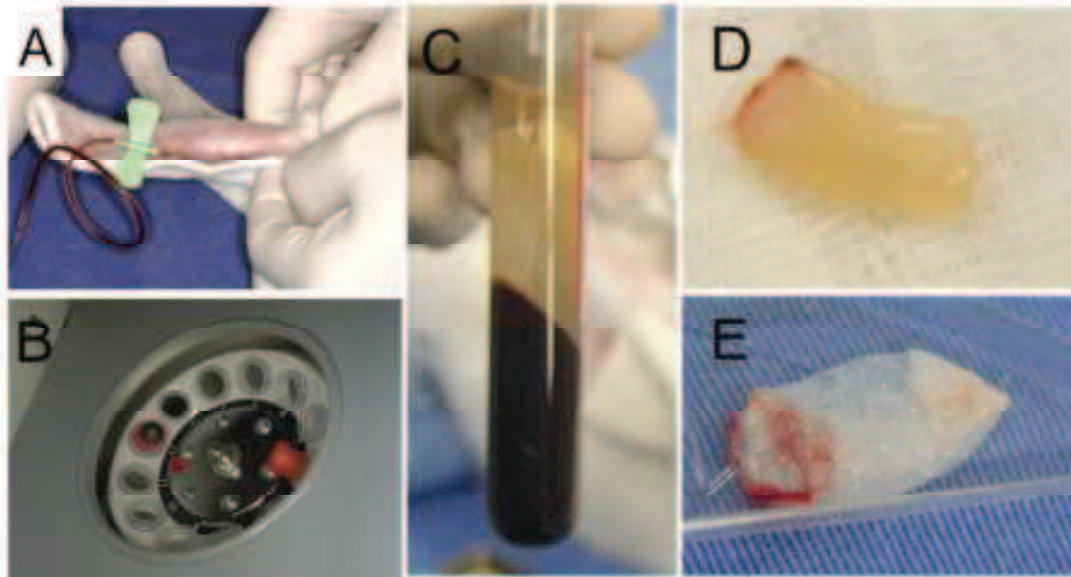
Gracinda Maria D. Almeida e Oliveira
Profª Gracinda Maria D. Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais



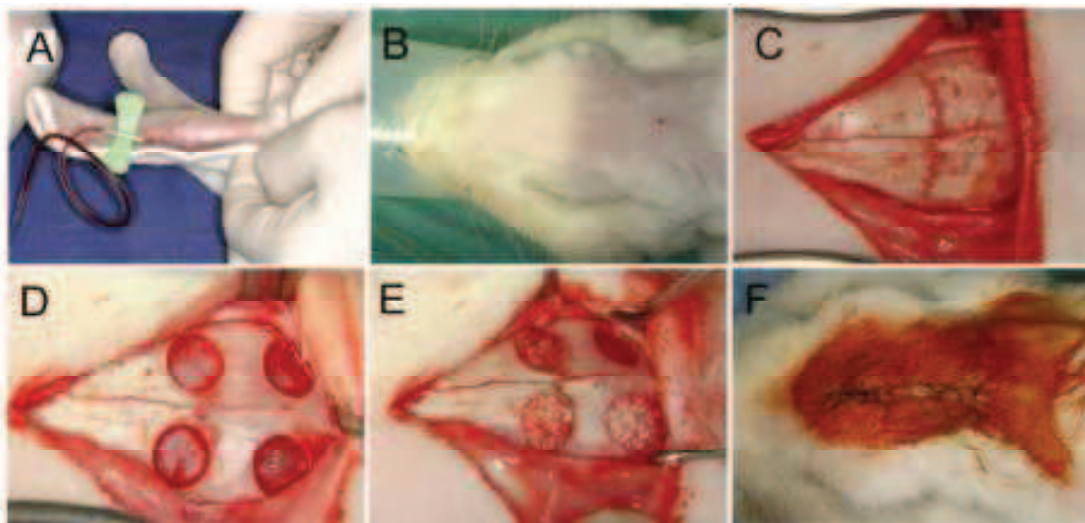
3

4

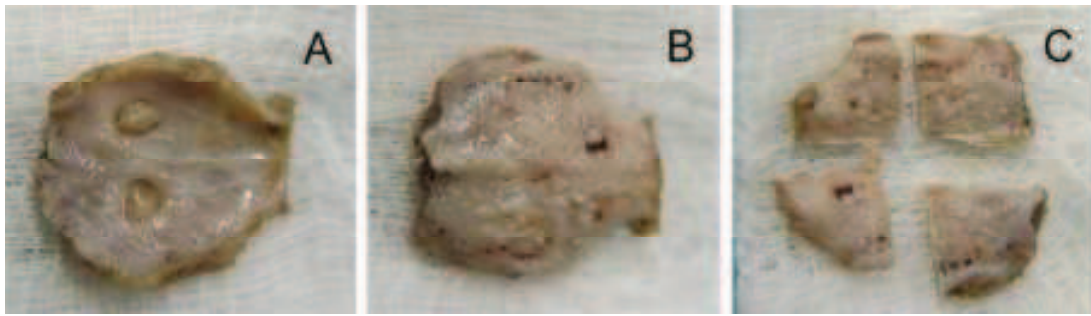
APPENDIX 1 - Document approved by the Ethics Committee.



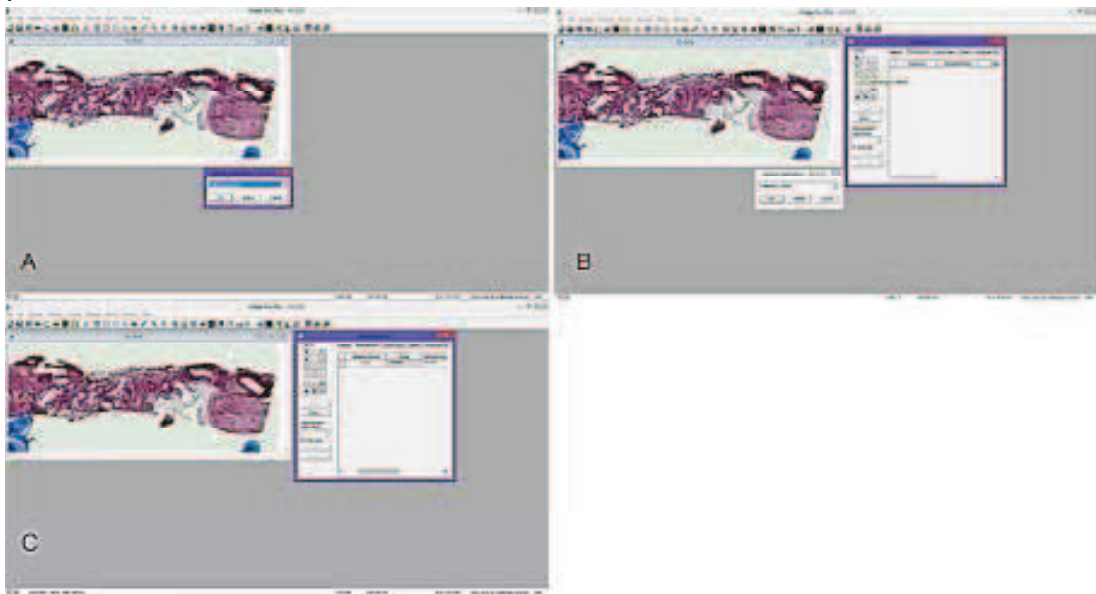
APPENDIX 2 - A) 24G catheter in the marginal ear vein to collect 0.6 ml of blood; B) tube without anticoagulant, containing blood placed in the centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes; C) after centrifugation, formation of three layers inside the tube: the lower layer of red cells, the upper layer the platelet-poor plasma supernatant and between them the LPRF itself; D) careful removal of the LPRF in the form of plug and removal of the red layer adhered to its base; E) LPRF membrane formed after compression procedure between sterile gauzes.



APPENDIX 3 - A) 24G catheter in the marginal ear vein for anesthesia B) trichotomized and decontaminated skull with chlorhexidine gluconate 0.2 %; C) longitudinal incision with mucoperiosteal flap elevation and bone calvaria exposure; D) creation of four 6 mm defects; E) clockwise filled defects with SBC alone, SBC + LPRF (1:1), LPRF alone and Clot; F) continuous surgical thread mononylon 5.0 and topical application of PVPI.



APPENDIX 4: A) Inside view of removed calvaria showing the position of the four defects; B) External view of the removed calvaria showing the difficulty in the defect identification; C) guided by internal view of the calvaria, the four defects were individualized and submitted to descaling, embedment, cutting and coloring procedures



APPENDIX 5: Software Image Pro Plus 4.5 A) on the menu "spacial calibration", "scanner calibration" was selected; B) on the menu "measurements" the tool "Create polygon feature" was used; C) after manually defining the value area in μm^2 , automatically appears "value".

TABELA 1 – VARIÂNCIA TOTAL, VARIÂNCIA DO ERRO, ERRO DE DAHLBERG, COEFICIENTE DE CONFIABILIDADE E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA A VARIÁVEL ÁREA TOTAL					
VARIÁVEL	VARIÂNCIA TOTAL S^2	VARIÂNCIA ERRO S_e^2	ERRO DE DALBERG (%)	COEF. CONFIAB. (%)	COEF. CORREL. (%)
Área total	181255506095718,00	695311058,19	0,0004	99,9996	99,9997
FONTE: Dados da pesquisa					

1

2 APPENDIX 6: Dahlberg Reproducibility test to calculate the total variance, error
3 variance, Dahlberg error, reliability coefficient and Pearson coefficient correlation
4 for the variable Defect Area.

5

TABELA 2 - ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA VARIÁVEL ÁREA TOTAL

Variável	Média	n	Desvio padrão
Area total t1	10718868,9821	56	13469324,5989
Area total t2	10713040,9286	56	13456905,5522

Fonte: dados da pesquisa

TABELA 3 - TESTE T DE STUDENT PARA AMOSTRAS EMPARELHADAS

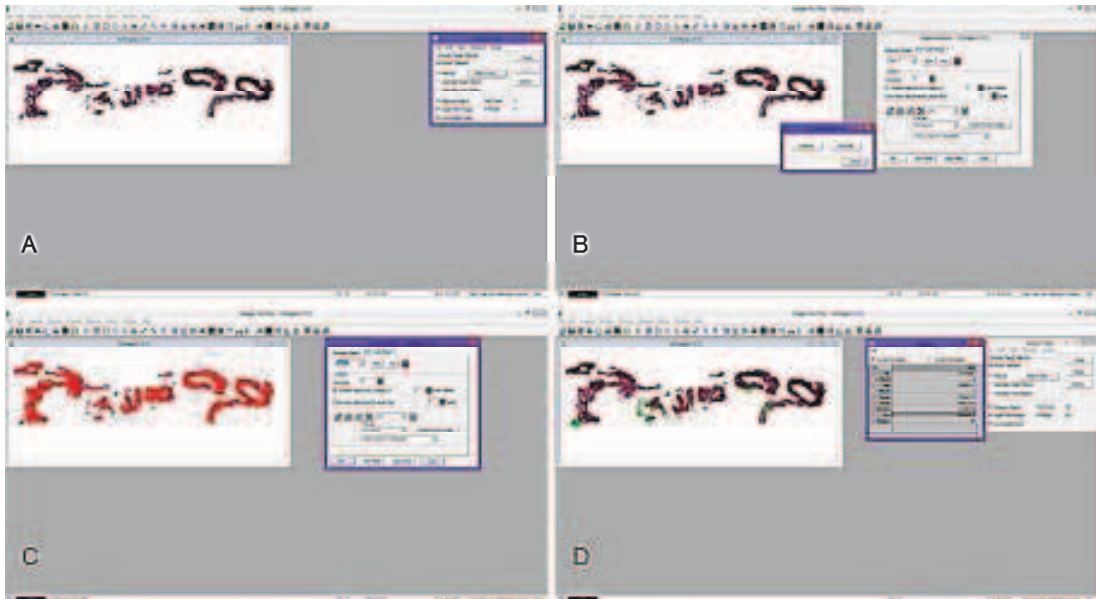
Variável	Diferença emparelhada					t	G.L.	Valor p
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança (95%) da diferença de médias				
				L.I.	L.S.			
Area total t1 - Área total t2	5828,0536	37166,1456	4966,5351	-4125,1052	15781,2124	1,1735	55	0,2457

Fonte: dados da pesquisa

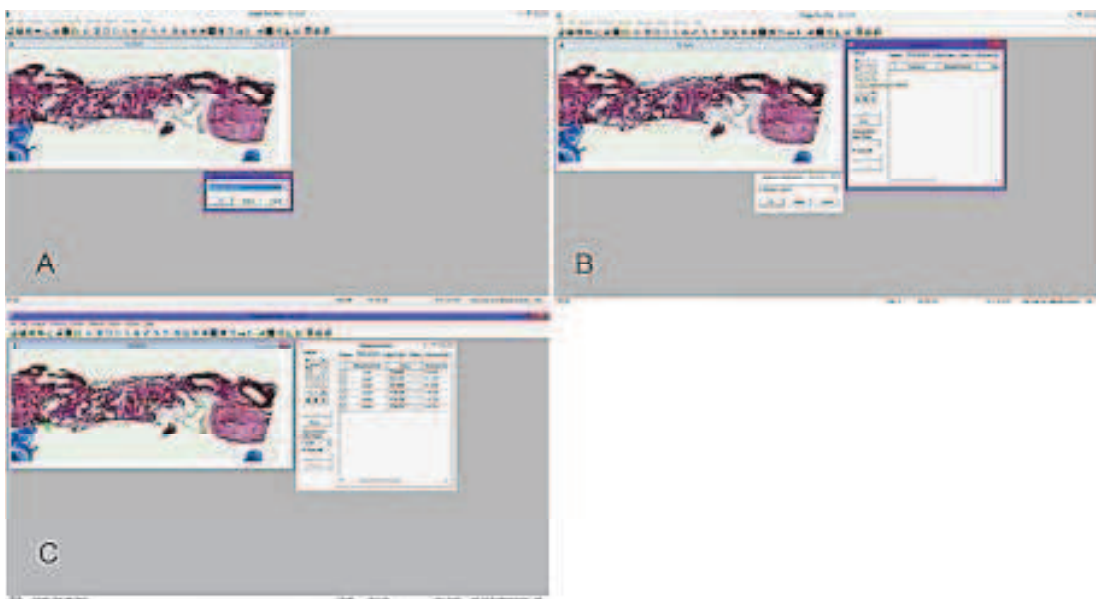
6

7 APPENDIX 7: Student's T test for paired samples evaluating the systematic error
8 of a variable, measured in two distinct times.

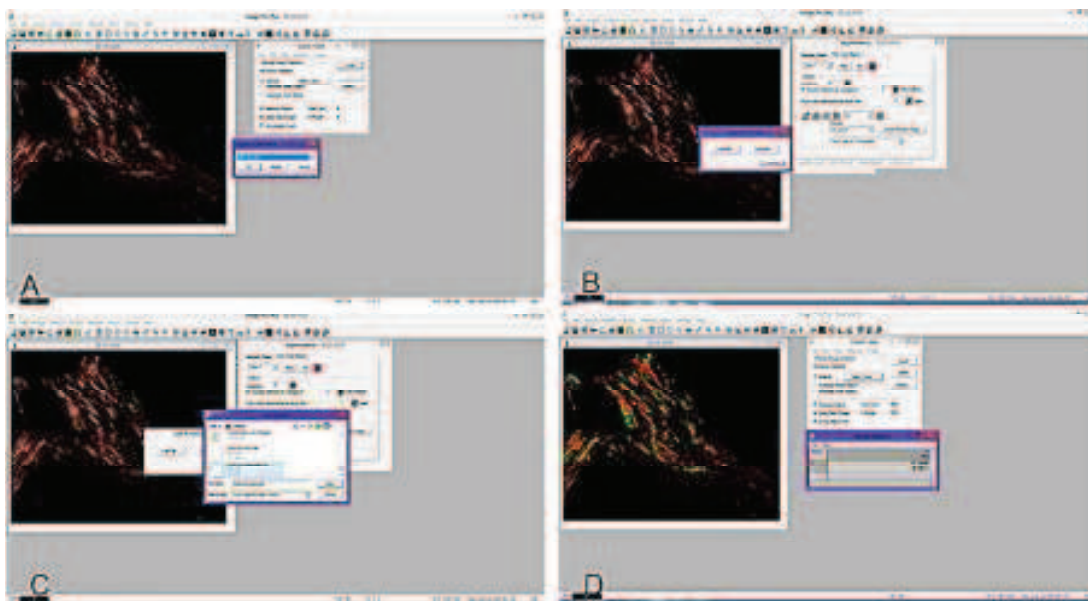
9



- 1
- 2 APPENDIX 8: Software Image Pro Plus 4.5 A) on the menu "spacial calibration",
- 3 "scanner calibration" was selected, on the menu "count / size", "select colors" was
- 4 selected; B) on the window "segmentation", "file" was clicked and after that "load
- 5 file" to select the previously created mask; C) mask showing the selection of the
- 6 entire bone area contained in the image; D) on the window "count / size", "count"
- 7 was clicked and the value in μm^2 automatically appears on the "sum" field.
- 8



- 9
- 10 APPENDIX 9: Software Image Pro Plus 4.5 A) on the menu "spacial calibration",
- 11 "scanner calibration" was selected; B) on the menu "measurements", the tool
- 12 "create click and drag line feature" was used; C) after manually defining five
- 13 parallel lines, the value in μm automatically appears on the "length" field.



APPENDIX 10: Software Image Pro Plus 4.5 A) on the menu “spacial calibration”, “OBJ 40x LPE” was selected and on the menu “count/size”, “select colors” was selected; B) on the window “segmentation”, “file” was clicked and after that in “load file” to select the mask previously created; C) mask being charged; D) on the window “count / size”, “count” was clicked, showing in the red image Collagen 1 and in green Collagen III, automatically showing the percentage in the “sum” field.

Tests of Normality							
Grupos		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Valor p	Statistic	df	Valor p
Média Area Total (µm²)	SBC	,103	12	,200 [*]	,952	12	,873
	SBC + LPRF	,122	12	,200 [*]	,953	12	,884
	LPRF	,138	12	,200 [*]	,970	12	,914
	Coágulo	,200	12	,200 [*]	,900	12	,160
Área do osso novo (µm²)	SBC	,133	12	,200 [*]	,931	12	,394
	SBC + LPRF	,220	12	,113	,911	12	,220
	LPRF	,210	12	,151	,890	12	,120
	Coágulo	,215	12	,132	,882	12	,094
Porcentagem de novo osso	SBC	,179	12	,200 [*]	,883	12	,096
	SBC + LPRF	,222	12	,106	,890	12	,119
	LPRF	,167	12	,200 [*]	,950	12	,836
	Coágulo	,177	12	,200 [*]	,879	12	,085
Média da altura do defeito (µm)	SBC	,143	12	,200 [*]	,958	12	,756
	SBC + LPRF	,166	12	,200 [*]	,948	12	,603
	LPRF	,103	12	,200 [*]	,968	12	,886
	Coágulo	,151	12	,200 [*]	,930	12	,382
Média da porcentagem de colágeno tipo I	SBC	,138	12	,200 [*]	,925	12	,328
	SBC + LPRF	,188	12	,200 [*]	,917	12	,259
	LPRF	,232	12	,074	,912	12	,228
	Coágulo	,208	12	,159	,915	12	,249

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

APPENDIX 11: Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk tests, showing variables with normal distribution.

1

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Valor p
Média Area Total (μm^2)	5,068	3	44	0,0042
Área do osso novo (μm^2)	5,769	3	44	0,0020
Percentagem de novo osso	,553	3	44	0,6489
Média da altura do defeito (μm)	8,604	3	44	0,0001
Média da percentagem de colágeno tipo I	5,817	3	44	0,0019
Valor p < 0,05 indica variâncias heterogêneas				

2

3

APPENDIX 12 – Levene's test performed to evaluate variance homogeneity.

4

5

Correlações de Pearson

		Média Area Total (μm^2)	Área do osso novo (μm^2)	Percentagem de novo osso	Média da altura do defeito (μm)	Média da percentagem de colágeno tipo I
Média Area Total (Micrometros quadrados)	Correlação de Pearson	1	,578**	-,644**	,875**	-,212
	Valor p		,000	,000	,000	,148
	N	48	48	48	48	48
Área do osso novo (Micrometros quadrados)	Correlação de Pearson	,578**	1	,170	,503**	-,062
	Valor p	,000		,248	,000	,678
	N	48	48	48	48	48
Percentagem de novo osso	Correlação de Pearson	-,644**	,170	1	-,522**	,050
	Valor p	,000	,248		,000	,738
	N	48	48	48	48	48
Média da altura do defeito (Micrometros)	Correlação de Pearson	,875**	,503**	-,522**	1	-,082
	Valor p	,000	,000	,000		,579
	N	48	48	48	48	48
Média da percentagem de colágeno tipo I	Correlação de Pearson	-,212	-,062	,050	-,082	1
	Valor p	,148	,678	,738	,579	
	N	48	48	48	48	48

**. A correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

6

APPENDIX 13 – Pearson's test performed to measure the degree of association between the two variables.

7

8