



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

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

ANIBAL SOLEY ABBATE FILHO

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM A
UTILIZAÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E
LEUCÓCITOS (L-PRF) ASSOCIADA OU NÃO A ENXERTO
BOVINO ANORGÂNICO. ESTUDO HISTOLÓGICO EM
CALVÁRIA DE COELHOS**

**Curitiba
2014**

ANIBAL SOLEY ABBATE FILHO

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM A UTILIZAÇÃO DA
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS (L-PRF)
ASSOCIADA OU NÃO A ENXERTO BOVINO ANORGÂNICO.
ESTUDO HISTOLÓGICO EM CALVÁRIA DE COELHOS.**

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

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Sonia Mara
Luczyszyn.**

Curitiba

2014

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

A123a
2014 Abbate Filho, Anibal Soley
Avaliação do reparo ósseo com a utilização da fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) associada ou não ao enxerto bovino anorgânico: estudo histológico em calvária de coelhos / Anibal Soley Abbate Filho; orientador, Sonia Mara Luczyszyn. -- 2014
42, [2] f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2014.
Inclui bibliografias

1. Odontologia. 2. Ossos - Regeneração. 3. Implantes dentários. 4. Fibrina. 5. Transplante ósseo. I. Luczyszyn, Sonia Mara. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6

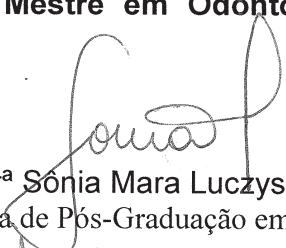
TERMO DE APROVAÇÃO

ANIBAL SOLEY ABBATE FILHO

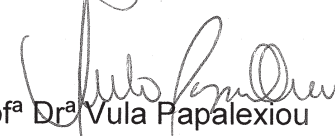
**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM A UTILIZAÇÃO DA FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS E LEUCÓCITOS (L-PRF) ASSOCIADA OU NÃO A ENXERTO
BOVINO ANORGÂNICO. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMORFOMÉTRICO EM
CALVÁRIA DE COELHOS**

Dissertação 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 **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Periodontia**.


Orientador(a):



Profª Drª Sônia Mara Luczyszyn
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Profª Drª Vula Papalexiou
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Profª Drª Daniela Bazan Palioto Bulle
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, FORP-USP

Curitiba, 01 de dezembro de 2014.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	1
Página título	1
Resumo	1
Introdução.....	2
Material e Método	5
Resultados.....	13
Discussão.....	15
Conclusão.....	19
Referências	21
ARTIGO EM INGLÊS	29
<u>Title page</u>	29
<u>Abstract</u>	29
<u>Introduction</u>	30
<u>Material and Methods</u>	33
<u>Results</u>	37
<u>Discussion</u>	37
<u>Conclusion</u>	40
ANEXO	42
<u>Parecer do comitê de ética</u>	43

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

2 Página título

3 Avaliação do Reparo Ósseo com a Utilização da Fibrina Rica em
4 Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) Associada ou Não a Enxerto Bovino Anorgânico.
5 Estudo Histológico em Calvária de Coelhos.

6 Anibal Soley Abbate Filho*, Vinicius Augusto Tramontina**, Sung Hyun Kim**,
7 Vula Papalexiou**, Sonia Mara Luczyszyn**

8 * Aluno do programa de Mestrado em Odontologia, área de concentração
9 Periodontia (PUCPR).

10 ** Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de
11 concentração Periodontia (PUCPR).

12 Autor correspondente: Prof^a. Dr^a Sonia Mara Luczyszyn

13 Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho – Curitiba/PR – CEP: 80242-980

14

15 Resumo

16 **Introdução:** Após a extração dentária, o processo alveolar sofre um
17 processo de atrofia fisiológica que pode levar a alterações, com perda de volume
18 da crista alveolar, impossibilitando ou dificultando a instalação de implantes.
19 Alguns autores vêm preconizando a utilização de concentrados de plaquetas para
20 acelerar a regeneração óssea alveolar. A fibrina rica em plaquetas e leucócitos
21 (L-PRF) tem sido utilizada para cicatrização de tecidos moles ou duros na
22 Periodontia e Cirurgias Buco Faciais. O Bio-Oss® é um osso de origem bovina,
23 desproteinado, usado frequentemente em cirurgias de aumento de rebordo
24 alveolar e levantamento de seio maxilar, servindo como arcabouço para
25 crescimento do novo tecido ósseo. O objetivo do presente estudo foi avaliar
26 histomorfometricamente, o processo de reparo ósseo e o potencial regenerativo
27 da fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) e do osso bovino anorgânico
28 (Bio-Oss), associados ou não, em defeitos cirurgicamente criados na calvária de
29 coelhos.

30 **Métodos:** Foram criados 4 defeitos circulares de 7 mm de diâmetro no
31 osso frontal e parietal de 20 coelhos albinos (*New Zealand*). Os defeitos foram
32 aleatoriamente preenchidos com um dos seguintes materiais: L-PRF, L-PRF +

1 Bio-Oss, Bio-Oss e um dos defeitos serviu como controle. Os animais foram
2 mortos 60 dias após os procedimentos cirúrgicos e os defeitos avaliados através
3 de análises histomorfométricas.

4 **Resultados:** A maior porcentagem de formação óssea foi encontrada no
5 grupo L-PRF, o qual não diferiu estatisticamente dos grupos L-PRF + Bio-Oss e
6 controle. O grupo Bio-Oss apresentou a menor porcentagem de formação óssea
7 aos 60 dias. Com relação ao preenchimento ósseo, o grupo Bio-Oss apresentou
8 a maior média de preenchimento, sem diferença estatisticamente significativa em
9 relação ao grupo L-PRF + Bio-Oss.

10 **Conclusão:** O L-PRF aumenta a formação óssea e sua associação com o
11 Bio-Oss mostrou-se favorável, permitindo um maior ganho de volume de tecido
12 formado.

13

14 *Palavras-chave:* regeneração óssea, fibrina rica em plaquetas, osso bovino anorgânico

15

16 **Introdução**

17 Com a crescente demanda por procedimentos relacionados à
18 Implantodontia nas últimas décadas, a reabilitação bucal total ou parcial do
19 paciente edêntulo com o uso de implantes dentários tornou-se mais frequente.
20 Em certos casos, existe indicação precisa e direta para a instalação de implantes
21 dentários, quando a quantidade óssea é suficiente, condição indispensável para a
22 execução destes procedimentos. No entanto, certas condições da crista óssea
23 alveolar devem ser corrigidas previamente à instalação dos mesmos. Essas
24 condições dizem respeito, na sua maioria, a atrofia óssea decorrente da causa
25 que levou ao edentulismo, como por exemplo a doença periodontal ou
26 traumatismos. A reabsorção óssea alveolar após a extração dentária é uma
27 condição inerente ao processo de cicatrização; a remodelação do processo
28 alveolar é gradual e pode resultar na redução da altura e volume ósseos, criando
29 uma condição inadequada para a instalação de implantes dentários
30 osseointegráveis¹. O conceito de que os procedimentos de preservação do
31 rebordo alveolar pós exodontia resultam em maiores dimensões do osso alveolar
32 quando comparados a casos onde esta preservação não é realizada, suporta a
33 ideia de que a regeneração óssea em altura e espessura desses sítios é

1 imprescindível, uma vez que, quando colocados em alvéolos frescos, os
2 biomateriais tendem a compensar os processos catabólicos nas regiões
3 desdentadas^{2,3}, especialmente quando se trata da porção anterior da maxila,
4 onde o volume ósseo é importante por razões estéticas e funcionais⁴.

5 A regeneração óssea continua sendo um grande desafio na Odontologia.
6 Diversos métodos tem sido descritos na literatura para regeneração do osso
7 alveolar perdido⁵. Vários biomateriais têm se mostrado eficazes com esse intuito,
8 associados às diversas técnicas preconizadas para ganho de tecido ósseo. Os
9 substitutos ósseos podem ser classificados em autógenos, alógenos, xenógenos
10 ou sintéticos, os quais podem atuar por meio de propriedades osteogênicas,
11 osteoindutoras ou osteocondutoras. O padrão ouro em regeneração óssea
12 continua sendo o osso autógeno⁶. Com propriedades osteogênicas,
13 osteoindutoras e osteocondutoras, este possui todas as condições para levar a
14 uma regeneração óssea adequada devido à presença de células secretoras
15 (osteócitos viáveis), presença de fatores de crescimento (como as proteínas
16 ósseas morfogenéticas) e por servirem de arcabouço para a angiogênese e a
17 deposição de matriz óssea. Entretanto, a escolha pelo osso autógeno reflete-se
18 na necessidade de uma área doadora e, portanto, num segundo sítio cirúrgico,
19 aumentando a morbidade cirúrgica e também a possibilidade de provocar maior
20 edema, dor e complicações pós-operatórias. Além disso, a área doadora é de
21 disponibilidade limitada, principalmente tratando-se de um ambiente intra-bucal⁷.

22 Os substitutos ósseos mais largamente comercializados possuem, na sua
23 maioria, propriedades osteocondutoras, atuando como um arcabouço para a
24 neoformação óssea. Entre os biomateriais com maior número de trabalhos
25 publicados na literatura destaca-se o Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen,
26 Suíça), um osso de origem bovina, anorgânico (desproteinado), com uma
27 porosidade de 75% a 80% e com um tamanho de partícula de aproximadamente
28 10nm⁸. É produzido a partir da extração química de todo material orgânico do
29 osso bovino cortical ou medular. É muito similar à porção mineral do tecido ósseo
30 humano, no que diz respeito à área de superfície interna, porosidade, tamanho
31 das partículas e proporção Cálcio/Fosfato⁹. Este substituto ósseo demonstrou
32 possuir propriedades osteocondutoras e tem se mostrado altamente
33 biocompatível com os tecidos duros bucais de animais e humanos, não
34 provocando respostas adversas antigênicas ou inflamatórias quando utilizado¹⁰.

1 O sistema de poros interconectados do Bio-Oss parece ter o tamanho e a
2 estrutura necessária para conduzir a uma nova vascularização¹¹. Há relatos de
3 que durante a cicatrização, as partículas de Bio-Oss são envoltas por osso
4 lamelar neoformado, demonstrando um processo lento de reabsorção e
5 substituição¹². O Bio-Oss pode contribuir para a regeneração óssea, conforme
6 sugerido em estudos *in vitro*¹³ e histológicos¹⁴, os quais demonstraram uma
7 íntima relação entre as partículas de Bio-Oss e o osso neoformado. Clinicamente,
8 este material tem sido utilizado nas mais diversas técnicas de regeneração
9 óssea, como a regeneração óssea guiada (ROG)¹⁵, em defeitos ósseos
10 periodontais¹⁶, em alvéolos pós-extração para prevenção do colapso alveolar¹⁷,
11 associado a implantes imediatos¹⁸ e em cirurgias de levantamento de seio
12 maxilar^{8,19}, com resultados bastante favoráveis.

13 Um outro material autógeno descrito na literatura recente, é a fibrina rica
14 em plaquetas e leucócitos (L-PRF) preconizada por Choukroun *et al.*²⁰ (2001). O
15 L-PRF pertence a uma nova geração de concentrados de plaquetas com
16 processamento simplificado, sem manipulação bioquímica do sangue. A técnica
17 de preparação do L-PRF, a partir do sangue do próprio paciente, não requer a
18 utilização de anticoagulante ou trombina bovina, ou qualquer outro agente de
19 geleificação, diferentemente da geração anterior de concentrados de plaquetas
20 como o plasma rico em plaquetas (PRP). Após a coleta da amostra de sangue,
21 esta é imediatamente centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. A ausência de
22 anticoagulantes implica na ativação imediata da maioria das plaquetas em
23 contato com as paredes do tubo (*vacuntainer*) onde o sangue é coletado, e inicia
24 a cascata de coagulação. Portanto, o tempo entre a coleta do sangue e o início
25 da centrifugação é essencial. A rápida manipulação é a única maneira de se
26 conseguir o coágulo de L-PRF adequado²¹. Com o processo de centrifugação,
27 três camadas são formadas no interior do tubo: uma camada rica em células
28 vermelhas do sangue (eritrócitos) no fundo, uma camada de plasma acelular
29 (plasma pobre em plaquetas) como um sobrenadante e uma camada
30 intermediária que corresponde ao coágulo de L-PRF. Este coágulo combina
31 inúmeros agentes promotores de cicatrização e imunológicos, fatores de
32 crescimento e citocinas, podendo ser usado diretamente como coágulo ou, após
33 compressão, como uma membrana²².

1 O L-PRF consiste de uma íntima coleção de citocinas, cadeias glicanas e
2 glicoproteínas estruturais impregnadas dentro de uma rede de fibrina lentamente
3 polimerizada. Estes componentes bioquímicos possuem efeitos sinérgicos nos
4 processos de cicatrização²³.

5 Como um coágulo sanguíneo otimizado, o L-PRF é um material complexo,
6 com uma biologia específica. É organizado como uma matriz densa de fibrina
7 com um grande número de leucócitos concentrados em uma parte do coágulo
8 (*buffy coat*)²⁴. Seu uso promove uma liberação lenta de fatores de crescimento
9 como fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), fator de crescimento
10 derivado de plaquetas-AB (PDGF- $\alpha\beta$), fator de crescimento do endotélio vascular
11 (VEGF) e glicoproteínas (como a trombospondina-1) durante pelo menos 7 dias,
12 podendo chegar até a 14 dias^{25,26}. Apesar das plaquetas serem responsáveis
13 pela imensa maioria dos fatores de crescimento, tem-se considerado como
14 fundamental o papel dos leucócitos, não somente para regulação imune e ação
15 anti-infecciosa, mas também para a liberação de fatores de crescimento, em
16 especial o TGF e o VEGF²⁷. Além disso, a matriz de fibrina certamente constitui o
17 elemento determinante responsável pelo real potencial terapêutico do L-PRF, que
18 pode ser considerado um biomaterial com propriedades biomecânicas. O coágulo
19 de fibrina com alta densidade pode servir como uma matriz de cicatrização
20 biológica que suporta a migração celular e a liberação de citocinas²⁸.

21 Os efeitos benéficos do L-PRF têm sido estudados em vários
22 procedimentos com o intuito de favorecer a cicatrização de tecidos duros e
23 moles, como por exemplo, na preservação de rebordo em alvéolos frescos²⁹,
24 enxerto ósseo em seio maxilar como material de preenchimento único³⁰, em
25 procedimentos de recobrimento radicular³¹, na correção de defeitos ósseos
26 periodontais³² e em defeitos de furca³³.

27 O presente estudo teve como objetivo avaliar histomorfometricamente, o
28 processo de reparo ósseo e o potencial indutivo da fibrina rica em plaquetas e
29 leucócitos (L-PRF) e do osso bovino anorgânico (Bio-Oss), associados ou não,
30 em defeitos cirurgicamente criados na calvária de coelhos.

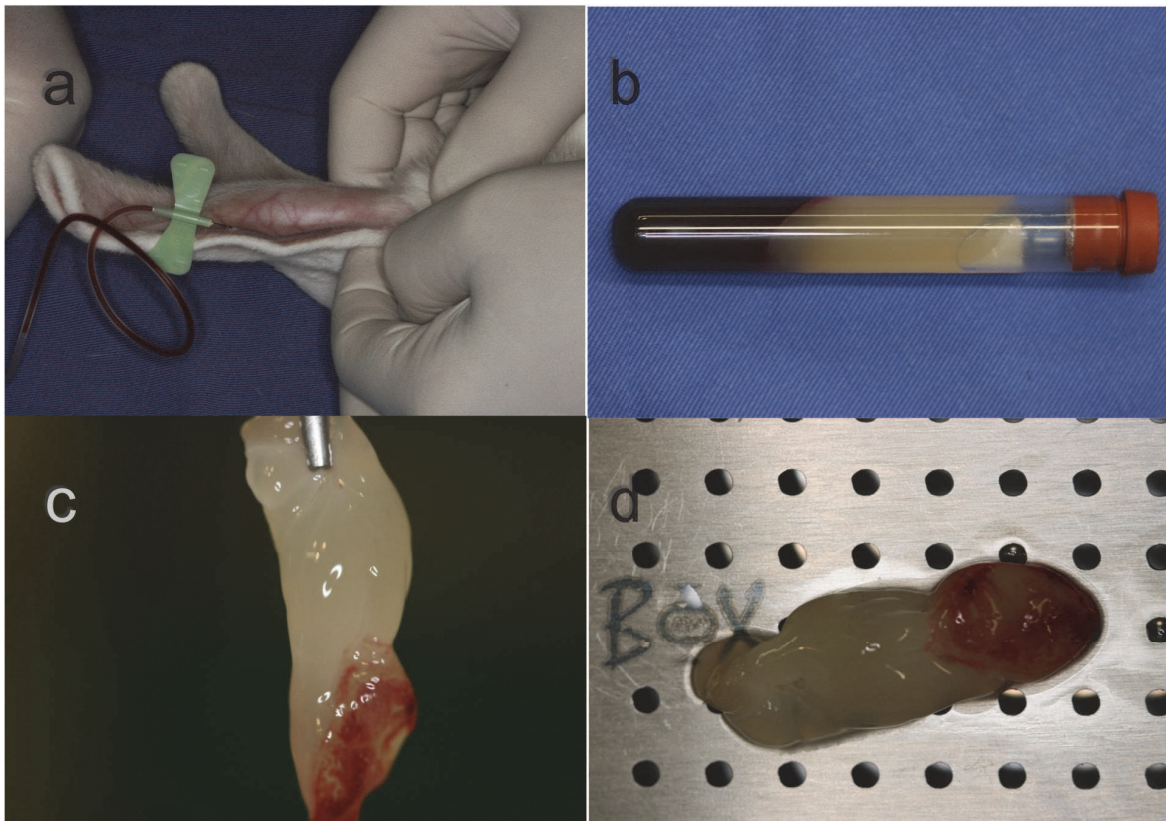
31 **Materiais e Método**

32 **Materiais**

1 Os materiais utilizados no presente estudo foram o Bio-Oss (Geistlich
2 Pharma, Suíça), um osso de origem bovina, anorgânico (desproteinado) e a
3 fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), ambos utilizados de forma isolada
4 ou em uma mistura dos dois materiais em partes iguais.

5 **Preparação do L-PRF**

6 Neste experimento, 5 ml de sangue foram coletados da artéria central da
7 orelha dos coelhos com a ajuda de um cateter e depositado em um *vacutainer*
8 seco. A fibrina rica em plaquetas e leucócitos é obtida a partir de uma amostra de
9 sangue imediatamente centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, sem a utilização
10 de nenhum aditivo bioquímico, sem anticoagulantes, trombina bovina ou cloreto
11 de cálcio, conforme preconiza a técnica apresentada por Choukroun *et al.*²⁰
12 (2001). Após a centrifugação, observam-se no *vacutainer* três camadas distintas:
13 na parte inferior, uma camada de células vermelhas (hemácias), na parte
14 superior, como sobrenadante, o plasma pobre em plaquetas (PPP) e uma
15 camada intermediária que corresponde ao coágulo de fibrina rica em plaquetas e
16 leucócitos, o L-PRF. Com este propósito foi utilizada uma centrífuga de mesa,
17 Centribio 80-2B. Após o término da centrifugação, o coágulo de L-PRF foi
18 removido diretamente do *vacutainer* com o auxílio de uma pinça dente de rato.
19 Isso é possível devido à consistência do coágulo de fibrina, que permite sua
20 remoção e manipulação sem deteriorar o biomaterial, diferentemente de outros
21 concentrados de plaquetas. Normalmente, a camada de células vermelhas
22 (hemácias), vem aderida ao coágulo de fibrina e deve ser removida através de
23 uma simples raspagem, tomando-se o cuidado de manter a última camada de
24 células vermelhas, também conhecida como *buffy coat*²⁴, que apresenta uma
25 grande concentração de plaquetas e leucócitos. Em seguida, o coágulo de L-
26 PRF foi acondicionado em uma caixa especialmente desenvolvida para este fim e
27 também para a confecção das membranas ou *plugs* de L-PRF. Nesta caixa, o L-
28 PRF fica armazenado até o momento da sua utilização (figura 1).



1

Figura 1: Coleta de sangue da artéria central da orelha do coelho (a). Vacuntainer logo após centrifugação com 3 camadas separadas (b). Coágulo de L-PRF sendo removido com uma pinça (c). Armazenamento do coágulo de L-PRF no PRF box (d)

2

3 **Amostra**

4 Foram incluídos no estudo vinte coelhos adultos albinos machos da raça
5 Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), com peso entre 2,5kg e 3Kg fornecidos
6 por criadores, que foram alocados no biotério da PUCPR e receberam água e
7 ração *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Centro
8 Cirúrgico do Laboratório de Técnicas Operatórias da PUCPR. A pesquisa foi
9 aprovada pelo comitê de Ética em Animais da Pontifícia Universidade Católica do
10 Paraná sob parecer n° 717/2011.

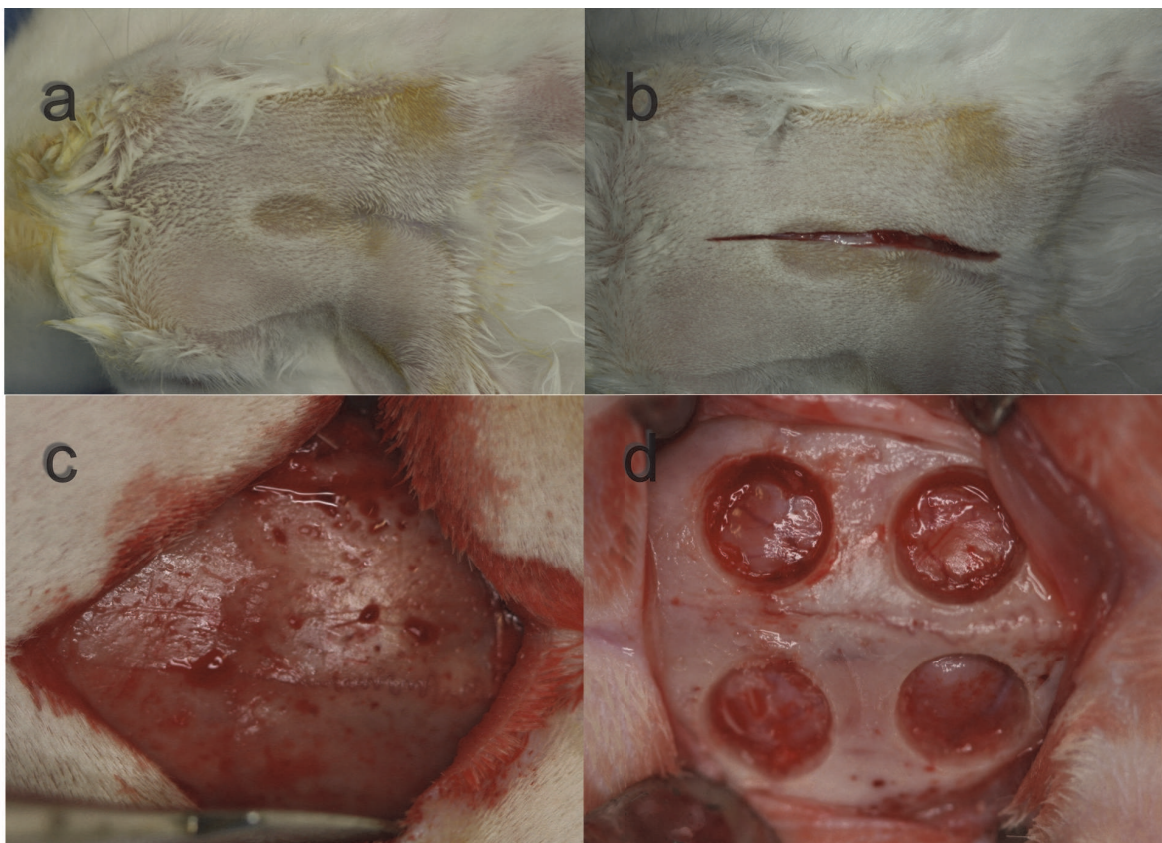
11 **Procedimentos Cirúrgicos**

12 Os coelhos foram anestesiados com Xilazina na dose de 8 mg/Kg
13 associada a Ketamina na dose de 30mg/Kg, por via intramuscular na região da
14 coxa. Em seguida, foi realizada a tricotomia externamente à orelha e assepsia
15 com álcool 70%. Os coelhos foram anestesiados com Propofol na dose de 10

1 mg/kg por via endovenosa, sob um cateter nº 24 G pela veia marginal da orelha.
2 A manutenção anestésica foi realizada com vaporizador (Oxigel) utilizado na
3 dosagem de 3% de Isoflurano.

4 Após um período de 5 minutos, foi realizada a tricotomia na região superior
5 da cabeça, parte do crânio e antissepsia local com PVPI degermante
6 (polivinilpirrolidona-iodo). Após a colocação de campo fenestrado estéril, foi
7 administrada 5 mg/kg de Morfina por via IM, para obtenção de analgesia no
8 decorrer do procedimento.

9 Foi realizada infiltração anestésica com 1,8 ml de Lidocaína a 2% com
10 Epinefrina (1:100.000) para complementação anestésica e controle de
11 sangramento no local da incisão. Uma incisão sagital estendendo-se do osso
12 nasal até o occipital foi feita com o uso de lâmina de bisturi nº 15 C, (Swann
13 Morton, Sheffield, Inglaterra). Um retalho de espessura total foi deslocado para
14 exposição óssea da área onde os defeitos foram criados. Confeccionou-se 4
15 defeitos circulares de 7 mm de diâmetro na calvária de cada coelho, com broca
16 Trefina de 6 mm de diâmetro interno (Neodent, Curitiba, Brasil), acoplada a um
17 contra-ângulo 20:1 Kavo (Kavo Kerr Group, Alemanha), sob vigorosa irrigação
18 (figura 2).



19

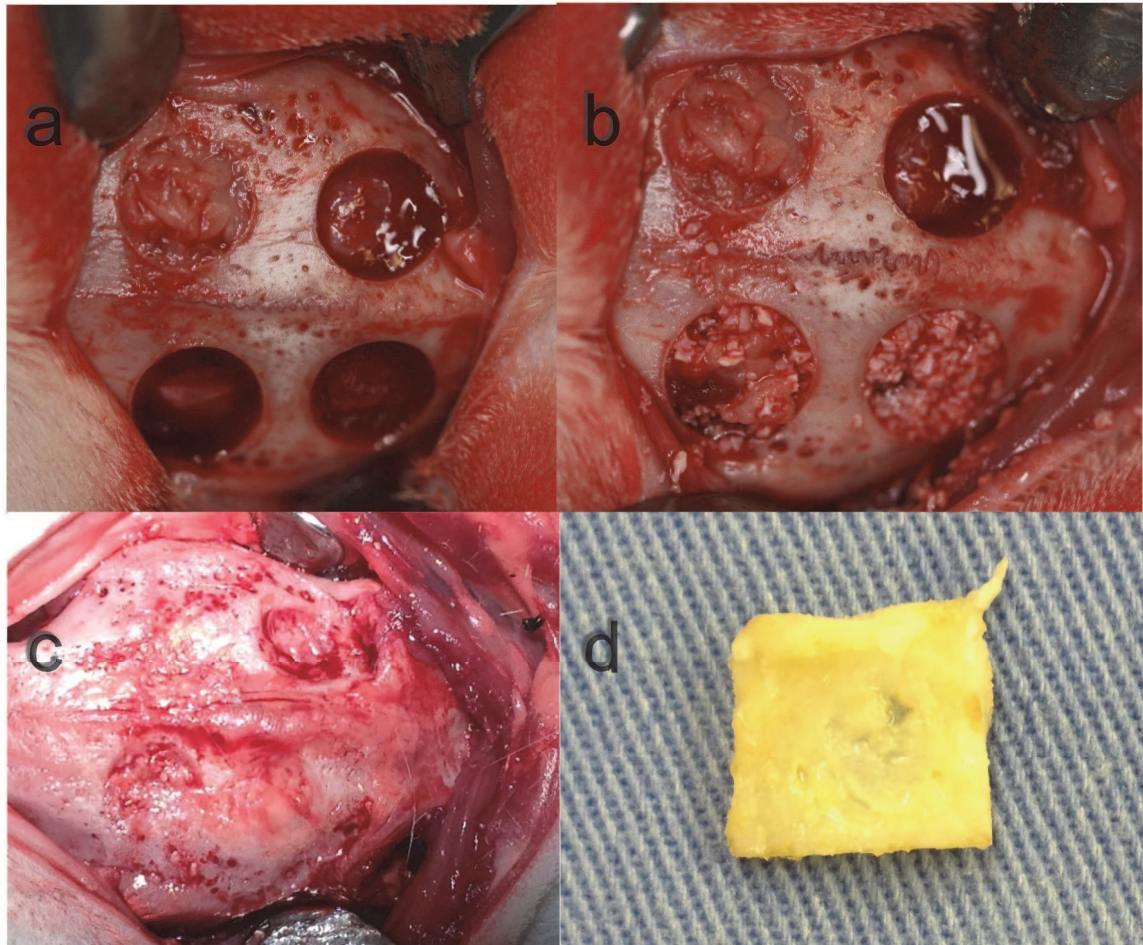
Figura 2: Tricotomia da região da calvária (a). Incisão sagital (b).
Deslocamento de retalho de espessura total (c). Confeccção dos 4 defeitos
circulares de 7 mm de diâmetro (d)

1 Cada defeito foi preenchido aleatoriamente da seguinte forma:

- 2 • L-PRF;
- 3 • L-PRF + Bio-Oss;
- 4 • Bio-Oss;
- 5 • Coágulo sanguíneo (controle).

6 Na maioria dos casos a osteotomia foi completada com cinzéis micro
7 Ochsenbein. Após remoção do fragmento ósseo e exposição da Dura Mater, foi
8 verificada a integridade da mesma para prosseguir com a colocação do material
9 sorteado para preencher os defeitos, em cada coelho. O Bio-Oss foi levado
10 diretamente aos defeitos cirurgicamente criados com o uso de uma cureta de
11 Molt (Hu-Friedy, Chicago, USA). Quanto ao L-PRF, a fim de padronizar sua
12 utilização, este foi fragmentado em pequenos pedaços previamente à sua
13 colocação nos defeitos e misturado ao Bio-Oss na proporção de 1:1. Para todos
14 os defeitos, adotou-se o critério de se condensar o material até a obtenção de um
15 preenchimento completo, em altura e extensão. Após o preenchimento de todos
16 os defeitos, o tecido mole foi reposicionado e suturado em dois planos (Vycril 5.0
17 e MonoNylon 4.0, Ethicon® Johnson e Johnson, EUA) (figura 16). Os animais
18 receberam o analgésico Ketoprofen® à 5 mg/kg, e Enrofloxacino® à 5mg/kg
19 como antibiótico, ambos por 3 dias no pós operatório. Após 10 dias, as suturas
20 foram removidas.

21 Os animais foram mortos após 60 dias dos procedimentos cirúrgicos, com
22 Tiopental sódico na dose de 180mg/kg por via IV, até a parada
23 cardiorrespiratória. Após a eutanásia, todo o osso da calvária foi removido, as
24 amostras de cada defeito ósseo foram separadas e acondicionadas em formol a
25 10% (formalina) para adequada fixação (figura 3).

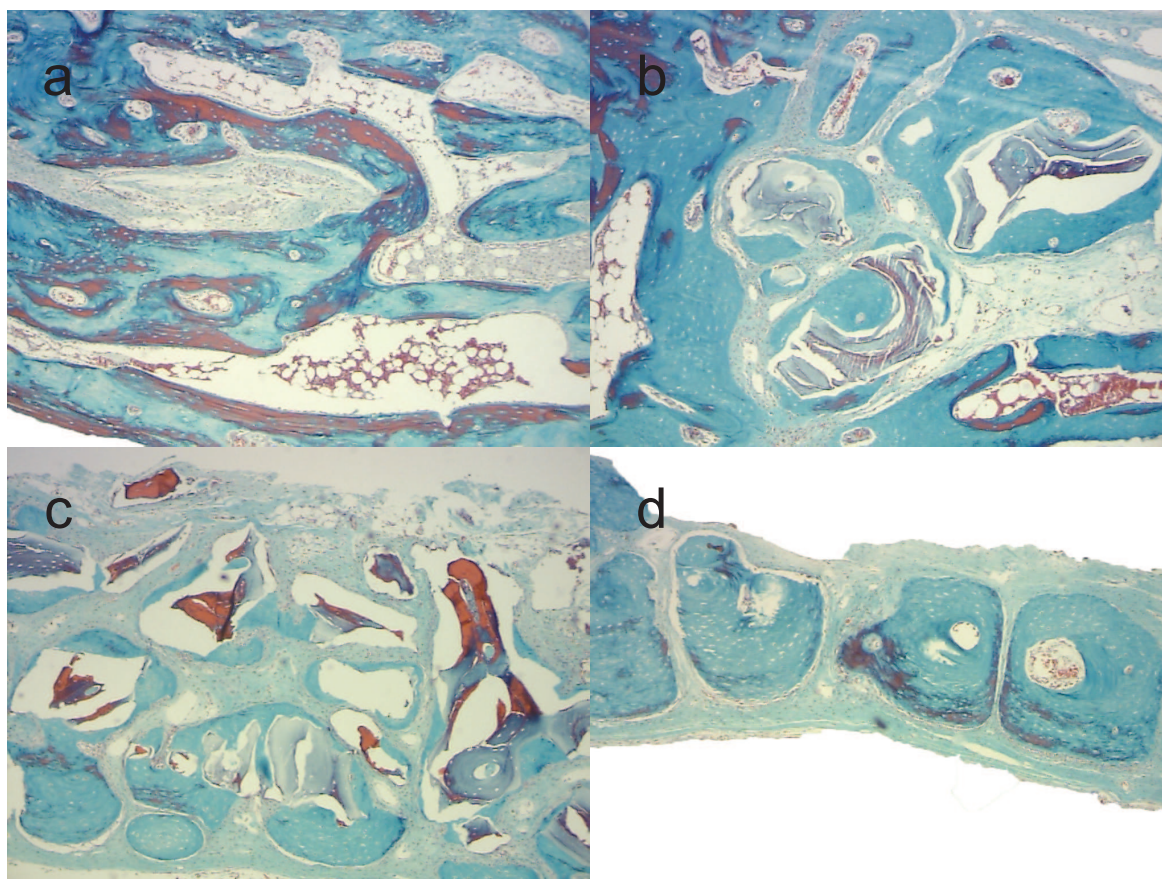


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Figura 3: Preenchimento do defeito circular com o L-PRF (a). Os defeitos preenchidos com L-PRF, L-PRF + Bio-Oss, Bio-Oss e com o coágulo (b). Defeitos cicatrizados após 60 dias (c). Espécime decalcificada em EDTA (d).

Análise Histológica e Histomorfométrica

O processamento das peças seguiu a técnica de rotina preconizada para espécimes mineralizadas. Inicialmente, as peças foram desmineralizadas com ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA a 5%), clivadas em sua região central, dobradas, lavadas, desidratadas em uma série gradual de álcool e imersas em parafina. Foram preparados cortes histológicos com 5µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Gomori (figura 4), para a avaliação histológica e histomorfométrica. A análise histomorfométrica foi realizada utilizando-se o software ImagePro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, USA).



1

Figura 4: Amostras coradas com tricômico de Gomori dos grupos: L-PRF (a); L-PRF + Bio-Oss (b); Bio-Oss (c); controle (d).

2

3 Os parâmetros avaliados foram:

- 4 1. Porcentagem de formação óssea: refere-se à área de tecido ósseo formado
5 em relação à área total do defeito preenchido. Inicialmente, por meio do software
6 Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe, USA), as áreas externas ao defeito foram
7 removidas. Em seguida a área correspondente ao tecido mole, como tecido
8 conjuntivo, vasos sanguíneos, além do espaço medular foram removidos,
9 mantendo apenas as porções correspondentes ao tecido ósseo para serem
10 mensuradas. Através do software ImagePro Plus 4.5, foi medida a área total do
11 defeito preenchido e, assim, obtida a porcentagem de tecido ósseo neoformado.
12 As imagens abaixo demonstram como foram feitas as medições (Figura 5).

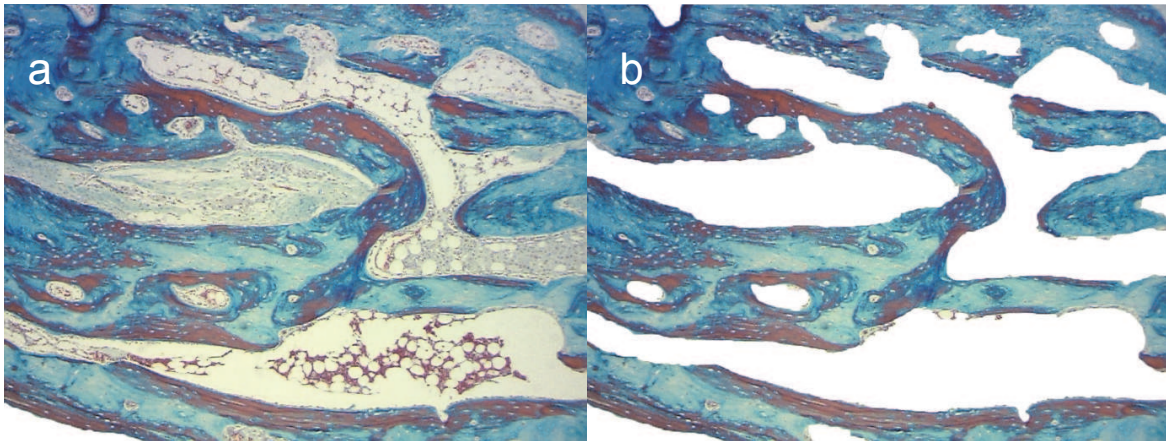


Figura 5: Amostra de defeito preenchido, com remoção das áreas externas as bordas (a). Amostra com remoção de todo tecido mole do defeito, mantendo-se apenas o tecido ósseo

2. Altura do preenchimento do defeito: é a medida linear (em μm) entre a borda superior e a borda inferior do defeito. Foram realizadas dez medições lineares entre os bordos superior e inferior da ferida reparada e utilizada a média destes valores como medida final representativa deste parâmetro (figura 6).

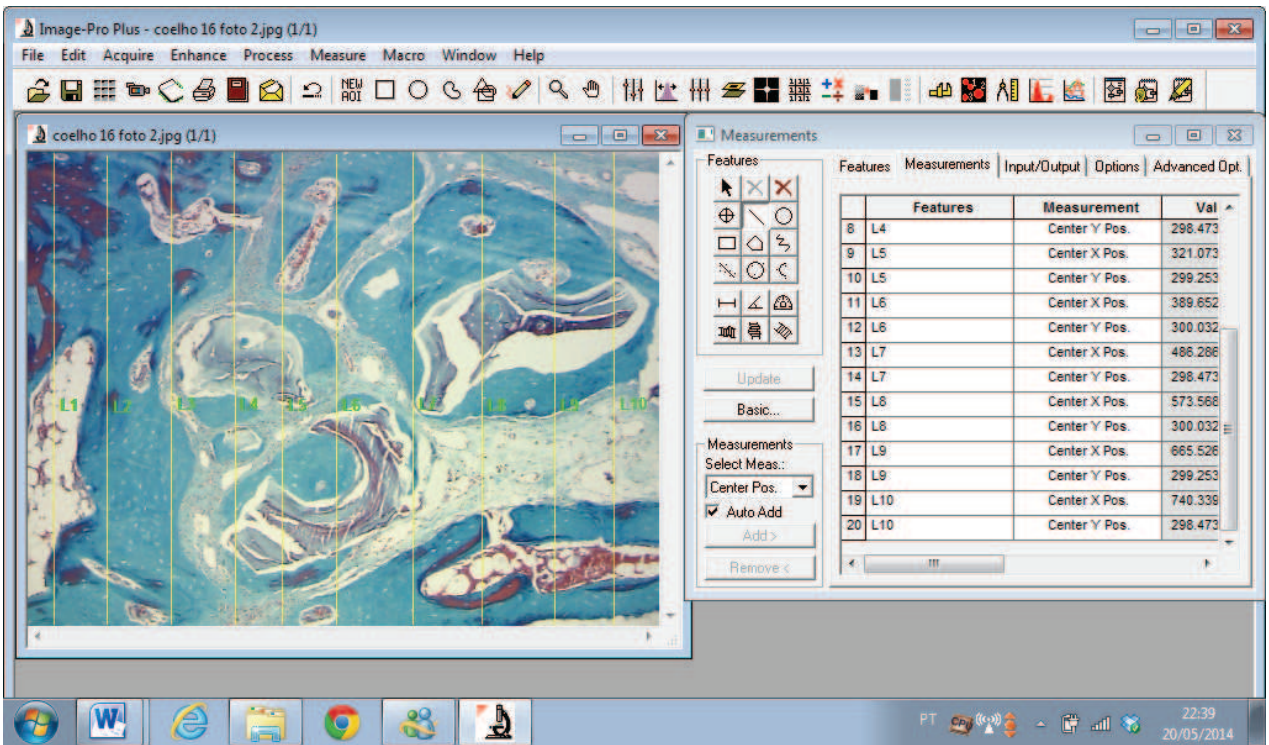


Figura 6: Medidas verticais sendo realizadas no software ImagePro Plus

1 **Análise Estatística**

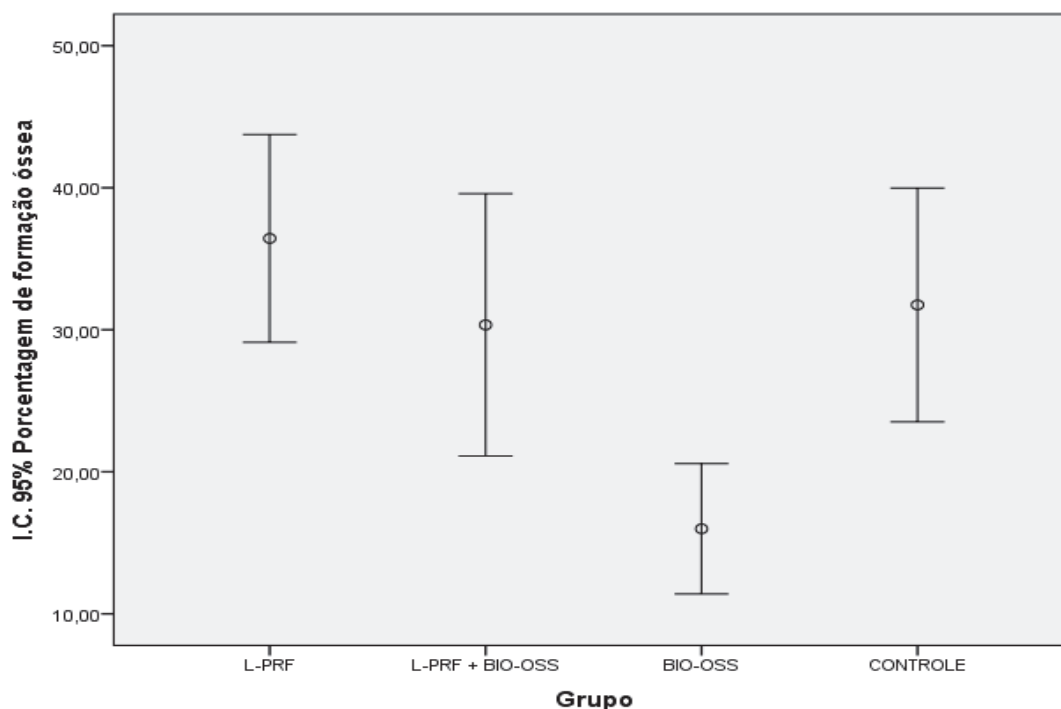
2 Visando comparar se existia diferença nos valores médios da porcentagem
3 de formação óssea e altura do preenchimento do defeito, segundo os quatro
4 grupos, foram aplicados os testes estatísticos. Devido ao tamanho da amostra
5 (n=20), inicialmente foi testada a normalidade através do teste Shapiro-Wilk, o
6 qual acusou distribuição normal para as duas variáveis e os quatro grupos ($p >$
7 $0,05$). Uma vez constatada a normalidade dos dados, foi aplicado teste Anova
8 para verificar diferenças estatísticas entre os grupos nas duas variáveis
9 submetidas, o que se mostrou verdadeiro para ambos os parâmetros. Em
10 seguida, os dados foram ainda submetidos ao teste de homogeneidade de
11 variância de Levene. No caso de haver homogeneidade de variâncias, que foi o
12 caso da variável altura do preenchimento do defeito, a comparação entre os
13 grupos foi feita utilizando teste de Tukey HSD para variâncias homogêneas. Caso
14 os dados não apresentassem variâncias homogêneas entre os grupos, que foi o
15 caso da porcentagem de formação óssea, foi utilizado o teste de comparações
16 múltiplas paramétricas de Games-Howell para variâncias heterogêneas.

17 **Resultados**

18 Todos os animais recuperaram-se de forma satisfatória frente aos
19 procedimentos cirúrgicos, sem quaisquer intercorrências, não havendo perda ou
20 descarte de animais.

21 1. Porcentagem de formação óssea

22 A maior média foi alcançada pelo grupo L-PRF ($36,43\% \pm 15,62$) que,
23 juntamente com os grupos L-PRF + Bio-Oss ($30,43\% \pm 19,73$) e controle ($31,75\%$
24 $\pm 17,59$) foram estatisticamente superiores ao grupo Bio-Oss ($15,99\% \pm 9,80$). Os
25 valores referentes à porcentagem de formação óssea podem ser vistos no gráfico
26 1 e na tabela 1.



1
2
3

Gráfico 1- Porcentagem de formação óssea

(I) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Valor p	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
L-PRF	L-PRF + BIO-OSS	6,0885	5,62772	0,7026	-9,0662	21,2432
	BIO-OSS	20,4443	4,12355	0,0001	9,2711	31,6175
	CONTROLE	4,6830	5,26065	0,8099	-9,4585	18,8245
L-PRF + BIO-OSS	L-PRF	-6,0885	5,62772	0,7026	-21,2432	9,0662
	BIO-OSS	14,3558	4,92651	0,0332	,8999	27,8117
	CONTROLE	-1,4055	5,91111	0,9952	-17,2949	14,4839
BIO-OSS	L-PRF	-20,4443	4,12355	0,0001	-31,6175	-9,2711
	L-PRF + BIO-OSS	-14,3558	4,92651	0,0332	-27,8117	-,8999
	CONTROLE	-15,7613	4,50263	0,0077	-28,0102	-3,5124
CONTROLE	L-PRF	-4,6830	5,26065	0,8099	-18,8245	9,4585
	L-PRF + BIO-OSS	1,4055	5,91111	0,9952	-14,4839	17,2949
	BIO-OSS	15,7613	4,50263	0,0077	3,5124	28,0102

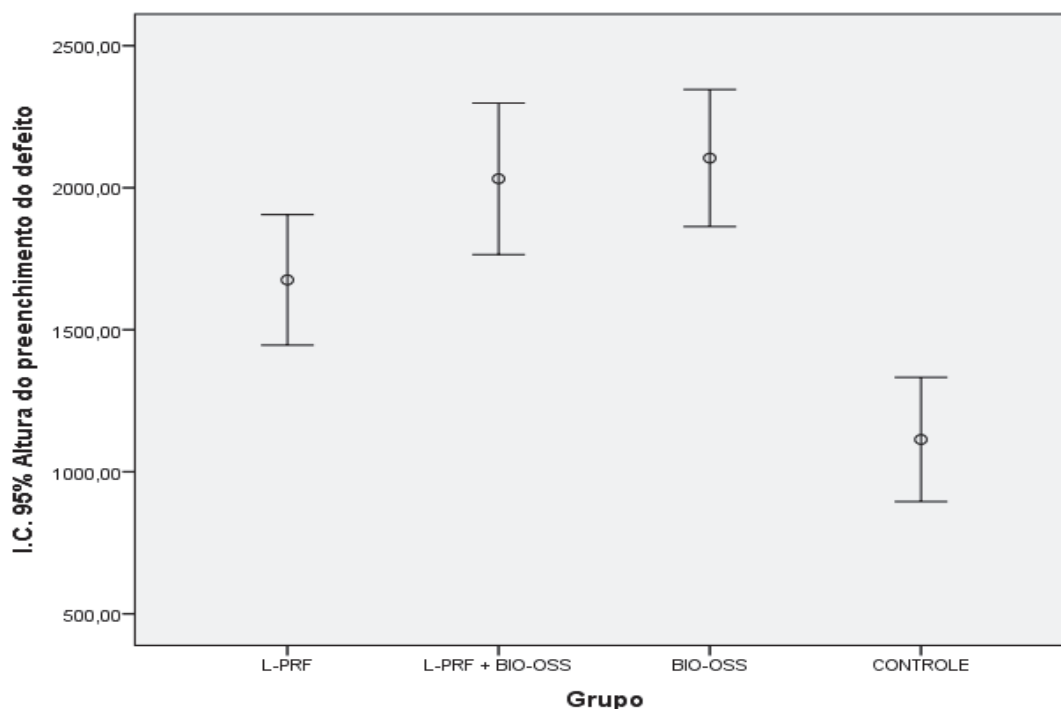
4
5
6

Tabela 1 - Porcentagem de formação óssea

2. Altura do preenchimento do defeito

8 O grupo Bio-Oss ($2.104,25 \mu\text{m} \pm 515,23$) foi o que atingiu a maior média
 9 de preenchimento, sendo estatisticamente superior aos grupos L-PRF ($1.675,48$
 10 $\mu\text{m} \pm 490,82$) e controle ($1.113,79 \mu\text{m} \pm 467,63$), não diferindo do grupo L-PRF +
 11 Bio-Oss ($2.031,44 \mu\text{m} \pm 569,99$). Nos três grupos onde foi usado algum tipo de
 12 biomaterial (Bio-Oss, L-PRF e L- PRF + Bio-Oss), a média de altura do
 13 preenchimento do defeito foi estatisticamente superior ao grupo controle. O
 14 gráfico 2 e a tabela 2 mostram os resultados obtidos.

15



1

2

Gráfico 2 – Altura do preenchimento ósseo

3

4

(I) Grupo		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Valor p	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
L-PRF	L-PRF + BIO-OSS	-355,9517	162,01385	0,1333	-781,5292	69,6257
	BIO-OSS	-428,7691	162,01385	0,0476	-854,3465	-3,1916
	CONTROLE	561,6980	162,01385	0,0047	136,1206	987,2755
L-PRF + BIO-OSS	L-PRF	355,9517	162,01385	0,1333	-69,6257	781,5292
	BIO-OSS	-72,8173	162,01385	0,9695	-498,3948	352,7601
	CONTROLE	917,6498	162,01385	0,0000	492,0723	1343,2272
BIO-OSS	L-PRF	428,7691	162,01385	0,0476	3,1916	854,3465
	L-PRF + BIO-OSS	72,8173	162,01385	0,9695	-352,7601	498,3948
	CONTROLE	990,4671	162,01385	0,0000	564,8897	1416,0446
CONTROLE	L-PRF	-561,6980	162,01385	0,0047	-987,2755	-136,1206
	L-PRF + BIO-OSS	-917,6498	162,01385	0,0000	-1343,2272	-492,0723
	BIO-OSS	-990,4671	162,01385	0,0000	-1416,0446	-564,8897

5

Tabela 2 – Altura do preenchimento ósseo

6

7

8 Discussão

9 A busca por biomateriais com propriedades osteoindutoras e osteogênicas
 10 como alternativa ao osso autógeno vem norteando as novas linhas de pesquisas.
 11 É neste contexto que enquadra-se o L-PRF, com a presença de inúmeros fatores
 12 de crescimento que induzem a formação de vasos sanguíneos, a quimiotaxia e
 13 mitose celular, a proliferação e a diferenciação celular. Os fatores de crescimento

1 liberados pelas plaquetas incluem 3 isômeros do fator de crescimento derivado
2 de plaquetas (PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$, PDGF $\alpha\beta$), 2 isômeros do fator de crescimento
3 transformador (TGF β 1, TGF β 2), fator de crescimento do endotélio vascular
4 (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF)²³.

5 Os efeitos do L-PRF na regeneração óssea já foram largamente estudados
6 *in vitro*, com resultados promissores. Foi demonstrado que a proliferação de
7 osteoblastos cultivados no L-PRF foi significativamente maior do que as
8 cultivadas em membranas de colágeno (Bio-Guide)³⁴. Outros autores sugeriram
9 que o L-PRF é capaz de aumentar a adesão e a proliferação de osteoblastos,
10 além de regular positivamente as proteínas relacionadas ao colágeno, o que
11 conjuntamente poderia promover a regeneração óssea³⁵. Ainda, segundo Dohan
12 *et al.*²⁴, foi demonstrado que o L-PRF aumentou significativamente a proliferação
13 de osteoblastos humanos de uma maneira dose-dependente, estimulando a
14 proliferação de fibroblastos, pré-queratinócitos e pré-adipócitos. Com isso, foi
15 sugerido que os fatores de crescimento e a matriz de fibrina foram responsáveis
16 por este efeito. O L-PRF pode servir de arcabouço para a migração de
17 fibroblastos e para a angiogênese e tem se mostrado propício para ser utilizado
18 como matriz para reprodução de células periostais humanas *in vitro*, as quais
19 podem ter aplicabilidade na bioengenharia de tecido ósseo³⁶.

20 Na literatura há alguns relatos de casos com a utilização de L-PRF em
21 cirurgias de levantamento de seio maxilar concomitante à instalação de
22 implantes^{32,33}, em cirurgias de preservação de rebordo alveolar^{30,31}, regeneração
23 tecidual/óssea guiada^{36,37}, recobrimento radicular^{34,35} entre outros, demonstrando
24 resultados favoráveis. Poucos ensaios clínicos controlados foram realizados até
25 então, na sua maioria utilizando o L-PRF associado a biomateriais alógenos ou
26 xenógenos, em cirurgias de levantamento de seio maxilar, mostrando resultados
27 controversos. Enquanto alguns estudos apontam uma diminuição no período de
28 cicatrização e aumento na quantidade de osso formado^{37,38}, outros não
29 demonstraram diferenças entre grupos com ou sem L-PRF³⁹. Recentemente,
30 pesquisas em animais, mais especificamente em coelhos, também mostraram
31 resultados antagônicos, com o L-PRF melhorando a formação óssea⁴⁰ ou
32 comportando-se de forma indiferente⁴¹, quando testado isoladamente e em
33 combinação com vários biomateriais. Ainda utilizando coelhos como modelo

1 animal, Yoon *et al.*,⁴² avaliando a influência do L-PRF na angiogênese e
2 osteogênese em regeneração óssea guiada, não encontraram efeitos
3 significativos na adição do L-PRF à substitutos ósseos xenógenos. Porém,
4 sugeriram que o L-PRF pode aumentar o número de células da medula óssea. O
5 uso do L-PRF em regeneração óssea guiada (ROG) foi também pesquisado.
6 Utilizado em conjunto com tampas de titânio, como barreira e mantenedor de
7 espaço, o LPRF utilizado isoladamente, levou a uma formação óssea
8 estatisticamente superior ao controle (coágulo). O resultado foi semelhante ao
9 alcançado pelo osso bovino inorgânico e superior ao obtido pelo fosfato de cálcio
10 bifásico⁴³

11 O uso do coelho como modelo animal foi questionado por Dohan *et al.*⁴⁴
12 (2010), os quais ressaltavam a dificuldade de se coletar sangue em velocidade e
13 quantidade suficiente para permitir a obtenção de um L-PRF de qualidade.
14 Defendiam que a única forma efetiva de se fazer uma boa coleta era por via intra-
15 cardíaca, o que levava a um alto índice de mortalidade dos animais. Outros
16 pesquisadores acabaram demonstrando segurança e previsibilidade na punção
17 da artéria central da orelha dos coelhos⁴⁵, metodologia que foi adotada neste
18 experimento. Neste trabalho, a técnica foi perfeitamente executada, conseguindo-
19 se um L-PRF bastante consistente, de forma rápida e segura.

20 A utilização do osso da calvária para avaliação da regeneração óssea dos
21 biomateriais utilizados deveu-se à similaridade embriológica, morfológica e
22 fisiológica com o osso da região maxilo-facial⁴⁷.

23 O período de 8 semanas de avaliação foi escolhido com base em
24 pesquisas anteriores com o mesmo modelo animal, com o intuito de se dar o
25 tempo adequado para a remodelação óssea, reabsorção e incorporação dos
26 biomateriais, possibilitando as devidas comparações⁴⁶. O tamanho e a
27 quantidade de defeitos criados foram definidos pela possibilidade de se testar,
28 em um mesmo animal, as quatro modalidades de tratamento. Além disso, o
29 espaço entre os defeitos deveria permitir uma margem segura de tecido ósseo
30 original e intacto.

1 Os resultados obtidos demonstraram diferença estatística entre os grupos
2 testados no que se refere à porcentagem de formação óssea. Estatisticamente,
3 os grupos L-PRF, L-PRF + Bio-Oss e controle não apresentaram diferenças entre
4 si, porém obtiveram uma porcentagem de formação óssea maior do que o grupo
5 Bio-Oss. A menor porcentagem de formação óssea do grupo Bio-Oss era
6 esperada, uma vez que a área correspondente às partículas de Bio-Oss, ainda
7 presentes após 60 dias, não foram contabilizadas como novo tecido ósseo, e
8 corrobora outros estudos envolvendo este tipo de biomaterial^{8,47}. O Bio-Oss leva
9 a um atraso no processo de cicatrização óssea, seus grânulos são lentamente
10 reabsorvidos, podendo até não ser completamente absorvidos, mesmo a longo
11 prazo⁴⁸. O novo tecido ósseo se forma através dos poros das partículas de Bio-
12 Oss, aprisionando essas partículas, e formando um emaranhado de tecido ósseo
13 neoformado e partículas de Bio-Oss não reabsorvidas, que atuam funcionalmente
14 como tecido ósseo. Os poros interconectantes do material permitem uma
15 completa camuflagem do corpo estranho e possibilitam a formação de camadas
16 de novo tecido ósseo vital no trabeculado não vital do Bio-Oss, possibilitando que
17 esta nova estrutura participe do *turn over* ósseo envolvido no processo de
18 remodelação óssea^{19,49}. No presente estudo, os grânulos de Bio-Oss não foram
19 considerados como tecido ósseo neoformado, o que poderia justificar a menor
20 média de porcentagem de formação óssea do grupo Bio-Oss em relação aos
21 outros grupos. Por outro lado, o grupo L-PRF + Bio-Oss obteve uma média de
22 porcentagem de formação óssea estatisticamente maior que a do Bio-Oss
23 isoladamente, o que nos leva a supor que o L-PRF acelerou o processo de
24 reparo ósseo nestes defeitos, corroborando estudos que atribuem ao uso do L-
25 PRF, uma redução no tempo de cicatrização e aumento da quantidade de osso
26 formado^{36,37}. O resultado do grupo controle foi muito semelhante ao grupo L-PRF
27 + Bio-Oss, porém com uma menor capacidade de manter o volume original do
28 defeito como pode ser visto na outra variável.

29 A outra variável estudada foi a média de altura do preenchimento, que se
30 refere à medida entre a borda superior e a borda inferior do defeito. Reflete a
31 capacidade do biomaterial em manter o volume de tecido formado. Foram
32 realizadas dez medições lineares em cada espécime, sendo a média dessas dez
33 medições, a média final da altura do preenchimento ósseo. O grupo Bio-Oss

1 alcançou a melhor média, a qual foi estatisticamente superior aos grupos controle
2 e L-PRF. O resultado está em concordância com outros autores que
3 demonstraram a capacidade do Bio-Oss em manter volume e conduzir a uma
4 formação óssea adequada, com as partículas de Bio-Oss interconectadas com o
5 novo tecido ósseo^{50,51}. O grupo controle obteve uma média de altura de
6 preenchimento menor que todos os demais grupos, o que já era previsto, uma
7 vez que nesse grupo o defeito não recebeu preenchimento com biomaterial,
8 levando a uma cicatrização a partir do coágulo, que por si só apresenta uma
9 estabilidade menor se comparado com os demais grupos. Os resultados das
10 comparações entre os grupos indicam que a adição do Bio-Oss ao L-PRF
11 favoreceu o volume de tecido formado. Extrapolando para a prática clínica, este
12 pode ser um dado importante, visto que o volume do tecido formado pode
13 interferir diretamente sobre as possibilidades de tratamento para os diversos
14 casos que se apresentam, tanto funcional quanto esteticamente.

15 A associação L-PRF + Bio-Oss obteve uma excelente média de altura do
16 preenchimento, comparáveis à média do Bio-Oss, que foi o grupo com melhor
17 desempenho, e também excelente média de porcentagem de formação óssea,
18 próxima à média do grupo L-PRF, que obteve a melhor média nessa variável,
19 reforçando as vantagens dessa associação. Parece lícito inferir que a adição do
20 L-PRF ao Bio-Oss agregou propriedades osteoindutoras a um material com
21 propriedades osteocondutoras já consagradas. Os resultados obtidos no presente
22 estudo nos permitem afirmar que o L-PRF aumentou a quantidade de tecido
23 ósseo neoformado, sendo que a adição do Bio-Oss ao L-PRF aumentou o
24 volume de tecido formado após 60 dias em comparação à cicatrização do L-PRF
25 isoladamente.

26 **Conclusão**

27 Com base nos resultados deste trabalho pode-se concluir que:

- 28 • O grupo L-PRF obteve a maior porcentagem de formação óssea;
- 29 • A associação L-PRF + Bio-Oss levou a um aumento da porcentagem de
30 formação óssea quando comparada ao uso do Bio-Oss isoladamente;

- 1 • O L-PRF utilizado isoladamente obteve uma porcentagem de formação
- 2 óssea alta, no entanto a altura de preenchimento do defeito foi
- 3 estatisticamente inferior ao obtido pelo Bio-Oss, demonstrando que a
- 4 associação L-PRF + Bio-Oss, além de favorecer o processo de reparo,
- 5 permitiu a manutenção do volume nos mesmos níveis do obtido pelo uso
- 6 do Bio-Oss.

Referências

- ¹ Araujo M, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 2005; 32: 212-218.
- ² Novaes Jr. AB, Papalexiou V, Luczyszyn SM, Muglia VA, Souza SL, Taba Junior M. Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: a case report. *Implant Dent* 2002;11:343-8.
- ³ Borges GJ, Novaes Jr. AB, Grisi MF, Palioto DB, Taba Jr. M, de Souza SL. Acellular dermal matrix as a barrier in guided bone regeneration: a clinical, radiographic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1105-15.
- ⁴ Seibert JS. Treatment of moderate localized alveolar ridge defects. Preventive and reconstructive concepts in therapy. *Dent Clin North Am* 1993;37:265-80.
- ⁵ Sartori, S et al. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation, *Clinical Oral Implants Research* 14, 2003; 14: 369-372 Stefano .
- ⁶ McAllister B, Haghghat K. Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology*, 2007; 78: 377–396.
- ⁷ Waasdorp, J.Reynolds, M. Allogeneic Bone Onlay Grafts for Alveolar Ridge Augmentation: A Systematic Review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2010; 25 (3).
- ⁸ Piattelli M, Favero G, Scarano A, Orsini G, Piattelli A.. Bone Reactions to Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss) Used in Sinus Augmentation Procedures: A Histologic Long-Term Report of 20 Cases in Humans. *Int J Oral Maxillofac*

Implants 1999;14:835–840

⁹ Camelo M, Nevins ML, Lynch SE, Schenk RK, Simion M, Nevins M. Periodontal regeneration with an autogenous bone- Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001; 21:109-119.

¹⁰ Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Shenk R. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-oss) for implant placement: 5 year study on 15 patients. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 2000; 20: 245-242.

¹¹ Storgard-Jensen S, Aaboe M, Pinholt ES, Hjørting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:55–66.

¹² Hans-Dieter J, Birgit W. Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* , 2004; 19(2): 199-207.

¹³ Mladenovic´ Z, Sahlin-Platt A, Andersson B, Johansson A, Bjorn E, Ransjo M. In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. *Clin. Oral Impl. Res.* 2013; 24: 329–335

¹⁴ Galindo-Moreno, P., Moreno-Riestra, I., Avila, G., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., Aguilar, M., Wang, H.L. & O'Valle, F. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. *Clinical Oral Implants Research*, 2010 21: 122–128.

¹⁵ Canullo L, Trisi, P, Trisi M. Vertical Ridge Augmentation Around Implants Using e-PTFE Titanium- Reinforced Membrane and Deproteinized Bovine Bone Mineral (Bio-Oss): A Case Report. (*Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26:355–361.

¹⁶ Paolantonio M, Scarano A, Di Placido G, Tumini V, D'Archivio D, Piattelli, A.

Periodontal Healing in Humans Using Anorganic Bovine Bone and Bovine Peritoneum-Derived Collagen Membrane: A Clinical and Histologic Case Report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001;21:505–515.

¹⁷ Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The Influence of Bio-Oss Collagen on Healing of an Extraction Socket: An Experimental Study in the Dog. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28:123–135.

¹⁸ Araújo M, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss Collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clin. Oral Impl. Res* 2011; 22; 1-8

¹⁹ Schlegel K, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang, J. Histologic Findings in Sinus Augmentation with Autogenous Bone Chips Versus a Bovine Bone Substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants*: 2003;18:53–58

²⁰ Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001; 42: 55-62

²¹ Dohan, D et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelets concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 2006 101(3): e37-e44.

²² Dohan D, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of Periodontology*, 2010; 81: 546-555.

²³ Dohan, D et al. Platelet-rich fibrin (PRF): Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 2006 101(3): e45-e50.

²⁴ Dohan D, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Cherrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelets-rich fibrina) on human gingival fibroblastos, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblastos in primary cultures. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2009; 108: 341-352

²⁵ Dohan D, Peppo G, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and trombospondin-1 in Choukroun's platelets-rich fibrin (PRF): a gold standart to achieve for all surgical platelets concentrates technologies. *Growth Factors*, February 2009; 27(1): 63–69

²⁶ He, L *et al.* A comparative study of platelet-rich fibrina (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 2009; 108: 707-713

²⁷ Dohan D, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelets concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates?. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 2006 101(3): e51-e55

²⁸ Dohan D, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of Periodontology*, 2010; 81: 546-555.

²⁹ Simon B, Gupta P, Tajbakhsh S. Quantitative evaluation of extraction socket healing following the use of autologous platelets-rich fibrin matrix in humans. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 2011; 31: 285–295

-
- ³⁰ Mazor Z, Horowitz A, Del Corso M, Prasad H, Rohrer M, Ehrenfest D. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: A radiologic and histologic study at 6 months. *Journal of Periodontology*, 2009; 80(12): 2056-2064
- ³¹ Jankovic S, Aleksic Z, Klokkevold P, Lekovic V, Dimitrijevic B, Kenney B, Camargo P. Use of platelet-rich fibrina membrane following treatment of gingival recession: A randomized clinical trial. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 2012; 32(2): e41-e50
- ³² Thorat MK, Pradeep AR, Pallavi B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 2011; 38: 925-932
- ³³ Sharma A, Pradeep A. Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized clinical trial. *Journal of Periodontology*, 2011; 82(10): 1396-1403
- ³⁴ Gassling V, Hedderich J, Açil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clinical Oral Implants Research*, 2013; 24: 320-328
- ³⁵ Wu C-L, Lee S-S, Tsai C-H, Lu K-H, Zhao J-H, Chang Y-C. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal* 2012; 57: 207-212
- ³⁶ Gassling V, Douglas T, Warnke P, Açil Y, Wiltfang J, Becker S. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periodontal tissue engineering. *Clinical Oral Implants Research*, 2010; 21: 543-549
- ³⁷ Xuan F, Lee C, Son J et al. A comparative study of the regenerative effect of

sinus bone grafting with platelet-rich fibrin-mixed Bio-Oss_ and commercial fibrin-mixed Bio-Oss_: An experimental study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* xxx 2013 1-4

³⁸ Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M et al. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in Reconstructive Surgery of Atrophied Maxillary Bones: Clinical and Histological Evaluations. *Int. J. Med. Sci.* 2012, 9(10): 872-880

³⁹ Zhang Y, Tangl S, Huber C. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2012; 40: 321-328

⁴⁰ Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S et al. The primacy of platelet—rich fiibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2013; xxx: 1-10

⁴¹ Knapen M, Gheldof D, Drion P. Effect of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) on Bone Regeneration: A Study in Rabbits *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, Volume *, Number *, 2013).

⁴² Yoon J-S, et al., The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2014.01.034>

⁴³ Ozdemir H, *et al.* Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Archives of Oral Biology* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.09.018>

⁴⁴ Dohan Ehrenfest DM, Lemo N, Jimbo R, Sammartino G. Selecting a relevant

animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF): rabbit tricks and traps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110: 414-6

⁴⁵ Kim S, Kim J, Choi J. The route from mission impossible to Columbus's egg: An easy means of platelet-rich-fibrin (PRF) production in the rabbit. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110: 416-8

⁴⁶ Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, et al: Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci* 2010; 40: 180-187

⁴⁷ Botticelli, D., Berglundh, T., Lindhe, J. The influence of a biomaterial on the closure of a marginal hard tissue defect adjacent to implants – an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 2004; 15: 285–292.

⁴⁸ Araújo, M., Linder, E., Lindhe, J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research*, 2009; 20: 1–6.

⁴⁹ Araujo M, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin. Oral Impl. Res.*, 2010; 21: 55–64.

⁵⁰ Bassil J, Naaman N, Lattouf R, et al. Clinical, histological, and histomorphometrical analysis of maxillary sinus augmentation using inorganic bovine in humans: preliminary results. *J Oral Implantol*. 2013 Feb;39(1):73-80. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-11-00012. Epub 2011 Sep 9

⁵¹ G Orsini¹, A Scarano¹, M Degidi, et al. Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss_ particles in sinus augmentation. *Oral*

Diseases 2007; 13: 586–593

ARTIGO EM INGLÊS

Title Page

Evaluation of the Bone Repair with the Use of Platelet-Rich Fibrin and leukocytes (L-PRF) Associated or Not to Graft Bovine anorganic. Histologic study in the calvaria of rabbits.

Anibal Soley Abbate Filho*, Vinicius Augusto Tramontina**, Sung Hyun Kim**, Vula Papalexiou**, Sonia Mara Luczyszyn**

* Student of the Master of Science Program in Dentistry, concentration área: Periodontics (PUCPR).

** Professor of Pos Graduate Program in Dentistry, concentration área: Periodontics (PUCPR).

Corresponding Author: Prof^a. Dr^a Sonia Mara Luczyszyn

Imaculada Conceição Street, 1155 - Prado Velho – Curitiba/PR – CEP: 80242-980.

Abstract

Background: After tooth extraction undisturbed wound healing could lead to the loss of ridge volume and changes in the ridge shape. This healing process can results in the lack of available alveolar bone for implant placement. Some authors have suggested the use of platelet concentrates to accelerate alveolar bone regeneration. The leukocyte- and platelet rich fibrin (L-PRF) is a platelet concentrate and has been used in hard and soft tissue healing in Periodontology and Maxillofacial Surgery. Bio-Oss is a deproteinized bovine bone material frequently used in sinus lift and ridge augmentation, acts as a scaffold to support new tissue growth and is eventually replaced by the host tissue. The aim of the present study was to investigate, histological and histomorphometrically, the potential use of L-PRF, associated or not to a deproteinized bovine bone (Bio-Oss), as grafting materials on bone regeneration in rabbit's calvarial defects.

Methods: Four equal critical-size bone defects were created in frontal and parietal bone of 20 rabbits (*New Zealand*). The defects were randomly grafted with: L-PRF, L-PRF + Bio-Oss, Bio-Oss and one of them was left unfilled to serve as a control group. The animals were killed after 60 days postoperative procedures and the defects were evaluated by using histological and histomorphometric analysis.

Results: A higher percentage of bone formation was found in L-PRF group, which was not statistically different from L-PRF + Bio-Oss and control groups. The Bio-Oss group had presented the lowest bone formation. In relation to bone fulfilled of the defects it was observed that Bio-Oss had showed a higher mean among the groups, but not statistically significant different from L-PRF + Bio-Oss group.

Conclusion: The L-PRF leads to increased bone formation and its association with Bio-Oss was favorable, allowing a greater volume gain of formed tissue.

<i>Keywords:</i> bone regeneration, platelet-rich fibrin, inorganic bovine bone

Introduction

With the growing demand for services related to implantology procedures in recent decades, the partial or total oral rehabilitation of edentulous patient with the use of dental implants has become more frequent. In some cases, there is precise and direct indication of dental implants when bone quantity is sufficient, essential to the implementation of the following procedures. However, some conditions of the alveolar crest should be corrected prior to installing them. These conditions relate mostly to bone atrophy due to the cause that led to tooth loss, such as periodontal disease or trauma. Alveolar bone resorption after tooth extraction is an inherent healing process condition; remodeling of the alveolar process is gradual and can result in reduced bone height and volume, creating an unhealthy condition for the installation of osseointegrated dental implants. The concept that ridge preservation procedures of post-extraction result in larger alveolar bone compared to cases where such preservation is not performed, supports the idea that bone regeneration in height and thickness of these sites is

essential, since that, when placed in fresh alveolus biomaterials tend to offset the catabolic processes in the edentulous regions, especially when it comes to the anterior portion of the jaw where the bone volume is important for aesthetic and functional reasons.

Bone regeneration remains a major challenge in dentistry. Several methods have been described in the literature for Regeneration of the lost alveolar bone. Several biomaterials have been proven effective for such purposes, associated with the various techniques recommended for bone tissue increase. The bone substitutes can be classified as autogenous, allogenic, xenogenous or synthetic, which may act through osteogenic, osteoinductive or osteoconductive properties. The gold standard in bone regeneration remains autogenous bone. With osteogenic, osteoinductive and osteoconductive properties, this has all the conditions to carry adequate bone regeneration due to the presence of secretory cells (viable osteocytes), presence of growth factors (such as bone morphogenetic proteins) and serving as a scaffold for angiogenesis and the deposition of bone matrix. However, the choice for autogenous bone is reflected in the need for a donor area and therefore a second surgical site, increasing surgical morbidity and the possibility of causing greater swelling, pain and postoperative complications. Furthermore, the donor site availability is limited, especially in the case of an intra-oral environment.

The bone substitutes marketed (commercialized) more widely, have mostly osteoconductive properties, acting as a scaffold for new bone formation. Among the biomaterials with the largest number of published studies highlight the Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), a bone of bovine origin, inorganic (deproteinated) with a porosity of 75% to 80% and with a particle size of approximately 10nm. It is produced from chemical extraction of all organic material from the cortical bone or marrow. It is very similar to the mineral part of human bone tissue, with respect to the internal surface area, porosity, particle size and aspect ratio calcium / phosphate. This bone substitute has demonstrated osteoconductive properties and has been shown to be highly biocompatible with oral hard tissues of animals and humans, causing no antigenic inflammatory or adverse responses when used. The system of interconnected pores of Bio-Oss seems to have the size and the structure necessary to conduct a new

vascularization. There are reports that during healing, the particles are Bio-Oss surrounded by newly formed lamellar bone, showing a slow resorption and replacement. Bio-Oss may contribute to bone regeneration, as suggested by in vitro and histological studies, which demonstrated a close relationship between Bio-Oss particles and new bone formation. Clinically, this biomaterial has been used in several bone regeneration techniques such as guided bone regeneration (GBR), in periodontal bone defects, in post-extraction sockets to prevent alveolar collapse associated or not with immediate implants and in maxillary sinus lift surgeries, with very favorable results.

Another autologous biomaterial described in recent literature, is the leukocytes and platelets rich fibrin (L-PRF) advocated by Choukroun et al. (2001) for specific use in oral and maxillofacial surgery. The L-PRF belongs to a new generation of platelets concentrates, with simplified processing without biochemical blood handling. The L-PRF preparation technique, from the patient's own blood does not require the use of anticoagulants, bovine thrombin or any other gelling agent, unlike the previous generation of platelet concentrates such as platelet-rich plasma (PRP). After collecting the blood sample, this is immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The absence of anticoagulants implies in immediate activation of most platelets of the blood sample in contact with the tube walls and the release of the coagulation cascades. Therefore, the time between blood collection and the start of the centrifugation is essential. Quick handling is the only way to get an appropriate L-PRF clot. With the centrifugation process, three layers are formed inside the tube: a layer rich in red blood cells (erythrocytes) at the bottom, a layer of acellular plasma (platelet poor plasma) as a supernatant, and an intermediate layer corresponding to L-PRF clot. This clot combines many immunological and healing promoters agents, growth factors and cytokines and can be used directly as a clot or after compression as a membrane.

L-PRF consists of an intimate collection of cytokines, structural glycans chains and glycoproteins impregnated within a fibrin network slowly polymerized. These biochemical components have synergistic effects on wound healing.

As an optimized blood clot, L-PRF is a biomaterial complex with a specific biology. It is organized as a dense fibrin matrix with a large number of leukocyte

concentrates on a part of the clot (buffy coat). Its use promotes a slow release of growth factors such as transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), platelet-derived growth factor $\alpha\beta$ (PDGF- $\alpha\beta$), vascular endothelium growth factor (VEGF) and glycoproteins (such as thrombospondin-1) for at least 7 days, reaching up to 14 days. Although platelets are responsible for the vast majority of growth factors, it has also been regarded as fundamental role of leukocytes, not only for anti-infective and immune regulating action, but for the release of growth factors, especially TGF and VEGF. Moreover, the fibrin matrix certainly constitutes the decisive factor responsible for the actual therapeutic potential of L-PRF, which can be regarded as dense fibrin biomaterial with biomechanical properties. A high density fibrin clot can serve as a biological healing matrix by supporting cell migration and cytokine release.

The beneficial effects of L-PRF have been studied in various procedures in order to promote the healing of hard and soft tissue, for example, in alveolar ridge preservation, in maxillary sinus bone graft as sole material, in root coverage procedures, in periodontal bone and furcation defects.

The present study aimed to evaluate, histological and histomorphometric, the bone repair process and inductive potential of leukocytes and platelets rich fibrin (L-PRF) and anorganic bovine bone (Bio-Oss), associated or not, in surgically created defects in the calvaria of rabbits.

Material and Method

Material

The materials used in this study were the Bio-Oss (Geistlich Pharma, Switzerland), a bone of bovine origin, inorganic (deproteinated) and leukocytes and platelets-rich fibrin in (L-PRF), both used alone or in a blend in equal parts.

Preparation of L-PRF

In this experiment, 5 ml of blood was collected from the central ear artery of rabbits with the aid of a catheter, and placed in a dry vacutainer. The leukocytes and platelets-rich fibrin are obtained from a blood sample immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes without use of any additive biochemical, without anticoagulants, bovine thrombin or calcium chloride, as recommended by the technique Choukroun et al. (2001). After centrifugation, are observed in vacutainer three separate layers: a layer of red blood cells (RBCs) at the bottom,

in the upper part, the platelet poor plasma (PPP) as supernatant, and an intermediate layer that corresponds to clot of leukocytes and platelets-rich fibrin, L-PRF. For this purpose a centrifuge table, Centribio 80-2B was used. After centrifugation, the L-PRF clot was removed directly from vacuntainer with the aid of a rat tooth forceps. This is possible due to the consistency of the fibrin clot, which allows removal and handling without damaging the biomaterial, unlike other platelet concentrates. Normally, the layer of red blood cells (RBCs) is attached to the fibrin clot and must be removed by a simple peeling, taking care to keep the last layer of red blood cells, also known as *buffy coat*, which shows a high concentration of platelets and leukocytes. Then, the L-PRF clot was placed in a box specially developed for this purpose and also for the confection of membranes or plugs of L-PRF. In this case, the L-PRF is stored until the time of use.

Sample

Twenty adult New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), weighing between 2.5kg and 3kg provided by breeders who were allocated in the vivarium of PUCPR university and received water ad libitum, were included in the study. The surgical procedures were performed in the Surgical Center of Operative Techniques Laboratory of the PUCPR university. The study was approved by the Ethics Committee on Animal of the Pontifical Catholic University of Paraná received an opinion n° 717/2011.

Surgical Procedures

The rabbits were anesthetized with xylazine at a dose of 8 mg/kg associated with Ketamine at 30 mg/kg, intramuscularly in the thigh region. Then trichotomy was performed externally to the ear and disinfected with 70% alcohol. The rabbits were anesthetized with propofol at a dose of 10 mg/kg intravenously in a catheter n° 24 G by marginal ear vein. Anesthesia was maintained with vaporizer (Oxigel) used at a dosage of 3% of isoflurane.

After a period of 5 minutes trichotomy and local antiseptic degerming with PVPI (polyvinylpyrrolidone-iodine) was carried in the upper part of the skull. After that was administered 5 mg / kg Morphine IM for obtaining analgesia during the procedure.

Anesthesia was performed with 1.8 mL of 2% lidocaine with epinephrine (1:100,000) for anesthetic supplementation and control of bleeding at the incision site. A sagittal incision extending from the nose to the occipital bone was made using a scalpel blade No. 15 C (Swann Morton, Sheffield, England). A full thickness flap was moved to display the area where bone defects were created. Was confectioned 4 circular defects of 7 mm in diameter in the skull of each rabbit with Trepine drill of 6 mm internal diameter (Neodent, Curitiba, Brazil) coupled to a handpiece 20: 1 Kavo (Kavo Kerr Group, Germany) under vigorous irrigation. Each defect was filled randomly as follows:

- L-PRF;
- L-PRF + Bio-Oss;
- Bio-Oss;
- Blood clot (control).

In most cases, osteotomy was completed with micro Ochsenein chisels. After removal of the bone fragment and exposure of the Dura Mater, was verified its integrity to proceed with the placement of the material randomly selected for fill the defects in each rabbit. The Bio-Oss was directly taken to the surgically created defects with the use of a Molt curette (Hu-Friedy, Chicago, USA). Regarding the L-PRF, in order to standardize their utilization, it was fragmented into small pieces before being placed in the defect and mixed with Bio-Oss at a ratio of 1: 1. For all defects, it was used the criteria condense the material to obtain a complete filling in height and length. After filling all defects, soft tissue was repositioned and sutured in two planes (Vycril 5.0 and 4.0 Mononylon, Ethicon® Johnson and Johnson, USA) (Figure 16). The animals received the analgesic Ketoprofen® 5 mg/kg, and Enrofloxacin® 5 mg/kg as an antibiotic, both for 3 days postoperatively. After 10 days, the sutures were removed.

The animals were killed after 60 days postoperatively with sodium thiopental at a dose of 180 mg/kg IV, until cardiac arrest. After euthanasia, the whole calvarial bone was removed, the samples of each bone defect were separated and placed into 10% formaldehyde (formalin) for proper fixation.

Histologic and Histomorphometric Analysis

Processing of the pieces has followed the routine technique recommended for mineralized specimens. Initially, the samples were demineralized with acid, ethylene diamine tetraacetic acid (5% EDTA), cleaved at its central region, folded, washed, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in paraffin. Histological sections of 5 μ m thick, which were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Gomori's trichrome for histological evaluation and histomorphometric were prepared. Histomorphometric analysis was performed using the ImagePro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, USA) software.

The parameters evaluated were:

1. Percentage of bone formation: refers to the area of bone tissue formed relative to the total area of the defect fill. Initially, using Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe, USA) software, external areas to the defect were removed. Then, the corresponding soft tissue, such as connective tissue, blood vessels, and the marrow space area were removed, retaining only those corresponding to the bone portion to be measured. By ImagePro Plus 4.5 software, was measured the total area of the defect fill and thus obtained the percentage of newly formed bone. The images below show how the measurements (Figures 18 to 20) were made.
2. Height of filling defect: is the measure (in nm) between the top edge and the bottom edge of the defect. Linear ten measurements were performed between the upper and lower edges of the wound repair, and used the average of these values as representative of this final measurement parameter (Figures 21 to 24).

Statistical Analysis

In order to compare whether there was difference in the mean values of the percentage of bone formation and height of the filling defect, according to the four groups, the statistical tests were applied. Due to sample size ($n = 20$), was initially tested normality by Shapiro-Wilk test, which accused normal distribution for the two variables and four groups ($p > 0.05$). Once established data normality, ANOVA was applied to verify statistical differences between the groups in both variables subjected, which proved to be true for both parameters. Then, the data were further tested for homogeneity of variance of Levene's test. In case there is homogeneity of variance, which was the case of variable height of the defect fill, comparison between groups was made using the Tukey HSD test for

homogeneity of variances. If the data presented homogeneity of variances between groups, which was true for percentage of bone formation, the parametric multiple comparisons Games-Howell test for heterogeneity of variances was used.

Results

All animals recovered satisfactorily from surgical procedures without any complications, no loss or disposal of animals.

1. Percentage of bone formation:

The highest average was achieved by L-PRF group ($36.43 \pm 15.62\%$), which together with the L-PRF + Bio-Oss ($30.43\% \pm 19.73$) and the control group ($31.75\% \pm 17.59$) were statistically superior to Bio-Oss group ($15.99\% \pm 9.80$). The figures concerning the percentage of bone formation can be seen in graph 1.

2. Height of filling defect:

The Bio-Oss (2104.25 ± 515.23 mm) was the group that reached the highest average fill, being statistically higher when compared to L-PRF (1675.48 ± 490.82 mm) and control (1113.79 mm \pm 467.63). In the three groups where it was used biomaterials (Bio-Oss, L-PRF and L-PRF + Bio-Oss), the average height of the filling of the defect was statistically superior to the control group. Graph 2 shows the results.

Discussion

The search for biomaterials with osteoinductive and osteogenic properties as an alternative to autogenous bone has been guiding the new lines of research. It is in this context that fits the L-PRF, with the presence of numerous growth factors that induce blood vessel formation, chemotaxis and cell mitosis, cellular proliferation and differentiation. The growth factors released by platelets include three isomers of platelet derived growth factor (PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$, PDGF $\alpha\beta$), two isomers of transforming growth factor (TGF β 1, TGF β 2), vasculo endothelial growth factor (VEGF) and epithelial growth factor (EGF) 23.;

The effects of L-PRF in bone regeneration have been widely studied in vitro with promising results. It was shown that proliferation of osteoblasts cultured in L-PRF was significantly higher than those grown on collagen membranes (Bio-guide). Other authors have suggested that the L-PRF is able to increase the adhesion and proliferation of osteoblasts, and upregulate collagen-related protein,

which together may promote bone regeneration. Furthermore, according Dohan et al., it was demonstrated that L-PRF significantly increased the proliferation of human osteoblasts in a dose-dependent manner, stimulating the proliferation of fibroblasts, keratinocytes and pre-preadipocytes. Thus, it was suggested that growth factors and fibrin matrix were responsible for this effect. L-PRF can serve as a scaffold for migration of fibroblasts and angiogenesis and has been shown to be suitable for use as a matrix for *in vitro* reproduction of human periosteal cells, which may have applicability in bioengineering of bone tissue.

There are some reports in literature of the use of L-PRF in maxillary sinus surgery with concomitant installation of implant, in alveolar ridge preservation, guided tissue regeneration/ guided bone regeneration, in the treatment of gingival recession, showing favorable results. Few controlled clinical trials have been conducted so far, mostly using the L-PRF associated with allogeneous or xenogeneous biomaterials, in maxillary sinus lift surgery showing controversial results. While some studies show a decrease in healing time and increase the amount of bone formation, others showed no difference between groups with or without L-PRF. Recently, animal research specifically in rabbits, also have shown conflicting results, with L-PRF improving bone formation, or behaving indifferently when tested alone and in combination with various biomaterials. Still using rabbits as animal model Yoon et al., evaluating the role of L-PRF in angiogenesis and osteogenesis in guided bone regeneration, found no significant effects in addition of L-PRF to xenogeneous bone substitutes. However, suggested that the L-PRF can increase the number of bone marrow cells. The use of L-PRF in guided bone regeneration (GBR) was also searched. Used in conjunction with titanium caps, as barrier and space maintainer, the L-PRF used alone, led to a bone formation statistically superior to control (blood clot). The result was similar to that achieved by inorganic bovine bone and superior to that obtained with biphasic calcium phosphate.

The use of rabbits as an animal model was questioned by Dohan et al. (2010), which emphasized the difficulty of collecting blood in speed and quality sufficient to enable obtaining a quality L-PRF. They argued that the only effective way to make a good collection was by intra-cardiac route, which led to a high mortality of animals. Other researchers have just demonstrating safety and

predictability in the puncture of the central ear artery of rabbits, a methodology that was adopted in this experiment. In this work, the technique was perfectly executed, achieving a fairly consistent L-PRF, quickly and safely.

The use of calvarial bone for evaluation of bone-regeneration was due because the embryological, morphological and physiological similarities with the bone of the maxillo-facial region.

The period of 8 week evaluation was chosen based on previous studies in the same animal model, in order to make it suitable for bone turnover, resorption and incorporation of biomaterials, allowing the necessary comparisons. The size and number of defects created were defined by the possibility of testing on the same animal, the four types of treatment. Furthermore, the space between the defects should allow a safe margin of intact bone tissue.

The results showed statistically significant differences between the tested groups in regard to the percentage of bone formation. Statistically, L-PRF, L-PRF + Bio-Oss and control groups did not differ among themselves, but had a higher than Bio-Oss group percentage of bone formation. The lowest percentage of bone formation Bio-Oss group was expected, since the particles corresponding to Bio-Oss still present after 60 days, and its area was not recorded as new bone tissue, and supports other studies involving this type of biomaterial. Bio-Oss leads to a delay in the healing process of bone repair, their granules are resorbed slowly and may not even be completely absorbed in the long term. The new bone is formed through the pores of the particles of Bio-Oss, trapping these particles, and forming a warren of newly formed bone and Bio-Oss particles not reabsorbed, that act functionally as bony tissue. The interconnecting pores of the material allow a complete camouflage of foreign body and allow new vital bone formation in the trabecular non vital Bio-Oss, enabling this new structure participate in bone turnover involved in the bone remodeling process. In the present study, the Bio-Oss granules were not considered as newly formed bone tissue, which may explain the lower mean percentage of bone formation of Bio-Oss group compared to other groups. On the other hand, the L-PRF + Bio-Oss group scores a statistically higher percentage of bone formation in compare with Bio-Oss alone, which leads us to suppose that the L-PRF accelerated the process of bone repair, confirming studies that attribute the use of L-PRF, a reduction in healing time and increase

the amount of bone formed. The result of the control group was very similar to the L-PRF + Bio-Oss group, but with a lower capacity to maintain the original volume of the defect as seen in other results.

Another variable studied was height of filling defect, which refers to the measured between the top edge and the bottom edge of the defect. Reflects the ability of the biomaterial to maintain the volume of formed tissue. The Bio-Oss group achieved the best average, which was statistically higher than the control group and L-PRF. The result is in agreement with other authors that demonstrated the ability of Bio-Oss in maintain the volume and lead to adequate bone formation, with the Bio-Oss particles interconnected with new bone. The control group had an average height of filling defect less than all other groups, which had been expected, since this group did not receive the defect filling with biomaterial, leading to a cicatrization from the clot, which by itself presents a lower stability compared with the other groups. The results of the comparisons between groups indicate that the addition of the Bio-Oss to L-PRF favored volume formed tissue. Extrapolating to clinical practice, this may be an important finding, since the volume of the formed tissue may interfere directly on the possibilities of treatment, both functionally and aesthetically.

The L-PRF + Bio-Oss association obtained an excellent average height of filling defect, comparable to the average of Bio-Oss, who was the group with the best performance and also excellent average percentage of bone formation, similar to the average of the L-PRF group, which had the best average in this variable, reinforcing the benefits of this association. Seems reasonable to infer that the addition of L-PRF to Bio-Oss added osteoinductive properties to a material with already established osteoconductive properties. The results obtained in this study allow us to conclude that the L-PRF increased the amount of newly formed bone, and the addition of Bio-Oss to L-PRF increased the volume of tissue formed after 60 days compared to the healing of L PRF alone.

Conclusion

Based on the results of this work can be concluded that:

- The L-PRF group had the highest percentage of bone formation;
- L-PRF + Bio-Oss association led to an increase in the percentage of bone formation compared to the use of Bio-Oss alone;

-
- L-PRF used alone obtained a high percentage of bone formation, but the height of filling defect was statistically inferior to that obtained with Bio-Oss, demonstrating that the combination L-PRF + Bio-Oss promotes the repair process and allows the maintenance of the same volume levels obtained by use of Bio-Oss.

ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 16 agosto de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 717 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da regeneração óssea com o uso da fibrina rica em plaquetas de Choukroun. Estudo histológico em calvária de coelhos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Anibal Soley Abbate Filho

EQUIPE DE PESQUISA:

Anibal Soley Abbate Filho, Sonia Luczyszyn

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Medicina - Medicina

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

O colegiado do CEUA em reunião no dia 16//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.

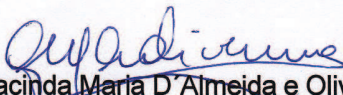
Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

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.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof^ª Graciinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais



ESPECIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelha	Macho	Adulto, 2,5-3 kg	C	20

O colegiado do CEUA em reunião no dia 18/08/2012, 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 iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser cuidadoso e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser repedido por este CEUA em qualquer tempo.

