

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JULIANA RIBEIRO DE ALBUQUERQUE BÓIA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE BIO-OSS[®], CERABONE[®] E FIBRINA RICA
EM PLAQUETAS INJETÁVEL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS NA
CALVÁRIA DE RATOS**

Alfenas/MG

2021

JULIANA RIBEIRO DE ALBUQUERQUE BÓIA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE BIO-OSS[®], CERABONE[®] E FIBRINA RICA
EM PLAQUETAS INJETÁVEL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS NA
CALVÁRIA DE RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

B678e Bóia, Juliana Ribeiro de Albuquerque
Estudo comparativo entre bio-oss®, cerabone® e fibrina rica em plaquetas
injetável em defeitos ósseos críticos na calvária de ratos / Juliana Ribeiro de
Albuquerque Bóia – Alfenas, MG, 2021.
67 f.: il. –

Orientador: Noé Vital Ribeiro Júnior.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológica) – Universidade
Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Regeneração Óssea. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Fibrina Rica em
Plaquetas. I. Ribeiro Júnior, Noé Vital. II. Título.

CDD- 617.6

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE BIO-OSS®, CERABONE® E FIBRINA RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS NA CALVÁRIA DE RATOS

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

Aprovada em: 06 de dezembro de 2021.

Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Ricardo Viana Bessa Nogueira
Instituição: Universidade de Alagoas

Profa. Dra. João Adolfo Costa Haneman
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Noé Vital Ribeiro Júnior, Professor do Magistério Superior**, em 06/12/2021, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Viana Bessa Nogueira, Usuário Externo**, em 06/12/2021, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Adolfo Costa Hanemann, Professor do Magistério Superior**, em 06/12/2021, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0646192** e o código CRC **33427FFE**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por tudo que conquistei.

Aos meus pais, José Ulisses Filho (in memorian) e Milene Ribeiro Vasconcelos Ulisses, muito obrigada por tornarem meus sonhos prioridade, abdicando dos seus próprios sonhos, pelo esforço empreendido, força e incentivo em todos os momentos da minha vida. Sem os seus ensinamentos eu não teria alcançado meus objetivos. Pai, tenho certeza que estará feliz por mais essa conquista. Ao meu irmão José Ulisses, agradeço por me apoiar na busca dos meus objetivos.

Ao Ricardo Ramos de Oliveira, meu esposo, obrigada por compartilhar comigo todos os momentos de ansiedade, dúvidas, questionamentos e pelos momentos de descontração e alegrias.

A todos os meus familiares e amigos, obrigada pelas orações e desejos de sucesso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Junior, obrigada por toda sua sabedoria, paciência e dedicação durante as diversas atividades para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por confiar em mim e acreditar na nossa pesquisa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano, obrigada por todo seu profissionalismo, disponibilidade e ajuda sempre que recorria ao senhor. Agradeço por também fazer este trabalho acontecer, sem sua parceria não seria possível.

À Professora Dra. Juliana dos Santos Neves pelo grande auxílio no processamento das peças e interpretação histológica. Obrigada por toda disponibilidade, por ser sempre solícita e por fazer parte desta pesquisa.

Ao Professor Dr. João Adolfo Costa Hanneman, por toda presteza e amparo na minha pesquisa e na coleta dos dados microscópicos.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas da UNIFAL por todo conhecimento e ensinamentos adquiridos, os quais levarei por toda minha vida profissional.

A todos do biotério central da UNIFAL pela parceria. Em especial, à médica-veterinária Érika Incerpi, sempre disposta a me orientar no manejo com os animais.

Ao Gustavo Patrício Passos, pelo auxílio em todos os procedimentos cirúrgicos envolvendo os animais dessa pesquisa.

Ao Lélío Fernando Ferreira Soares, pela ajuda na transcrição para artigo em inglês.

A todos os funcionários da UNIFAL, principalmente aos do laboratório de morfologia pelo auxílio na parte histológica envolvendo minha pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

As cirurgias reconstrutivas ósseas têm sido amplamente utilizadas na reabilitação bucal com o uso de próteses implantossuportadas. Devido aos dois momentos cirúrgicos que ocorrem em enxertos autógenos, aumentando a morbidade, os biomateriais xenógenos e os concentrados plaquetários têm ganhado destaque, por serem biocompatíveis e favorecerem a formação óssea. O objetivo deste estudo foi comparar a capacidade de regeneração óssea do Bio-Oss[®], Cerabone[®] e fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF), criando-se defeitos ósseos críticos na calvária de 56 ratos machos da linhagem Wistar. Foram realizados 2 defeitos cirúrgicos por animal e distribuídos aleatoriamente em 7 grupos de acordo com o tratamento recebido, sendo cada grupo composto de 8 animais e 16 defeitos cirúrgicos. O coágulo (CG) e osso autógeno (OA) foram os grupos controle negativo e positivo, respectivamente. Os demais grupos foram Bio-Oss[®] (BO), Cerabone[®] (CB), i-PRF homogêneo (i-PRF), Bio-Oss[®] associado ao i-PRF (BOPRF) e Cerabone[®] associado ao i-PRF (CBPRF). Em cada grupo experimental 8 defeitos cirúrgicos foram analisados após 30 dias e 8 foram analisados após 60 dias pós-operatórios. A área de neoformação óssea (ANO) foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original (AT). Os valores obtidos foram submetidos ao teste F (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$). As médias mais elevadas de regeneração óssea corresponderam ao grupo OA (37,83%), que se apresentou estatisticamente significativa ($p < 0,001$) comparado aos demais grupos e ao grupo CBPRF (18,79%), que se apresentou estatisticamente significativa ($p < 0,001$) comparado aos grupos BO (10,20%) e CG (6,96%), mas não apresentou diferença estatística com os grupos i-PRF (17,07%), BOPRF (16,86%) e CB (16,15%). Nenhum outro estudo foi encontrado comparando ao mesmo tempo a utilização dos três materiais utilizados nesta pesquisa. Os resultados obtidos permitiram concluir que o uso de Cerabone[®] e de i-PRF apresentaram aplicabilidade satisfatória para a regeneração óssea.

Palavras-chave: Regeneração Óssea; Materiais Biocompatíveis; Fibrina Rica em Plaquetas.

ABSTRACT

Bone reconstructive surgeries have been widely used in oral rehabilitation with the use of implant-supported prostheses. Due to the two surgical moments that occur in autogenous grafts, increasing morbidity, xenogenic biomaterials and platelet concentrates have gained prominence, as they are biocompatible and favor bone formation. The aim of this study was to compare the bone regeneration capacity of Bio-Oss®, Cerabone® and injectable platelet-rich fibrin (i-PRF), creating critical bone defects in the calvaria of 56 male Wistar rats. Two surgical defects were performed per animal and randomly distributed into 7 groups according to the treatment received, each group being composed of 8 animals and 16 surgical defects. Clot (CG) and autogenous bone (OA) were the negative and positive control groups, respectively. The other groups were Bio-Oss® (BO), Cerabone® (CB), homogeneous i-PRF (i-PRF), Bio-Oss® associated with i-PRF (BOPRF) and Cerabone® associated with i-PRF (CBPRF). In each experimental group 8 surgical defects were analyzed after 30 days and 8 were analyzed after 60 days postoperatively. The area of bone neoformation (ABN) was calculated as a percentage of the total area of the original defect (AT). The values obtained were submitted to the F test (ANOVA) and the Tukey test ($p < 0.05$). The highest means of bone regeneration corresponded to the OA group (37.83%), which was statistically significant ($p < 0.001$) compared to the other groups and to the CBPRF group (18.79%), which was statistically significant ($p < 0.001$) compared to the BO (10.20%) and CG (6.96%) groups, but there was no statistical difference with the i-PRF (17.07%), BOPRF (16.86%) and CB (16.15%). No other study was found comparing the use of the three materials used in this research at the same time. The results obtained allowed to conclude that the use of Cerabone® and i-PRF presented satisfactory applicability for bone regeneration.

Keywords: Bone Regeneration; Biocompatible Materials; Platelet-Rich Fibrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Punção intracardíaca e retirada do sangue.....	26
Figura 2 -	Obtenção de fibrina rica em plaquetas injetável.....	27
Figura 3 -	Criação do defeito crítico e preenchimento com os respectivos enxertos.....	29
Figura 4 -	Processamento laboratorial padronizado da redução das peças.....	31
Figura 5 -	Padronização do defeito para análise histomorfométrica.....	32
Figura 6 -	Visão panorâmica do grupo Coágulo nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 25x).....	34
Figura 7 -	Fotomicrografia do grupo Coágulo nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 400x).....	34
Figura 8 -	Visão panorâmica do grupo Autógeno nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 25x).....	35
Figura 9 -	Fotomicrografia do grupo Autógeno nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 400x).....	36
Figura 10 -	Visão panorâmica do grupo Bio-Oss® nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 25x).....	37
Figura 11 -	Fotomicrografia do grupo Bio-Oss® nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 400x).....	37
Figura 12 -	Visão panorâmica do grupo Cerabone® nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 25x).....	38
Figura 13 -	Fotomicrografia do grupo Cerabone® nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 400x).....	39
Figura 14 -	Visão panorâmica do grupo i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 25x).....	40
Figura 15 -	Fotomicrografia do grupo i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 400x).....	40
Figura 16 -	Visão panorâmica do grupo Bio-Oss® + i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 25x)...	41
Figura 17 -	Fotomicrografia do grupo Bio-oss® + i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 400x).....	42

Figura 18 - Visão panorâmica do grupo Cerabone® + i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 25x)...	43
Figura 19 - Fotomicrografia do grupo Cerabone® + i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias e 60 dias (aumento 400x).	44
Figura 20 - Gráfico da média do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo e o tempo de avaliação.....	46
Figura 21 - Gráfico da média do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo, considerando-se a média dos tempos de avaliação...	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatísticas do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo e o tempo de avaliação.....	45
Tabela 2 - Estatísticas do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo...	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANO	- Área de neoformação óssea
ANOVA	- Análise de Variância
AO	- Osso autógeno
AT	- Área total do defeito original
BO	- Bio-Oss®
BOPRF	- Bio-Oss® associado ao i-PRF
CB	- Cerabone®
CEUA	- Comitê de Ética na Utilização de Animais
CG	- Coágulo
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
i-PRF	- Fibrina rica em plaquetas injetável homogênea
PRF	- Fibrina rica em plaquetas
PRP	- Plasma rico em plaquetas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	SUBSTITUTOS ÓSSEOS BOVINOS - BIO-OSS®	16
2.2	SUBSTITUTOS ÓSSEOS BOVINOS – CERABONE®.....	18
2.3	FIBRINA RICA EM PLAQUETAS.....	20
3	OBJETIVO.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	25
4.1.1	Grupos Controle.....	25
4.1.2	Grupos experimentais.....	25
4.2	PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL.....	26
4.2.1	Punção Intracardiaca e retirada do sangue.....	26
4.2.2	Separação celular.....	26
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	27
4.4	EUTANÁSIA.....	30
4.5	PROCESSAMENTO DAS PEÇAS.....	30
4.6	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	31
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS.....	33
5.1	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO NOS PERÍODOS EXPERIMENTAIS DE 30 E 60 DIAS DE ACORDO COM O MATERIAL UTILIZADO.....	33
5.1.1	Grupo CG.....	33
5.1.2	Grupo OA.....	35
5.1.3	Grupo BO.....	36
5.1.4	Grupo CB.....	38
5.1.5	Grupo i-PRF.....	39
5.1.6	Grupo BOPRF.....	41
5.1.7	Grupo CBPRF.....	42
5.2	ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA.....	44
6	DISCUSSÃO.....	49

7	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A.....	65
	APÊNDICE A.....	66
	APÊNDICE B.....	67

1 INTRODUÇÃO

Cirurgias ósseas reconstrutivas são muitas vezes necessárias para evitar ou recuperar a perda óssea vertical e horizontal, obtendo-se uma quantidade e qualidade ósseas adequadas para a reabilitação oral com próteses implantossuportadas. A forma do osso alveolar é dependente dos dentes e o processo alveolar sofre diferentes quantidades de reabsorção óssea após a perda do elemento dental (CARDAROPOLI; ARAUJO; LINDHE, 2003; KASSIM; IVANOVSKI; MATTHEOS, 2014). A reabsorção dos maxilares pode levar a defeitos anatômicos significativos comprometendo a função e a estética e, em muitos casos, inviabilizar a reabilitação oral (LINDHE; KARRING; LANG, 2010). Foi demonstrado que após doze meses da extração do dente, sem nenhuma intervenção, há perda considerável da largura e altura da crista alveolar, ocorrendo grande parte dessa redução nos primeiros três meses (SCHROPP *et al.*, 2003). Dessa forma, há uma constante busca por novos biomateriais que possam ser utilizados como substitutos ao osso autógeno nas reconstruções ósseas (KIM *et al.*, 2013; TETÈ *et al.*, 2013).

Os substitutos ósseos, no reparo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos, têm sido usados frequentemente para identificar potenciais terapias que aumentem o crescimento ósseo (OLIVEIRA *et al.*, 2015; AL-ASKAR *et al.*, 2016; DO LAGO *et al.*, 2019).

O osso bovino desproteínizado demonstrou ser um material seguro e biocompatível com propriedades osteocondutoras (BENLIDAYI *et al.*, 2009) e é considerado o biomaterial mais amplamente utilizado e melhor documentado em Odontologia (PRADEEP *et al.*, 2009; DORI *et al.*, 2009; LEE; CHEN; DARBY, 2012; SCHMITT *et al.*, 2013). Como é um biomaterial natural, é possível que o material mantenha suas características de superfície originais, ou seja, mimetize o osso humano, apresentando uma superfície receptora para as células de formação óssea (PRADEEP *et al.*, 2009; DORI *et al.*, 2009).

O Bio-Oss® (Ed Geistlich Sons, Wolhusen, Suíça) é um tipo de xenoenxerto, o qual consiste em osso bovino desproteínizado e esterilizado com superfície de 75% a 80% de porosidade e está disponível em cinco apresentações entre grânulos grandes e pequenos. Possui uma matriz porosa

natural não antigênica, que é química e fisicamente idêntica à fase mineral do osso humano (ORSINI *et al.*, 2007).

Como a variedade de tipos de substitutos ósseos está em contínua expansão, recentemente introduziu-se no mercado o xenoenxerto Cerabone® (Botiss biomaterials, Zossen, Straumann, Alemanha), o qual tem origem de osso bovino esponjoso de gado da Nova Zelândia e é composto por fosfato de cálcio. Apresenta porosidade entre 65% a 80% e propriedades osteocondutoras (HUBER *et al.*, 2006; LASCHKE *et al.*, 2007).

Diante da propriedade basicamente osteocondutora dos xenoenxertos, identifica-se a possibilidade de associação com substâncias capazes de acrescentar propriedades osteoindutoras aos biomateriais. O plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido amplamente estudado por seu potencial de osteoindução em enxertos ósseos. Sistemicamente, no campo da hematologia, a utilização de concentrados de plaquetas no reparo tecidual, através das transfusões, já é utilizada há algum tempo (EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009). Entretanto, a utilização tópica do PRP em outras áreas da medicina, odontologia e cirurgia bucomaxilofacial é relativamente recente e a comprovação de sua capacidade terapêutica ainda gera controvérsia (ANITUA *et al.*, 2006; LUCARELLI *et al.*, 2010).

Devido à necessidade de desenvolvimento de materiais que contribuam de forma significativa para a regeneração óssea, surgiu uma segunda geração de concentrado de plaquetas denominada fibrina rica em plaquetas (PRF) (CHOUKROUN *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2009). O PRF é produzido através do sangue do próprio paciente sem a adição de trombina bovina ou outros componentes exógenos (CHOUKROUN *et al.*, 2006; TATULLO *et al.*, 2012).

Há uma constante evolução das técnicas de regeneração óssea utilizando diferentes biomateriais. O Bio-Oss® já é um biomaterial amplamente relatado e seu uso consolidado na literatura. Dessa forma, nessa pesquisa se comparou a utilização do Bio-Oss®, com Cerabone® e i-PRF, isoladamente ou associado aos xenoenxertos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SUBSTITUTOS ÓSSEOS BOVINOS – BIO-OSS®

O enxerto de osso autógeno é considerado padrão-ouro nas enxertias ósseas, por apresentar propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras (MISCH; BIDEZ, 2009). Contudo, algumas desvantagens em sua utilização, como maior morbidade cirúrgica, possibilidade de não aceitação do paciente por uma segunda ferida cirúrgica e limitação no tamanho do transplante ósseo, impulsionaram o desenvolvimento da engenharia tecidual (TATULLO *et al.*, 2012). Com o objetivo de regenerar tecidos ósseos, o grande desafio dessa ciência é desenvolver um *scaffold* (arcabouço) com porosidade suficiente e com alta resistência mecânica para permitir adesão, migração, crescimento e proliferação celular, resultando em uma boa integração com os tecidos vizinhos (GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2020; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005).

O Bio-Oss® é um substituto ósseo natural feito de osso bovino inorgânico com macro e microconfigurações muito próximas da estrutura do osso humano. Apesar da ausência de componentes orgânicos, possui cristais de hidroxiapatita, atuando como um arcabouço, o qual permite a inserção e proliferação de osteoblastos, favorecendo a deposição de matriz óssea devido à sua capacidade osteocondutora (HÄMMERLE; LANG, 2001; TAPETY *et al.*, 2004). O tamanho e a estrutura das partículas do Bio-Oss® formam um sistema de poros interligados favorável ao crescimento das células sanguíneas, dos osteoblastos, osteoclastos e de proteínas (HÄMMERLE; LANG, 2001). Dessa forma, a arquitetura trabecular do osso bovino permite uma rápida estabilização do coágulo e revascularização, propiciando a migração de células ósseas e a aposição de osso neoformado (AMERIO *et al.*, 2010; STAUROPOULOS *et al.*, 2003).

Estudos histológicos demonstraram uma área óssea neoformada em íntimo contato com as partículas de Bio-Oss® (DAHLIN; SIMION; HATANO, 2010; GALINDO-MORENO *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2012; MLADENOVIC *et al.*, 2013; ORSINI *et al.*, 2005), impulsionando a sua utilização em diferentes procedimentos de regeneração óssea na periodontia, cirurgia e implantodontia

(CHA *et al.*, 2019). Tem sido utilizado em estudos clínicos em humanos (ARTZI; TAL; DAYAN, 2000; ZITZMANN *et al.*, 2001) e em animais (OLIVEIRA *et al.*, 2015) para preservar o rebordo alveolar após exodontias (NEVINS *et al.*, 2011), levantamento de seio maxilar (HALLMAN *et al.*, 2005; RIACHI *et al.*, 2012), aumento horizontal de rebordo alveolar (HÄMMERLE, LANG, 2001) e deiscências ósseas associadas à instalação de implantes (CANEVA *et al.*, 2011).

O Bio-Oss® possui biocompatibilidade e excelentes propriedades osteocondutoras (AL RUHAIMI, 2001; BALDINI; DE SANCTIS; FERRARI, 2011), sendo considerado superior quando comparado a outros substitutos ósseos (IEZZI *et al.*, 2008; STAUROPOULOS *et al.*, 2003). Existem relatos de que o Bio-Oss® possui índices de osteocondutividade similares aos do enxerto ósseo autógeno (CARMAGNOLA *et al.*, 2000; DE SANTIS *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2020).

De Santis *et al.* (2011), em um estudo de implantes dentários em cães, indicou que a regeneração óssea em grupos que receberam Bio-Oss® no defeito foi semelhante à do osso autógeno. Kim *et al.* (2020) avaliaram a estabilidade volumétrica e a formação óssea em enxertos na calvária de coelhos, com Bio-Oss®, osso autógeno e osso autógeno associado ao Bio-Oss®. Também não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à área óssea neoformada. Mas o uso de Bio-Oss® isoladamente e Bio-Oss® associado ao osso autógeno na proporção de 75% e 25%, respectivamente, apresentaram estabilidade dimensional superior em relação ao uso isolado de osso autógeno.

Essa evidenciação pode ser justificada, já que o Bio-Oss® não é completamente reabsorvível, devido a reabsorção lenta de suas partículas (SKOGLUND *et al.*, 1997). Corroborando com esses resultados, Mordenfeld *et al.* (2010) avaliaram espécimes obtidos de enxertos ósseos realizados em procedimentos de elevação dos seios maxilares com Bio-Oss® e constataram que a porcentagem média de partículas residuais foi de 17,3% após 11 anos de acompanhamento.

O uso de fatores de crescimento, isoladamente e em combinação com Bio-Oss® ou outros materiais de enxerto parecem melhorar a regeneração óssea. O Bio-Oss® pode fornecer um veículo de transporte adequado para fatores de crescimento e permitir o reparo mais rápido de defeitos ósseos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

2.2 SUBSTITUTOS ÓSSEOS BOVINOS – CERABONE®

Uma das propriedades solicitadas dos substitutos ósseos é a sua capacidade de ser absorvido e substituído por um novo osso a uma velocidade adequada (ZHAO *et al.*, 2020). Ressalta-se que reabsorções muito lentas dos enxertos podem aumentar as taxas de inflamação tecidual e afetar a neoformação óssea, sendo identificados vários anos após o procedimento de enxertia (MANGANO *et al.*, 2014; MORDENFELD *et al.*, 2010; TRISI; MARCATO; TODISCO, 2003). A reabsorção do osso bovino inorgânico depende de vários fatores, como sua natureza cortical ou esponjosa, seu tamanho de partícula, desproteinização e sinterização química (TADIC; EPPLE, 2004).

Demonstrou-se que o tratamento a altas temperaturas pode ter um efeito positivo sobre a ultraestrutura da matéria-prima e possivelmente sobre o seu potencial regenerativo (TAWIL *et al.*, 2018). Kayyk *et al.* (2021) observaram que xenoenxertos sinterizados em altas temperaturas, como o Cerabone®, apresentaram um aumento significativo na viabilidade osteoblástica e atividade metabólica, quando comparado a outros materiais processados em temperaturas mais baixas. Além disso, vários tratamentos físicos e químicos para purificar xenoenxertos de componentes imunogênicos podem influenciar o seu potencial de cicatrização, pois restos orgânicos residuais podem induzir reações imunes (KIM; NOWZARI; RICH, 2013).

O biomaterial Cerabone® é produzido por meio de tratamento de temperatura de três estágios, incluindo uma sinterização final de 1.250° C para desproteinização total, eliminando todos os componentes orgânicos. Por conter a parte inorgânica sinterizada do osso, hidroxiapatita, foi demonstrado que o Cerabone® se assemelha à estrutura do osso natural com alta porosidade e superfície rugosa (PERIĆ KAČAREVIĆ *et al.*, 2018; ROTHAMEL *et al.*, 2012; TADIC; EPPLE, 2004; TRAJKOVSKI *et al.*, 2018).

O Cerabone® é um material de enxerto ósseo bovino natural, derivado do osso esponjoso dos cêndilos femorais do gado doméstico (KONERMANN *et al.*, 2014). Pode ser utilizado na forma de partículas (0,5 a 1 mm ou 1 a 2 mm) ou em forma de bloco altamente poroso (TADIC; EPPLE, 2004).

Estudos avaliaram a eficácia do Cerabone® em cirurgias ortopédicas (HUBER, 2006), no aumento do assoalho nasal (MAZOR, 2012), no

levantamento de seio maxilar (PANAGIOTOU *et al*, 2015; RIACHI *et al*, 2012; TAWIL *et al*, 2018) e na preservação alveolar (KOLLATI P. *et al*, 2019; PAPAGIANNOULIS *et al.*, 2012) com relatos bem-sucedidos.

Tawil *et al.* (2018) realizaram levantamento de seio maxilar, seguido de enxerto com Cerabone® em 30 pacientes, apresentando graves perdas ósseas em região posterior de maxila. Implantes foram colocados onde a qualidade óssea do rebordo residual permitia boa estabilidade primária. Nos casos em que a qualidade óssea residual não permitiu a inserção do implante, aguardou-se 6 meses para a maturação do enxerto. Amostras de biópsia foram analisadas em períodos de até 60 semanas. O osso recém-formado foi encontrado cobrindo a maioria das áreas superficiais dos grânulos do material, indicando um bom potencial osteocondutivo. A reabsorção do biomaterial mostrou-se contínua durante as fases inicial e tardia da cicatrização, demonstrando que a alta temperatura para a desproteínização não pareceu afetar negativamente seu potencial osteocondutor ou de reabsorção. Dessa forma, o osso bovino sinterizado de alta temperatura mostrou ser um material osteocondutivo de reabsorção lenta e eficaz.

Também se comparou Cerabone® e Bio-Oss®, radiográfica e histomorfometricamente, em oito pacientes com altura óssea alveolar residual menor que 5 mm, os quais foram submetidos a aumento bilateral do seio maxilar e posterior colocação de implantes. Nenhuma diferença estatística foi encontrada e ambos demonstraram ser eficazes na reabilitação de maxilas atroficas (PANAGIOTOU *et al*, 2015).

Investigou-se a influência das propriedades químicas e físicas de Bio-Oss® e Cerabone® na taxa de reabsorção de enxertos sinusais de 22 pacientes. Após 8 meses de cicatrização implantes foram inseridos. Observou-se que o tamanho médio de partícula de Bio-Oss® foi menor, resultando em maior área superficial e maior taxa de liberação de cálcio. Estas pequenas diferenças foram associadas com uma perda volumétrica significativamente maior do tamanho inicial do enxerto com Bio-Oss® comparado ao Cerabone®. Dessa forma se demonstrou que as propriedades químicas e físicas do material influenciam significativamente o seu potencial de regeneração óssea (RIACHI *et al*, 2012).

Com base em uma revisão dos dados resumidos da literatura, comparando-se osso bovino sinterizado (Cerabone®) e não sinterizado (Bio-

Oss®), embora ambos sejam biocompatíveis e tenham propriedades osteocondutoras, a maior porcentagem de osso recém-formado, avaliando-se o mesmo período, foi encontrada utilizando Cerabone® (PERIĆ KAČAREVIĆ *ET AL.*, 2018).

Sargolzaie *et al.* (2018) avaliaram neoformação óssea e comportamento tecidual após o procedimento de preservação alveolar comparando Cerabone® e sulfato de cálcio hemi-hidratado em alvéolos mandibulares de cães. Como resultado, não observaram diferença estatística entre os grupos comparados para neoformação óssea, proporção de tecido e presença de células inflamatórias. Contudo, a ausência de células inflamatórias nos períodos de 4 e 8 semanas no grupo Cerabone®, indicaram uma capacidade adequada de substituição por osso neoformado na área enxertada, com poucas partículas remanescentes.

Kollati *et al.* (2019) realizaram um estudo com 25 pacientes que necessitaram de extração de pelo menos dois dentes não adjacentes. Um alvéolo foi submetido a um procedimento de preservação utilizando o Cerabone® com PRF e o outro foi submetido apenas a extração atraumática. Parâmetros como perda de largura e altura da crista foram medidos clinicamente e radiograficamente no início do tratamento e após 6 meses de preservação. Os resultados sugeriram que o procedimento de preservação da cavidade utilizando Cerabone® com PRF foi um método confiável que minimizou a perda óssea alveolar.

2.3 FIBRINA RICA EM PLAQUETAS

O PRP foi descrito como a primeira geração de concentrados de plaquetas em 1998 (MARX *et al.*, 1998) e a sua utilização tópica foi considerada uma biotecnologia promissora, devido a capacidade de estimulação do reparo de tecidos moles e duros (ANITUA *et al.*, 2006; LUCARELLI *et al.*, 2010). No entanto, os efeitos do PRP estão sendo questionados, pois alguns estudos sugerem que a rápida liberação dos fatores de crescimento produza um benefício imediato e passageiro, pouco significativo para a reparação tecidual, principalmente em relação à regeneração óssea (HE *et al.*, 2009; RAO *et al.*, 2012). Além disso, o protocolo para a obtenção do PRP é complexo, exigindo a

adição de anticoagulantes ao sangue coletado (KANG *et al.*, 2011; THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011) e uma centrifugação de um ou dois passos (CHANG; ZHAO, 2011; KEYHAN *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013).

Dessa forma, outros materiais que contribuam para regeneração óssea estão sendo desenvolvidos. Vários trabalhos têm mostrado que o PRF promove uma liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento (WU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012), por pelo menos uma semana, podendo chegar a 28 dias (KANG *et al.*, 2011). Assim, exerce efeito sobre o processo de reparo tecidual por um período relativamente longo, criando condições favoráveis para que o reparo ocorra de forma mais adequada (ROY *et al.*, 2011).

A obtenção do PRF é relativamente simples, através da centrifugação rápida do sangue do próprio paciente em uma única etapa, sem a adição de anticoagulantes ou trombina exógena (DOHAN *et al.*, 2004; RAO *et al.*, 2012; TAJIMA *et al.*, 2013), já que os anticoagulantes são agentes que inibem a cicatrização de feridas (MIRON *et al.*, 2017). Além da mínima manipulação bioquímica do sangue (TUNALI *et al.*, 2013), requer um arsenal mínimo de materiais, restringindo-se a tubos de ensaio esterilizados, seringas descartáveis e uma centrífuga (SINGH; KOHLI; GUPTA, 2012).

A ativação da maioria das plaquetas é possível pela ausência de anticoagulante, dando início à cascata de coagulação. Em seguida, a trombina circulante transforma o fibrinogênio concentrado na parte superior do tubo em rede de fibrina (KUMAR; SUBHASHINI, 2013). A produção da fibrina por vias naturais impede que os fatores de crescimento sejam degradados por proteolisinas e assim mantêm-se ativos por um período maior, promovendo uma estimulação da regeneração tecidual mais prolongada (LUNDQUIST *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2012).

O PRF é um concentrado autólogo plaquetário de segunda geração, que contém fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento transformador beta e fator angiogênico derivado de plaquetas (PETERSON *et al.*, 2010). Além disso, as plaquetas secretam fibrina, fibronectina e vitronectina, que modulam a resposta dos tecidos e comportam-se como matriz para o tecido conjuntivo e moléculas de adesão, resultando em recrutamento celular mais eficiente na área da ferida. Um maior número de

plaquetas pode resultar na ativação e agregação de plaquetas subsequentes que servem como cola molecular (DE PASCALE *et al.*, 2015).

O PRF tem sido utilizado sozinho ou em combinação com xenoenxertos, com o objetivo de promover a regeneração óssea e aumentar a quantidade de osso neoformado, aumentando as células osteoprogenitoras na área enxertada (JEONG *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

As vantagens clínicas do PRF quando usadas em combinação com osso mineral bovino desproteínizado ainda permanecem controversas (NIZAM *et al.*, 2017). Nenhum efeito citotóxico do PRF foi notado, demonstrando uma grande biocompatibilidade (HUANG *et al.*, 2010). Em relação à regeneração óssea os estudos são escassos, embora já existam evidências de crescimento e proliferação de osteoblastos humanos em contato com o PRF (KANG *et al.*, 2011; 2012; WU *et al.*, 2012) e uma capacidade superior de estimulação da mineralização em relação ao PRP (HE *et al.*, 2009).

Algumas aplicações clínicas do PRF em cirurgias plásticas (KUMAR; SUBHASHINI, 2013), em cirurgia oral de implantes dentários (CASTRO *et al.*, 2017) e cirurgias periodontais já foram relatadas (CHANG; ZHAO, 2011). O PRF tem sido utilizado como membrana na regeneração tecidual guiada (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011), como material de substituição tecidual na cobertura radicular (EREN; ATILLA, 2014) e como material de enxerto em procedimentos de aumento do seio maxilar (MAZOR *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012).

A terminologia do PRF foi alterada para fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), por conter plaquetas e leucócitos de forma concentrada, portanto uma matriz de fibrina leucoplaquetária, mas ainda pertence à segunda geração de plaquetas (DOHAN *et al.*, 2014; FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017; YOU *et al.*, 2019). As alterações metodológicas na obtenção dos agregados plaquetários, como variações na força g, tempo de rotação, ângulo do rotor e tipos de tubos podem resultar em matrizes distintas.

Dessa forma, uma formulação injetável do PRF, denominado i-PRF, em que se utiliza tubo de plástico, sem adição de qualquer aditivo, tem sido desenvolvida para que os profissionais possam utilizar de forma mais fácil um concentrado de plaquetas em formulação líquida, o qual pode ser utilizado sozinho ou combinado facilmente com vários biomateriais (MIRON *et al.*, 2017).

O i-PRF foi desenvolvido em 2014 por meio da modificação da força de centrifugação (WANG *et al.*, 2017b). Observou-se que uma maior porcentagem de células, incluindo plaquetas e leucócitos, permanecem no compartimento superior dos tubos de centrifugação onde o i-PRF é coletado, fornecendo assim mais células capazes de auxiliar na regeneração de tecidos e na liberação de moléculas pró-cicatrização de feridas (WANG *et al.*, 2019). Wang *et al.* (2017a) demonstrou em um estudo *in vitro* que o i-PRF foi capaz de induzir maior migração, proliferação e diferenciação dos osteoblastos humanos quando comparada ao PRP.

Miron *et al.* (2017) coletaram amostras de sangue de 6 doadores voluntários e o sangue foi então processado para preparação de PRP e i-PRF. Para preparação de i-PRF, dois tubos de 10 ml de sangue, sem o uso de anticoagulantes, foram centrifugados e então foi coletado i-PRF da camada superior de líquido. Em comparação com o PRP, o i-PRF induziu maior migração de fibroblastos, expressão de fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento transformador beta e colágeno tipo I, demonstrando que uma formulação líquida potente de concentrados de plaquetas pode ser obtida sem uso de anticoagulantes.

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

3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de análise histomorfométrica, a ação na regeneração óssea do Bio-Oss[®], Cerabone[®] e i-PRF, isoladamente ou associando o i-PRF aos xenoenxertos, criando-se defeitos ósseos críticos em calvária de ratos sistemicamente saudáveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Todo protocolo experimental foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – Unifal - MG (nº de registro: 60/2018 - ANEXO A).

Foram utilizados 68 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), machos, com idade média de 7 semanas e peso entre 200 e 300 gramas (Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas - Unifal – MG). Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental. Quatro animais foram a óbito durante o período experimental e oito animais foram utilizados como ratos doadores para obtenção de i-PRF, totalizando 56 ratos restantes. Os animais foram escolhidos aleatoriamente, através de sorteio, divididos em 7 grupos de 8 animais cada. Foram realizados dois defeitos cirúrgicos em cada rato, os quais receberam o mesmo tipo de enxerto. Em cada grupo experimental 4 animais foram eutanasiados após 30 dias e 4 foram eutanasiados após 60 dias, dessa forma 8 defeitos ósseos foram avaliados em cada período pós-operatório. A divisão dos grupos está ilustrada no final do presente trabalho (APÊNDICE A). O tamanho amostral foi calculado (software GPower v3.1.9.2) segundo um tamanho de efeito de 0,4, com um nível de significância de 5% e 80% de poder, demonstrando a necessidade de no mínimo 14 defeitos cirúrgicos por grupo. Os grupos estão descritos abaixo.

4.1.1 Grupos Controle

OA: osso autógeno (controle positivo);

CG: coágulo (controle negativo).

4.1.2 Grupos Experimentais

BO: osso bovino Bio-Oss®, Geistlich;

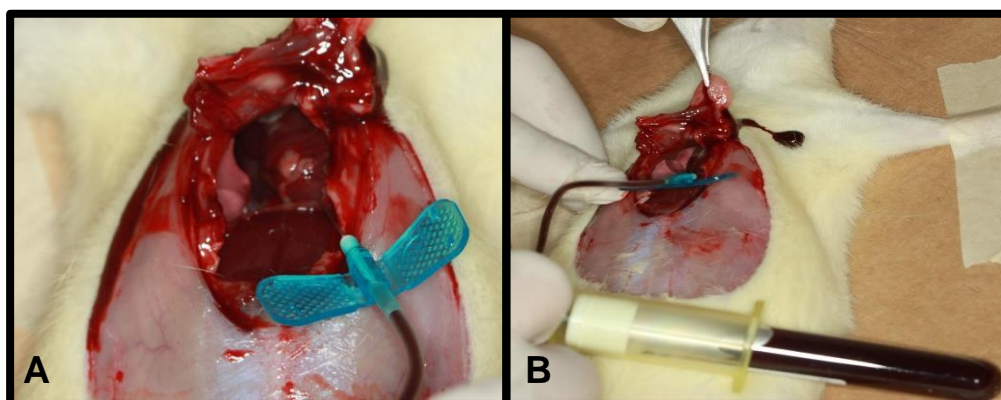
CB: osso bovino Cerabone[®], Straumann;
i-PRF: fibrina rica em plaquetas injetável homogênea;
BOPRF: Bio-Oss[®] associado ao i-PRF;
CBPRF: Cerabone[®] associado ao i-PRF.

4.2 PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL

4.2.1 Punção intracardíaca e retirada do sangue

Realizou-se a punção intracardíaca com escalpe BD Vacutainer[®] Safety-Lok[™] Blood Collection Set (0,8 x 19mm x 178mm) diretamente no ventrículo esquerdo do animal e utilização de tubo Vacuette[®] tampa branca 9 ml (Z, sem aditivos), conforme mostrado na Figura 1. O volume sanguíneo retirado nos ratos doadores para obtenção do i-PRF homogêneo foi de aproximadamente 7 ml e centrifugado imediatamente.

Figura 1- Punção intracardíaca e retirada do sangue.



Fonte: Do autor.

Legenda:

- A) Punção intracardíaca no ventrículo esquerdo do rato doador;
- B) Utilização de escalpe BD Vacutainer[®] e tubo Vacuette[®].

4.2.2 Separação celular

A separação dos elementos do sangue foi realizada por centrifugação (Centrífuga FibrinFuge25[®], Montserrat). Seguindo as orientações do fabricante, o sangue coletado foi centrifugado, uma única vez a 2700 rpm, por 6 minutos,

sem a adição de qualquer anticoagulante, como preconizado por Dohan *et al.* (2006). Com o término desse processo foi possível observar uma área de cor alaranjada na parte superior (i-PRF) e as células vermelhas do sangue no fundo do tubo. Em seguida, os tubos foram abertos cuidadosamente para não ocorrer a homogeneização do material e foram utilizadas uma seringa e uma agulha hipodérmica para coletar o i-PRF (FIGURA 2).

Figura 2 - Obtenção de fibrina rica em plaquetas injetável.



Fonte: Do autor.

Legenda:

- A) Volume sanguíneo retirado do rato doador;
- B) Após a centrifugação do sangue coletado se observa uma área de cor alaranjada na parte superior e as células vermelhas do sangue no fundo do tubo;
- C) Seringa e agulha utilizadas para coletar o i-PRF na parte superior do tubo.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (10mg/kg) (Xilazin®, Syntec, Brasil) e quetamina (90mg/kg) (Dopalen®, Ceva, Brasil). Os olhos dos animais foram protegidos com gaze umedecida com soro fisiológico. Realizou-se tricotomia na região fronto-parietal da calvária dos

animais e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine[®], Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Os animais receberam anestesia local via subcutânea com lidocaína 1% e epinefrina (1:100.000). Incisão em “U” com base caudal foi realizada na calvária dos ratos com lâmina de bisturi 15c e um retalho de espessura total foi descolado em direção posterior. Realizou-se dois defeitos no sentido crânio-caudal de tamanho crítico na calvária de cada rato, para diminuir o tamanho da amostra, um mais anterior e o outro mais posterior, com broca trefina de 6mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Brasil) acoplada em motor elétrico NSK, rotação 1200 rpm, sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Fisiológico 0,9%, Equiplax[®], Aparecida de Goiânia, GO, Brasil).

Após a confecção dos dois defeitos críticos, os grupos receberam os respectivos enxertos. O grupo controle positivo recebeu enxerto autógeno (grupo OA) e no grupo controle negativo houve o fechamento da ferida com coágulo (grupo CG). O grupo que recebeu o osso autógeno teve a circunferência óssea ostectomizada e particulada em um moedor de osso, em seguida o osso triturado foi colocado novamente na região dos defeitos. O grupo coágulo teve os defeitos confeccionados com a trefina, exérese da circunferência óssea e o fechamento da ferida com apenas o preenchimento de coágulo sanguíneo na região do defeito.

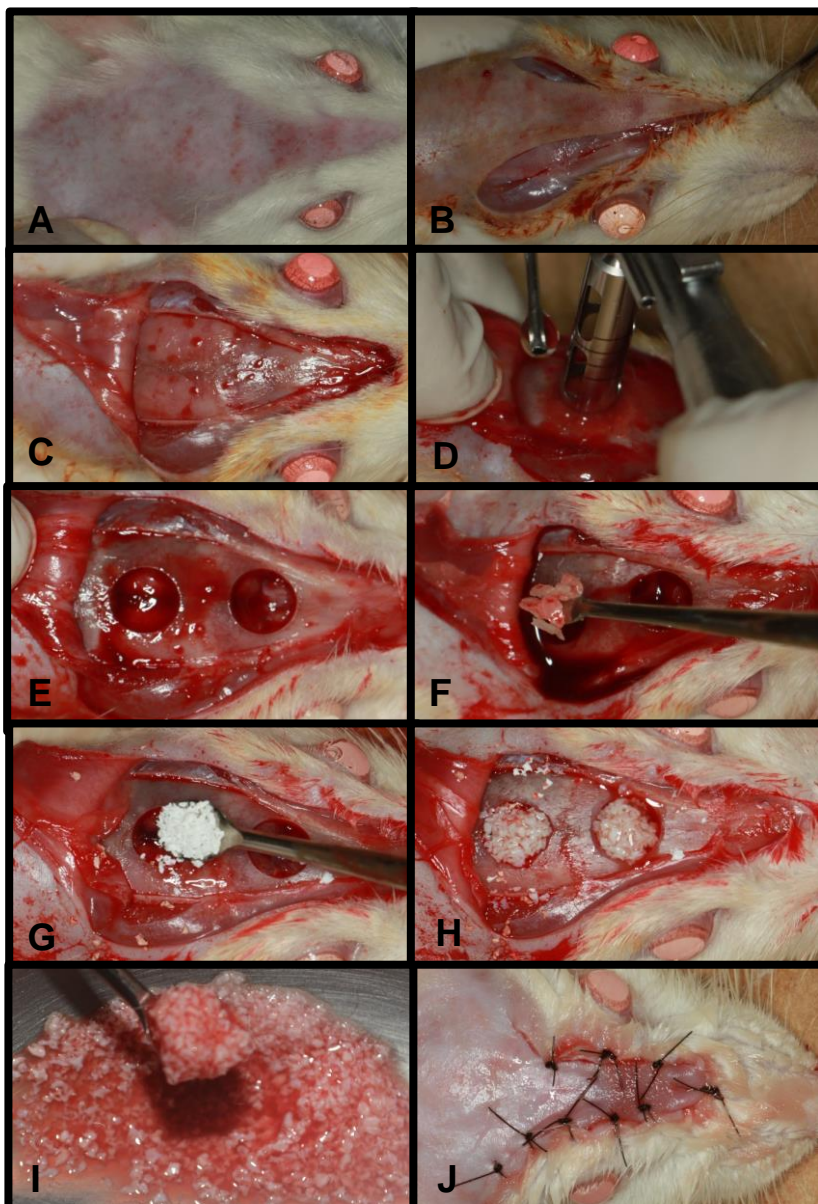
Os defeitos dos grupos experimentais foram preenchidos com Bio-Oss[®] na forma de grânulos de 0,25 - 1,0 mm (grupo BO), Cerabone[®] na forma de grânulos de 0,5 - 1,0 mm (grupo CB), i-PRF homogêneo (grupo i-PRF), Bio-Oss[®] associado ao i-PRF (grupo BOPRF) e Cerabone[®] associado ao i-PRF (grupo CBPRF). Os enxertos foram depositados em uma cuba metálica pequena e umedecidos com soro fisiológico (grupos BO e CB) ou associados ao i-PRF, formando o “sticky bone” (grupos BOPRF e CBPRF), em seguida foram inseridos nos defeitos com uma colher medidora. Os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de nylon 3.0 (Ethicon, Johnson&Johnson, Brasil) (FIGURA 3).

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de Pentabiótico[®] Veterinário 1.200.000 UI (Zoetis, Brasil) de 0,03 ml para ratos com peso de 400 gramas, via intramuscular e uma dose de 0,2 ml de anti-inflamatório Meloxicam 0,2% (Elo-xicam, Chemitec[®], Brasil). Também se aplicou dose analgésica de 0,06 ml de cloridrato de tramadol 50mg/ml, por via intraperitoneal. As doses

analgésicas foram administradas ao final do procedimento e por mais 3 dias. O acompanhamento foi realizado todos os dias na primeira semana do pós-operatório e em seguida de 15 em 15 dias para avaliação clínica.

A metodologia descrita já foi previamente utilizada em outros trabalhos (DO LAGO *et al.*, 2019; MESSORA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2015), mas com modificações, como dois defeitos cirúrgicos por animal, para reduzir o tamanho da amostra (HAYASHI *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2020).

Figura 3 - Criação do defeito crítico e preenchimento com os respectivos enxertos.



Fonte: Do autor.

Legenda:

- A) Tricotomia fronto-parietal;
- B) Incisão em "U" com base caudal;
- C) Retalho de espessura total;

- D) Criação dos defeitos com broca trefina 6mm e irrigação com soro fisiológico;
- E) Circunferências correspondentes ao tamanho dos defeitos;
- F) Preenchimento do defeito ósseo com osso autógeno particulado.
- G) Aspecto das partículas de CB;
- H) Defeito ósseo preenchido com BO;
- I) Aspecto do BOPRF;
- J) Reposicionamento do retalho e sutura.

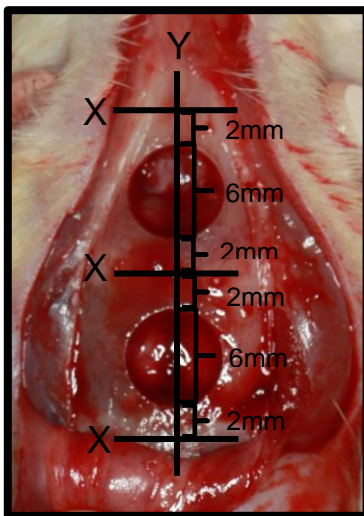
4.4 EUTANÁSIA

Em conformidade com as normas do CONCEA para a prática da eutanásia, o método escolhido deve garantir a perda de consciência de forma rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável, ou seja, o animal não deve apresentar dor, estresse, apreensão ou ansiedade. O método escolhido foi a eutanásia pela câmara de CO₂, que possui um rápido início de ação, causa imediata perda de consciência e, portanto, mínimo desconforto ao animal. Os animais foram eutanasiados nos períodos de 30 e 60 dias pós-operatórios.

4.5 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS

As peças foram fixadas em paraformaldeído 4% (ph=7.2) por 24 horas e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda[®], Brasil). Para a obtenção da solução de EDTA 18%, foram utilizadas 250 gramas de pó de edta dissódico, misturadas a 1750 ml de água destilada e 25 gramas de hidróxido de sódio para neutralizar o ph da solução (ph=7). A solução foi trocada do frasco uma vez por semana por 30 dias. Após descalcificação, os dois defeitos de cada rato foram separados através de cortes transversais com distância aproximada de 2 mm das margens dos defeitos, de modo que cada espécime apresentasse 10 mm de extensão no sentido longitudinal. As peças foram processadas e um corte longitudinal ao longo dos centros dos defeitos cirúrgicos originais foi realizado para dividi-los em dois blocos (FIGURA 4), em seguida foram incluídos em parafina. Cortes seriados, com 5 micrômetros de espessura, no sentido longitudinal da peça foram realizados, iniciando a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histológica e histomorfométrica.

Figura 4 - Processamento laboratorial padronizado da redução das peças. Cortes transversais (X) e corte longitudinal ao longo da linha central (Y) no defeito de tamanho crítico.



Fonte: Do autor.

4.6 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Os cortes histológicos foram selecionados de maneira que o defeito cirúrgico original pudesse ser avaliado histomorfometricamente em toda a sua extensão. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (Axiocam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada à um microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com um aumento original de 25x, 50x e 400x (lente objetiva N - Achromplan) e salvas em um computador.

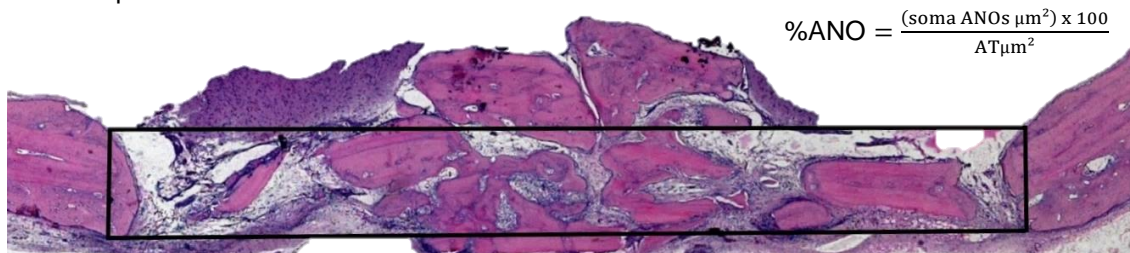
As imagens foram capturadas no *software* "AxioVision Rel. 4.8" e se utilizou sua respectiva barra de escala. O programa permitiu o cálculo da área de formação óssea em micrômetros quadrados. Os seguintes critérios baseados nos trabalhos de Melo *et al.*, (2005), Messoria *et al.*, (2008) e Silva *et al.*, (2016) foram utilizados para padronizar a análise histométrica das imagens digitalizadas:

- a) A área total (AT) analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico. Esta área foi determinada pela identificação das superfícies interna e externa da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas curvaturas. Foram então medidos 2 mm nas extremidades dos espécimes para estabelecer os limites do defeito cirúrgico original. A

altura da área total foi determinada de acordo com a espessura da calota craniana. A área de neoformação óssea (ANO) foi delineada dentro dos limites da AT (FIGURA 5). A ANO foi representada por uma região de intensa atividade celular, matriz osteóide e osso mineralizado com osteócitos, formada a partir da borda do defeito cirúrgico em direção ao centro;

- b) A AT foi medida em μm^2 e considerada 100% da área analisada. A ANO também foi medida em μm^2 e calculada como porcentagem de AT;
- c) Apenas as partículas do enxerto de osso autógeno foram medidas em μm^2 e calculada como porcentagem de AT.

Figura 5 - Padronização do defeito para análise histomorfométrica. Utilização do software AxioVision Rel. 4.8, com o estabelecimento da AT do defeito cirúrgico (linhas em preto). Considerou-se o comprimento total de acordo com as margens do defeito e a altura de acordo com a espessura da calota craniana.



Fonte: Do autor.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ANO foi representada pela porcentagem da área de novo osso em relação à AT do defeito cirúrgico. Os resultados foram expressos pelas estatísticas: média, desvio padrão (média \pm desvio padrão) e mediana. Para a comparação dos fatores grupos (CG, OA, BO, CB, i-PRF, BOPRF, CBPRF) e tempo de avaliação (30 dias e 60 dias) foi utilizado técnica F (ANOVA) e teste de Tukey. A escolha do modelo foi devido à verificação da normalidade dos dados e a igualdade das variâncias, pelos testes Shapiro-Wilk e teste F de Levene, respectivamente.

A significância estatística foi fixada em 5% na decisão dos testes estatísticos. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS na versão 23.

5 RESULTADOS

Quatro animais foram a óbito durante o período experimental. Dois deles morreram durante o período cirúrgico e dois foram eutanasiados no período pós-operatório por demonstrarem sofrimento. Os quatro animais foram substituídos mantendo assim o total de 64 animais. Os animais se mantiveram saudáveis durante todo o período experimental, demonstrando boa tolerabilidade ao procedimento cirúrgico e ausência de sinais de infecção após as intervenções.

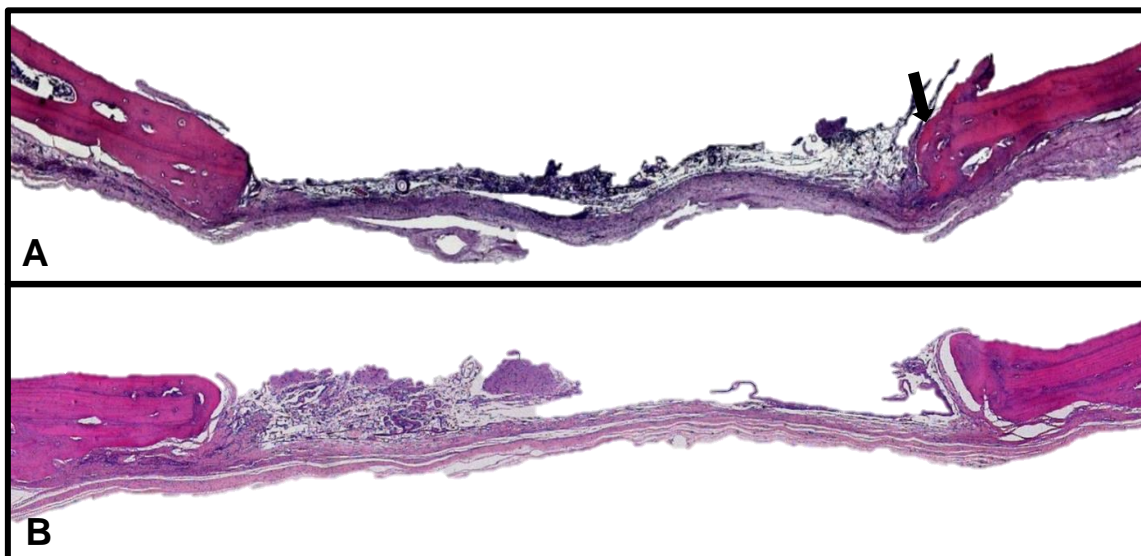
5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO NOS PERÍODOS EXPERIMENTAIS DE 30 E 60 DIAS DE ACORDO COM O MATERIAL UTILIZADO

Ao analisar os cortes histológicos nenhum dos espécimes apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico, mesmo no período experimental de 60 dias. Independente do material utilizado no defeito, não se observou presença de infiltrado inflamatório durante o reparo nos períodos analisados. Como não se comprovou diferença significativa entre os tempos de avaliação de 30 e 60 dias, os grupos foram representados abaixo juntando os dois tempos de avaliação.

5.1.1 Grupo CG

Neoformação óssea foi observada às margens do defeito na maioria dos espécimes. A região do defeito mostrou espessura menor que a espessura da calvária original (FIGURA 6). Fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos foram observados ao longo do defeito, caracterizando predominantemente tecido conjuntivo frouxo (FIGURA 7).

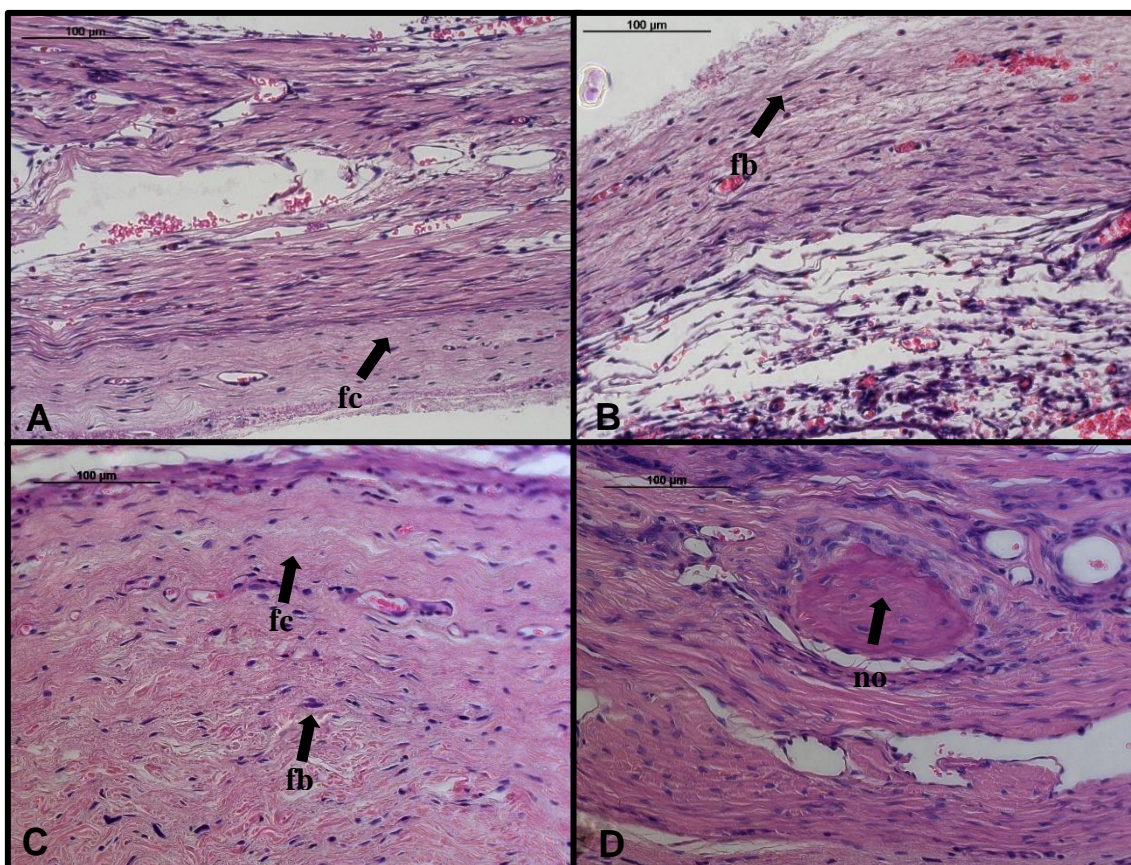
Figura 6 - Visão panorâmica do grupo CG nos períodos experimentais de 30 dias (A) e 60 dias (B). Aumento 25x.



Fonte: Do autor.

Legenda: Seta indicativa de neoformação óssea na margem do defeito.

Figura 7 - Fotomicrografia do grupo CG nos períodos experimentais de 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D). Aumento 400x.



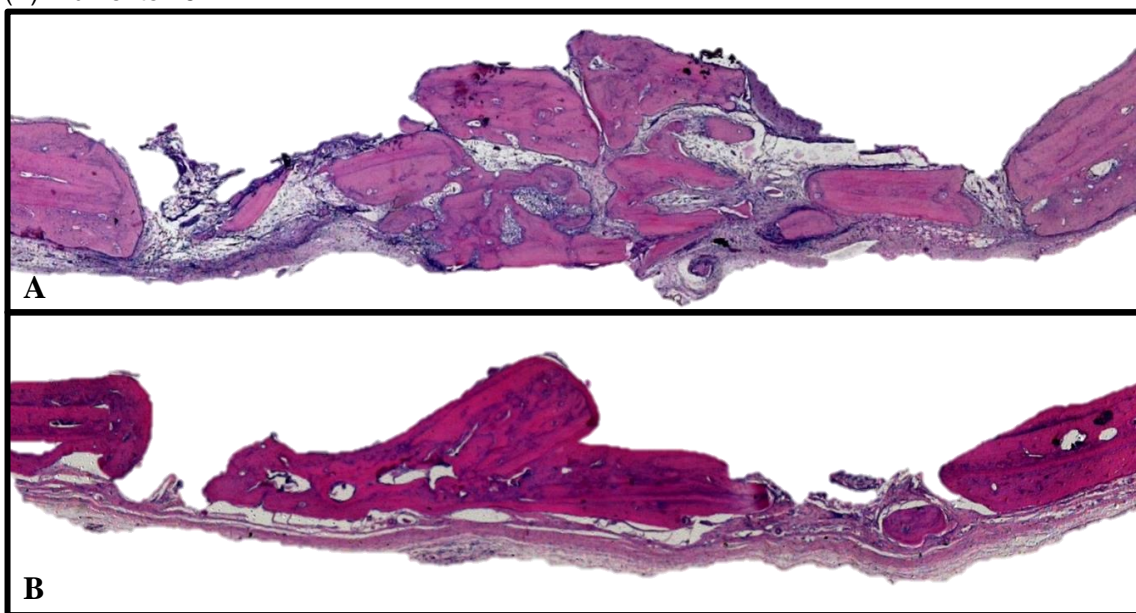
Fonte: Do autor.

Legenda: As setas indicam nas imagens: fibras colágenas (fc), fibroblastos (fb) e neoformação óssea (no).

5.1.2 Grupo OA

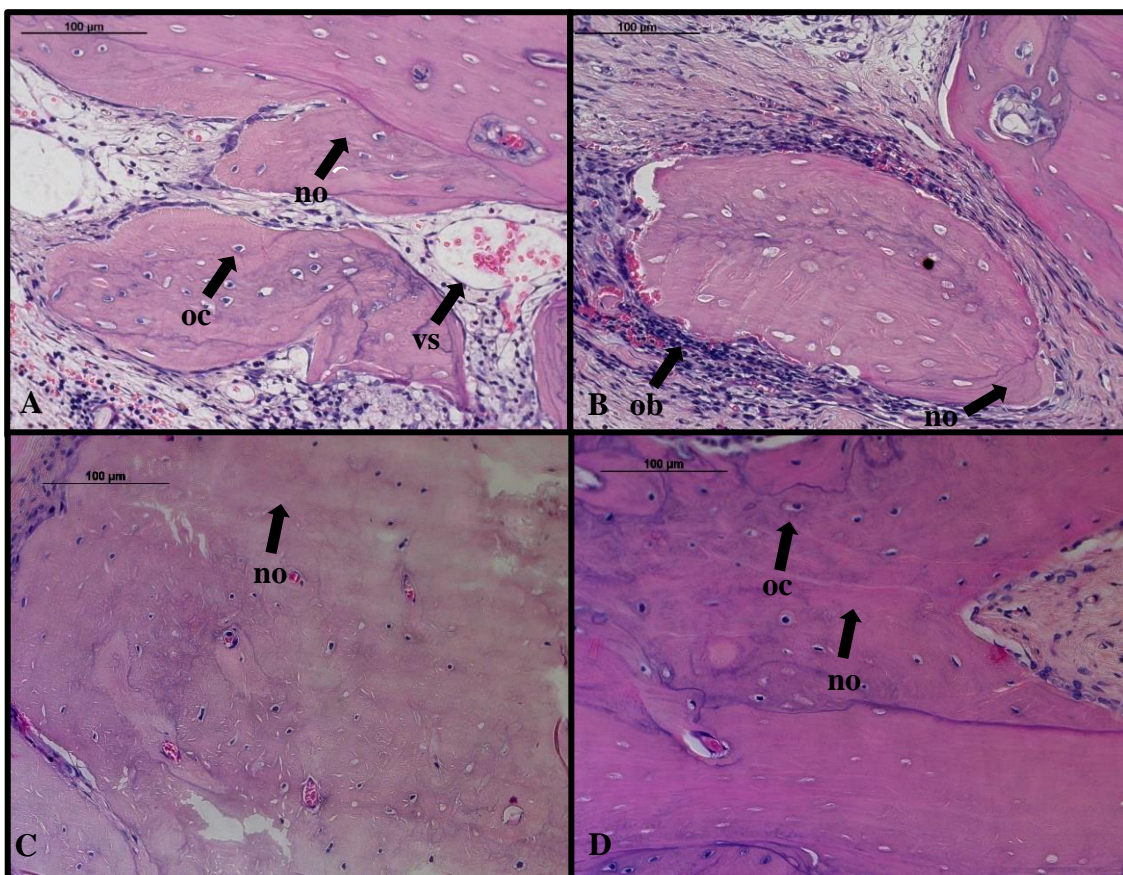
A análise microscópica dos cortes das calvárias mostrou neoformação óssea a partir das bordas do defeito em direção ao centro. As partículas de OA preencheram a maior parte do defeito, com manutenção da espessura da calvária na maioria dos espécimes. (FIGURA 8). As áreas de tecido ósseo neoformado correspondentes a formação da matriz óssea, concentraram-se principalmente entre as partículas do osso triturado. Ao redor das partículas do OA observa-se a presença de células osteoblásticas e matriz extracelular com presença de ostócitos, sugerindo o processo de osseointegração do osso enxertado. As partículas de OA encontravam-se distribuídas ao longo do defeito e circundadas predominantemente por tecido conjuntivo denso e bem organizado. Vasos sanguíneos também foram observados (FIGURA 9).

Figura 8 - Visão panorâmica do grupo OA nos períodos experimentais de 30 dias (A) e 60 dias (B). Aumento 25x.



Fonte: Do autor.

Figura 9 - Fotomicrografia do grupo OA nos períodos experimentais de 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D). Aumento 400x.



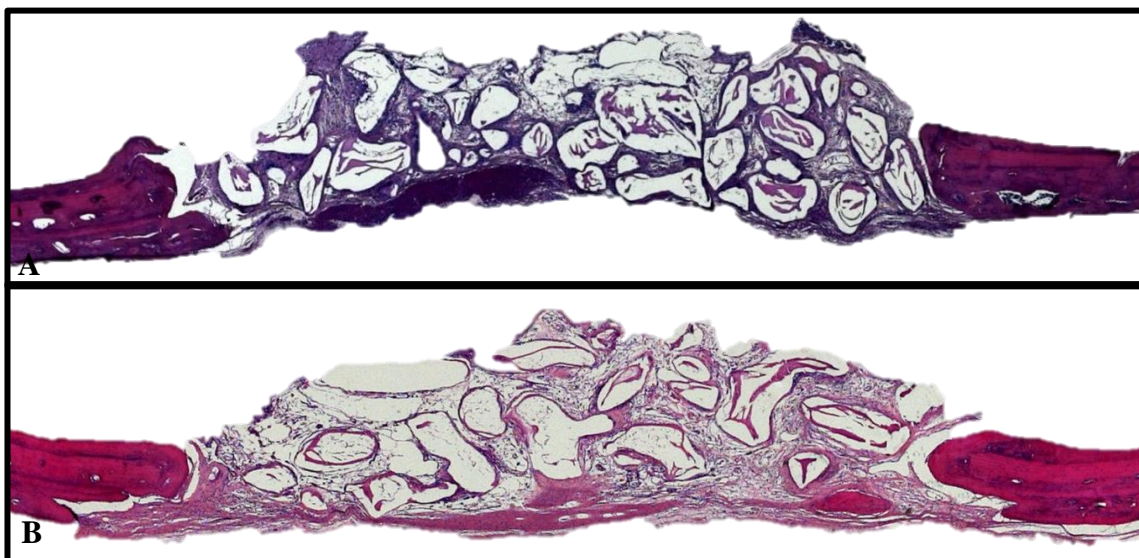
Fonte: Do autor.

Legenda: As setas indicam nas imagens: neoformação óssea (no), osteócitos (oc), vaso sanguíneo (vs) e osteoblastos (ob).

5.1.3 Grupo BO

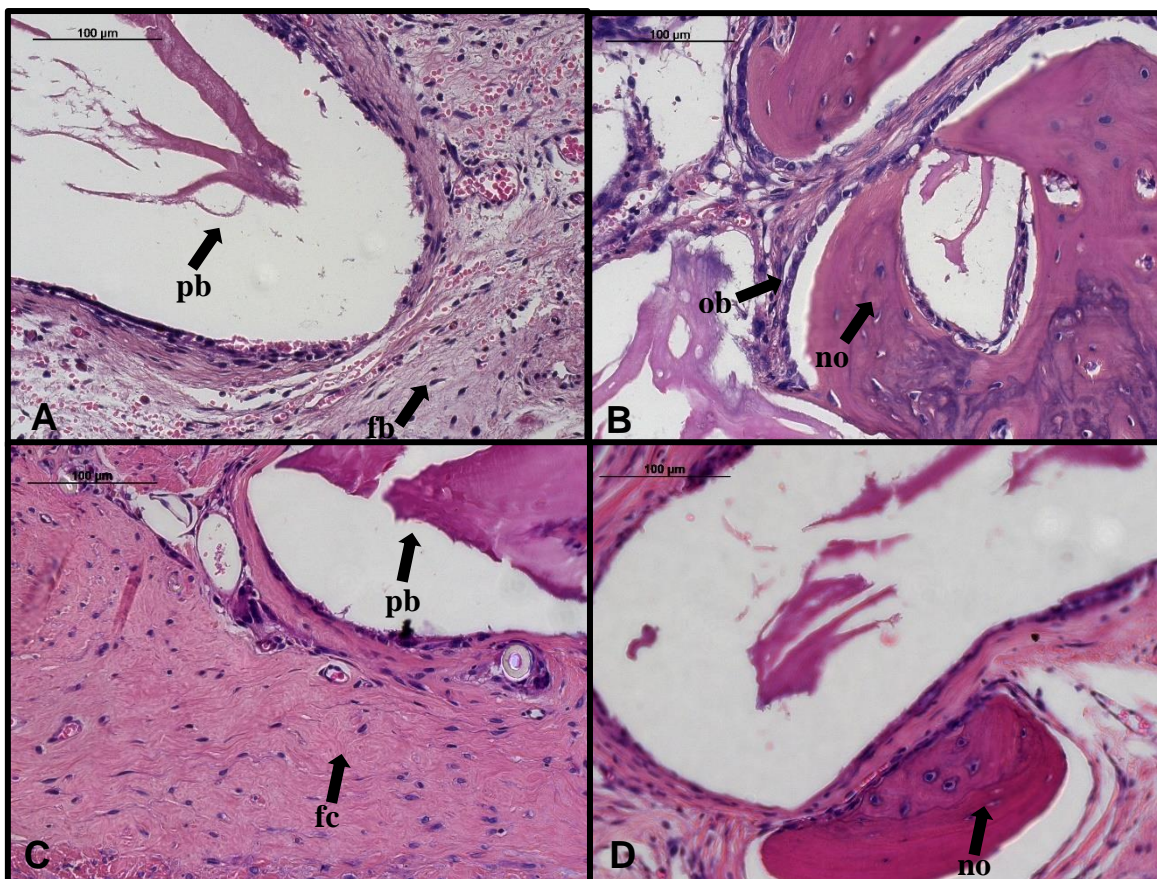
Osso neoformado foi observado nas margens do defeito. As partículas de BO preencheram a maior parte do defeito, mantendo a espessura da calvária original (FIGURA 10). Presença de tecido conjuntivo rico em fibroblastos, foi observado envolvendo as partículas de BO. Pontuais neoformações de tecido ósseo entre as partículas de BO caracterizadas pela presença de matriz óssea contendo osteócitos, osteoblastos e vasos sanguíneos foram observadas (FIGURA 11).

Figura 10 - Visão panorâmica do grupo BO nos períodos experimentais de 30 dias (A) e 60 dias (B). Aumento 25x.



Fonte: Do autor.

Figura 11 - Fotomicrografia do grupo BO nos períodos experimentais de 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D). Aumento 400x.



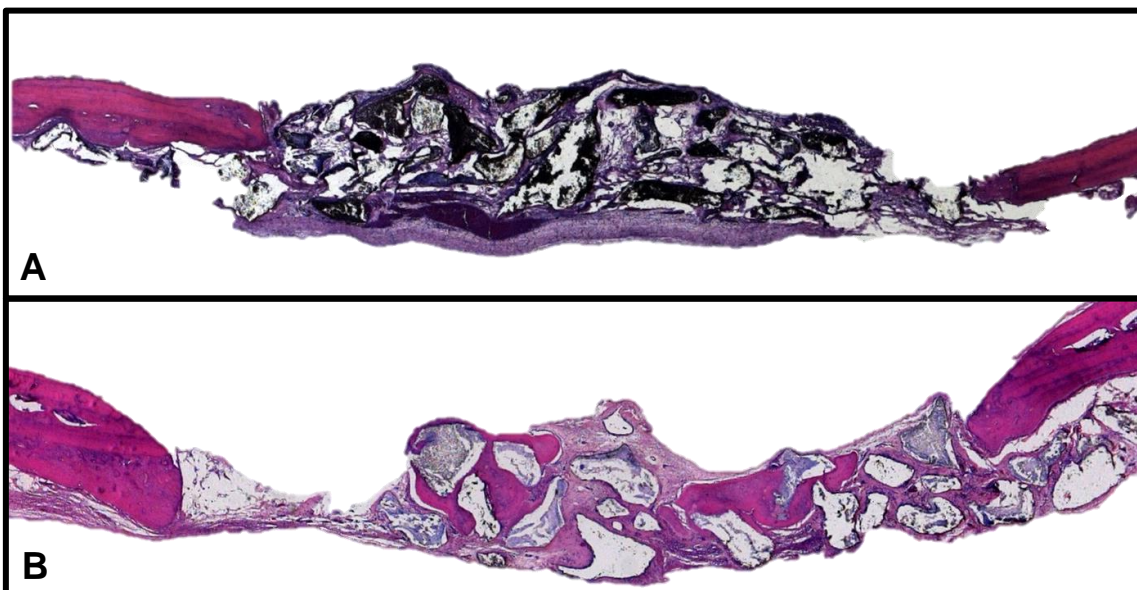
Fonte: Do autor.

Legenda: As setas indicam nas imagens: partícula de BO (pb), fibroblastos (fb), osteoblastos (ob), neoformação óssea (no) e fibras colágenas (fc).

5.1.4 Grupo CB

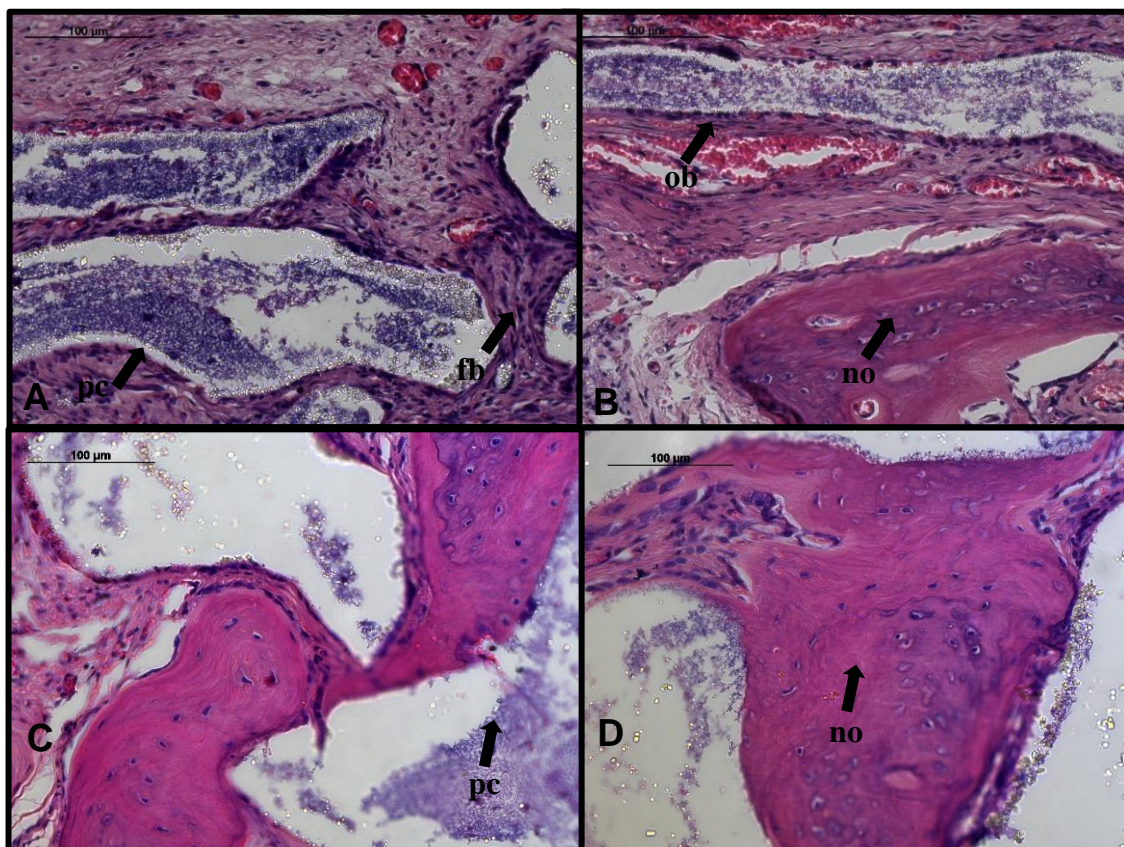
Neoformação óssea foi observada junto às margens do defeito. As partículas de CB preencheram a maior parte do defeito, mantendo a espessura da calvária original (FIGURA 12). Tecido conjuntivo rico em fibroblastos, além de matriz óssea, osteoblastos e vasos sanguíneos foram observados. Há presença de osso neoformado envolvendo as partículas de CB. (FIGURA 13).

Figura 12 - Visão panorâmica do grupo CB nos períodos experimentais de 30 dias (A) e 60 dias (B). Aumento 25x.



Fonte: Do autor.

Figura 13 - Fotomicrografia do grupo CB nos períodos experimentais de 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D). Aumento 400x.



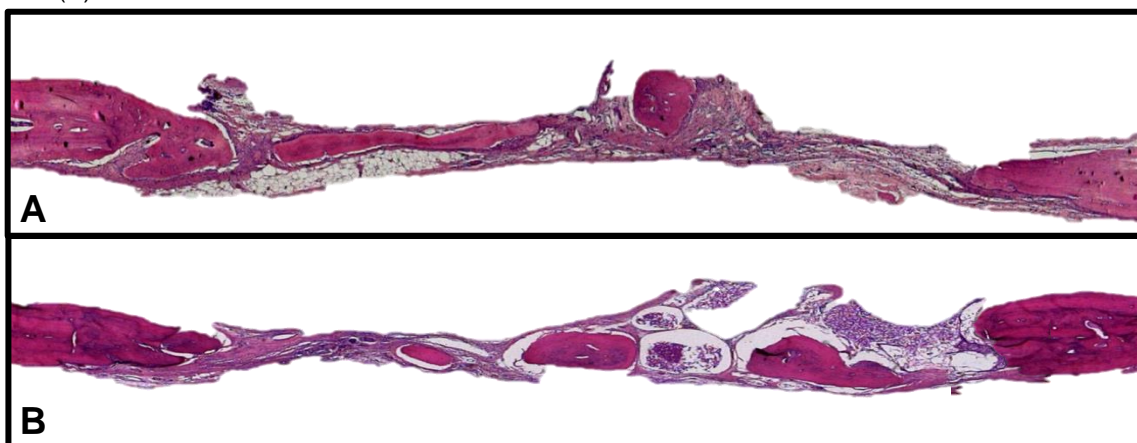
Fonte: Do autor.

Legenda: As setas indicam nas imagens: partícula de CB (pc), fibroblastos (fb), osteoblastos (ob) e neoformação óssea (no).

5.1.5 Grupo i-PRF

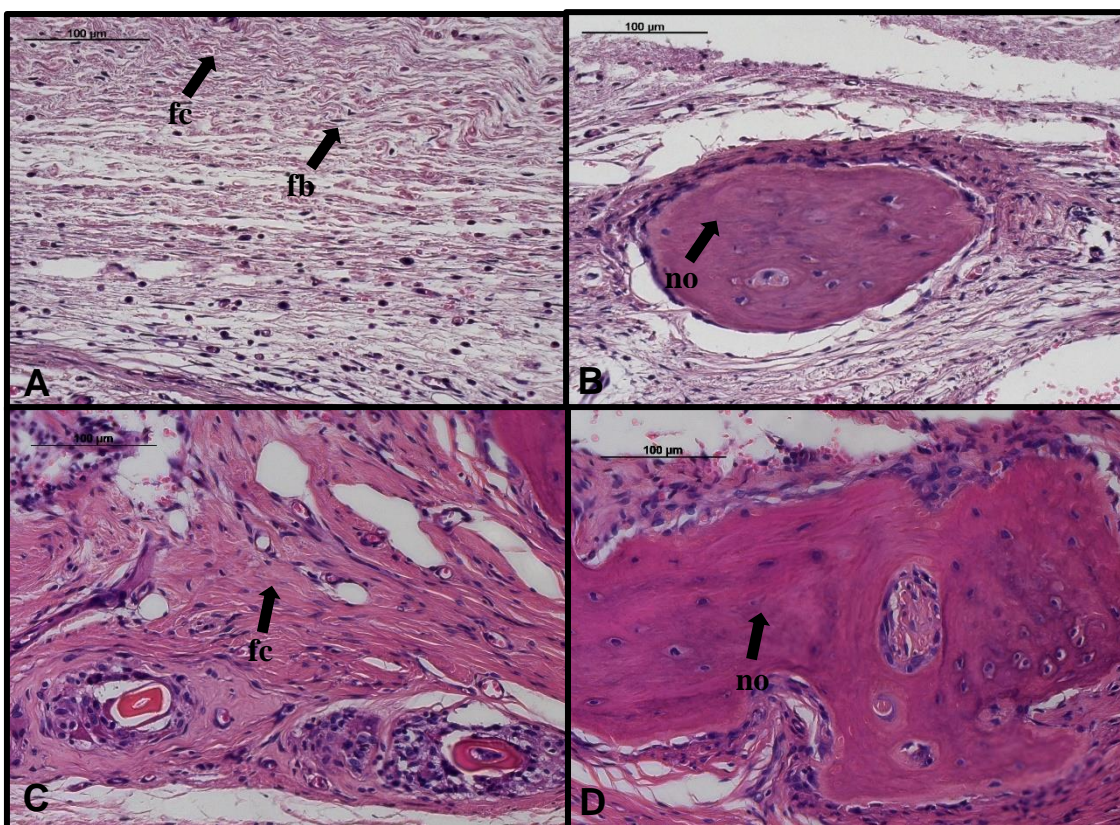
Foi notada neoformação óssea nas margens e centro do defeito (FIGURA 14). Parte do defeito se encontrava repleta de tecido conjuntivo com presença de fibroblastos e em algumas regiões com várias fibras colágenas. Regiões de neoformação óssea foram observadas no centro do defeito na maioria dos espécimes (FIGURA 15).

Figura 14 - Visão panorâmica do grupo i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias (A) e 60 dias (B). Aumento 25x.



Fonte: Do autor.

Figura 15 - Fotomicrografia do grupo i-PRF nos períodos experimentais de 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D). Aumento 400x.



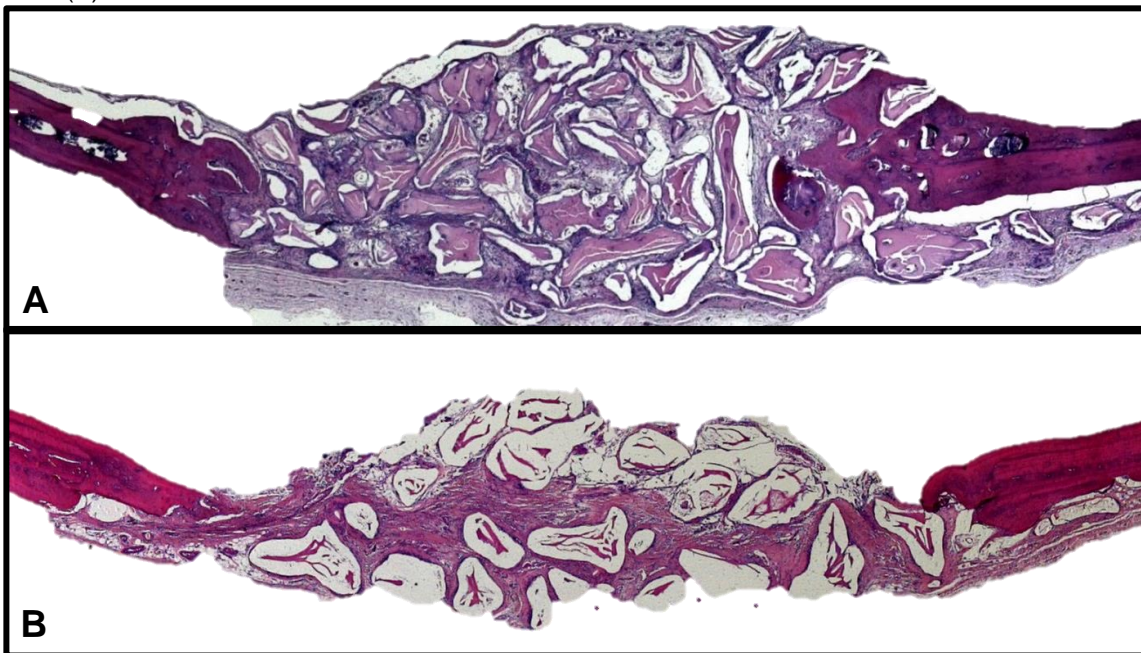
Fonte: Do autor.

Legenda: As setas indicam nas imagens: fibras colágenas (fc), fibroblastos (fb) e neoformação óssea (no).

5.1.6 Grupo BOPRF

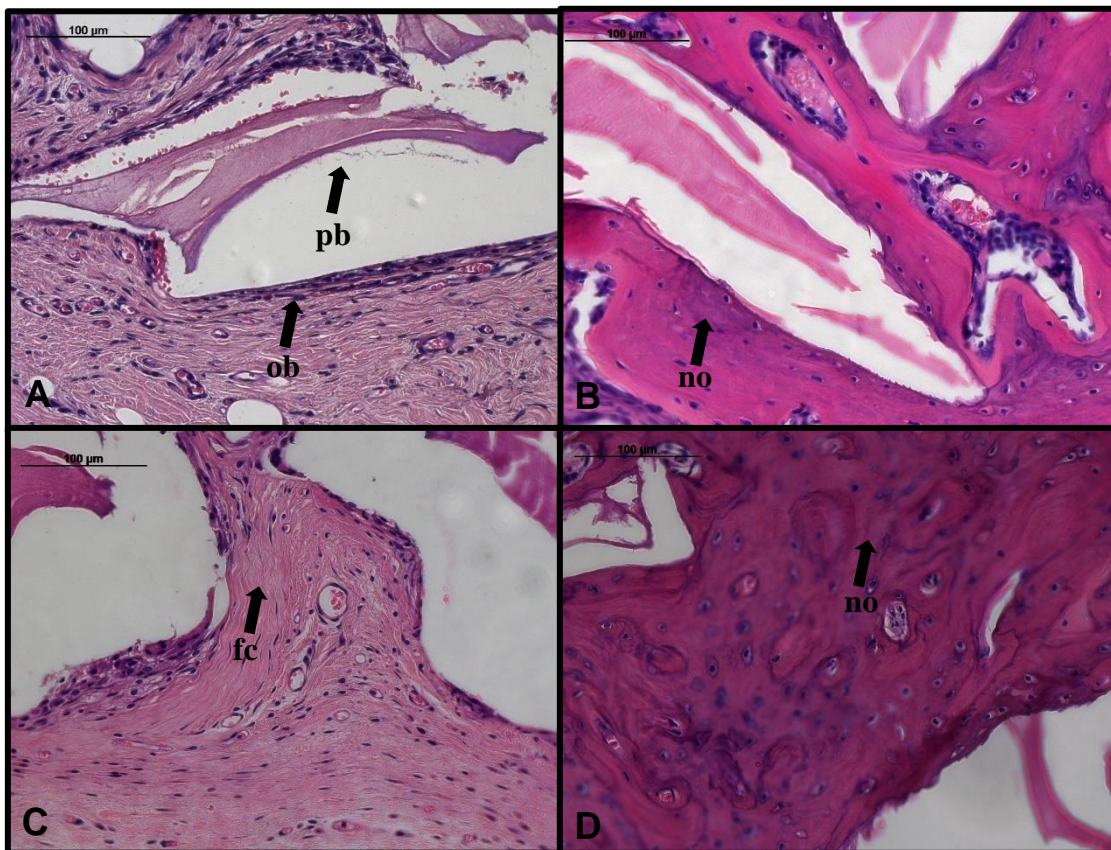
Neoformação óssea foi observada em todos os espécimes progredindo das margens do defeito e aproximando-se de sua região central. A espessura da calvária na região do defeito mostrou-se mantida e, em alguns espécimes, o volume mostrou-se maior (FIGURA 16). As partículas de BOPRF encontravam-se distribuídas ao longo do defeito e circundadas predominantemente por tecido conjuntivo denso e matriz óssea (FIGURA 17).

Figura 16 - Visão panorâmica do grupo BOPRF nos períodos experimentais de 30 dias (A) e 60 dias (B). Aumento 25x.



Fonte: Do autor.

Figura 17 - Fotomicrografia do grupo BOPRF nos períodos experimentais de 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D). Aumento 400x.



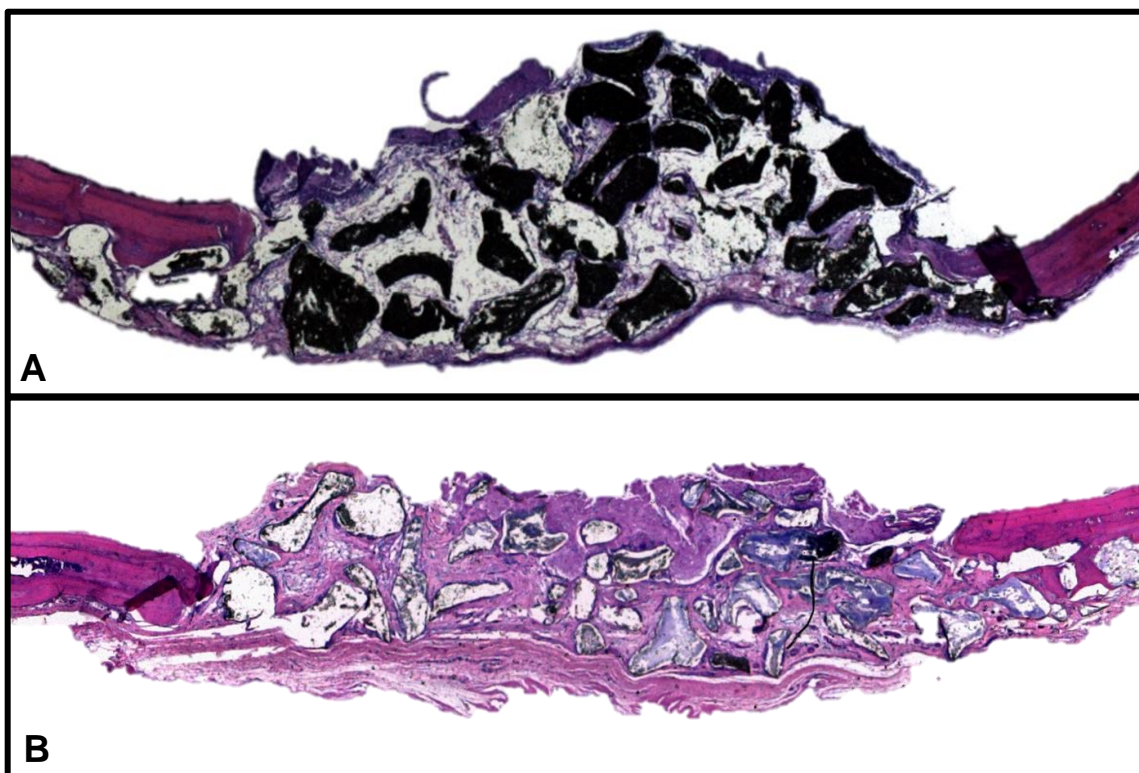
Fonte: Do autor.

Legenda: As setas indicam nas imagens: partícula de BO (pb), osteoblastos (ob), neoformação óssea (no) e fibras colágenas (fc).

5.1.7 Grupo CBPRF

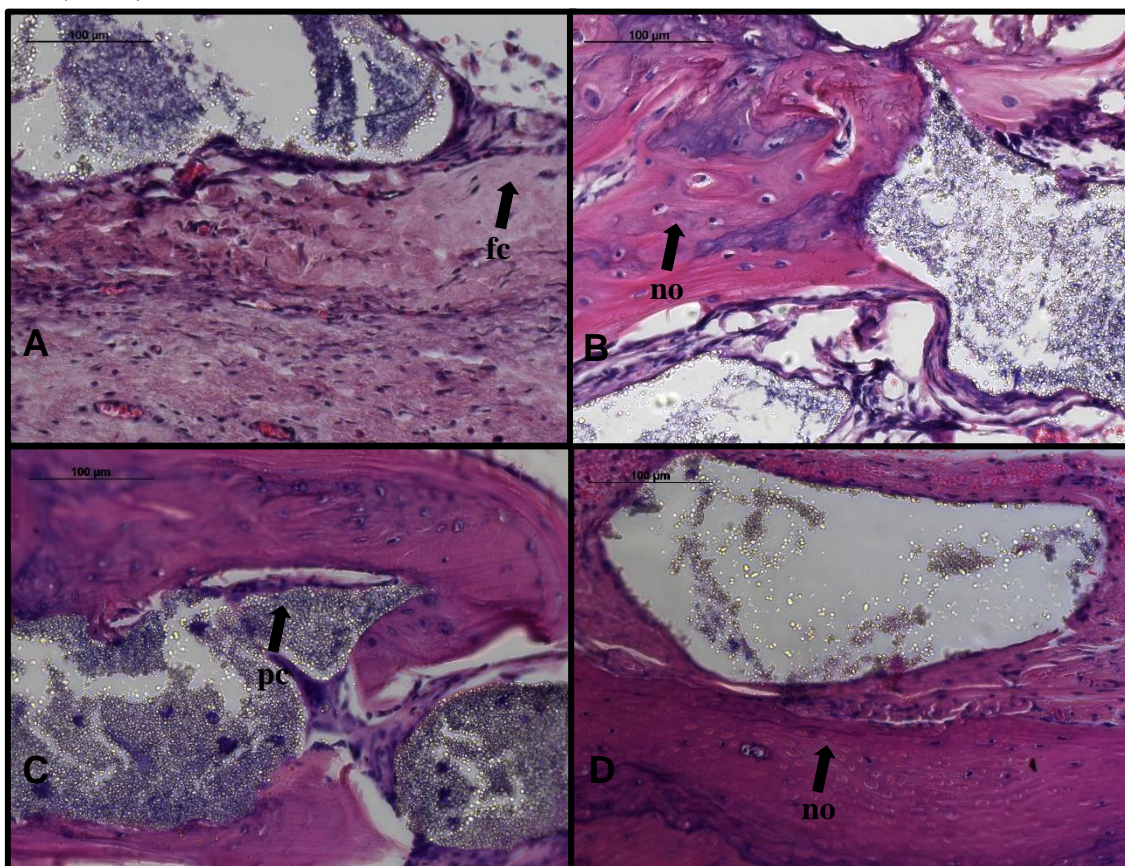
Neoformação óssea foi observada em todos os espécimes progredindo das margens do defeito e aproximando-se de sua região central. A espessura do novo osso acompanhou a espessura da calvária original ou apresentou maior volume (FIGURA 18). As partículas de CBPRF encontravam-se distribuídas ao longo do defeito e permeadas predominantemente por tecido conjuntivo denso com fibras colágenas, vasos sanguíneos e matriz óssea (FIGURA 19).

Figura 18 - Visão panorâmica do grupo CBPRF nos períodos experimentais de 30 dias (A) e 60 dias (B). Aumento 25x.



Fonte: Do autor.

Figura 19 - Fotomicrografia do grupo CBPRF nos períodos experimentais 30 dias (A e B) e 60 dias (C e D). Aumento 400x.



Fonte: Do autor.

Legenda: As setas indicam nas imagens: fibras colágenas (fc), neoformação óssea (no) e partícula de CB (pc).

5.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA

A porcentagem de formação óssea levando-se em conta a AT e a ANO de cada espécime, segundo os períodos e grupos experimentais, estão ilustradas no final do presente trabalho (APÊNDICE B), onde pode-se observar que os espécimes com maior formação óssea no período de 60 dias pertencem aos grupos OA e CBPRF.

Para a comparação dos fatores grupos (CG, OA, BO, CB, i-PRF, BOPRF, CBPRF) e tempo de avaliação (30 dias e 60 dias) foi utilizado técnica F (ANOVA) com dois fatores incluindo interação (modelo de fatores). A Tabela 1 e Figura 20 apresentam os resultados do percentual da ANO em relação à AT do defeito segundo o grupo e o tempo de avaliação. Destaca-se que as três médias mais elevadas corresponderam aos grupos OA com 60 e 30 dias (42,12% e 33,53%, respectivamente) e CBPRF com 60 dias (21,85%). As médias

correspondentemente menos elevadas ocorreram nos grupos CG com 60 e 30 dias (5,90% e 8,01%, respectivamente), seguidas de BO com 60 e 30 dias (9,65% e 10,75%, respectivamente). As médias dos demais grupos variaram entre 15,43% a 18,72%.

Os resultados da F (ANOVA) com dois fatores indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p^1 < 0,001$), mas não se comprovaram diferença significativa entre os tempos de avaliação ($p^2 > 0,05$). A interação grupo e tempo de avaliação também não se mostrou significativa ($p^3 > 0,05$). Pelos testes de comparações múltiplas de Tukey se verificaram diferenças significativas entre: o grupo OA de todos os outros grupos; entre o grupo CG e os grupos CB, i-PRF, BOPRF e CBPRF; entre BO e CBPRF.

A variabilidade expressa pelo desvio padrão oscilou de baixa (desvio padrão inferior a 1/3 das médias correspondentes) a elevada (desvio padrão superior as médias correspondentes).

Tabela 1 – Estatísticas do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo e o tempo de avaliação.

Grupo	Tempo de avaliação		Valor de p
	30 dias Média ± DP (Mediana)	60 dias Média ± DP (Mediana)	
OA ^(A)	33,53 ± 8,75 (33,71)	42,12 ± 10,80 (42,07)	$p^{(1)} < 0,001^*$
CG ^(B)	8,01 ± 4,26 (7,76)	5,90 ± 4,93 (4,20)	$p^{(2)} = 0,147$
BO ^(BC)	10,75 ± 4,37 (10,09)	9,65 ± 5,90 (7,10)	$p^{(3)} = 0,283$
CB ^(CD)	16,84 ± 7,67 (16,51)	15,45 ± 5,48 (15,93)	
i-PRF ^(CD)	15,43 ± 5,42 (16,15)	18,72 ± 7,99 (17,68)	
BOPRF ^(CD)	16,47 ± 5,52 (15,40)	17,24 ± 11,31 (15,52)	
CBPRF ^(D)	15,72 ± 9,30 (12,62)	21,85 ± 6,09 (20,49)	

Fonte: Do autor.

(*) Diferença significativa ao nível de 5,0%;

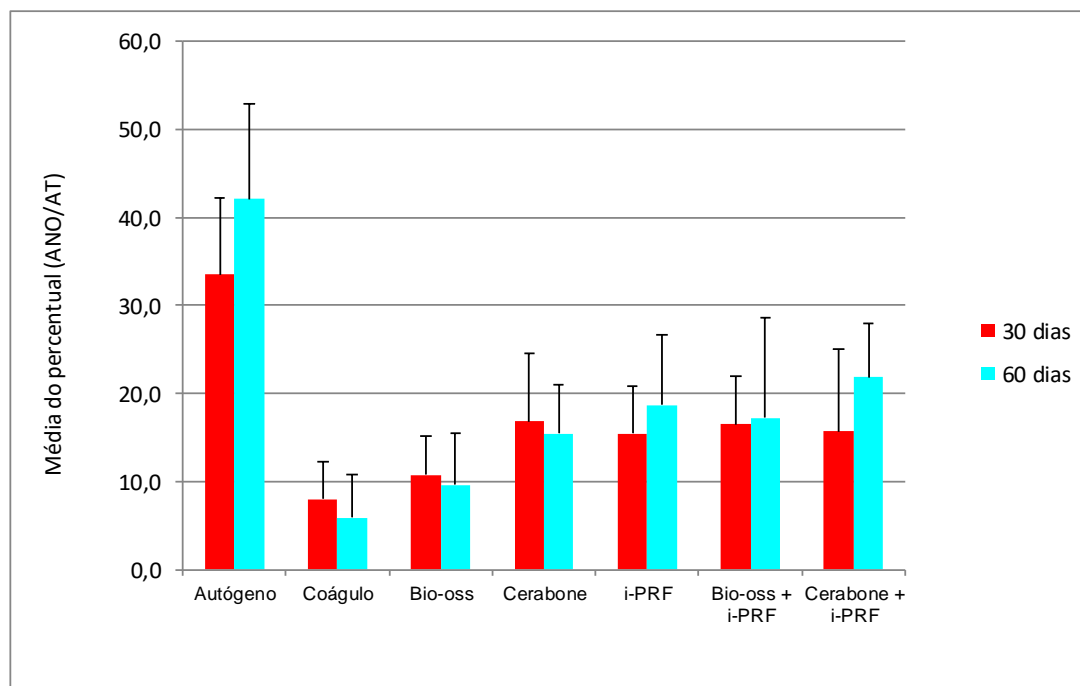
(1) Pelo teste F (ANOVA) para a comparação entre os grupos com comparações de Tukey;

(2) Pelo teste F (ANOVA) para a comparação entre os tempos de avaliação;

(3) Pelo teste F (ANOVA) para avaliar a interação grupo e tempo de avaliação;

Obs. Se as letras entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes.

Figura 20 - Gráfico da média do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo e o tempo de avaliação.



Fonte: Do autor.

A Tabela 2 e Figura 21 apresentam os resultados do percentual da ANO em relação à AT do defeito segundo o grupo, considerando-se a média dos dois tempos de avaliação, já que não houve diferença significativa entre os tempos de 30 e 60 dias ($p > 0,05$). Desta tabela se destaca que a média mais elevada correspondeu ao grupo OA (37,83%) e as menos elevadas foram nos grupos CG (6,96%) e BO (10,20%). As médias dos demais grupos variaram entre 16,15% a 18,79%.

Os resultados da F (ANOVA) com um fator indicaram diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Pelos testes de comparações múltiplas de Tukey se verificaram diferenças significativas entre: o grupo OA de todos os outros grupos; entre o grupo CG e os grupos CB, i-PRF, BOPRF e CBPRF; entre BO e CBPRF.

O grupo CBPRF apresentou valores maiores e estatisticamente significativo comparado com os grupos BO e CG, mas não apresentou diferença estatística com os grupos i-PRF, BOPRF e CB.

Apesar de não haver diferenças estatísticas, numericamente, considerando-se as médias, observou-se maior quantidade de osso neoformado no grupo BOPRF (16,86%) em comparação com o grupo BO (10,20%) e no

grupo CBPRF (18,79%) em comparação com o grupo CB (16,15%), assim como maior quantidade de osso neoformado no grupo CBPRF (18,79%) em comparação com o grupo BOPRF (16,86%).

A variabilidade expressa pelo desvio padrão oscilou de baixa (desvio padrão inferior a 1/3 das médias correspondentes) e não foi elevada (desvio padrão inferior à metade das médias correspondentes).

Tabela 2 – Estatísticas do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo.

Grupo	Média ± DP (Mediana)	Valor de p
OA ^(A)	37,83 ± 7,96 (40,14)	p ⁽¹⁾ < 0,001*
CG ^(B)	6,96 ± 3,29 (5,97)	
BO ^(BC)	10,20 ± 2,82 (10,39)	
CB ^(CD)	16,15 ± 4,72 (17,07)	
i-PRF ^(CD)	17,07 ± 4,95 (16,35)	
BOPRF ^(CD)	16,86 ± 6,14 (15,96)	
CBPRF ^(D)	18,79 ± 5,98 (17,00)	

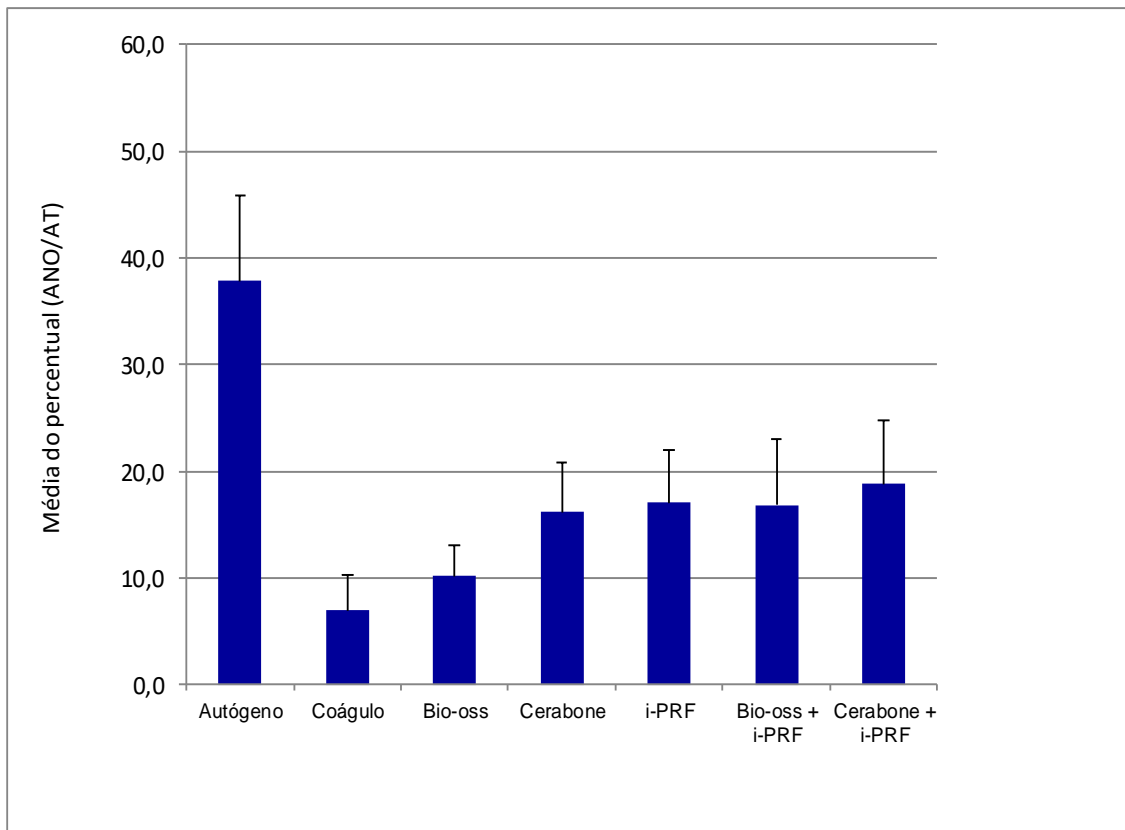
Fonte: Do autor.

(*) Diferença significativa ao nível de 5,0%;

(1) Pelo teste F (ANOVA) para a comparação entre os grupos com comparações de Tukey;

Obs. Se as letras entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes.

Figura 21 - Gráfico da média do percentual da área de neoformação óssea em relação à área total do defeito segundo o grupo, considerando-se a média dos tempos de avaliação.



Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou avaliar o uso de Bio-Oss[®], Cerabone[®] e de i-PRF, isoladamente ou em combinação aos xenoinxertos, em defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de ratos. Todos os espécimes apresentaram fechamento incompleto do defeito nos períodos de 30 e 60 dias. Nenhum estudo foi encontrado na literatura até o momento, em animais ou humanos, comparando ao mesmo tempo a utilização dos três materiais utilizados nesta pesquisa.

O modelo experimental utilizado no presente estudo, em que se realizou dois defeitos ósseos, com o mesmo tipo de enxerto, na calvária de cada rato, seguindo as diretrizes do ARRIVE e do CEUA, pareceu adequado para avaliação da regeneração óssea. Outros autores já utilizaram este modelo experimental para essa finalidade (HAYASHI *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2020).

Nessa pesquisa se optou pelo i-PRF homogêneo, já que ao utilizar ratos doadores se obteve um maior volume de i-PRF. O volume sanguíneo possível de ser coletado para a produção do i-PRF autógeno seria bastante reduzido devido ao pequeno porte dos animais, podendo até ser considerado um procedimento terminal (PARASURAMAN *et al.*, 2010). Há relato da utilização de ratos doadores para a obtenção de concentrados de plaquetas sem interferências nos resultados (OLIVEIRA *et al.*, 2015). O risco de antigenicidade é insignificante quando os animais doadores são saudáveis, da mesma idade e espécie dos animais receptores (ASPENBERG; VIRCHENKO, 2004). Assim, sugere-se que a utilização de animais doadores para a obtenção de derivados sanguíneos, em pesquisas experimentais com ratos, é viável (GHANAATI *et al.*, 2018). No presente estudo, nenhuma reação de antigenicidade foi observada nos ratos receptores.

Embora a literatura científica sugira um período de 60 dias para análise histológica de neoformação óssea em modelos experimentais (CARDAROPOLI *et al.*, 2003; CHOUKROUN *et al.*, 2006), não houve diferença estatística entre os grupos durante as 30 e 60 dias de avaliação nesse estudo. Outros relatos que utilizaram materiais de enxerto para avaliar a regeneração óssea, mostraram que 30 dias é um período suficiente para observar a formação óssea e vascular em modelos experimentais (OZDEMIR *et al.*, 2013; TAMIMI *et al.*, 2006). Por outro

lado, alguns estudos justificam que é importante avaliar os efeitos dos materiais na regeneração óssea após 60 dias de pós-operatório (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011). De acordo com Sohn *et al.* (2011), seria um período longo o suficiente para observar a ação dos materiais, avaliando a incorporação, remodelação e reabsorção dos enxertos.

Nessa pesquisa, apenas as partículas do enxerto de osso autógeno foram medidas e incluídas no cálculo da porcentagem de neoformação óssea em relação a área total do defeito. Os xenoenxertos não foram contabilizados para realização do cálculo nos defeitos cirúrgicos. Dessa forma, o osso autógeno apresentou diferença estatística de todos os grupos, apresentando resultados numéricos consideravelmente superiores.

Os grupos BO e CB, utilizados isoladamente nos defeitos ósseos críticos, não demonstraram diferenças estatísticas, apesar do grupo BO ter apresentado um resultado numérico consideravelmente inferior. Esses resultados indicaram que o Cerabone[®] é um material tão eficiente quanto o Bio-Oss[®], substituto ósseo mais comumente usado, com bons resultados clínicos e histológicos documentados na literatura (AL-ASKAR *et al.*, 2016; CHA *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2020).

Mahesh *et al.* (2020) investigaram a neoformação óssea com Bio-Oss[®] e Cerabone[®] em procedimentos de levantamento de seios maxilares, através de análise histológica e histomorfométrica. Comparado aos resultados do presente trabalho, os xenoenxertos usados também não apresentaram diferenças estatísticas e permitiram a neoformação óssea nos seios enxertados. Assim, ambos os materiais foram considerados eficazes para aplicação em diferentes procedimentos clínicos e demonstraram um processo cicatricial semelhante, envolvendo inflamação mínima e resultando em sucesso a longo prazo.

Tawil *et al.* (2018) demonstraram que a utilização do Cerabone[®] em pacientes submetidos a procedimentos de levantamento do seio maxilar, seguido da instalação de implantes, mostrou ser um material osteocondutor adequado. Além disso, outro estudo em humanos, no qual Cerabone[®] e Bio-Oss[®] foram comparados para avaliar o processo de regeneração óssea, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos, assim como os resultados da presente pesquisa, sendo ambos os xenoenxertos eficazes no levantamento de seios dos maxilares atróficos (PANAGIOTOU *et al.*, 2015). Riachi *et al.*

(2012) relataram, por meio de análise radiográfica de seios maxilares enxertados, que o Bio-Oss® apresentou perda volumétrica significativamente maior ($33,4 \pm 3,1\%$) do tamanho inicial do enxerto em comparação ao Cerabone® ($23,4 \pm 3,6\%$), sendo a maior quantidade de perda vertical do volume observada após um ano da cirurgia, ressaltando o uso do Cerabone® como um substituto ósseo adequado.

Alguns autores também têm pesquisado a ação do PRF na regeneração óssea na sua utilização isolada, já que o i-PRF parece exercer um efeito prolongado sobre o reparo tecidual, com liberação lenta e gradual dos fatores de crescimento (THORAT; PRADEEP; PALLAVI, 2011). Tajima *et al.* (2013) mostraram que a utilização do PRF como único material de enxerto para elevação do assoalho do seio maxilar concomitante à instalação de implantes, permitiu um ganho significativo em altura do rebordo. Hauser *et al.* (2013) demonstraram o efeito positivo da utilização isolada do PRF na regeneração óssea, envolvendo o preenchimento de alvéolos pós exodontia de pré-molares com este concentrado de plaquetas. Li *et al.* (2013) relataram o favorecimento da mineralização do osso alveolar com a utilização somente do PRF, demonstrando que a fibrina tem ação significativa na diferenciação osteogênica.

Dessa forma, sugere-se que o PRF utilizado isoladamente é capaz de favorecer a regeneração óssea (DU *et al.*, 2018; TAMBELLA *et al.*, 2020; YOU *et al.*, 2019), situação também observada no presente estudo, no qual o i-PRF foi estatisticamente superior ao grupo CG e não apresentou diferença estatística dos demais xenoenxertos. Podendo ser utilizado em diversos procedimentos periodontais e cirúrgicos, mostrando-se versátil, eficaz e de baixo custo para sua obtenção (BANSAL; BHARTI, 2013).

Estudos pesquisando a ação do PRF na regeneração óssea em associação a outros materiais de enxertos ósseos em defeitos de calvária, ainda são escassos na literatura. Mas essa junção parece ser promissora, já que além da propriedade osteocondutora do enxerto bovino, as citocinas e fatores de crescimento disponibilizados pelo PRF aceleram a migração celular, a neovascularização e a resposta inflamatória, favorecendo ainda mais o reparo tecidual (MESSORA *et al.*, 2008; MOURAO *et al.*, 2015) e funcionando como uma conexão biológica, aglutinando as partículas do enxerto (BANSAL; BHARTI, 2013).

Mu *et al.* (2020) investigaram a capacidade angiogênica e osteogênica de partículas de Bio-Oss® embebidas em i-PRF para enxerto de seio maxilar, em coelhos. O i-PRF associado ao Bio-Oss® acelerou a formação vascular e a remodelação óssea, sendo observadas fibras colágenas maduras, mesmo em estágios iniciais de cicatrização, demonstrando grande potencial de utilização para levantamento dos seios maxilares, em comparação com o uso do Bio-Oss® de forma isolada. Xie *et al.* (2019) também demonstraram efeito positivo na associação entre i-PRF e Bio-Oss®, sendo o i-PRF considerado um material seguro e confiável, podendo diminuir o tempo de cicatrização e aumentar o efeito da osteogênese. Assim como nessa pesquisa, em que o grupo BOPRF se apresentou numericamente superior ao grupo BO, apesar de não haver diferença estatística.

O grupo CBPRF também não apresentou diferença estatística com o grupo CB. Mas não foi encontrado na literatura estudos *in vivo* comparando o uso do Cerabone® com o Cerabone® associado ao i-PRF. Kollati *et al.* (2019) demonstraram que o Cerabone® associado ao PRF para preservação de rebordo em humanos é um método confiável que minimiza a perda óssea alveolar, quando comparado ao grupo controle, em que se realizou apenas extração atraumática. Kyyak *et al.* (2021), em estudo *in vitro*, compararam o Cerabone® e o Bio-Oss® associados ou não ao i-PRF, demonstrando a viabilidade e atividade metabólica de osteoblastos humanos. Para os grupos sem i-PRF, os maiores valores relativos à viabilidade foram observados no grupo Cerabone®, já nos grupos em que os enxertos foram associados ao i-PRF, observou-se aumento da viabilidade nos dois grupos, sendo os maiores valores para o grupo do Cerabone® associado ao i-PRF.

Os resultados deste trabalho mostraram que o grupo CBPRF apresentou valores maiores e estatisticamente significante comparado com o grupo BO. E apesar de não haver diferenças estatísticas, numericamente observou-se maior quantidade de osso neoformado no grupo CB em comparação ao grupo BO e maior quantidade de osso neoformado no grupo CBPRF em comparação ao grupo BOPRF. Apesar do Bio-Oss® ser amplamente utilizado na Odontologia como substituto ósseo, um estudo de Grossi-Oliveira *et al.* (2020) relatou a utilização de materiais de enxerto, de origem xenogênica e aloplástica, com

melhores resultados do que o Bio-Oss[®]. Mesmo o Bio-Oss[®] exibindo uma taxa superior de liberação de cálcio em relação ao Cerabone[®] (BERBERI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2020), uma das principais desvantagens deste material, é a reabsorção muito lenta e incompleta de suas partículas. Assim, resulta em um volume considerável do enxerto que não pode ser substituído pelo novo osso, processo denominado por alguns autores de osteobstrução (LEE, CHEN, DARBY, 2012; MORDENFELD *et al.* 2010).

Por fim, destaca-se a escassez de estudos na literatura, com o mesmo modelo de estudo que esse, para comparação com os materiais utilizados. Ressaltando sua importância e destacando a necessidade de novas investigações entre diferentes substitutos ósseos e concentrados plaquetários com metodologias mais homogêneas. Novas pesquisas devem ser realizadas para confirmar as reais propriedades do Cerabone[®] e do i-PRF no processo de regeneração óssea, além de estudos com períodos de observações mais longos investigando a total substituição dos biomateriais por osso neoformado. Destaca-se também que algumas limitações estruturais no período da pesquisa impossibilitaram a realização de análises mais refinadas, como análise microtomográfica e imuno-histoquímica, que poderiam fornecer ainda mais entendimento sobre a investigação proposta.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e dentro dos limites deste estudo, observa-se que o Cerabone® e a fibrina rica em plaquetas na forma injetável, usada isoladamente ou associada com partículas de osso bovino Bio-Oss® e Cerabone®, apresentam aplicabilidade satisfatória quando utilizados no preenchimento de defeitos críticos em calvária de ratos, favorecendo o processo de regeneração óssea.

REFERÊNCIAS

AL RUHAIMI, K.A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 16, p. 105–114, 2001.

AL-ASKAR, M. *et al.* Guided Bone Regeneration in Standardized Calvarial Defects in Rats Using Bio-Oss and beta-Tricalcium Phosphate with Adjunct Platelet-Derived Growth Factor Therapy: A Real-Time In Vivo Microcomputed Tomographic, Biomechanical, and Histologic Analysis. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 36, p. 61-73, 2016.

AMERIO *et al.* The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. **Clinical Oral Implant Res**, v. 21, p. 650-655, 2010.

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

ARTZI, Z.; TAL, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. **J Periodontol**, v. 71, p. 1015–1023, 2000.

ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. **Acta Orthop Scand**, v. 75, n. 1, p. 93-9, Feb 2004.

BALDINI, N.; DE SANCTIS, M.; FERRARI M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. **Dent Mater**, v. 27, p. 61-70, 2011.

BANSAL, C.; BHARTI, V. Evaluation of efficacy of autologous platelet-rich fibrin with demineralized-freeze dried bone allograft in the treatment of periodontal intrabony defects. **J Indian Soc Periodontol**, v. 17, n. 3, p. 361-6, May 2013.

BENLIDAYI, M.E. *et al.* Comparison of two different forms of bovine-derived hydroxyapatite in sinus augmentation and simultaneous implant placement: an experimental study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, p. 704–711, 2009.

BERBERI, A. *et al.* Physicochemical characteristics of bone substitutes used in oral surgery in comparison to autogenous bone. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 320-790, 2014.

CANEVA, M. *et al.* Alveolar process preservation at implants installed immediately into extraction sockets using deproteinized bovine bone mineral – an experimental study in dogs. **Clin Oral Implant Res**, v. 23, p. 789-796, 2012.

- CARDAROPOLI, G.; ARAUJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 9, p. 809–818, 2003.
- CARMAGNOLA, D. *et al.* Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 27, p. 799–805, 2000.
- CASTRO, A. B. *et al.* Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 225–234, 2017.
- CHA, J. K. *et al.* Alveolar ridge preservation in the posterior maxilla reduces vertical dimensional change: A randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 30, n. 6, p. 515-523, Jun 2019.
- CHANG, Y. C.; ZHAO, J. H. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblast and application for periodontal infrabony defects. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. 4 p. 365-371, 2011.
- CHOUKROUN, J. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontic**, v. 101, n. 3, p. 299-303, Mar. 2006.
- DAHLIN, C.; SIMION, M.; HATANO, N. Long-term follow-up on soft and hard tissue levels following guided bone regeneration treatment in combination with a xenogeneic filling material: a 5-year prospective clinical study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 12, n. 4, p. 263-70, Dec 2010.
- DE PASCALE, M. R. *et al.* Platelet derivatives in regenerative medicine: An update. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 29, p. 52–61, 2015.
- DE SANTIS, E *et al.* Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, p. 430–437, 2011.
- DO LAGO, E. S. *et al.* Improvement of bone repair with I-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. **Clin Oral Investig**, v. 24, n. 5, p. 1637-1650, May 2019.
- DOHAN, D. M. *et al.* Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. **Muscles Ligaments Tendons Journal**, v. 4, p. 3–9, 2014.
- DOHAN, D. M. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 101, n. 3, p. 37-44, 2006

- DORI, F. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an anorganic bovine bone mineral: A pilot study. **J Periodontol**, v. 80, p. 1599–1605, 2009.
- DU, J. *et al.* Platelet-rich fibrin/aspirin complex promotes alveolar bone regeneration in periodontal defect in rats. **J Periodontal Res**, v. 53, n. 1, p. 47-56, Feb 2018.
- EHRENFEST, D. M. D.; RASSMUND, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.
- EREN, G.; ATILLA, G. Platelet-rich fibrin in the treatment of localized gingival recessions: A split-mouth randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, p.1941–1948, 2014.
- GALINDO-MORENO, P. *et al.* Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 122-8, Jan 2010.
- GARCIA-GONZALEZ, S. *et al.* Volumetric changes in alveolar ridge preservation with a compromised buccal wall: a systematic review and meta-analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 25, n. 5, p. e565-e575, Sep 1 2020.
- GHANAATI, S. *et al.* A Proof of the Low Speed Centrifugation Concept in Rodents: New Perspectives for In Vivo Research. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 24, n. 11, p. 659-670, Nov 2018.
- GROSSI-OLIVEIRA, G. *et al.* Comparative Evaluation of Bone Repair with Four Different Bone Substitutes in Critical Size Defects. **Int J Biomater**, v. 2020, p. 5182845, 2020.
- GUIANNOUDES, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: na update injury. **International Journal of the Cure of the Injured**, v. 365, p. 520-527, 2005.
- HALLMAN, M. *et al.* A 3-year prospective follow-up study of implant-supported fixed prostheses in patients subjected to maxillary sinus floor augmentation with a 80:20 mixture of deproteinized bovine bone and autogenous bone Clinical, radiographic and resonance frequency analysis. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 3, p. 273-80, 2005.
- HÄMMERLE, C.H.F., LANG, N.P. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. **Clin Oral Implants Res**, v. 12, p. 9–18, 2001.
- HE, L. *et al.* A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of a rat

- osteoblasts in vitro. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endod**, v.108, n.5, p.707-713, Nov. 2009.
- HAUSER, F. *et al.* Clinical and Histological Evaluation of Postextraction Platelet-rich Fibrin Socket Filling: A Prospective Randomized Controlled Study. **Implant Dentistry**, v.22, n.3, p.295-303, 2013.
- HAYASHI, *et al.* Transplantation of human-induced pluripotent stem cells carried by self-assembling peptide nanofiber hydrogel improves bone regeneration in rat calvarial bone defects. **BDJ Open**. v.2. p.15007. Jan. 2016.
- HUANG, F. M. *et al.* Platelet-rich fibrin increase proliferation and differentiation of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 1628-1632, Oct. 2010.
- HUBER, F.X. *et al.* Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinical results. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 126, p. 533–540, 2006.
- IEZZI, G. *et al.* Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with anorganic bovine bone. **Journal of Periodontology**, v. 79, p.192-198, 2008.
- JENSEN, T. *et al.* Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 1, p. 114-20, Jan 2012.
- JEONG, S. M. *et al.* Simultaneous sinus lift and implantation using platelet-rich fibrin as sole grafting material. **Journal of Cranio-maxillo- facial Surgery**, v. 42, p. 990–994, 2014.
- KANG, Y. H. *et al.* Platelet-rich fibrin is a biscalfold ans reservoir of growth factors for tissue regeneration. **Tissue Engineering**, v. 17, n. 3 e 4, p. 349-359, 2011.
- KASSIM, B.; IVANOVSKI, S.; MATTHEOS, N. Current perspectives on the role of ridge (socket) preservation procedures in dental implant treatment in the aesthetic zone. **Aust Dent J**, v. 59, n 1, p. 48–56, 2014.
- KEYHAN, S. O. *et al.* Use of Platelet-Rich Fibrin and Platelet-Rich Plasma in Combination With Fat Graft: Which is More Effective During Facial Lipostructure? **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 3, p. 610-621, 2013.
- KIM, D. M. *et al.* The clinical and histologic outcome of dental implant in large ridge defect regenerated with alloplast: a randomized controlled preclinical trial. **Journal of Oral Implantology**, v. 39, n. 2, p. 148-153, 2013.
- KIM, Y. J. *et al.* Bone Formation in Grafts with Bio-Oss and Autogenous Bone at Different Proportions in Rabbit Calvaria. **Int J Dent**, v. 2020, p. 2494128, 2020.

KIM, Y.; NOWZARI H.; RICH S.K. Risk of prion disease transmission through bovine derived bone substitutes: A systematic review. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 15, p. 645–653, 2013.

KOLLATI P. *et al.* Effectiveness of naturally derived bovine hydroxyapatite (Cerabone™) combined with platelet-rich fibrin matrix in socket preservation: A randomized controlled clinical trial. **J Indian Soc Periodontol**, v. 23, n. 2, p.145-151, 2019.

KONERMANN, A. *et al.* Bone substitute material composition and morphology differentially modulate calcium and phosphate release through osteoclast-like cells. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4, p. 514–521, 2014.

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

KYYAK, S. *et al.* Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin - A comparative in vitro study. **J Biomater Appl**, v. 35, n. 1, p. 83-96, Jul 2020.

KYYAK, S. *et al.* Activation of Human Osteoblasts via Different Bovine Bone Substitute Materials With and Without Injectable Platelet Rich Fibrin *in vitro*. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 9, p. 599224, 2021.

LASCHKE, M. W. *et al.* Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 82, p. 494–505, 2007.

LEE, D.Z.; CHEN, S.T.; DARBY, I.B. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, p. 918–924, 2012.

LI Q. *et al.* Platelet-rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Aumentation. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2010.

LUCARELLI, E. *et al.* A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. **European Cells and Materials**, v. 20, p. 13-23, 2010.

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

MAHESH, L. *et al.* Histological evaluation of two different anorganic bovine bone matrixes in lateral wall sinus elevation procedure: A retrospective study. **Natl J Maxillofac Surg**, v. 11, n. 2, p. 258-262, Jul-Dec 2020.

MANGANO, C. *et al.* Clinical and histologic evaluation of calcium carbonate in sinus augmentation: A case series. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 34, p. 43–49, 2014.

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

MAZOR, Z. *et al.* Nasal floor combined with dental implant placement. **Clin Implant Dent Relat Res**, v.14, p. 768–771, 2012.

MAZOR, Z. *et al.* 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**, v. 80, p. 2056–2064, 2009.

MESSORA, M. R. *et al.* Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 2, p. 217-23, Apr 2008.

MIRON, R. J. *et al.* Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? **Clin Oral Investig**, v. 21, n. 8, p. 2619-2627, 2017.

MISCH, C.E.; BIDEZ, M.W. Enxertos ósseos e Biomateriais, capítulo 12. In: MISCH, C.E. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Santos, 2009.

MLADENOVIC, Z. *et al.* In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 3, p. 329-35, Mar 2013.

MORDENFELD, A. *et al.* Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 9, p. 961-70, Sep 2010.

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

MU, Z. *et al.* Effects of injectable platelet rich fibrin on bone remodeling in combination with DBBM in maxillary sinus elevation: a randomized preclinical study. **Am J Transl Res**, v. 12, n. 11, p. 7312-7325, 2020.

NEVINS, M. *et al.* The clinical and histologic efficacy of xenograft granules for maxillary sinus floor augmentation. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 31, p. 227-235, 2011.

NIZAM, N. *et al.* Maxillary sinus augmentation with leukocyte and platelet-rich fibrin and deproteinized bovine bone mineral: A split-mouth histological and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, v. 29, n. 1, p. 67-75, 2018.

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 5, p. 649-55, May 2015.

ORSINI, G. *et al.* Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 74, n. 1, p. 448-57, Jul 2005.

ORSINI, G. *et al.* Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss particles in sinus augmentation. **ORAL DIS**, v.13, p.586–593, 2007.

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

PANAGIOTOU, D. *et al.* Comparison of two different xenografts in bilateral sinus augmentation: radiographic and histologic findings. **Quintessence Int**, v. 46, n. 7, p. 611-9, Jul-Aug 2015.

PAPAGIANNOULIS, N. *et al.* Vergleich von allogenem und alloplastischem Knochenregenerationsmaterial mit Pericardium Membran in der horizontalen gesteuerten Augmentation von Alveolardefekten. **Dent Implantol**, v.16, p. 360–369, 2012.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R.; KESAVAN, R. Blood sample collection in small laboratory animals. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 1, n. 2, p. 87-93, Jul 2010.

PERIĆ KAČAREVIĆ Z. *et al.* Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. **Int J Artif Organs**, v. 41, n. 11 p. 789-800, Nov 2018.

PETERSON, J. E. *et al.* Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. **American Journal of Hematology**, v. 85, p. 487–493, 2010.

PRADEEP, A. R. *et al.* A randomized clinical trial of autologous platelet-rich plasma in the treatment of mandibular degree II furcation defects. **J Clin Periodontol**, v. 36, p. 581–588, 2009.

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

RIACHI, F. *et al.* Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. **Int J Dent**, v. 2012, p. 737262, 2012.

ROTHAMEL, D. *et al.* Impact of citric acid etching on biocompatibility and osseous organisation of a natural bovine bone mineral. Preliminary results of an in-vitro/in-vivo study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 27, p. 146–154, 2012.

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

SARGOLZAIE, N. *et al.* Comparison of the effect of hemihydrate calcium sulfate granules and Cerabone on dental socket preservation: An animal experiment. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**, v. 12, n. 4, p. 238-244, 2018.

SCHMITT, C. M. *et al.* Histologic results after maxillary sinus augmentation with Straumann Bone Ceramic, Bio-OssR, PurosR, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, p. 576–585, 2013

SCHROPP, L. *et al.* Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 23, n. 4, p. 313–323, 2003.

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

SKOGLUND, A.; HISING P.; YOUNG C. A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural boné mineral. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.12, p.194–199, 1997.

SOHN, D. S. *et al.* Bone regeneration in the maxillary sinus using an autologous fibrin-rich block with concentrated growth factors alone. **Implant Dent**, v. 20, n. 5, p. 389-95, Oct 2011.

STAUROPOULOS, A. *et al.* Deproteinized bovine bone (Bio- Oss) and bio active glass (Biogram) arrest bone formation when used as an adjust to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. **J Clin Periodontol**, v. 7, p. 636–643, 2003.

TADIC, D.; EPPLE, M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, v. 25, p. 987–994, 2004.

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

TAMBELLA, A. M. *et al.* Effects of Autologous Platelet-Rich Fibrin in Post-Extraction Alveolar Sockets: A Randomized, Controlled Split-Mouth Trial in Dogs with Spontaneous Periodontal Disease. **Animals (Basel)**, v. 10, n. 8, Aug 2020.

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

TAPETY, E.I. *et al.* A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss® in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. **Clin Oral Implant Res**, v. 15, p. 320-324, 2004.

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

TAWIL, G. *et al.* Sinus Floor Elevation Using the Lateral Approach and Window Repositioning and a Xenogeneic Bone Substitute as a Grafting Material: A Histologic, Histomorphometric, and Radiographic Analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 33, n. 5, p. 1089-1096, September/October 2018.

TETÈ, S. *et al.* Maxillary sinus augmentation procedures through equine-derived biomaterial or calvaria autologous bone: immunohistochemical evaluation of OPG/RANKL in humans. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 10, p. 60 – 65, 2013.

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

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

TRAJKOVSKI, B. *et al.* Hydrophilicity, Viscoelastic, and Physicochemical Properties Variations in Dental Bone Grafting Substitutes. **Materials (Basel)**, v. 11, n. 2, p.215, Jan 2018.

TRISI, P.; MARCATO, C.; TODISCO, M. Bone-to-implant apposition with machined and MTX microtextured implant surfaces in human sinusgrafts. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 23, p. 427–437, 2003.

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

WANG, X. *et al.* Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 2, Feb 4 2017a.

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

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

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

XIE H. *et al.* Bone regeneration effect of injectable-platelet rich fibrin (I-PRF) in lateral sinus lift: a pilot study. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v. 28, n. 1, p. 71-75, Feb 2019.

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

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

ZHAO, M. *et al.* Degradation Behavior, Transport Mechanism and Osteogenic Activity of Mg–Zn–RE Alloy Membranes in Critical-Sized Rat Calvarial Defects. **Coatings**, v. 10, p. 496, 2020.

ZITZMANN, N.U.; NAEF, R., SCHARER P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.12, p. 844–852, 1997.

ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais –
CEUA/UNIFAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

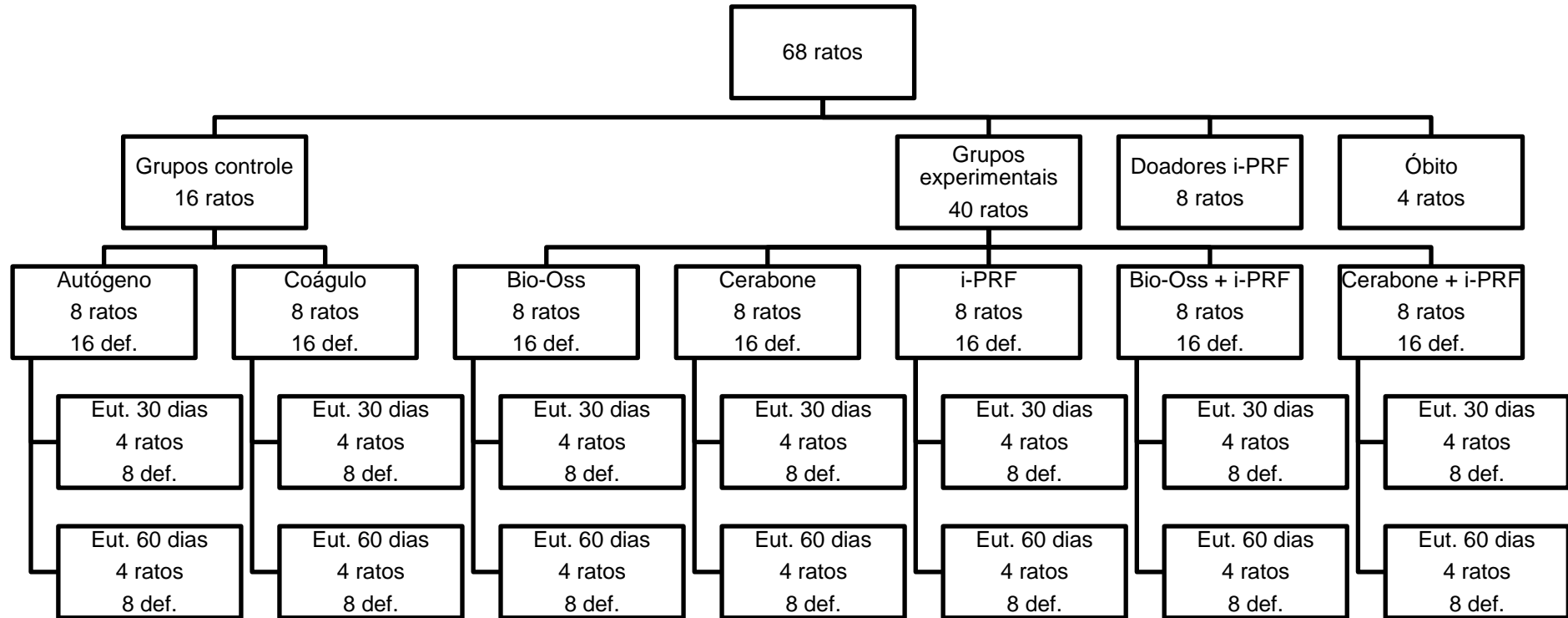
Certificamos que a proposta intitulada "Estudo comparativo entre BIO-OSS® e Cerabone® associados ou não com fibrina rica em plaquetas injetável na regeneração óssea de defeitos críticos na calcária de ratos", registrada com o nº 60/2018, sob a responsabilidade de Noé Vital Ribeiro Júnior, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 13/12/2018 a 03/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	68
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 13 de Dezembro de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG

APÊNDICE A – Organograma do experimento. Divisão do número de ratos e defeitos cirúrgicos nos grupos.



Fonte: Do autor.

Notas: Def.: defeitos; Eut.: eutanásia.

APÊNDICE B - Tabela de Distribuição da área total e de neoformação óssea e suas respectivas porcentagens segundo os grupos e períodos experimentais.

Distribuição da área total e de neoformação óssea e suas respectivas porcentagens segundo os grupos e períodos experimentais.

		AUTÓGENO		COÁGULO		BIO-OSS		CERABONE		i-PRF		BIO-OSS + i-PRF		CERABONE + i-PRF		
		30 Dias	60 Dias	30 Dias	60 Dias	30 Dias	60 Dias	30 Dias	60 Dias	30 Dias	60 Dias	30 Dias	60 Dias	30 Dias	60 Dias	
Rato 1	D1	AT	1578601,12	1138553,14	1795097,84	1609644,40	1308532,85	2006780,28	2132922,72	969125,24	1124107,04	917261,98	2215217,98	4185261,80	852191,70	1562314,54
		ANO	624916,73	455443,38	264431,24	123337,35	90527,71	438214,12	608375,56	168249,78	245669,80	102451,08	233212,84	1647517,52	116365,49	229670,70
		%	39,59%	40,00%	14,73%	7,66%	6,92%	21,84%	28,52%	17,36%	21,85%	11,17%	10,53%	39,36%	13,65%	14,70%
Rato 2	D2	AT	1321812,57	1621129,92	1194629,29	1583540,94	1236120,56	1370021,35	1161246,62	1156343,13	789246,04	1860931,40	1227242,09	1235760,40	959106,80	1176951,64
		ANO	528677,37	840498,02	103763,67	60216,36	124819,60	136528,47	101458,06	171475,64	133043,04	262785,74	222027,23	149237,20	79942,64	233144,01
		%	40,00%	51,85%	8,69%	3,80%	10,10%	9,97%	8,74%	14,83%	16,86%	14,12%	18,09%	12,08%	8,34%	19,81%
Rato 3	D1	AT	1105276,20	1421507,92	1540830,42	1486951,58	838548,52	2373609,74	952812,23	1774981,66	904633,19	1889919,44	2178002,39	1791172,40	1347764,03	732241,21
		ANO	294908,90	627274,48	119136,35	14479,16	55996,01	350982,34	199947,55	303076,75	175673,57	670710,44	608936,27	450538,92	121494,12	154930,16
		%	26,68%	44,13%	7,73%	0,97%	6,68%	14,79%	20,98%	17,07%	19,42%	35,49%	27,96%	25,15%	9,01%	21,16%
Rato 4	D2	AT	1740065,82	2216817,23	1216652,02	1160532,91	996745,33	1039056,04	1366314,00	1298563,98	624981,74	904124,35	1373847,65	1145419,34	644649,46	1469382,97
		ANO	686816,14	1134065,63	28143,57	105409,13	100343,17	60968,07	208642,54	221331,55	96434,68	179849,85	265896,01	88464,34	74688,79	511342,60
		%	39,47%	51,16%	2,31%	9,08%	10,07%	5,87%	15,27%	17,04%	15,43%	19,89%	19,35%	7,72%	11,59%	34,80%
Rato 1	D1	AT	1670316,74	1933839,32	1253827,96	1536158,24	1805357,49	1376345,64	1011716,82	2070542,10	1426761,66	1167855,09	2710020,42	1758643,95	1332277,08	2250840,93
		ANO	774908,98	721188,21	34365,33	33518,14	328946,55	111583,98	102570,04	534785,56	307254,12	180631,93	438492,86	333345,95	487114,77	571529,34
		%	46,39%	37,29%	2,74%	2,18%	18,22%	8,11%	10,14%	25,83%	21,54%	15,47%	16,18%	18,95%	36,56%	25,39%
Rato 2	D2	AT	1080068,20	875836,80	1171536,01	1095413,06	1356662,33	1086944,31	939337,56	1542766,70	660635,34	1360029,34	1280797,12	1251108,57	1141827,64	1545198,62
		ANO	254733,24	176761,71	88372,74	176135,50	90707,84	50146,16	76741,77	137600,90	69316,22	297589,34	154462,16	100700,10	231502,93	302476,70
		%	23,58%	20,18%	7,54%	16,08%	6,69%	4,61%	8,17%	8,92%	10,49%	21,88%	12,06%	8,05%	20,27%	19,58%
Rato 3	D1	AT	1716311,69	1784934,01	1126406,78	1412897,08	3584796,56	1457828,06	3343686,60	2774172,12	1323709,20	2263829,87	1985570,41	2087591,94	2897502,66	3289497,16
		ANO	422156,48	702164,77	141472,55	65033,92	578924,01	88619,56	841390,14	390545,05	114611,96	246509,65	258404,19	431083,74	463920,06	718234,72
		%	24,60%	39,34%	12,56%	4,60%	16,15%	6,08%	25,16%	14,08%	8,66%	10,89%	13,01%	20,65%	16,01%	21,83%
Rato 4	D2	AT	1393170,80	1494227,50	1311737,96	1259719,40	1067644,28	1211811,32	1129311,20	1124959,52	905921,84	1380049,69	853434,09	1145307,00	931232,29	2436053,16
		ANO	389414,60	792447,84	102038,33	35897,20	119620,24	72129,47	200412,89	95399,26	83160,96	287627,24	124711,97	68497,35	95909,20	427977,62
		%	27,95%	53,03%	7,78%	2,85%	11,20%	5,95%	17,75%	8,48%	9,18%	20,84%	14,61%	5,98%	10,30%	17,57%
Médias (%)			33,53%	42,12%	8,01%	5,90%	10,75%	9,65%	16,84%	15,45%	15,43%	18,72%	16,47%	17,24%	15,72%	21,85%

Fonte: Do autor.

Notas: D1: Defeito cirúrgico anterior; D2: Defeito cirúrgico posterior; AT: Área total; ANO: Área de neoformação óssea.