

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Pablo Eduardo Walker Lago

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DA
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS NA
CONSOLIDAÇÃO DE ENXERTOS
AUTÓGENOS EM BLOCO – ESTUDO EM
COELHOS**

Passo Fundo

2014

Pablo Eduardo Walker Lago

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DA
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS NA
CONSOLIDAÇÃO DE ENXERTOS
AUTÓGENOS EM BLOCO – ESTUDO EM
COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação da profa. Dra. Márcia Borba.

Passo Fundo

2014

Ata de aprovação da Banca Examinadora

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Pablo Eduardo Walker Lago, nascido no dia 13 de janeiro de 1985 na cidade de Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil, graduado em Odontologia pela Universidade de Passo Fundo –UPF, no ano de 2007, Especialista em Ortodontia pela Associação Gaúcha de Ortodontia, Porto Alegre, ano 2010, Especialista em Radiologia e Imaginologia Odontológica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, ano 2010. Atualmente trabalha em consultório particular na cidade de Ijuí-RS e como aspirante a oficial dentista do exército brasileiro no 27 Grupo de Artilharia de Campanha em Ijuí-RS.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Aos meus pais pelo exemplo de amor e honestidade que me transmitem todos os dias.

As minhas irmãs por me colocarem na obrigação de cada dia ser uma pessoa e um profissional melhor.

A minha noiva pelo companheirismo, compreensão e pela ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo e orientador Prof. Vinicius Rosa pelo incentivo de ingressar no ppgodonto da UPF, pelos conselhos desde o primeiro dia de curso e todos os ensinamentos transmitidos até o dia de hoje.

A Prof.a Michelli Ataide e o Prof. Marco Silva pela ajuda durante todo o experimento, amizade, conselhos e ensinamentos, vocês foram como irmãos.

Ao aluno da Medicina Veterinária Luís Pedrotti, meu braço direito e esquerdo durante todo experimento. Com certeza vai ser um excelente profissional.

Aos alunos da Medicina Veterinária Marcieli, Luana, Ligiani, Isadora, Maria Patrícia, Patrícia e Alfredo pela ajuda, risadas, parceria e dedicação no cuidado com os animais durante a pesquisa.

A minha segunda orientadora Prof.a Luciana Ruschel por ter aceitado o convite de me orientar na ausência do Prof. Vinicius e por tudo que fez juntamente com o pessoal do Hospital Veterinário.

A minha terceira orientadora Prof.a Márcia Borba, pela ajuda na reta final da dissertação e pelos ensinamentos durante todo o Mestrado.

Ao meu amigo e colega André Tonetto pela amizade, parceria, ensinamentos e ajuda com os materiais durante a pesquisa.

Aos meus colegas e professores de curso pelos momentos que aproveitamos juntos.

Aos funcionários da faculdade de Odontologia e do Hospital Veterinário.

A todos que fizeram parte de história.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Enxertos ósseos.....	19
2.2 Reparo ósseo	22
2.3 Ação dos fatores de crescimento sobre os enxertos ósseos.....	26
2.4 Concentrados plaquetários	28
2.5 Fibrina Rica em plaquetas.....	29
2.5.1 Fatores de crescimento e citocinas da PRF	32
3 PROPOSIÇÃO	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Aspectos éticos da pesquisa	45
4.2 Caracterização das amostras	45
4.3 Manejo e Manutenção dos animais	46
4.4 Protocolo de anestesia e medicação dos animais	46
4.5 Cirurgia para obtenção dos enxertos autógenos	48
4.6 Obtenção e preparo das fibrinas ricas em plaquetas.....	50
4.7 Preparo do leito receptor e fixação do enxerto autógeno	52
4.8 Eutanásia dos animais	55
4.9 Análise histológica.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Metodologia do estudo.....	57
5.2 Análises histológicas.....	61

6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIAS.....	72
8 APÊNDICE.....	86
9 ARTIGO A SER SUBMETIDO	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	A) Tricotomia região craniana, B) Tricotomia região submandibular bilateral.	47
Figura 2 -	A) Posicionamento do guia cirúrgico, B) demarcações com broca esférica (setas brancas).	49
Figura 3 -	A) União das marcações, B) Remoção do enxerto.	49
Figura 4 –	Enxertos em bloco preparados para instalação.	50
Figura 5 -	A) Coleta sanguínea, B) Centrifuga – EBA 20S.	51
Figura 6 -	A) PRF obtido, B) Separação PRF dos glóbulos vermelhos.	51
Figura 7 -	A) Membrana de PRF (1mm de espessura), B e C) Membrana adaptada ao enxerto e ao parafuso.	52
Figura 8 -	Perfurações monocorticais no leito receptor.	53
Figura 9 -	Enxerto em posição no leito receptor e fixado.	53
Figura 10 –	A) Sutura periósteeo e músculo B) Sutura da pele.	54
Figura 11 –	A) Coleta sanguínea B) Sangue coagulando no interior da seringa C) Coágulo obtido de maneira difusa.	60
Figura 12 –	A) Coleta sanguínea, B) Membrana de PRF obtida.	61
Figura 13 -	Neoformação óssea após 14 e 28 dias para os grupos com e sem PRF. Coloração HE.	62
Figura 14 -	Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado matriz extracelular com maior densidade das fibras colágenas (setas) no grupo PRF, 14 e 28 dias. Coloração HE.	64

Figura 15 - Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado presença de vasos sanguíneos (setas) em ambos os grupos em 14 dias (coloração HE)	65
Figura 16 - Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado presença de maior atividade osteoblástica no grupo PRF, em 14 dias. Azul de toluidina.	66
Figura 17 - Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado presença de osso mais compacto no grupo PRF em 28 dias. Coloração HE.	68
Figura 18 - Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado presença de menor atividade osteoblástica em ambos os grupos em 28 dias. Azul de Toluidina.	69
Figura 19 – Membrana de PRF ausente na interface enxerto/ leito receptor em A) 14 dias e B) 28 dias.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

PRP	Plasma rico em plaquetas
BMP's	Proteínas morfogenéticas do osso
PRF	Fibrinas ricas em plaquetas
CGF	Fator de crescimento concentrado
PDGF	Plasma rico em fatores de crescimento
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
TGFB	Fator transformador de crescimento beta transformador
PDGF	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
PDEGF	Fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas
A	Alfa
IL-1	Interleucina um
IL-4	Interleucina quatro
IL-6	Interleucina seis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PPP	Plasma pobre em plaquetas
BMSC	Human oral bone mesenchymal stem cell
ABB	Anorganic bovine bone Osso bovino inorgânico
rhBMP-2	Proteínas morfogenéticas do osso recombinante 2
BCP	Biphasic calcium phosphate Fosfato de cálcio bifásico
TCP	Mixed tricalcium phosphate Matriz de tricálcio fosfato
FDBA	Mineralized Freeze-Dried Bone Allograft Enxerto Ósseo Liofilizado Mineralizado Alógeno
BPMB	Osso mineral poroso bovino
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais

UPF	Universidade de Passo Fundo
Kg	Kilograma
°C	Graus Celsius
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
%	Porcentagem
IV	Intravenosa
L-5/L6	Lombar 5/ Lombar 6
®	Marca Registrada
L	Litro
Min	Minuto
Mm	Milímetro
n.	Numero
cm	Centímetro
G	Comprimento da agulha em polegadas
Rpm	Rotações por minuto
EDTA	Ácido diaminotetracético
µm	Micrometro
HE	Hematolina Eosina
et al.	e colaboradores

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* o efeito da membrana de fibrina rica em plaquetas (PRF) na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco no leito receptor. A hipótese a ser testada é que a interposição da membrana de PRF aumenta a qualidade da formação óssea na interface leito receptor e enxerto autógeno. Essa pesquisa foi previamente aprovada pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo. Dez coelhos *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem Nova Zelândia, foram submetidos a instalação bilateral no ângulo da mandíbula de dois enxertos autógenos em bloco (10 mm x 10 mm) obtidos da calota craniana. Em um dos enxertos foi interposta uma membrana de PRF entre o enxerto e o leito receptor. Após 14 e 28 dias os animais foram submetidos a eutanásia e os enxertos removidos e processados para análise histológica. Em ambos os períodos de avaliação, foi observada no grupo com PFR uma formação óssea organizada, com continuidade de tecido mineralizado, maior densidade de fibrilas colágenas e maior presença de vasos sanguíneos em sítios sem formação óssea. A hipótese do estudo foi aceita uma vez que os dados histológicos mostraram que no lado que recebeu PRF, a remodelação óssea ocorreu de maneira mais intensa. A interposição da membrana de PRF pode ser um método promissor quando aplicada entre o enxerto e o leito receptor em coelhos para acelerar a consolidação de enxertos autógenos.

Palavras-chave: fibrinogênio, regeneração, fatores de crescimento, citocinas, coagulação sanguínea.

ABSTRACT¹

The objective was to evaluate in vivo the effects of platelet rich fibrin (PRF) in the consolidation of autogenous bone graft. The tested hypothesis was that PRF enhances the quality of bone formation between the graft and the host tissue. Ten rabbits were submitted to a surgical procedure to implant bilaterally bone grafts from calvaria in the mandible. PRF was placed in the interface in one side and the other side was left untreated (control). After 14 and 28 days the animals were euthanized and the tissues processed for histological evaluation (eosin and hematoxylin and toluidine blue). In both periods of evaluation, the use of PRF has improved the organization of the newly formed bone with higher concentration of blood vessels and density of collagen fibrils where bone formation has not occurred. The hypothesis was accepted once the histology showed that PRF has improved the quality of bone formation after 14 and 28 days as compared to the control. The use of PRF between graft and host bone can be a promising method to improve graft consolidation.

Key words: fibrinogen, regeneration, growth factors, cytokines, blood clotting

¹Histological analysis of the effect of platelet-rich fibrin in the consolidation of bone grafts blocks - study in rabbits

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários estão entre as melhores opções para reposição de dentes perdidos. Para que o tratamento com implante tenha um resultado satisfatório, é preciso que exista, dentre outros requisitos, volume e qualidade óssea adequada. A perda óssea pode ser causada por inúmeros fatores como, traumatismos dento alveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita, patologias que envolvam maxila e mandíbula, falta de função do rebordo e carga protética inadequada, além de infecções que resultam em problemas estéticos-funcionais (TOLEDO FILHO *et al.*, 2001; MENDES, 2000).

Em muitos casos, essa perda óssea exige o uso de técnicas de enxertia para restabelecer o volume ósseo perdido (MACHADO *et al.* 2010). Mesmo com altura suficiente, a ausência da parede óssea vestibular pode gerar um mau posicionamento do implante, comprometendo a estética, higienização e função (VAN DEN BERGH *et al.*, 1998).

Entre as opções de enxertos ósseos destacam-se os autoenxertos (autógenos), homoenxertos (alógenos), xenoenxertos, materiais sintéticos ou combinação dos mesmos (BAUER & MUSCHLER, 2000).

O osso autógeno é considerado o “padrão ouro” entre as opções terapêuticas para a enxertia óssea (VAN DEN BERGH *et al.*, 1998; GROENEVELD *et al.*, 1999). Durante o procedimento de enxertia, o

osso autógeno perde muito de sua vitalidade celular, mas ainda fornece uma estrutura que se revasculariza e permite a osseointegração. Dependendo do grau da perda óssea e do tipo de enxerto, se faz necessário um período de aproximadamente seis meses para o início da reabilitação oclusal (TONG & BUCHMAN, 2000).

O desejo dos pacientes por reabilitações orais extensas em curtos períodos de tempo exige da equipe profissional a busca por materiais e técnicas que permitam a aceleração do processo de osseointegração (UEDA *et al.*, 2007).

Algumas alternativas têm sido utilizadas para acelerar o processo de fusão entre o enxerto ósseo e o leito receptor, como o plasma rico em plaquetas (PRP) e as proteínas morfogenéticas do osso (BMP's), que liberam fatores de crescimento onde aplicados, tanto na loja óssea preparada para receber o implante, como no material de enxerto, intensificando-se o processo de quimiotaxia das células responsáveis pela reparação tecidual e promovendo a aceleração da formação e maturação de tecido ósseo (CARLSON & ROACH, 2002; LOUREIRO, 2010).

Existem diferentes tipos de agregados plaquetários para o uso em odontologia. Entre eles estão as fibrinas ricas em plaquetas (PRF), o fator de crescimento concentrado (CGF) e plasma rico em fatores de crescimento (PDFG) (ANITUA *et al.*, 2004; SOHN *et al.*, 2009).

A PRF apresenta mais vantagens para o uso na Odontologia, pois possui um protocolo de preparação prático e acessível, conteúdo biológico favorável ao processo de reparação tecidual e rede de fibrina semelhante ao coágulo natural (COSTA *et al.*, 2012).

A PRF é uma membrana de fibrina com um altíssimo potencial de reparação de feridas (THORWARTH *et al.*, 2005). Pode ser usada sozinha ou associada a diferentes biomateriais, inclusive osso autógeno. Alguns estudos mostram que a sua associação ao osso autógeno resulta no rápido amadurecimento e consolidação do enxerto, aumento da densidade óssea, aumento da taxa de osteogênese e melhor qualidade do novo osso (DOHAN *et al.*, 2006c; WU *et al.*, 2012).

A PRF possui fatores de crescimento que aceleram a regeneração óssea precoce, aumentando angiogênese, quimiotaxia, mitose e proliferação celular (CROMACK *et al.*, 1990; WU *et al.*, 2012). Portanto, a interposição de uma membrana fina da PRF entre enxertos autógenos parece ser um método promissor para a aceleração da osseointegração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enxertos ósseos

Os enxertos ósseos são empregados em situações onde se faz necessário a correção de alterações ósseas, sejam elas de natureza traumática, congênita ou patológica. A função dos enxertos ósseos é auxiliar o processo de reparo ósseo e conseqüentemente, o retorno dos tecidos envolvidos à sua condição de normalidade, para posterior reabilitação protética (ELLIS III, 1996).

Entre as opções para enxertia óssea existem os enxertos autógenos e alógenos. Os enxertos alógenos em longo prazo possuem resultados semelhantes aos autógenos, mas, por serem removidos de outro ser vivo apresentam riscos de transmissão de doenças (WEILAND *et al.*, 1983; DEL VALLE *et al.*, 2006).

O enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão ouro entre as técnicas para a enxertia óssea. Ele atua por mecanismos de osteogênese, osteocondução e osteoindução (MISCH, 1999; GRAGEDA, 2004; KLONGNOI *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2007; INTINI *et al.*, 2008).

Como vantagens os enxertos autógenos apresentam um período de reparo mais curto do que o alógeno, excelente incorporação ao leito receptor, custo menor comparado aos outros substitutos ósseos, reconstroem tridimensionalmente a anatomia perdida e não oferecem

riscos de rejeição imunológica ou possibilidade de transmissão de doenças (MISCH, 2008).

Como desvantagens apresentam um maior tempo operatório, maior perda sanguínea, ferida operatória adicional e conseqüentemente aumento da morbidade do sítio doador (MISCH, 1999).

Os enxertos autógenos podem ser usados de forma particulada ou em bloco. Os enxertos particulados normalmente são utilizados em defeitos pequenos, já os enxertos em bloco são utilizados em defeitos onde a reposição óssea necessária é maior (BEZERRA & LENHARO, 2002).

Os enxertos autógenos em bloco podem ser usados de três maneiras diferentes para a reconstrução de rebordos atróficos: enxerto tipo *onlay*, onde grandes blocos de osso são colocados sobre o a crista do rebordo alveolar; enxerto tipo *veneer*, onde o enxerto é colocado na face vestibular ou lingual, envolvendo ou não a crista do rebordo alveolar; e enxerto tipo *inlay*, onde o osso é colocado dentro dos defeitos ósseos (BREINE & BRANEMARK, 1980).

Os enxertos em bloco podem ser classificados em cortical, cortico-esponjoso e esponjoso, variando pela proporção de osso cortical ou medular da área doadora (TOPAZIAN, 1975). A escolha de um determinado tipo de enxerto em bloco depende da necessidade de aumento horizontal e/ou vertical, grau de atrofia, tipo de prótese e preferência do clínico e do paciente (MISCH, 2011).

Existem três diferenças histológicas entre os enxertos corticais e medulares: i) os enxertos corticais revascularizam mais lentamente e não por inteiro; ii) a substituição dos elementos ósseos, células e matriz nos enxertos medulares ocorrem inicialmente com uma fase de aposição

óssea, seguida por reabsorção enquanto no enxerto cortical ocorre o contrário; iii) os enxertos corticais formam um misto de osso novo e osso necrótico não reparando completamente enquanto no medular ocorre reparação total (BURCHARDT, 1983).

As áreas doadoras extrabucais de enxertos autógenos em bloco são a crista ilíaca, costela, calvária, tibia e as intrabucais são as regiões de corpo, mento, ramo e coronóide mandibular, apesar da menor quantidade óssea (BOYNE, 1997).

Enxertos em bloco da calota craniana apresentam menor reabsorção e perda de volume do bloco, semelhante aos enxertos de ilíaco ou costela, principalmente quando realizados na mandíbula. O osso da calvária é preferido também para o procedimento no terço médio da face, área nasal e órbitas (MARX, 2007).

A taxa de cicatrização e a quantidade de formação de osso final em enxertos autógenos em bloco variam conforme o local doador e dependem de outros fatores, entre eles, a quantidade de células medulares transplantadas com o enxerto ósseo, a vascularização do leito receptor e a obtenção da estabilidade do enxerto (MARX, 2007).

Normalmente a instalação dos implantes é feita em um tempo cirúrgico posterior em casos de enxertia em bloco para que ocorra a consolidação do enxerto ao leito receptor, em média de seis a oito meses (MISCH & MISCH, 1998) e para o início da reabilitação protética um período de espera de quatro meses é necessário, devido a necessidade de osseointegração dos implantes (MISCH, 2011).

Durante a espera pela consolidação do enxerto em bloco, é necessário que a área enxertada fique livre de tensões e fixada rigidamente, caso contrário poderá ocorrer a deiscência do tecido mole e

exposição do enxerto, levando ao insucesso da enxertia (MISCH & MISCH, 1998).

Pacientes que usam próteses mucosuportadas devem fazer uso de dieta pastosa por um período de dois meses após a enxertia, para que a estabilidade dos implantes não dependa somente dos parafusos de fixação (MISCH, 2011).

Esse período de espera do início do tratamento até a reabilitação protética, o desconforto e colaboração necessários por parte do paciente faz com que alguns pacientes desistam do tratamento. Então a aceleração do processo de consolidação do enxerto parece ser um fator importante de estudo.

2.2 Reparo ósseo

Os materiais para enxerto ósseo interagem com o leito receptor para que ocorra a reparação óssea por osteocondução, osteogênese e osteoindução (DELACURE, 1994).

A osteogênese é a estimulação da formação óssea diretamente a partir de osteoblastos. A osteoindução é a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local ou mesmo estimulando a formação de ossos em um sítio heterotópico (URIST, 1965). A osteocondução é a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, o que requer a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras, característica de materiais inorgânicos (MASTERS, 1988).

Enxertos ósseos em bloco formam novo osso, por osteoindução e osteocondução, a partir das margens ósseas adjacentes e em menor quantidade por osteogênese direta de células sobreviventes osteocompetentes. É por isso que os enxertos de blocos maiores formam menos osso e apresentam uma redução de seu volume quando usados como enxertos *onlay* (MARX, 2007).

O osso é formado por osteogênese quanto ocorre a sobrevivência de osteoblastos do enxerto e as células-tronco da medula endosteal (menor nos enxertos de bloco), por osteoindução através da liberação de BMP's e fator de crescimento semelhante a insulina 1 e 2 (IGF-1 e -2) e osteocondução por meio da estrutura do enxerto (MARX, 2007).

Lesões ósseas por trauma ou procedimento cirúrgico intencional, via de regra, sofrem reparo por regeneração, ou seja, ocorre o restabelecimento integral da forma e função original. Em situações que ocorre cicatrização o local da lesão e reparado de forma parcial não retornando as suas características originais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O processo de reparo ósseo em geral é influenciado pela severidade do trauma na fratura ou local de implantação, grau de fixação durante o reparo, local de fratura ou implante, tipo de osso (cortical ou trabecular) e idade. O reparo é um processo complexo com eventos celulares e extracelulares, sendo que o reparo bem sucedido é aquele com reconstituição da continuidade tecidual (OPREA et al., 2003).

Nas regiões onde ocorre a lesão óssea, primeiramente observa-se hemorragia, pela lesão de vasos sanguíneos, destruição de matriz, morte de células ósseas e formação do coágulo em torno do enxerto (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Obtém-se então um ambiente

acidótico (pH entre 4 a 6) e hipóxico ($PO_2 = 5$ a 10 mmHg), contendo vários elementos figurados do sangue como as plaquetas, leucócitos e as células vermelhas. (MARX, 1999).

Essa primeira fase de formação e organização do coágulo é coordenada pelas plaquetas, que controlam a hemostasia e liberação de mediadores químicos que coordenam as atividades celulares neste período (BURCHARDT, 1983 e GORDH & ALBERIUS, 1999). (MARX, 1999).

Após a formação do coágulo o tecido ósseo inicia um processo de consolidação óssea, que é um processo complexo e pode ser dividido em três estágios principais: fase inflamatória, reparo e remodelação (SOUSA, 2003; DYCE *et al.*, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). O tempo de cada fase depende da idade do indivíduo, do estado de saúde geral e nutricional, do tipo de osso envolvido, da intensidade do trauma, irrigação local, presença ou não de forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção (TEN CATE, 1985).

A fase inflamatória é caracterizada pelo início de um processo inflamatório agudo na área lesada com grande mobilização de macrófagos e neutrófilos, provocados pela liberação de substâncias quimiotáticas (histamina e serotonina). A fagocitose na região tem como objetivo o início da remoção do coágulo das regiões necrosadas e dos osteócitos mortos (CATANZARO & GUIMARÃES, 1982).

Nos primeiros dois dias o exsudato do hematoma está repleto de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios liberados pelas plaquetas, e também de células locais como mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (SOUSA, 2003; DYCE *et al.*, 2004).

Os fibroblastos que produzem colágeno estão presentes em grande número na fase reparadora e são responsáveis pela formação do calo fibroso. Surge uma nova rede capilar, através das células mesenquimais indiferenciadas e das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos, isso, concomitantemente com a ação dos macrófagos que estão reabsorvendo o coágulo e tecido ósseo necrosado. Fibroblastos e osteoblastos vão formar rapidamente um novo tecido ósseo no local, através da ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva, que vai resultar em um osso imaturo (CATANZARO e GUIMARÃES, 1982).

Os osteoblastos depositam uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que se torna impregnada de sais de cálcio, formando o osso primário. Após ocorre a transformação do osso primário em osso amadurecido com estrutura lamelar típica, denominado calo ósseo (CROCI *et al.*, 2003; BETTI, 2004).

Na fase remodeladora processos de neoformação e reabsorção óssea, através de atividades osteoblásticas e osteoclásticas respectivamente, removem os excessos de material do calo ósseo, restabelecendo as cavidades ósseas que existiam, reconstruindo o sistemas de Havers e o trabeculado de osso esponjoso na mesma disposição anterior à lesão (CATANZARO e GUIMARÃES, 1982).

A ativação e o aumento de células mesenquimais em osteoblastos definem a extensão e a atividade de reparo ósseo juntamente com quimiotaxia e ativação de macrófagos. Os osteoblastos secretam o fator de crescimento transformante β (TGFB-1) e o IGF, e os macrófagos são atraídos pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pelo gradiente de oxigenação entre o espaço morto e o tecido adjacente. As

células mesenquimais então secretam o TGF- β 1 e o IGF para continuar a auto-estimulação da formação óssea. O processo de reabsorção e aposição óssea leva a formação de um osso maduro, envolvendo o IGF e a BMP (MARX, 1999).

Para que ocorra a osteogênese é necessário o fenômeno de angiogênese durante o processo de regeneração. As células dos capilares possuem relação direta na formação óssea, devido à sua proximidade com os osteoblastos e células osteoprogenitoras nos sítios de nova formação óssea (PELLISSIER *et al.*, 2004).

A incorporação e o remodelamento ósseo estão intrinsecamente relacionados ao processo de revascularização e a manutenção de seu volume depende da rapidez deste processo (GORDH *et al.*, 1997). A revascularização depende da angiogênese proveniente do leito receptor, desencadeada pela ação de fatores de crescimento que resulta em crescimento de capilares e remodelação óssea.

A perfuração do leito ósseo favorece a incorporação do enxerto devido ao estímulo da angiogênese (ALBERIUS *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2000). O preparo cirúrgico do leito receptor é realizado com objetivo de aproximar a medula óssea da área receptora (fonte de vasos sanguíneos e células osteogênicas) e do enxerto (HARDESTY e MARSH, 1990).

2.3 Ação dos fatores de crescimento sobre os enxertos ósseos

O reparo ósseo em áreas de enxerto ósseo ocorre dentro de um ambiente bioquímico complexo, no qual o tecido enxertado deve

progredir de um tecido transplantado para um tecido auto-sustentado (MARX, 1999).

Tanto em enxertos autógenos quanto na cicatrização de fraturas há um influxo inicial de elementos hematopoiéticos vindos do tecido ósseo saudável adjacente (MUNDY, 1996). Portanto, provavelmente, as plaquetas e seus derivados (fatores de crescimento e citocinas) estão presentes nos estágios iniciais da cicatrização do enxerto (LANDEBERG *et al.*, 2000).

Os fatores de crescimento liberados pelos alfa grânulos plaquetários atuarão com forte influência na 1ª semana pós instalação do enxerto (MARX, 1999; GARG, 1999).

Após três dias o PDGF estimula a mitogênese das células do canal medular transferidas junto com o enxerto e inicia a angiogênese do complexo capilar no interior do enxerto pela indução de mitose das células endoteliais. O TGF- β , estimula a mitogênese de pré-osteoblastos e osteoblastos para aumentar o número destas células, bem como promover a diferenciação das mesmas em osteoblastos maduros e funcionais. No intuito de sustentar a invaginação capilar, o TGF- β influencia os osteoblastos e os fibroblastos a depositarem matriz óssea e colágeno. O IGF, por sua vez, atua nos osteoblastos endósteos, que limitam as trabéculas do osso esponjoso enxertado (MARX, 1999; GARG, 1999).

Do 5º ao 7º dia, através do mecanismo de quimiotaxia, o PDGF atrai os macrófagos para a área enxertada e os processos regenerativos a partir de então serão estimulados pelos fatores de crescimento derivados dos macrófagos (FCDM) (MARX, 1999; GARG, 1999).

2.4 Concentrados plaquetários

A PRF é a segunda geração de plaquetas concentradas e consiste em uma membrana de fibrina com um altíssimo potencial de reparação de feridas. A primeira geração de fatores de crescimento autólogo é o PRP, utilizado clinicamente para estimular regeneração óssea (THORWARTH *et al.*, 2005).

O PRP apresenta efeitos limitados para a regeneração óssea, devido à rápida liberação dos fatores de crescimento no local da regeneração e por sua rede de fibrina não favorecer o enredamento de citocinas e migração celular (DOHAN *et al.*, 2006a).

Outras opções de concentrados plaquetários são o CGF e PDFG, que também são utilizados para a reconstrução de defeitos ósseos. Assim como a PRF essas técnicas são simples e não requerem tromboplastina bovina para ativação (ANITUA *et al.*, 2004; SOHN *et al.*, 2009).

A diferença entre a PRF, CGF e PDFG se dá na velocidade de centrifugação e na quantidade de sangue necessário para a obtenção dos concentrados plaquetários (ANITUA *et al.*, 2004; SOHN *et al.*, 2009).

Os concentrados de plaquetas surgiram como alternativa às colas de fibrina na cirurgia bucomaxilofacial, visando melhorar o processo de cicatrização (WHITMAN *et al.*, 1997). Através das plaquetas, fatores importantes no processo de reparação como PDGF-AB, TGFb-1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são liberados e estimulam a proliferação celular, a angiogênese e a remodelação (MARX *et al.*, 1999).

2.5 Fibrina Rica em plaquetas

A técnica de obtenção da PRF foi desenvolvida por Joseph Choukroun, na França, para uso específico em cirurgia oral e maxilofacial (CHOUKROUN *et al.*, 2000).

A PRF é obtida a partir de sangue autólogo, sem adição de fatores externos, diferente do que acontece no processamento do PRP que exige o uso de anticoagulantes (SUNITHA & MUNIRATHNAM, 2008; PRAKASH & THAKUR, 2011).

A PRF é considerada um biomaterial de fibrina. Sua estrutura molecular com baixa concentração de trombina é uma matriz ideal para a migração de células endoteliais e fibroblastos. Ela permite uma rápida angiogênese e facilitação na remodelação da fibrina em um tecido conectivo mais resistente, além de uma matriz contendo todos os elementos moleculares e celulares que permitem a cura ideal. Essa matriz transporta todos os componentes favoráveis presentes numa amostra de sangue e por isso que este biomaterial pode ser considerado um concentrado fisiológico (DOHAN *et al.*, 2006b).

A obtenção da PRF deve ser autóloga, não podendo ser transferida entre pacientes, devido à possibilidade de rejeição e contaminação pela presença de células imunes que apresentam elevada concentração de moléculas circulantes (VRENDRAMIN *et al.*, 2006; CHOUKROUN *et al.*, 2006b).

A diferença dos componentes sanguíneos entre seres humanos, não parece influenciar na composição da PRF em termos de

mineralização, proliferação, e nos efeitos de migração celular, o que indica que as membranas de PRF provocam efeitos biológicos semelhantes (LI *et al.*, 2013).

O uso da PRF é inviável em cirurgias de grande porte devido à necessidade de grandes volumes de sangue para obtenção de membranas maiores. Entretanto a PRF pode ser utilizado em cirurgias odontológicas por essa se tratarem de cirurgias de tamanho reduzido. (ANITUA *et al.*, 2006).

Uma vez que não são utilizados anticoagulantes para a obtenção da PRF, ocorre rapidamente a ativação da maioria das plaquetas da amostra de sangue assim que elas entram em contato com as paredes do tubo de vidro, fazendo com que ocorra a liberação das cascatas de coagulação (DOHAN *et al.* 2006a).

O substrato final de todas as reações de coagulação é o fibrinogênio que é uma proteína solúvel. O fibrinogênio é transformado em uma fibrina insolúvel pela trombina, enquanto o gel de fibrina polimerizado constitui a primeira matriz cicatricial da área lesionada (CLARCK, 2001; PRAKASH e THAKUR 2011; VAN HINSBERGH *et al.* 2001).

Durante a obtenção da PRF o fibrinogênio é inicialmente concentrado na parte alta do tubo, antes da trombina circulante transformá-lo em fibrina. Um coágulo de fibrina é então obtido no meio do tubo, entre os glóbulos vermelhos localizados na parte inferior e o plasma acelular ou plasma pobre em plaquetas (PPP) na parte superior. As plaquetas são teoricamente presas nas malhas de fibrina (DOHAN *et al.*, 2006a).

As plaquetas acumulam-se parte inferior do coágulo de fibrina, principalmente na junção entre os glóbulos vermelhos e o coágulo de PRF em si. Esta região se encontra na extremidade vermelha da PRF e é a parte mais eficaz do coágulo de fibrina para o uso clínico (DOHAN *et al.*, 2006b).

O fibrinogênio é altamente presente tanto no plasma quanto nos grânulos- α das plaquetas e desempenha um papel determinante na agregação plaquetária durante a hemostasia. Ele se transforma em uma espécie de cola biológica capaz de consolidar o aglomerado plaquetário inicial, formando uma barreira protetora ao longo de violações vasculares durante a fase da coagulação (CLARCK, 2001; VAN HINSBERGH *et al.*, 2001).

O protocolo de obtenção da PRF depende inteiramente da velocidade de obtenção do sangue e de transferência para a centrífuga, pois, devido a ausência de anticoagulante, as amostras começam a coagular imediatamente após o contato com o tubo de vidro. Este manuseio deve ser rápido para que se consiga um coágulo de PRF clinicamente utilizável. Se o tempo para o início da centrifugação for longo a fibrina irá polimerizar de um modo difuso no tubo e apenas um pequeno coágulo de sangue sem consistência será obtida (DOHAN *et al.*, 2006a).

A PRF tem a característica de polimerizar naturalmente e lentamente durante a centrifugação devido as concentrações de trombina serem aproximadamente fisiológicas, já que descarta a adição de trombina bovina. Este aspecto é crucial para determinar a organização tridimensional da rede de fibrina, que devido a isso, é semelhante ao coágulo de fibrina natural (DOHAN *et al.*, 2006 a).

Pequenas concentrações de trombina implicam uma porcentagem muito significativa de junções equiláteras. Essas junções ligadas permitem o estabelecimento de uma rede de fibrina fina e flexível capaz de suportar o enredamento de citocinas e migração celular. Na maioria dos outros concentrados de plaquetas obtêm-se devido a alta concentração de trombina, junções bilaterais que permitem o espessamento dos polímeros de fibrina. Isso leva a constituição de uma rede rígida, não favorável ao enredamento das citocinas e migração celular (DOHAN *et al.*, 2006 ab).

Um modo de polimerização progressiva significa incorporação aumentada de citocinas circulantes nas malhas de fibrina (citocinas intrínsecas). Isso acarreta em um tempo de vida maior para estas citocinas, que serão liberadas e utilizadas apenas no tempo de remodelação da matriz inicial cicatricial (efeito em longo prazo). As citocinas são assim mantidas disponíveis *in situ* durante um período conveniente, quando as células começam a remodelação da matriz, ou seja, quando eles têm que ser estimuladas para lançar a reconstrução do local lesionado (DOHAN *et al.*, 2006b).

2.5.1 Fatores de crescimento e citocinas da PRF

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e regeneração. Estas moléculas naturais são iniciadoras universais de quase todos os processos cicatriciais (MARX, 1999).

O organismo humano utiliza os fatores de crescimento para promover o rápido aumento do número de células mesenquimais

indiferenciadas no sítio cicatricial durante o tempo de reparo e cicatrização (MARX *et al.*, 1999).

Os três principais fatores de crescimento das plaquetas, atuantes na regeneração são:

- i) PDGF - são essenciais para a migração, sobrevivência, proliferação de células mesenquimais indiferenciadas e a angiogênese por indução de mitose de células endoteliais (LUCARELLI *et al.*, 2003; MARX, 1999).
- ii) TGFb - induz a síntese de colagénio I e fibronectina, através dos osteoblastos ou fibroblastos. Embora os seus mecanismos de regulação sejam particularmente complexos, TGFb-1 pode ser considerado como um regulador da inflamação através da sua capacidade de induzir a cicatrização fibrosa (CHOUKROUN *et al.*, 2006b)
- iii) IGF - atua nos osteoblastos endosteais que revestem o trabeculado do osso esponjoso. O IGF I e II são reguladores positivos da proliferação e diferenciação de vários tipos celulares, que infelizmente incluem as células tumorais (WINKLER *et al.*, 2000).

A PRF impede que os fatores de crescimento sofram proteólise e assim permite que eles mantenham suas atividades por um período maior estimulando a regeneração óssea de forma mais eficaz (LUNDQUIST *et al.*, 2008).

Após a ativação das plaquetas durante a obtenção do PRF, a sua degranulação leva a liberação de várias citocinas e fatores de crescimento. O PDFG- AB, VEGF e TGF-b1 são os fatores de crescimento liberados em maior quantidade e são responsáveis por

ajudar na cicatrização dos tecidos moles e duros através do estímulo da produção de colágeno e por aumentar a resistência da ferida e iniciar a formação do calo ósseo. Outros fatores resultantes do processo são o IGF, interleucina (IL1- β e IL-4) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (DOHAN *et al.*, 2006b; EHRENFEST *et al.*, 2009a; CROMACK *et al.*, 1990).

Esses fatores de crescimento aceleram a regeneração óssea precoce, aumentando angiogênese, quimiotaxia, mitose e proliferação celular (CROMACK *et al.*, 1990; WU *et al.*, 2012).

Efeitos como aumento na fixação de osteoblastos e regulação na produção de proteínas colagenosas são características da PRF, apresentando assim um alto potencial de regeneração óssea (WU *et al.*, 2012).

Podemos considerar que as citocinas das plaquetas ficam presas nas malhas de fibrina da PRF e provavelmente nos polímeros da fibrina (MOSESSON *et al.*, 2001). Na verdade, a maioria das referidas citocinas não são encontrados nem no sobrenadante, nem no exsudado. Elas permanecem presas na matriz de fibrina da PRF, mesmo depois da exsudação de soro, o qual implica, necessariamente, uma incorporação íntima destas moléculas com a arquitetura molecular do polímero de fibrina (DOHAN *et al.*, 2006b).

A membrana de PRF sustenta uma liberação lenta e significativa de fatores de crescimento importantes (TGFB-1, PDGF-AB, VEGF) durante uma semana, logo, a membrana estimula o local durante um tempo significativo enquanto ocorre a cicatrização (EHRENFEST *et al.*, 2009a).

Alguns autores sugerem que exista uma íntima relação entre formação óssea e a angiogênese, observada pela relação entre vascularização, diferenciação dos osteoblastos e mineralização óssea durante a osteogênese intramembranosa (PELISSIER *et al.*, 2004).

A angiogênese é induzida pelo VEGF, que faz com que ocorra a formação de novos vasos, e através desse se obtenha nutrientes e células para o desenvolvimento ósseo (DYCE *et al.*, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Para que ocorra a angiogênese é necessário que exista uma matriz extracelular para permitir a migração, divisão e mudanças fenotípicas de células endoteliais. A matriz de fibrina estimula diretamente a angiogênese (DVORAK *et al.*, 1987).

A propriedade de angiogênese da matriz de fibrina é explicada pela estrutura tridimensional do gel de fibrina e pela ação simultânea de citocinas presas nas malhas (VAN HINSBERGH, 2001). Portanto, indução de angiogênese direta da fibrina pode ser explicada pela ligação de fibrina de inúmeros fatores de crescimento diferentes, como o VEGF e PDGF (FENG *et al.*, 1999; SAHNI, 1998).

A fibrina é uma matriz de suporte reconhecida para BMP's e isso confere a matriz propriedades angiogênicas, hemostáticas e ósseo condutoras (KAWAMURA & URIST 1988). BMP's enredados na matriz de fibrina são progressivamente lançadas e quando transplantadas por via intramuscular são capazes de induzir a formação óssea. Esta liberação progressiva de citocinas é uma característica comum de fibrinas naturais *in vivo* e nos coágulos da PRF (CHOUKROUN *et al.* 2006 b).

A quantidade das cinco citocinas de leucócitos mais importante no processo de inflamação (IL-1, IL-6, TNF- α) e cicatrização (IL-4, VEGF) foram testadas em amostras obtidas entre o sobrenadante (PPP) e o exsudato do coágulo de PRF, e entre os exsudatos do coágulo do PRF e as médias plasmáticas e as taxas sorológicas médias estabelecidas pelo laboratório. Essas cinco citocinas testadas seriam progressivamente presas nas redes de fibrina durante a polimerização e liberadas lentamente, favorecendo o processo de cura (DOHAN *et al.*, 2006c).

A IL-4 inibe as vias de sinalização inflamatórias e neutraliza sua amplificação e a VEGF apoia e coordena o desenvolvimento de estruturas cicatriciais iniciais, como tubos vasculares (DOHAN *et al.*, 2006c).

Testes para avaliar o efeito da PRF sobre um meio de cultura com osteoblastos humanos em diferentes tempos (3, 7, 14, 21 e 28 dias), concluíram que a PRF induz uma estimulação significativa e contínua de proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Além disso, observaram um início de processo de mineralização da membrana de PRF após 14 dias. Os leucócitos da PRF parecem proliferar e interagir com osteoblastos, funcionando como uma “dama de companhia”, o que explicaria o duplo efeito de proliferação/diferenciação observado em osteoblastos (EHRENFEST *et al.*, 2009b).

Em outra pesquisa foi testado o efeito da PRF sobre um meio de cultura com células mesenquimais indiferenciadas humanas (BMSC) e observado que ela gera a proliferação e diferenciação de BMSC durante todo o período experimental (3, 7, 14, 21 e 28 dias). Este efeito era dependente da dose (1 ou 2 membranas). A análise por microscopia eletrônica de varredura da cultura no dia 14 permitiu mostrar o nódulos

de mineralização, que eram mais numerosos e mais estruturados nos grupos com PRF em comparação com os grupos controle. A associação de BMSC oral e PRF pode oferecer muitas aplicações clínicas e biotecnológicas (EHRENFEST *et al.*, 2010a).

Um estudo comparou o efeito do PRF e do PRP na proliferação e na diferenciação dos osteoblastos de camundongos *in vitro*. Foram obtidas amostras de sangue humanas de 14 voluntários e preparados os concentrados plaquetários dentro de seus padrões específicos. Os exsudatos foram obtidos nos tempos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias. O estudo conclui que as células tratadas com exsudatos de PRF coletados no dia 14 atingiram significativamente o pico da mineralização, mais do que os outros dois grupos controle negativo e controle positivo. Através deste estudo pôde-se concluir que o PRF é superior ao PRP, a partir das expressões de ALP e indução do processo de mineralização. PRF libera fator de crescimento autógeno de forma gradual e expressa efeito maior e mais durável na proliferação e na diferenciação de osteoblastos de ratos (HE *et al.*, 2009).

A PRF teve efeito positivo sobre a formação óssea, quando utilizada sozinha ou combinada com osso autógeno, mas não com osso bovino desproteínizado. Este estudo foi realizado na calvária de 20 coelhos, 10 coelhos foram tratados com PRF e os outros 10 não receberam a PRF, no preenchimento de defeitos críticos (10 mm x 10 mm) criados nas calotas cranianas. Os animais foram sacrificados após 8 semanas (PRIPATNANONT *et al.*, 2013).

Imunomarcações da intensidade para VEGF, no preenchimento de defeitos de 7 mm na calota craniana de 10 coelhos, foi maior no grupo experimental (PRF + osso xenógeno) em comparação a o grupo

controle (osso xenógeno), mas não houve diferenças significativas entre o grupos nas análises histomorfométricas para avaliação da formação óssea (YOON *et al.*, 2014).

O efeito da formação óssea das PRF, osso bovino inorgânico (ABB) e fosfato de cálcio bifásico (BCP) foi testada na calvária de vinte e quatro coelhos machos associadas com barreiras de titânio. Os coelhos foram divididos em quatro grupos (um grupo é o controle e três grupos experimentais). Os animais foram sacrificados após 1 mês e 3 meses, para avaliação histológica da diferença nova área de osso formada entre os grupos. Diferenças estatisticamente significativa foram encontradas entre os grupos PRF, BCP e a ABB após um mês em relação ao grupo controle. PRF e ABB também tiveram efeitos superiores na formação óssea comparados a grupo controle e BCP após 3 meses. Sendo assim, a PRF quando usada em conjunto com barreiras de titânio, parece aumentar a qualidade do osso recém-formado e melhorar a taxa de formação de osso, devido à concentração de fatores de crescimento (OZDEMIR *et al.*, 2012).

O uso de PRP, PRF e CGF facilita a formação óssea na fase inicial de cicatrização do enxerto ósseo. Isso foi demonstrado em um estudo com 12 coelhos onde os autores compararam os efeitos desses fatores de crescimento em defeitos na calota craniana dos animais. Entre os concentrados plaquetários não houve diferença estatística em relação a osteogênese, apenas entre grupos experimentais e grupo controle. Os resultados foram obtidos após 12 semanas (KIM *et al.*, 2014).

Vinte coelhos que receberam dois defeitos ósseos de 7 mm de diâmetro, onde foram instalados implantes de 3,0 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento. A ancoragem foi obtida no ápice dos implantes

deixando um espaço a ser preenchido na região cervical. Um dos espaços era preenchido com PRF, que fazia parte do grupo experimental; no grupo controle, o espaço era preenchido apenas por sangue. Os animais foram sacrificados e foram realizados testes de torque de remoção e análises histomorfométricas. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significantes, favorecendo o grupo experimental em comparação ao controle, para torque de remoção, neoformação óssea e área de contato entre osso e implante (JANG *et al.*, 2010).

Um estudo em coelhos avaliou a PRF para preenchimento de defeitos peri-implantares (3 mm x 5 mm). No grupo experimental os defeitos foram preenchidos com PRF e o grupo controle apenas com coágulo. Os animais sofreram eutanásia após 8 semanas. Os autores definiram que em coelhos, defeitos peri-implantares repararam com sucesso através do uso de PRF, apresentando resultados estatisticamente significantes (LEE *et al.*, 2012).

Uma pesquisa comparou a associação da matriz de tricálcio fosfato (TCP, grupo 1- controle), com o PRF (TCP + PRF - grupo 2) e também a associação desta com rhBMP-2 (proteínas morfogenéticas do osso recombinante 2) (TCP + rhBMP-2 - grupo 3) em levantamento de seio maxilar de coelhos. Os animais foram sacrificados em três dias, uma, duas, quatro, seis e oito semanas para análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que houve uma maior e mais rápida formação óssea no grupo em que houve associação de PRF com TCP e não foram observadas diferenças significativas nas características inflamatórias entre os grupos aos três dias e na primeira semana de avaliação (KIM *et al.* 2012).

Foi realizado levantamento de seios maxilares em 9 pacientes, no grupo experimental 6 seios maxilares foram preenchidos com PRF + FDBA (enxerto ósseo liofilizado mineralizado alógeno) e no grupo controle 3 seios maxilares foram preenchidos sem PRF. Foi observado que esta matriz de fibrina guia os processos de cicatrização, e em 4 meses o grupo PRF possui histomorfometricamente resultados iguais ao grupo controle em 8 meses. O número de osteócitos tanto nas amostras do grupo controle e teste foi idêntico. Portanto, PRF não parece aumentar a proliferação celular em longo prazo, mas pode desempenhar um importante papel na revascularização do enxerto, apoiando angiogênese (CHOUKROUN *et al.*, 2006e).

Onze levantamentos de seios maxilares foram realizados em 10 pacientes. No grupo experimental foi feita a associação entre PRF e Bio-OSS através de uma mistura e no grupo controle o seio maxilar foi preenchido apenas com o Bio-OSS. Exames clínicos e radiográficos foram realizados no pré- e pós-operatório. Os resultados foram obtidos após 6 meses dos procedimentos iniciais e demonstraram características morfológicas semelhantes, tanto para a PRF e grupos de controle. Não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Os autores concluíram que não existe vantagem nem desvantagem da aplicação da PRF em combinação com osso bovino mineral desproteínizado no aumento de seios após um período de acompanhamento de 6 meses (ZHANG *et al.*, 2011).

A elevação do seio simultânea a instalação de implantes utilizando a PRF como o único material de preenchimento é relatada como um processo confiável para promover o aumento do osso no seio maxilar. Um estudo realizado com 6 cães onde houve a instalação do

implante juntamente com a elevação do seio maxilar sugere que a elevação do seio simultânea e implantação usando fibrina rica em plaquetas como material de enxerto único não é um procedimento previsível e reprodutível. Especialmente no que diz respeito à formação do osso em torno dos implantes em cavidades sinusais, pela falta de apoio da membrana Schneideriana em sua posição pois a PRF biodegrada rapidamente (JEONG *et al.*, 2014).

Vinte e três levantamentos de seio maxilar foram realizados com instalação imediata dos implantes. Um total de 20 pacientes recebeu 52 implantes (19 AstraTech, Molndal, Suécia, e 33 Intra-LockOssean, Boca Raton, EUA). Membranas e tampões de PRF foram utilizados para cobrir a membrana sinusal e preencher os espaços entre os implantes que serviram de "tenda" para manter o afastamento da membrana sinusal. Radiografias foram realizadas antes da instalação, após seis meses, um ano e a cada ano seguinte. O acompanhamento mínimo foi de dois anos e o máximo de seis anos. Nenhum implante foi perdido. Todos os casos tinham um osso residual de 1 mm a 3 mm e o ganho vertical de osso foi, em média, 10,4 mm (variando entre 8,5 mm a 12 mm) (SIMONPIERI *et al.*, 2011).

Em um estudo clínico randomizado duplo cego, foi avaliado o tratamento de 18 pacientes, com 36 defeitos de furca Tipo II em mandíbula. O grupo controle foi tratado com retalho aberto e debridamento, e o grupo experimental com retalho aberto, debridamento e colocação de PRF. Foram feitas avaliações através do índice de placa, sangramento a sondagem, nível da margem gengival e controle radiográfico do defeito foram realizados no pré-operatório e nove meses após o tratamento. Os resultados mostraram que, em todos os parâmetros

clínicos e radiográficos, houve benefício para o grupo com PRF (SHARMA e PRADEEP, 2011).

Foi realizado um estudo com dois seres humanos, um homem com 28 anos e uma mulher com 22 anos, que necessitavam de exodontia e instalação de implantes. Depois de realizada a implantodontia, a presença de gaps entre o osso e o implante, foi preenchida apenas com a PRF e observaram que houve um ganho ósseo de aproximadamente 5 mm nessas regiões (LI *et al.*, 2013).

Usando um desenho split-mouth (boca dividida), 17 defeitos intra-ósseos foram tratados aleatoriamente com PRF ou com combinação PRF- BPBM (osso mineral poroso bovino). Foram realizadas cirurgias para reavaliação após 6 meses. Profundidade de bolsa pré-operatória, níveis de fixação e trans-medições ósseas foram semelhantes para os grupos PRF e PRF- BPBM. Medições pós-cirúrgicas revelaram uma redução significativamente maior no grupo PRF- BPBM bem como um maior ganho de inserção. Os resultados deste estudo indicam que a PRF pode melhorar parâmetros clínicos associados com defeitos periodontais intra-ósseos humanos. A BPBM tem a capacidade para aumentar os efeitos de PRF na redução da profundidade da bolsa, melhorando nível clínico de inserção e promoção do preenchimento de defeitos (LEKOVIC *et al.*, 2012).

Análise cintilografica realizada em pacientes, após 4 semanas da cirurgias de extração de terceiros molares e preenchimento da cavidade óssea com PRF, não mostrou diferenças estatísticas significantes entre o grupo tratados com PRF e o grupo sem PRF, ou seja, não indicaram cicatrização óssea reforçada e atividade celular maior pelo uso da PRF (GURBUZER *et al.*, 2010).

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo investigar, utilizando um modelo animal, o efeito da membrana de fibrina rica em plaquetas na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco no leito receptor. A hipótese a ser testada é que a interposição da membrana da PRF aumenta a qualidade da formação óssea na interface entre o leito receptor e o enxerto autógeno, quando comparado ao tratamento convencional (sem membrana), nos tempos experimentais de 14 e 28 dias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Essa pesquisa foi aprovada pela a Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo (CEUA-UPF), sob registro número 001/2013.

4.2 Caracterização das amostras

Foram utilizados 10 coelhos *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem Nova Zelândia, albinos, com idade entre seis e oito meses, machos, massa média de 3,5 Kg, livres de ectoparasitas e endoparasitas (Cabanha São Nunca, Araricá, Rio Grande do Sul, Brasil).

Todos os coelhos receberam enxertos autógenos em bloco bilateralmente na região de ângulo da mandíbula. Em um dos lados, escolhidos por sorteio, foi interposta na interface entre o enxerto e leito receptor uma membrana de PRF. Os coelhos foram submetidos a eutanásia em 14 e 28 dias.

4.3 Manejo e Manutenção dos animais

Os animais permaneceram em uma sala no Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo, com condições sanitárias ideais. Foram alojados em gaiolas individuais, em condições de temperatura controlada por sistema de ar condicionado na faixa de 20 a 25° C, ciclo de luz-escurecimento de doze horas, alimentação com ração própria para a espécie e com água à vontade. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um médico veterinário e um cirurgião-dentista no bloco cirúrgico do mesmo Hospital Veterinário, dentro dos padrões assépticos e normas de biossegurança. Todos os cuidados pré e pós-operatórios relativos à alimentação e medicação foram realizados por estagiários do hospital veterinário e monitorados pelos médicos veterinários.

4.4 Protocolo de anestesia e medicação dos animais

Após a adaptação de pelo menos 48 horas, os animais foram submetidos a quatro horas de jejum antes de receber a pré-medicação com cloridrato de tramadol (100 mg/2 ml - União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil) dose de 2 mg/Kg, cloridrato de tiletamina + cloridrato de zolazepam (Zoletil® 50 – 50 mg/ml Virbac do Brasil Indústria e Comércio, Brasil) dose de 4 mg/Kg e midazolam (1 mg/ml - Hipolabor Farmacêutica, Brasil) dose de 1mg/Kg, todos via intramuscular. Após o relaxamento do animal foi obtido acesso para perfusão contínua de soro fisiológico 0,9% através da veia braquicefálica, dose de 10 mg/Kg/h e induzido ao plano anestésico com diazepam (10 mg/2ml - Teuto Brasileiro, Brasil) dose de 0,5 mg/Kg

intravenoso (IV), seguido de propofol (10 mg/2ml - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) dose de 2mg/Kg/IV. A intubação traqueal foi realizada com sonda de número 3,0 sem *cuffy* para manutenção com isoflurano 100% (Isoforine[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) dose de 1 mg/1ml vaporizado a oxigênio 100%. Já como antibioticoterapia profilática foi utilizado cefalotina sódica (1g - ABL – Antibióticos do Brasil LTDA, Brasil) dose de 5 mg/Kg/IV, enquanto que a analgesia pré emptiva com meloxicam (Maxican 0,2%[®] - Ouro Fino Saúde Animal Ltda., Brasil) dose de 0,1 mg/Kg/IV e sulfato de Morfina (10 mg/ml - Hipolabor Farmacêutica, Minas Gerais, Brasil) via epidural (L5-L6) dose de 0,01 mg/Kg diluído com soro fisiológico 0,9%.

Depois de anestesiados os animais foram submetidos a tricotomia ampla na região craniana (Figura 1A) e região submandibular bilateral (Figura 1B) e antisepsia com clorexidine degermante 2% seguido por álcool 70%, foram posicionados os campos cirúrgicos com auxílio de pontos isolados simples com náilon 3-0.

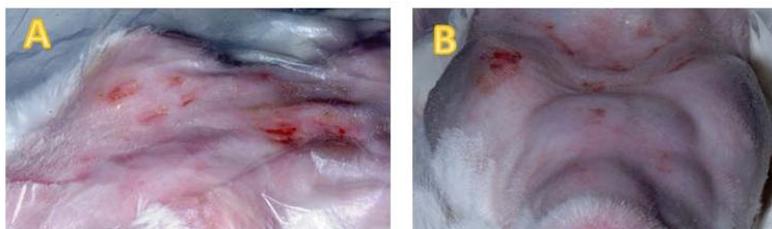


Figura 1 – A) Tricotomia região craniana, B) Tricotomia região submandibular bilateral.

4.5 Cirurgia para obtenção dos enxertos autógenos

Os animais foram submetidos a uma cirurgia no crânio para obtenção de dois enxertos autógenos e enxertia dos mesmos no ângulo da mandíbula.

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em decúbito ventral para obtenção dos enxertos da calota craniana e decúbito dorsal horizontal na calha operatória para enxertia dos blocos na região mandibular. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano (100% -Isoforine® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) dose 1 mg/ 1ml, 1,5% em fluxo constante de 2 l/min e com uma frequência respiratória de 10 movimentos respiratórios por minuto. Todos os animais foram monitorados: frequência cardíaca, frequência respiratória, capnografia, pulso e oximetria

Os blocos de enxerto autógeno foram obtidos bilateralmente da região parietal das calotas cranianas respectivas de cada coelho.

Foram realizadas incisões lineares diretamente sobre a pele, no sentido ântero-posterior, medindo em média 7 cm, ao longo da calota craniana anteroposteriormente.

A gálea aponeurótica e a fáscia foram incisadas e rebatidas, seguido de incisão periosteal para exposição da cortical da calota craniana.

As osteotomias do crânio foram realizadas como peças de mão acopladas a um motor de implante, sob irrigação abundante de solução fisiológica 0,9%, diretamente sobre a área ostectomizada.

Os enxertos medindo 10 x 10 mm foram obtidos bilateralmente na calota craniana com o uso de um guia cirúrgico de aço inoxidável e brocas cirúrgicas esféricas carbide (n. 2) e tronco cônica (n. 701) (Figura 2 A e B).

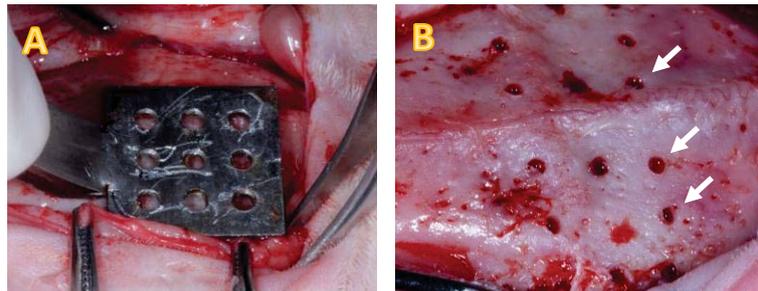


Figura 2 - A) Posicionamento do guia cirúrgico, B) demarcações realizadas com broca esférica (setas brancas).

A remoção do enxerto em ambos os lados foi realizada cuidadosamente para evitar a laceração da dura-máter. (Figura 3 A e B). A sutura foi feita com fio de Vicryl 4.0 no periósteo, fâscia e gálea aponeurótica e nylon 4.0 na pele com ponto simples. O enxerto removido foi mantido em gaze estéril e embebido por solução fisiológica 0,9% até o preparo do leito receptor.

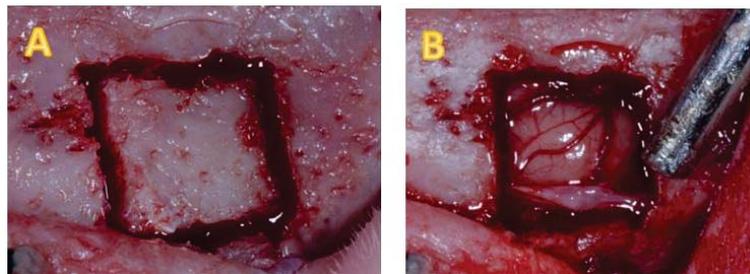


Figura 3 - A) União das marcações, B) Remoção do enxerto.

Os blocos removidos tiveram os bordos arredondados com o uso de uma broca edenta e uma perfuração foi feita com uma broca tronco cônica (n° 701), em uma das extremidades do enxerto para a inserção do parafuso (1,5 mm de diâmetro e 5,0 mm de comprimento, DSP, Biomedical, Campo Largo, Paraná) de maneira que o enxerto não fosse submetido a pressão no momento da sua instalação (Figura 4).



Figura 4 – Enxertos em bloco preparados para instalação.

4.6 Obtenção e preparo das fibrinas ricas em plaquetas

Cada coelho recebeu em um dos enxertos, uma malha de fibrina autóloga entre o enxerto autógeno e o leito receptor previamente ao posicionamento do enxerto. Para obtenção da membrana, foi realizada a coleta sanguínea antes do início da cirurgia. O local de coleta foi a veia jugular externa com sistema de vácuo e agulha 21G com tubo de 10 ml, sem anticoagulante (Figura 5A) e imediatamente após a coleta centrifugada a 2700 rpm x 12 min, com uma centrífuga específica (Hettich EBA 20, Tuttingen, Alemanha). (Figura 5B), como recomendado pela técnica de Choukroun (DOHAN *et al.*, 2006a).

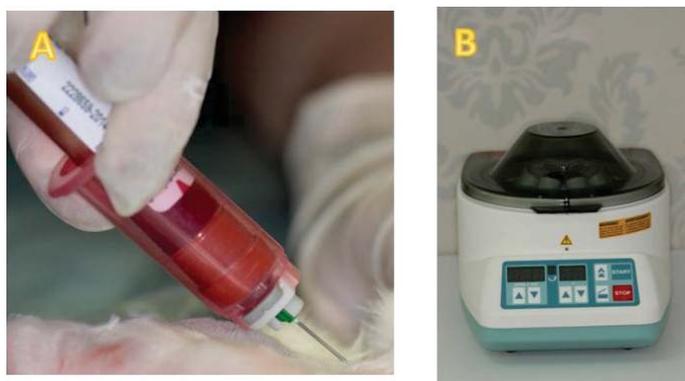


Figura 5 - A) Coleta sanguínea, B) Centrifuga – EBA 20S.

Após a centrifugação, o material obtido constitui-se de três camadas: plasma acelular (porção superior), o gel de fibrina (porção mediana) e glóbulos vermelhos (porção inferior) (Figura 6A). A PRF foi retirada do tubo com uma pinça Williams reta e os remanescentes sanguíneos removidos com tesoura cirúrgica (Figura 6B).

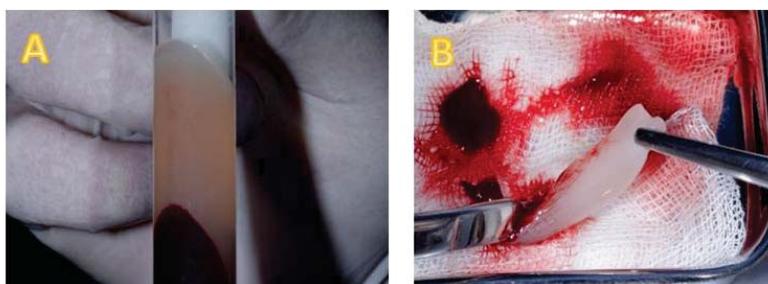


Figura 6 - A) PRF obtido, B) Separação PRF dos glóbulos vermelhos.

A membrana foi acomodada sobre a caixa de processamento da PRF (*Box Intralock*, São Paulo, Brasil), pressionada para a extração do

soro e foi assim obtido uma membrana com espessura de aproximadamente 1 mm. (Figura 7 A).

Ao expulsar os fluidos presos na matriz de fibrina, obteve-se uma membrana autóloga de fibrina muito resistente (DOHAN *et al.*, 2006a).

Após a membrana da PRF foi reduzida ao mesmo perímetro do enxerto obtido e adaptada ao enxerto e ao parafuso, para posterior inserção no leito receptor (Figura 7 B e C).

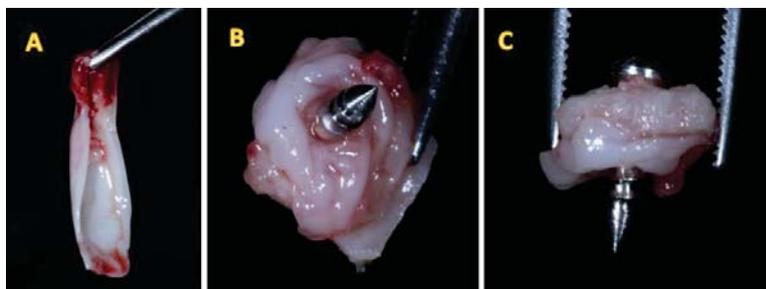


Figura 7 - A) Membrana de PRF (1mm de espessura), B e C) Membrana adaptada ao enxerto e ao parafuso.

4.7 Preparo do leito receptor e fixação do enxerto autógeno

Uma incisão linear (1,5 cm) foi realizada sobre a pele transpondo a gálea aponeurótica, fáscia, o músculo e periósteo até alcançar a região de implantação localizada posteriormente a saída do nervo mental.

Após rebatimento do retalho, foi utilizado um afastador oftálmico para exposição do leito receptor. Foram realizadas 3 perfurações monocorticais dos leitos receptores com o auxílio de brocas cirúrgicas esféricas carbide (n. 2) e irrigação salina abundante, para facilitar a comunicação da trabecular do leito receptor e a cortical do

enxerto (ALBERIUS *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2000).
(HARDESTY e MARSH, 1990) (Figura 8).

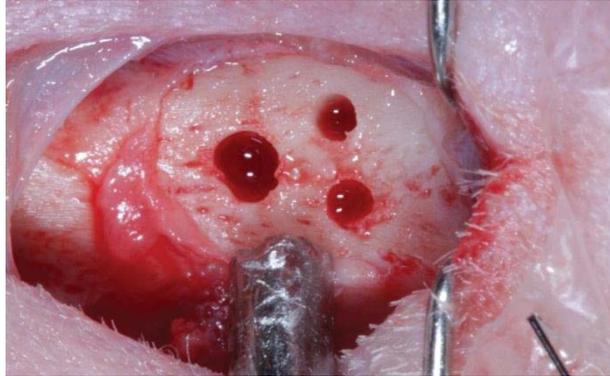


Figura 8 - Perfurações monocorticais no leito receptor.

Os enxertos foram posicionados e fixados por meio de parafuso posicional de titânio (1,5 mm de diâmetro e 5,0 mm de comprimento, DSP, Biomedical, Brasil) (Figura 9).

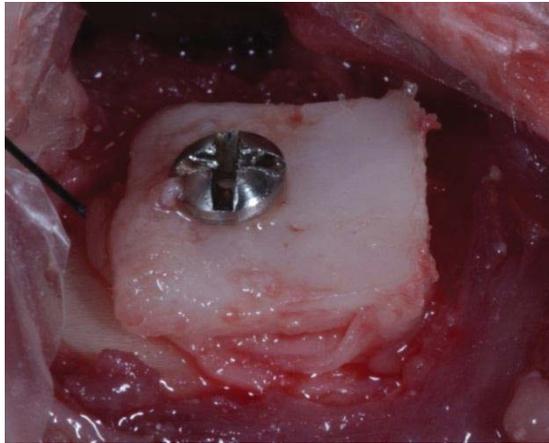


Figura 9 - Enxerto em posição no leito receptor e fixado.

A sutura foi feita com fio Vicryl 4.0 (Ethicon, São Paulo, Brasil) no periósteo e músculo e nylon 4.0 na pele com ponto simples (Figura 10A e 10B). A alimentação dos animais não foi comprometida, pois as incisões foram feitas na região extrabucal. Após a cirurgia os animais ficaram em observação por 4 horas.

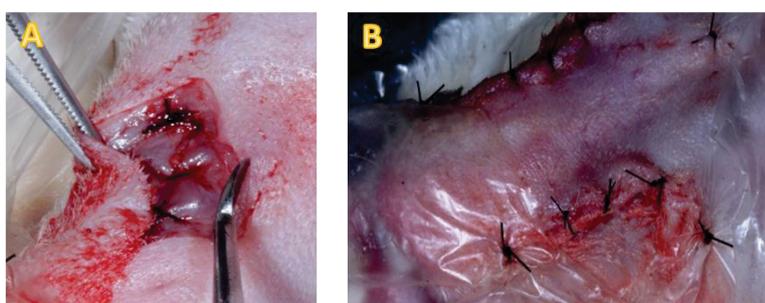


Figura 10 – A) Sutura periósteo e músculo B) Sutura da pele.

Após a cirurgia os animais receberam injeções intramusculares diárias de enrofloxacina (Enro flec 10%® - Laboratório Veterinário Vansil LTDA, Brasil) dose de 5 mg/Kg de peso corporal duas vezes ao dia, durante 7 dias. A analgesia foi mantida com o analgésico cloridrato de tramadol (100mg/2ml - União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil) dose de 4mg/Kg sub cutâneo a cada 8 horas por 2 dias e o anti-inflamatório meloxicam (Maxican 0,2%® - Ouro Fino Saúde Animal Ltda., Brasil) na dose de 0,1 mg/Kg, uma vez ao dia por 2 dias. Para controle da dor pós-operatória, os animais receberam sulfato de Morfina (10mg/ml- Hipolabor Farmacêutica, Brasil) dose de 3 mg/Kg via intramuscular ao final da cirurgia e 4 horas após a primeira aplicação.

4.8 Eutanásia dos animais

Após o término do pós-operatório os animais ficaram alojados no mesmo local que estavam antes da cirurgia, até o momento da eutanásia. Aleatoriamente, mediante sorteio, foram definidos os animais que ficariam no grupo de 14 e 28 dias.

Os animais foram submetidos a eutanásia através da administração de tiopental sódico 2,5%, dose 10 ml/Kg, por via endovenosa, sendo o óbito constatado por falta de expansão torácica e batimentos cardíacos, midríase e ausência de reflexo palpebral, procedimento realizado por dois médicos veterinários.

Após a eutanásia dos coelhos, as amostras foram removidas de cada lado da mandíbula com brocas tronco cônicas e irrigação de soro fisiológico, respeitando o limite de em média 3 mm das bordas do enxerto.

Após a remoção dos tecidos para o estudo histológico os animais foram contidos em sacolas especiais, para posterior descarte, seguindo os protocolos padrões de manuseio de material biológico.

4.9 Análise histológica

Os blocos ósseos removidos foram fixados em formalina tamponada 10% (pH 7,4) por 24 horas e após, armazenados em potes esterilizados com álcool 70% até o momento da descalcificação com ácido diaminotetracético (EDTA) 4%. A descalcificação foi realizada durante o período de um mês aproximadamente, sendo o parâmetro para o fim da descalcificação o corte das amostras sem resistência (teste da agulha).

Em seguida, as amostras foram submetidas à lavagem em água corrente por 8 horas, desidratação, diafanização e impregnação em parafina histológica.

Os blocos de parafina foram cortados com o micrótomo em formas padronizadas de 0,3 μm de espessura e foram divididos de forma intercalada para análise histológica.

As lâminas para análise histológica foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e azul de toluidina para análise histomorfológica do reparo ósseo.

As análises histológicas foram realizadas com um microscópio ótico em aumentos de 100 μm , 150 μm e 200 μm , com o objetivo de avaliar a interface entre o enxerto e o leito receptor através da análise qualitativa de diferentes características teciduais do processo de osseointegração, tais como: neoformação óssea, fibrilas colágenas, vasos sanguíneos e atividade osteoblástica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Metodologia do estudo

Para avaliar a efetividade do uso da membrana de PRF na qualidade de formação óssea optou-se pela utilização de coelhos New Zealand White (*Orytolagus cuniculus*) uma vez que esses animais são frequentemente utilizados em pesquisas ortopédicas e craniomaxilofaciais, apresentam semelhança entre a densidade óssea, resistência a fratura e reparação óssea pós-trauma semelhante com os seres humanos (HUTMACHER, 2000; HARKNESS, 1993; NUNAMAKER, 1998).

Os coelhos são animais de fácil aquisição e manuseio, além de permitirem o volume de 10 ml de sangue necessários para obtenção da PRF, sem que o animal sofra alterações hemodinâmicas colocando a vida do animal em risco ou alterando os resultados do estudo (EFEOGLU *et al.*, 2004). Além disso, os elementos figurados do sangue desses animais são morfologicamente semelhantes aos dos humanos (JAIN, 1993).

O tempo de 14 dias e 28 dias para a avaliação dos resultados permite verificar a diferença de formação óssea nos momento iniciais do processo de consolidação do enxerto. Isso porque, o ciclo completo de remodelação óssea cortical dos coelhos é observado após 42 dias. Assim, pode-se supor que os achados no período de sacrifício de 60 dias correspondem ao período de 6 meses em humanos (ROBERTS *et al.*, em

1987), tempo de espera necessário para a instalação de implantes osseointegrados em áreas submetidas à reconstrução óssea (TONG & BUCHMAN, 2000).

Estudos em animais demonstram que no período de 56 dias o efeito da PRF sobre a formação óssea é semelhante entre o grupo controle (sem PRF) e os grupos teste (com PRF) (HE *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2014). Em seres humanos, o período de 6 meses após o preenchimento do seio maxilar com PRF e enxerto xenógeno foi semelhante entre os grupos testados (CHOUKROUN *et al.*, 2006b).

A calvária foi a região cirúrgica escolhida como área doadora do enxerto em bloco cortical, por possuir duas corticais com osso medular entre elas, oferecer baixa morbidade, acessibilidade, reduzida interferência de forças musculares e permitir a obtenção de dois enxertos de 1cm², padronizando o tipo de enxerto e descartando a possibilidade da influência de outras variáveis advindas de enxertos obtidos de locais diferentes, fazendo que apenas a PRF atuasse sobre a interface dos enxertos (DAHLIN *et al.*, 1991). Além disso, o osso da calvária (área doadora) é cortical como o osso da mandíbula (leito receptor), isso confere a vantagem de que na avaliação histológica da interface, o osso trabecular presente é necessariamente tecido neoformado.

Na região da calvária a perfuração da dura-máter foi evitada para que não houvesse interposição e invaginação de tecido cerebral e o periósteo fosse mantido para que ocorresse irrigação local (ALBERIUS *et al.*, 1990). Nenhum coelho apresentou alteração motora clínica após as cirurgias.

A obtenção da PRF em coelhos não é aconselhada, pois o tempo para coleta de sangue em suas veias e artérias não permitem a obtenção

rápida do sangue, pela falta de volume e pressão arterial, fazendo com que o sangue coagule parcialmente fora do tubo, prejudicando a formação da PRF e tornando esse sem aplicação clínica (EHRENFEST *et al.*, 2010b).

Em nosso estudo piloto a coleta de sangue foi realizada com seringa descartável 20 ml com agulha 22G (Figura 11A) na veia jugular externa. O tempo de obtenção do sangue foi muito longo e com volume sanguíneo insuficiente, pela falta de pressão obtida com esse tipo de seringa. Com isso, ocorreu a coagulação parcial do sangue coletado dentro da própria seringa (Figura 11B).

Devido a não utilização de anticoagulantes, ocorre rapidamente a ativação da maioria das plaquetas após a coleta de sangue, levando a liberação das cascatas de coagulação. Se a amostra de sangue não for centrifugada rapidamente o sangue acaba por coagular dentro do tubo de vidro e/ou da seringa. (DOHAN *et al.* 2006a).

A coagulação parcial do sangue antes do início da centrifugação não favorece a formação da PRF. A flexibilidade da membrana e a incorporação de fatores de crescimento estão diretamente ligadas a maneira de polimerização da PRF, e devido a ausência de protrombina ocorre de maneira lenta e gradual (DOHAN *et al.*, 2006ab).

Após centrifugação do sangue coletado no estudo piloto e que estava parcialmente coagulado, obtivemos um coágulo difuso ao invés de uma membrana organizada (Figura 11C). Esse coágulo careceu de flexibilidade para manipulação e incorporação de fatores de crescimento (DOHAN *et al.*, 2006ab).



Figura 11 –A) Coleta sanguínea B) Sangue coagulando no interior da seringa C) Coágulo obtido de maneira difusa.

Para a obtenção da membrana de PRF, foi necessário coletar uma amostra de sangue de aproximadamente 10 ml (DOHAN *et al.*, 2006a). O volume total de sangue coletado em animais nunca deve ser superior a 15% - 20% do volume total sanguíneo, ou pode-se colocar a vida do animal em risco (EHRENFEST *et al.*, 2010b).

No presente estudo conseguiu-se coletar uma amostra de 10 ml de sangue em coelhos com aproximadamente 3,5 Kg, como padroniza a técnica de CHOUKROUN (DOHAN *et al.*, 2006a), através da coleta na veia jugular externa com sistema de vácuo e agulha 21G (Figura 12A).

Assim foi possível realizar uma coleta rápida (sem coagulação sanguínea antes do início da centrifugação) e com volume necessário (Figura 12A), permitindo a obtenção da membrana da PRF (Figura 12B), devendo esse ser o protocolo adotado para a obtenção da PRF em coelhos.

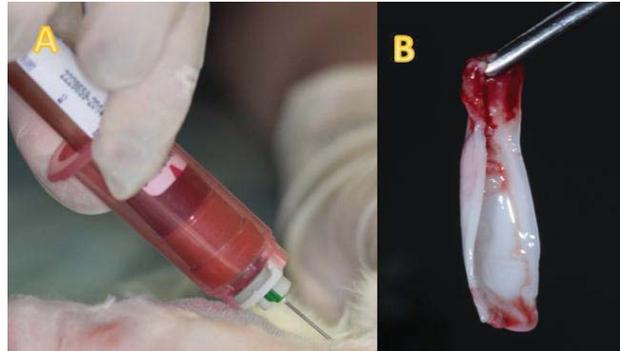


Figura 12 – A) Coleta sanguínea, B) Membrana de PRF obtida.

5.2 Análises histológicas

A hipótese do estudo foi confirmada, pois, houve uma formação óssea mais organizada nos grupos experimentais 14 e 28 dias, comparadas ao grupo controle.

A figura 13 mostra em ambos os grupos formação de trabéculas ósseas na interface enxerto/leito receptor em meio a tecido conjuntivo, evidenciando uma formação óssea mais organizada, com osso mais denso no grupo experimental em que a membrana de PRF foi interposta entre o enxerto e o leito receptor.

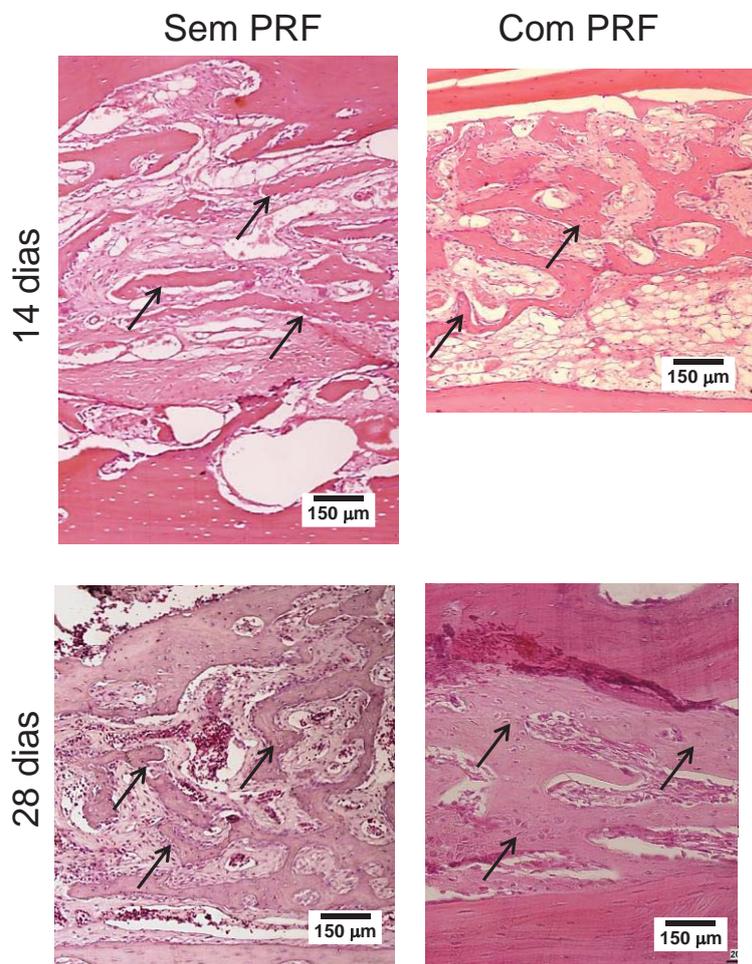


Figura 13 -Neoformação óssea (setas) após 14 e 28 dias para os grupos com e sem PRF. Coloração HE.

A consolidação do enxerto ósseo depende principalmente de quatro fatores: a) interação de celular (CHOUKROUN *et al.* 2006d); b) matriz extracelular (DAMSKY, 1999); c) vascularização (SANTOS & REIS, 2010) e, d) citocinas (SCHLIEPHAKE, 2002).

A PRF age sobre os quatro fatores citados. Possui fatores de crescimento e citocinas em suas malhas de fibrina que atuam sobre a interação das células (DOHAN *et al.*, 2006b; DOHAN *et al.*, 2009), funciona como matriz extracelular para migração de células mesenquimais indiferenciadas (BOO *et al.*, 2002; GASLING *et al.*, 2011) e aumenta a angiogênese (CHOUKROUN *et al.*, 2006b).

Alguns estudos testaram o efeito do PRF em diferentes processos de regeneração óssea e em diferentes animais, como coelhos (TUNALI *et al.* 2012, PRIPATNANONT *et al.*, 2013, OZDEMIR *et al.* 2012, LEE *et al.* 2010, LEE *et al.* 2012, KIM *et al.* 2012, JANG *et al.* 2012), cachorros (XUAN *et al.* 2013) , ovelhas (BOLUKBASI *et al.* 2013) e ratos (HE *et al.* 2009). Todos esses estudos demonstraram um efeito positivo na utilização da PRF sozinha ou em associação com outros materiais para enxertia de osso.

Quando a PRF é interposta entre o enxerto e o leito receptor, mesmo em áreas onde não aconteceu formação óssea, o tecido conectivo é mais organizado e com maior densidade de fibrilas colágenas (Figura 13 e 14). Essa característica favorece uma maior e melhor formação óssea, pois, células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e substituem o tecido de granulação por cartilagem hialina, formando um calo provisório (BURKITT *et al.*, 1994).

Evidências indicam que as BMP's regulam a diferenciação das células, aumentando a expressão de condroblastos e osteoblastos em sítios ósseos em processo de cicatrização (URIST e STRATES, 1971). A fibrina é uma matriz de suporte reconhecida para BMP's. Essas moléculas quando enredadas na matriz de fibrina são progressivamente lançadas no local da regeneração óssea (KAWAMURA e URIST, 1988).

A membrana de PRF libera fatores de crescimento e matriz de proteínas por até 7 dias após sua aplicação (EHRENFEST *et al.* 2009a), atuando sobre células mesenquimais indiferenciadas, angiogênese, síntese de colágeno I e fibronectina (MARX, 1999; CHOUKROUN *et al.*, 2006d).

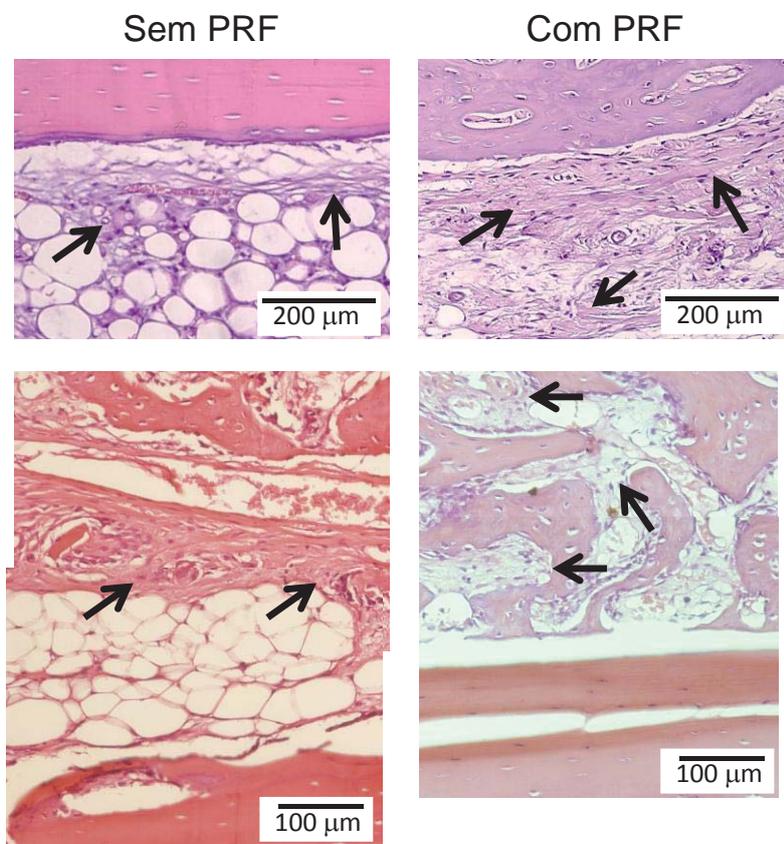


Figura 14 - Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado matriz extracelular com maior densidade das fibrilas colágenas (setas) no grupo PRF, 14 e 28 dias. Coloração HE.

Na Figura 15, observou-se em 14 dias, a maior presença de vasos sanguíneos, no grupo com PRF. Além disso, os vasos no grupo com PRF parecem ter o endotélio e o lúmen mais delimitados comparados ao grupo sem PRF.

A matriz de fibrina promove a angiogênese (PELISSIER *et al.* 2004; DVORAK *et al.* 1987), pela presença do fator de crescimento vascular endotelial VEGF (VAN HINSBERGH, 2001), indutor da angiogênese (DYCE *et al.* 2004). Devido à relação do processo de angiogênese com a osteogênese, a maior presença e organização dos vasos contribuem com uma melhor integração do enxerto com o leito receptor.

Os enxertos corticais revascularizam mais lentamente (BURCHARDT, 1983). A incorporação e o remodelamento ósseo estão relacionados ao processo de revascularização e a manutenção de seu volume depende da rapidez deste processo (Gordh, 1997). Células dos capilares possuem relação direta na formação óssea devido à sua proximidade com os osteoblastos e células osteoprogenitoras nos sítios de nova formação óssea (PELISSIER *et al.*, 2004).

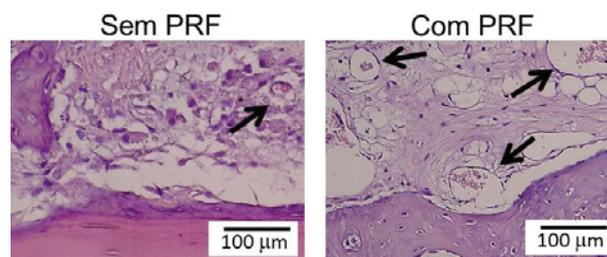


Figura 15 - Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado presença de vasos sanguíneos (setas) em ambos os grupos em 14 dias (coloração HE)

Imunomarcações para VEGF foram maiores no grupo experimental (PRF associado a osso xenógeno) em comparação ao grupo controle (osso xenógeno) no preenchimento de defeitos ósseos na calota craniana de 10 coelhos. Não houve diferenças significativas entre os grupos nas análises histomorfométricas para avaliação da formação óssea (YOON *et al.*, 2014).

Podemos observar na Figura 16, que em torno das matrizes ósseas as células foram coradas, pela técnica do azul de toluidina, com maior intensidade no grupo com PRF, sugerindo que nessa região as células osteoblásticas estão em intensa atividade mitótica (BEHMER *et al.*, 1976).

A PRF parece induzir a formação óssea pela ação do TGF- β , que estimula a mitogênese de pré-osteoblastos e osteoblastos (DOHAN *et al.* 2006b), através de seu efeito imediato na expressão do fator RUNX2, cuja ativação é essencial para a diferenciação osteoblástica (LI *et al.* 2013).

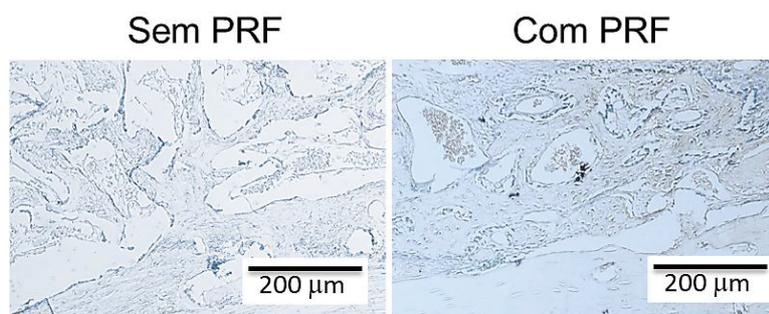


Figura 16 -Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrado presença de maior atividade osteoblástica no grupo PRF, em 14 dias. Azul de toluidina.

Aplicação da PRF para a reconstrução de defeitos maxilofaciais resulta em maturação óssea mais rápida, maior densidade óssea e consolidação do osso autógeno transplantado. A combinação da PRF e osso autógeno aumenta a taxa de osteogênese e a qualidade do osso novo (CHOUKROUN *et al.*, 2006de).

Aos 28 dias observamos que houve uma maturação óssea mais rápida, com maior densidade (osso mais compacto) nos grupos PRF (Figura 17) e com fibras colágenas em menor quantidade quando comparado ao tempo de 14 dias (Figura 13 e 14). No grupo sem PRF, o osso formado é menos compacto e as fibras colágenas também estão presentes com densidade menor (Figura 14).

O TGF- β 1 é um fator que estimula a mitogênese de pré-osteoblastos e osteoblastos e promove a diferenciação das mesmas em osteoblastos maduros e funcionais. Este fator é liberado da PRF após 14 dias no local da regeneração (HE *et al.* 2009). A conformação do osso neoformado após 28 dias de forma mais compacta pode ter sua origem explicada devido a liberação contínua desse fator de crescimento (Figura 17).

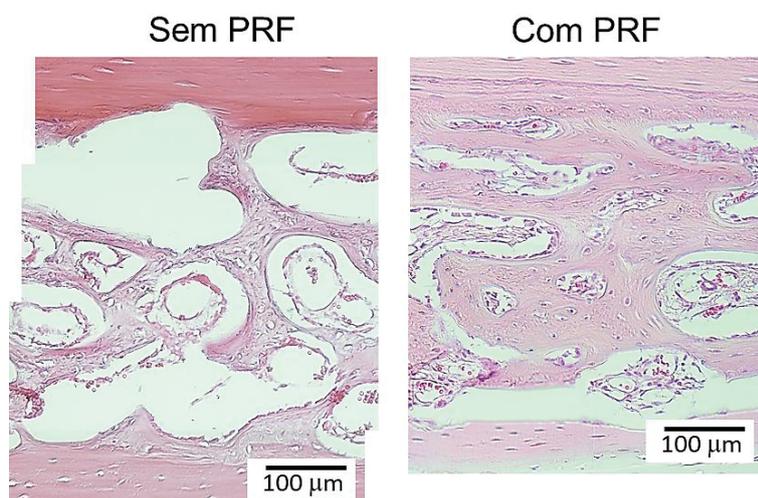


Figura 17 - Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrando presença de osso mais compacto no grupo PRF em 28 dias. Coloração HE.

Uma maior organização do calo ósseo também foi observada em uma pesquisa que associou osso autógeno e PRF no preenchimento de defeito críticos na calota craniana de coelhos. Os resultados obtidos após 8 semanas demonstraram maior organização e formação óssea no grupo que recebeu PRF. Isso pode ser influenciado pelos fatores de crescimento presentes na PRF e a sobrevivência de osteoblastos, osteócitos e pré-osteoblastos dos enxertos autólogos influenciando na regeneração (PRIPATNANONT *et al.*, 2013).

Na coloração azul de toluidina aos 28 dias, observou-se uma menor intensidade na cor azul das células em ambos os grupos, isso pode ser explicado pela diminuição de efeito da PRF no grupo que estava associada (Figura 18).

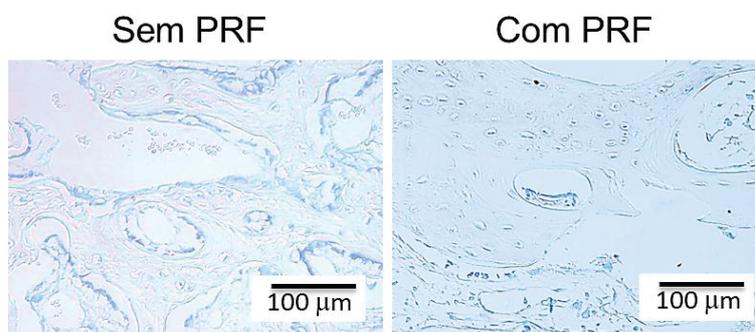


Figura 18 -Interface leito receptor e enxerto cortical, demonstrando presença de menor atividade osteoblástica em ambos os grupos em 28 dias. Azul de Toluidina.

No presente estudo, observou-se que a membrana da PRF não estava presente após 14 e 28 dias (Figura 19).

A membrana PRF é reabsorvida em aproximadamente 7 dias após sua aplicação (EHRENFEST *et al.*, 2009a). Em camundongos, a implantação da PRF subcutaneamente mostrou que essa é substituída por colágeno denso após 2 semanas de aplicação, sugerindo excelente biodegradabilidade (LI *et al.*, 2013).

A biodegradação da membrana de PRF faz com que diminua a quantidade de fatores de crescimento e citocinas, diminuindo seu efeito sobre as células envolvidas no processo de reparo, fazendo com que o processo de reparo ósseo seja semelhante ao ocorrido fisiologicamente neste período (EHRENFEST *et al.*, 2009a).

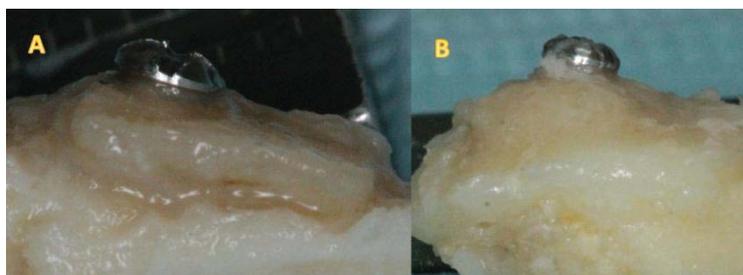


Figura 19 – Membrana de PRF ausente na interface enxerto/ leitor receptor em A) 14 dias e B) 28 dias.

O sucesso do enxerto ósseo autógeno depende do contato íntimo do mesmo com o leito receptor (BURCHARDT, 1983). A membrana da PRF interposta entre o enxerto e o leito receptor, não prejudica a formação óssea nessa região, pelo contrário, melhora a formação e organização do calo ósseo nos tempos estudados, funcionando assim como um tecido conectivo entre o leito receptor e enxerto ósseo.

6 CONCLUSÕES

A hipótese do estudo foi aceita uma vez que os dados histológicos mostraram que no grupo PRF a remodelação óssea ocorreu de maneira mais intensa. A interposição da membrana de fibrinas rica em plaquetas entre o enxerto ósseo e leito receptor parece ser um método viável em coelhos, podendo funcionar com um tecido conectivo na interface.

7 REFERÊNCIAS

ALBERIUS P, GORDH M, LINDBERG L, JOHNNELL O. Influence of surrounding soft tissues on onlay bone graft incorporation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 82, p. 22-33, 1990.

ALBERIUS, P.; GORDH, M.; LINDBERG, L.; JOHNNELL, O. Effect of cortical perforations of both graft and host bed on onlay incorporation to the rat tibia. *European Journal of Oral Sciences*, 104, p. 554- 561, 1996.

ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; NURDEN, P.; ORIVE, G.; ANDIA, I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends of Biotechnology*, v.24, p. 227-34, 2006.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M. Plasma rich in growth factor. *Dental Dialogue*, v.3, p. 1-10, 2004.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone Graft Materials; an overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 371, p.10-27, Feb, 2000.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS, N.A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Edart; 1976. p.109-31

BEZERRA, J.F.B.; LENHARO, A. *Terapia Clínica Avançada em Implantodontia*. v.1 36-38. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p 313.v.1 36-38

BETTI, L. V. *Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos*. 2004.

152f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Baurú, 2004.

BREINE, U.; BRANEMARK P-I. Reconstruction of alveolar jaw bone. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, v.14, n.1, pg. 14-48, 1980.

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

BOYNE, P.J. *Osseous Reconstruction of the Maxilla and Mandible*. Chicago: Quintessence, v.1. 1997. p.105.

BOO, J.S.; YAMADA, Y.; OKAZAKI Y.; HIBINO, Y.; OKADA, K.; HATA K. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *Journal of craniofacial surgery*, v.13, p. 231-239, 2002.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, Gainesville, v.1, n.174, p. 28-38, 1983.

BURKITT, P. R.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. Tecidos esqueléticos. In: *Weather histologic functional*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. cap. 10. p. 173-186.

CARLSON, NE.; ROACH, RB JR. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry, *Journal of the American Dental Association*, v.133 n.10, p.1383-6, 2002.

CARVALHO, P.S.P.; VASCONCELOS, L.W.; PI, J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 15, n. 4, p. 565-570, 2000.

CATANZARO, C; GUIMARÃES, S. A. *Patologia básica da cavidade bucal*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1982, p.282-315.

CHOUKROUN, J.; ADDA, F; SCHOEFFLER, C; VERVELLE, A. Une opportunit  en paro implantologie: le PRF. *Implantodontie*, v. 42, p. 55-62, 2000.

CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; DOHAN, D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 101, p. 56-60, 2006.

CHOUKROUN, J; DISS, A; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; DOHAN, D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograftmaturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 101, p. 299-303, 2006.

CLARCK, R.A. Fibrin and wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 936, p. 355-367, 2001.

CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS Jr, S. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimula o de forma o óssea. Estudo experimental. *Acta Ortopédica Brasileira*, v.11, n.4, 2003.

CROMACK, D.T, PORRAS-REYES, B.; MUSTOE, T.A. Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. *The Journal of Trauma*, v. 30, p. 129-133, 1990.

COSTA , A.L.C.; NETO, A.S.R.; NEVES, D.M.; SILVA, F.G.O.; SIMAO, G.M.L. Características dos agregados plaquetários e indica es da L- PRF na cirurgia oral. *Implant News*, v.4, 2012.

DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of Neurosurgery*, v. 74: 487- 491, 1991.

DAMSKY, C.H. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone*, v. 25, p. 96-96, 1999.

DEL VALLE, R.C.; CARVALHO, M.L. de; GONZALEZ, M.R. Estudo do comportamento de enxerto ósseo com material doador obtido dos bancos de tecidos músculo-esqueléticos. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, v.18(2), p.189-94, 2006.

DELACURE, MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v.27, p.859-74,1994.

DOHAN, D.M; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L; DOHAN, A.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 101, p. 37-44, 2006.

DOHAN, D.M; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L; DOHAN, A.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 101, p. 45-50, 2006.

DOHAN, D.; CHOUKROUN, J.; DISS, A. ; DOHAN, S.; DOHAN, A. ; MOUHYI, J. ; GOGLY, B.; Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v.101: p. 51-5, 2006.

DVORAK, H.F.; HARVEY, V.S.; ESTRELLA, P.; BROWN, L.F.; MCDONAGH, J.; DVORAK, A.M. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Laboratory Investigation*, v. 57, p. 673-686, 1987.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. *Tratado de anatomia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 11-16.

EFEOGLU, C.; AKCAY, Y.D.; ERTURK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.62, p. 1403-1407, 2004.

EHRENFEST, D.M.; DE PEPPA, G.M., DOGLIOLI, P.; SAMMARTINO, G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, v. 27, p. 63-69, 2009.

EHRENFEST, D.M.; DISS, A.; ODIN, G.; DOGLIOGLI, P.; HIPPOLYTE, M.P.; CHARRIER, J.B. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 108, p.341-352, 2009.

EHRENFEST, D.M.; DOGLIOLI, P.; DE PEPPA, G.M.; DEL CORSO, M.; CHARRIER, J.B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way . *Archives of oral biology*, v. 55, p. 185-194, 2010.

EHRENFEST, D.M.; LEMO, N.; JIMBO, R.; SAMMARTINO, G. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): Rabbit tricks and traps, Letters to the Editor. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 110, n. 4, 2010.

ELLIS III, E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos na mandíbula. In: PETERSON, L. J. *et al. Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 606-616.

FENG, X.; CLARK, R.A.; GALANAKIS, D.; TONNESEN, M.G. Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilizatin of alphav/beta3 mRNA by fibrin1. *Journal of Investigative Dermatology* , v. 113, p. 913-919, 1999.

GARG, A.K. Grafting material in repair and restoration. *Tissue Enginnering*, 1ª ed, Illinois, Quintessense Books, 1999. p.83-101.

GASSLING, V.; HEDDERICH, J.; AÇIL, Y.; PURCZ, N.; WILTFANG J. ; DOUGLAS, T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications, *Clinical Oral Implant Research*, v. 00, p.1-9, 2011

GORDH, M.; ALBERIUS, P. Some basic factors essential to autogenic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. *Scand. J. Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, v. 33, n. 1, p. 129-146, 1999.

GORDH, M.; ALBERIUS, P. LINDBERG, L. JOHNNELL, O. Bone graft incorporation after cortical perforations of the host bed. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, v. 117, n. 6, p. 664-670, 1997.

GRAGEDA, E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dentistry*, v.12, p. 301-309, 2004.

GROENEVELD, E.H.J.; VAN DEN BERGH, J.P.A.; HOLZMANN, P.; TEN BRUGGENKATE, C.M.; TUINZING, D.B.; BURGER, E.H. Histomorphometrical analysis of bone formed in human maxillary sinus floor elevations grafted with OP-1 device, demineralized bone matrix or autogenous bone. Comparison with non-grafted sites in a series of case reports. *Clinical Oral Implants Research*, v. 10, n. 6, p. 499-509, 1999.

GURBUZER, B.; PIKDOKEN, L.; TUNALI, M.;URHAN, M.; KUÇUKODACI, Z.; ERCAN, F. Scintigraphic Evaluation of Osteoblastic Activity in Extraction Sockets Treated With Platelet-Rich Fibrin , *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 68, p. 980-989, 2010.

HARDESTY, R.A.; MARSH, J.L. Craniofacial onlay bone grafting: A prospective evaluation of graft morphology, orientation and embryonic origin. *Plastic and Reconstructive Surgery* v. 85, n. 1, p. 5-15, 1990.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. São Paulo: Roca;1993.

HE, L.; LIN, Y.; HU, X.; ZHANG, Y.WU. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v.108, p.707-713, 2009.

HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, p. 2529-4, 2000.

INTINI, G.; ANDREANA, S.; BUHITE, RJ.; BOBEK, LA. A Comparative analysis of bone formation induced by human desmineralized freeze-dried and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defect. *Journal of Periodontology*, v. 79, n.4, p.1217-1224, 2008.

JAIN, N.C. The platelets. In: Lea & Febiger, eds. *Essentials of veterinary hematology*, 1st edition, Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. p. 105.

JANG, E.S.; PARK, J.W.; KWEON, H.Y.; LEE, K.G.; KANG S.W.; BAEK, D.H. CHOI, J.Y.; KIM, S.G. Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 109, p. 831-836, 2010.

JEONG, S.M; LEE, C.U.; SON J.S.; OH, J.H.; FANG, Y.; CHOI, B.H. Simultaneous sinus lift and implantation using platelet-rich fibrin as sole grafting material *Journal of Cranio-Maxillo Facial Surgery*, v.1, p.1-5, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.U. ; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.488

KAWAMURA, M.; URIST, M.R. Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 235,p. 302-310, 1988

KIM, B.J.; KWON, T.K.; BAEK, H.S.; HWANG, D.S.; KIM, C.H.; CHUNG, I.K. A comparative study of the effectiveness of sinus bone

grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 113, p. 583 – 592, 2012.

KIM TH; KIM, S.H.; SANDOR, G.K.; KIM, Y.D. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of oral biology*, v. 59, p. 550-558, 2014.

KLONGNOI B.; RUPPRECHT, S.; KESSLER, P.; ZIMMERMANN, R.; THORWARTH, M.; PONGSIRI, S. Lack of beneficial effects of platelet-rich plasma on sinus augmentation using a fluorohydroxyapatite or autogenous bone: an explorative study. *Journal of Clinical Periodontology*, v.33, p.500-509, 2006.

LANDESBURG, R.; ROY, M.; GLICKMAN R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet – rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.58, n.3, p.297-300, 2000.

LEE, J.W.; KIM, S.G.; KIM, J.Y.; LEE, Y.C. CHOI, J.Y.; DRAGOS, R. Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 113, p. 459 – 463, 2012.

LEKOVIC, V.; MILINKOVIC, I.; ALEKSIC, Z.; JANKOVIC, S.; STANKOVIC, P.; KENNEY, E.B.; CAMARGO, P.M. Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabone periodontal defects. *Journal of Periodontal Research*, v. 47, p. 409 417, 2012.

LI, Q.; PAN, S.; DANGARIA, S.J.; GOPINATHAN, G.; KOLOKYTHAS, A.; CHU, S.; GENG, Y.; ZHOU, Y.; LUAN, X. Platelet-Rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Augmentation. *BioMed Research International*, v. 2013, p.1-13, 2013.

LOUREIRO, C.C.S. PRP ou BMPs: qual a melhor opção para enxertia e aceleração de osseointegração nas reabilitações com implantes? Revisão

de literatura. *Innovations. Implant Journal, Biomaterial esthetics*, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 45-50, 2010.

LUCARELLI, E.; BECCHERONI, A.; DONATI, D.; SANGIORGI, L.; CENACCHI, A.; DEL VENTO, A.M. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*, v. 24, p. 3095-100, 2003.

LUNDQUIST, R.; DZIEGIEL, MH.; AGREN, MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regeneration*, v.15, p.356-363, 2008.

NUNAMAKER, D.M. Experimental model of fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.355, p.56-65, 1998.

MACEDO, L.G.S.; MONTEIRO, A.S.F.; MACEDO, N.L. Osso humano fresco congelado em reconstruções ósseas: estudo retrospectivo e relato de casos. *Implant Dentistry*, v.4, p.49-55, 2007.

MACHADO, C.P.G.; PINTOR, A.V.B.; GRESS, A.; ROSSI, M.A.; GRANJEIRO, M.J. ; MAIA, C.D.M. Avaliação da hidroxiapatita contendo estrôncio como substituto ósseo em tíbias de ovelhas. *Innovations. Implant Journal, Biomaterial esthetics*, v.5, p.9-14, 2010.

MASTERS, D.H. Implants. Bone and bone substitutes. *Journal of the California Dental Association*, v.16, p. 56-65, 1988.

MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. – *Tissue Engineering*. Illinois, Quintessence, p.71-101, 1999.

MARX, R.E. Bone and Bone Graft Healing. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, v. 19, p.455–466, 2007.

MENDES, V.C. Influência da matriz de esmalte dentário (Emdogain®) sobre o processo de reparo alveolar: análise histológica e histométrica em ratos. 2000. p.110. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2000.

MISCH, C. *Contemporary Implant dentistry*. St. Louis: Mosby; 1999. p.508

MISCH, C M. Maxillary Autogenous Bone Grafting. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, v.23, p. 229–238, 2011.

MISCH, C.M. Autogenous bone grafting for dental implants. In: Fonseca RJ, Turvery TA, Marciani RD, editors. 2nd edition. *Oral and maxillofacial surgery*, vol. 1. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2008. p. 344–70.

MISCH C.M.; MISCH, C.E. Intraoral autogenous donor bone grafts for implant dentistry. In: MISCH CE, ed. *Contemporary Implant Dentistry*. St. Louis Mosby Year-Book Inc; 1998:497–508.

MOSESSON, M.W.; SIEBENLIST, K.R.; MEH, D.A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 936, p. 11-30, 2001.

MUNDY, G.R. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 324, p. 24-28, Mar. 1996.

OPREA, W.E.; KARP, J.M; HOSSEINI, M.M; DAVIES, J.E. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *Journal of craniofacial surgery*, v. 14, p. 292-300, 2003.

OZDEMIR, H.; EZIRGANLI, S.; KARA, M.I.; MIHMANLI, A.; BARIS, E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Archives of oral biology*, v.1, p.1-8, 2012.

PELISSIER, P. H.; MASQUELET, A. C.; BAREILLE, R.; MATHOULIN, S.; AMEDEE, J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and cold stimulate bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Research*, v.22, p.73-79, 2004.

PRAKASH, S.; THAKUR, A. Platelet Concentrates: Past, Present and Future . *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.10, p.45–49, jan-mar, 2011.

PRIPATNANONT, P.; NUNTANARANONT, T.; VONGVATCHARANON, S.; PHURISAT, K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *Journal of Cranio-Maxillo Facial Surgery*, v.1, p.1-10, 2013.

ROBERTS, E. Bone physiology and metabolism. *Journal of the California Dental Association*, v. 15, p. 54-61, 1987.

SANTOS, M.I.; REIS, R.L. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromolecular Bioscience*, v. 10, p. 12-27, 2010.

SIMONPIERI, A.; CHOUKROUN, J.; DEL CORSO, M.; SAMMARTINO, G.; EHRENFEST, D..M. Simultaneous Sinus-Lift and Implantation Using Microthreaded Implants and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material: A Six-Year Experience. *Implant Dentistry*, v.20, p. 1-6, 2011.

SHARMA, A.; PRADEEP, A.R. Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree furcation defects: a randomized clinical trial. *Journal of Periodontology*, v.82, n.10, p.1396-403, 2011.

SCHLIEPHAKE, H.; SCHARNWEBER, D.; DARD, M.; ROSSLER, S.; SEWING, A.; MEYER, J.; HOOGESTRAAT, D. Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, v. 13, p. 312-319, 2002

SOHN, D.S.; MOON, J.W.; MONN, Y.S.; PARK J.S.; JUNG, H.S. The use of concentrated growth factors (CGF) for sinus augmentation. *Journal of Oral Implant (Japan)*, v.38, p.25–35, 2009.

SOUSA, V. L. *Efeitos do ultra som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (Canis familiaris)*. 2003.127f. Dissertação (Mestrado)-

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SAHNI, A.; ODRILJIN, T.; FRANCIS, C.W. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 7554-9, 1998.

SUNITHA, V.; MUNIRATHNAM, E. Platelet rich fibrin: evolution of a second generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research*, v.39, p. 42-46, 2008.

TEN CATE, A.R. *Histologia Bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1985. p.95-112.

THORWARTH, M.; RUPPRECHT, S.; FALK, S.; FELSZEGHY, E.; WILTFANG, J.; SCHLEGEL, KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (PRP)—an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*, v.26, p. 2575-83, 2005.

TOLEDO FILHO, J.L.; MARZOLA, C.; RODRIGUEZ, M.P.S. Os enxertos ósseos e de biomateriais e os implantes osseointegrados. *Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia*, v.8, p. 127-143, 2001.

TONG L.; BUCHMAN, S.R. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *The Journal of Craniomaxillofacial Trauma*, v. 6, n.1, p. 31-41, 2000.

TOPAZIAN, R.G. Rehabilitation of the atrophic edentulous maxilla by bone grafting. *Journal of the American Dental Association*, v. 90, n.3, p. 625-631, 1975.

TUNALI, M.; OZDEMIR, H.; KUCUKODACI, Z.; AKMANC, S.; FIRATLI, E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* v.1 , p.1-7, 2012.

UEDA, J.K.; FRANCISCHONE, C.E.; RAMALHO, L.T.O.; SCARSO J.F. Estudo comparativo da substituição óssea frente a enxerto de osso autógeno e proteína morfogenética óssea ao lado de implantes de titânio.

Revista Dental Press de Periodontia e Implantodontia, v,1, p. 76-84, 2007.

URIST, M.R. Bone: Formation by autoinduction. *Science*, v.150, p.893-899, 1965.

URIST, M.R.; STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. *Journal of Dental Research*, v. 50, p. 1392-406,1971

VAN DER BERGH, J.P.A.; TEN BRUGGENKATE, C.M.; TUINZING, D.B. Preimplant surgery of the bony tissues. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 80, n. 2, p. 175-183, 1998.

VAN HINSBERGH, V.W.; COLLEN, A.; KOOLWIJK, P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 936, p. 426- 437, 2001.

VRENDRAMIN, FS.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, CM.; PEREIRA, MS.; FRANCO, TR. Platelet-rich plasma and growthfactors: processing technique and application in plastic surgery. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. Cir,v.33, p.24-28, 2006.

WEILAND, A.J.; MOORE, J.R.; DANIEL, R.K. Vascularized boneautografts. Experience with 41 cases. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. Res., v.174, p.87-95, 1983.

WINKLER, R.; PASLEAU, F.; BOUSSIF, N.; HODZIC, D. The IGF system: summary and recent data. *Revue médicale de Liège*, v. 55, p. 725-739, 2000.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L; GREEN, D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* , v. 55, p. 1294-9, 1997.

WU, C.L.; LEE, S.S.; TSAI, C.H.; GIRARD, M.O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.L. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal*, v. 57, n.2, p 207-212, 2012.

YOON, J.S.; LEE, S.H.; YOON, H.J. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, v. 1, p.1-7, 2014.

ZHANG, Y.; TANGL, S.; HUBER, C.D.; LIN, Y.; QIU, L.; RAUSCH, X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: A histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, v.40, p. 321-328, 2012.

XUAN, F. LEE, C.; SON, J.S; JEONG, S.M.; CHOI, B.H. A comparative study of the regenerative effect of sinus bone grafting with platelet-rich fibrin-mixed Bio-Oss_ and commercial fibrin-mixed Bio-Oss: An experimental study. *Journal of Cranio-Maxillo Facial Surgery*, v.10, p.1-4, 2013.

8 APÊNDICE

Apêndice – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em março de 2012 (Parecer CEUA-UPF No 002/2012)

	UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
PARECER Nº 001/2013	
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 05/04/2013, analisou o protocolo de pesquisa "Efeito da oxigenoterapia hiperbárica associada a plaquetas ricas em fibrinas na osseointegração de enxertos autógenos – um estudo <i>in vivo</i>", registro na CEUA Nº 022/2012, de responsabilidade da pesquisadora Luciana Ruschel dos Santos. O projeto de pesquisa foi reformulado considerando o parecer CEUA-UPF nº 035/2012.</p> <p>Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o estudo relevante e com relação custo-benefício adequada. A pesquisadora e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e dos "Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório" preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).</p> <p>Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.</p> <p>A pesquisadora deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.</p> <p>Situação: PROTOCOLO APROVADO</p> <p style="text-align: right;">Passo Fundo, 8 de abril de 2013.</p> <p style="text-align: center;"> Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini Coordenadora – CEUA – UPF</p>	

9 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of dental sciences

Histological analysis of the effect of platelet-rich fibrin on the consolidation of bone graft blocks – study in rabbits

Pablo Walker Lago¹, Márcia Borba¹, Vinicius Rosa²

¹ Post-graduate Program in Dentistry, Faculty of Dentistry, University of Passo Fundo, Brazil.

² Faculty of Dentistry, National University of Singapore, Singapore

* Corresponding author. Tel.: +55 (55) 91460354; fax: +55 (55) 33335426.
E-mail address: ortholago@hotmail.com ([Lago, P.](#)).

ABSTRACT

The objective was to assess *in vivo* the effects of platelet-rich fibrin (PRF) in the consolidation of autogenous bone graft. The tested hypothesis was that PRF enhances the quality of bone formation between the graft and the host tissue. Ten rabbits were submitted to a surgical procedure to bilaterally implant bone grafts from calvaria in the mandible. The PRF was placed in the interface on one side and the other side was left untreated (control). After 14 and 28 days, the animals were euthanized and the tissues processed for histological assessment (hematoxylin and eosin, and toluidine blue). In both assessment periods, the use of PRF improved the organization of the newly formed bone with higher concentration of blood vessels and density of collagen fibrils where bone formation has not occurred. The hypothesis was accepted once histology showed that PRF has improved the quality of bone formation after 14 and 28 days as compared to the control. The use of PRF between graft and host bone may be a promising method to improve graft consolidation.

Keywords: fibrinogen, regeneration, growth factors, cytokines, blood clotting.

INTRODUCTION

Implant installation is usually performed in a posterior surgical time, when the use of bone grafts is required. In cases where the autogenous graft block is selected, the time for graft consolidation to the host tissue is of about six to eight months [1] The patient's desire for long oral rehabilitations in short periods of time demands the professional team to seek for materials and techniques that allow accelerating the osseointegration process [2]

Some alternatives have been used to speed the fusion process between bone graft and host tissue, such as the BMPS (Bone morphogenetic proteins), PRP (Platelet-rich plasma), PRF (Platelet-rich fibrin), CGF (Concentrated growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), and other platelet [3,4] Thus, intensifying the chemotaxis process of the cells responsible for tissue repair, and promoting acceleration of bone tissue formation and [5]

Among these options are platelet-rich fibrins (PRF) that appeared around the 2000s as the second generation of platelet concentrates, and were developed by Joseph Choukroun, in France, for specific use in oral and maxillofacial surgery [6]. The PRF is obtained from autologous blood with no addition of external factors, different from what occurs in the PRP processing, which requires the use of anticoagulant. The blood sample of 10 ml is prepared with 3000-rpm centrifugation for 10 min in a specific tube. [7,8]

The PRF is a fibrin membrane with very high potential of healing wounds [9]. It may be used either alone or associated with different biomaterials, including autogenous bone. The PRF has growth factors

that speed early bone regeneration, increasing angiogenesis, chemotaxis, mitosis, and cellular proliferation [10,11]

Studies show that PRF has a positive effect on bone formation when used alone or combined with autogenous bone [12,13] Histological and histomorphometric results - supported by radiographic assessment - of a study with animal models showed that the PRF group associated with the autogenous graft presented greater bone formation than the group without PRF. These findings are explained by the presence of growth factors of the PRF, and the survival of osteoblasts, osteocytes, and pre-osteoblasts of autogenous grafts. Another investigation also reported that the action of PRF growth factors, when used along with titanium barriers, was responsible for better and higher amount of bone formation when comparing to anorganic bovine bone (ABB) and biphasic calcium phosphate (BCP). [14]

On the other hand, a study showed that the immunostaining of intensity for VEGF in the filling of 7 mm defects in the calvaria of 10 rabbits was higher in the experimental group (PRF + xenogeneic bone) than the control group (xenogeneic bone), however it did not find significant differences between groups in histomorphometric analyses for the assessment of bone formation.[15] Literature suggests that the use of PRP, PRF, and CGF favors bone formation in the initial stage of bone graft healing. This was showed in a study with 12 rabbits, where the authors compared the effects of these growth factors in defects of the calvaria of animals. There was no statistical difference among the platelet concentrates regarding osteogenesis, only among experimental groups and control group .[16]

Therefore, the interposition of a thin membrane of PRF between autogenous grafts seems to be a promising method to accelerate osseointegration, because it has growth factors directly connected to bone regeneration, such as platelet-derived growth factor A and B (PDGF-AB), transforming growth factor b1 (TGFb-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), which upon release stimulate cell proliferation, angiogenesis, and remodeling [17].

Thus, this study aims to investigate, in rabbits, the effect of platelet-rich fibrin membrane on the consolidation of autogenous bone graft blocks in the host tissue. The tested hypothesis is that the interposition of the PRF membrane enhances the quality of bone formation in the host tissue/autogenous graft interface when compared to the control group (without PRF membrane), in experimental periods of 14 and 28 days.

MATERIALS AND METHODS

This research was approved by the Ethics Committee for Animal Use of the University of Passo Fundo (CEUA-UPF), under registration number 001/2013. Ten *Oryctolagus cuniculus* rabbits of the New Zealand lineage were used; they were albino, aged six to eight months, average mass of 3.5 Kg, free from ectoparasites and endoparasites (Cabanha Dois Irmãos, Dois Irmãos, Rio Grande do Sul, Brazil).

After at least 48 hours of adaptation, the animals were submitted to four hours of fasting before receiving pre-medication with 2 mg/kg of tramadol hydrochloride (100 mg/2 ml - União Química Farmacêutica

Nacional S/A, Minas Gerais, Brazil), 4 mg/kg of tiletamine hydrochloride + zolazepam hydrochloride (**Zoletil™** 50 – 50 mg/ml Virbac do Brasil Indústria e Comércio, São Paulo, Brazil), and 1 mg/kg of midazolam (1 mg/ml - Hipolabor Farmacêutica, Sabará, Minas Gerais, Brazil), all of them intramuscularly. After relaxation of the animal, the access to continuous infusion of 10 mg/kg/h of 0.9% NaCl was achieved through the brachiocephalic vein, and the anesthetic plan was induced with 0.5 mg/kg/IV of diazepam (10 mg/2 ml - Teuto Brasileiro – Goiás, Brazil), followed by 2 mg/kg/IV of propofol (10 mg/2 ml - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brazil). Endotracheal intubation was performed with a 3.0 mm endotracheal tube without cuff for maintenance with 1 mg/1 ml of 100% isoflurane (Isoforine™ - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brazil), vaporized by 100% oxygen. As for prophylactic antibiotic therapy, 5 mg/kg/IV of cephalothin sodium (1g - ABL – Antibióticos do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil) was used, while preemptive analgesia with 0.1 mg/kg/IV of meloxicam (0.2% Maxican™ - Ouro Fino Saúde Animal Ltda. - São Paulo, Brazil) and 0.01 mg/kg of morphine sulphate (10 mg/ml - Hipolabor Farmacêutica, Minas Gerais, Brazil), epidurally (L5-L6), and diluted with 0.9% NaCl.

After anesthesia, the animals were submitted to broad trichotomy in the cranial region and the bilateral submandibular region.

For membrane attainment, blood was collected before surgery. The site of collection was the external jugular vein with vacuum system (Vacutaneir, Franklin Nakes, New Jersey, USA) and 21G needle with 10 ml tube, without anticoagulant, and immediately after the centrifuged collection at 2700 rpm x 12 min, with a specific centrifuge (Hettich EBA

20, Tuttlingen, Baden-Württemberg, Germany), as indicated by the Choukroun technique [18]. After centrifugation, the material obtained consisted of three layers: acellular plasma (upper portion), fibrin gel (median portion), and red blood cells (lower portion).

The PRF gel was removed from the tube with a straight Williams tweezers and the remaining blood was removed with a surgical scissor. The membrane was seated over the PRF processing box (Box interlock), pressed for extracting serum, thus obtaining a membrane of approximately 1-mm thick.

Then, the PRF membrane was reduced to the same perimeter of the graft obtained, and adapted to the graft and screw for later insertion in the host tissue.

Bicortical grafts blocks with diameter of 10 mm x 10 mm were removed from the parietal area aided by a surgical guide made of stainless steel, and carbide spherical surgical burs n. 2 and conical trunk n. 701. After preparation for grafting, the grafts were kept in sterile gauze and soaked in 0.9% saline solution until preparation of the host tissue.

After folding the flap, 3 monocortical perforations were made in the host tissues aided by carbide spherical burs n. 2 and abundant saline irrigation, so to facilitate communication of the trabecular bone of the host tissue and the cortical bone of the graft. Grafts were placed and fixed by titanium positional screw (1.5 mm diameter and 5.0 mm length, DSP Biomedical, Brazil).

Animals were submitted to euthanasia by the administration of 10 ml/Kg of 2.5% thiopental sodium, intravenously. The blocks of bones were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4) for 24 hours, and then

stored in 70% alcohol-sterilized jars until the moment of decalcification with 4% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The glass slides for histological analysis were stained by hematoxylin and eosin (HE), and Toluidine Blue staining, for morphological analysis of bone repair.

RESULTS

The present study allowed the collection of a 10 ml blood sample in rabbits with approximately 3.5 Kg, as standardized by the CHOUKROUN technique[18] through the collection in the external jugular vein with vacuum system and 21G needle (Figure 12A).

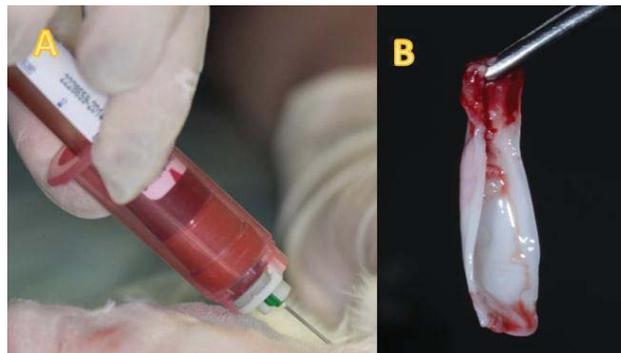


Figure 12 – A) Blood collection, B) PRF membrane obtained.

Figures 1 and 2 show histological glass slides stained by Hematoxylin Eosin, which represent the groups without PRF and with PRF, in 14 and 28 days. The 5 glass slides chosen from each group present similar results for the formation of collagen fibers and bone trabeculae in the graft/host tissue interface. Table 1 describes the

characteristics of the glass slides from both groups. It is possible to observe the effects of PRF membrane interposition between the autogenous graft and the host tissue, compared to the group that did not receive the PRF membrane.

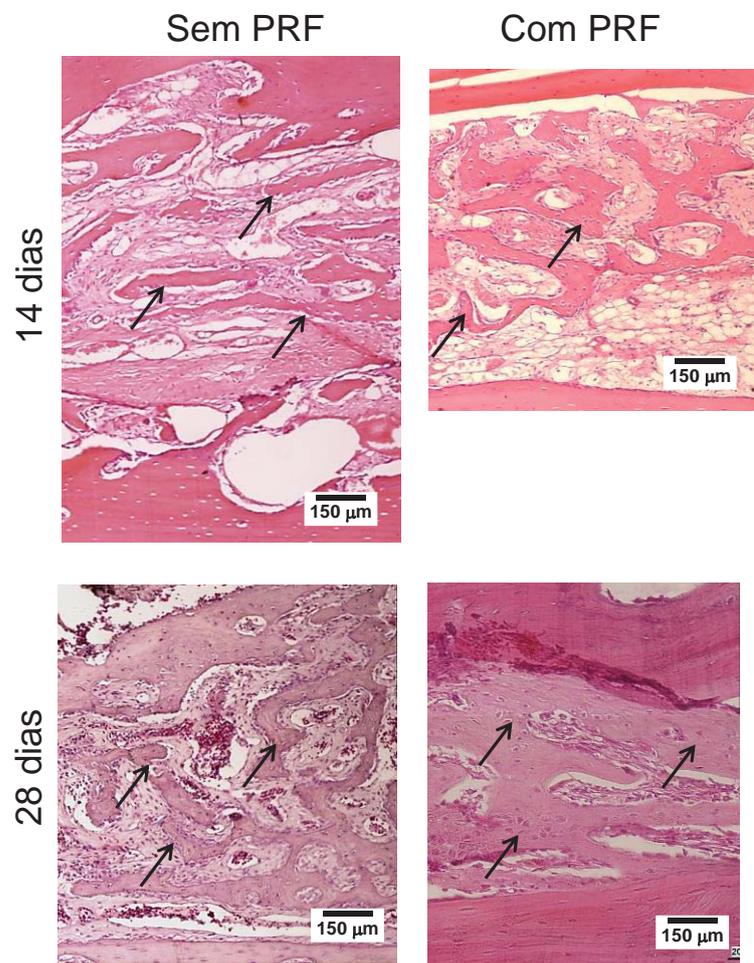


Figure 1 – Newly formed bone after 14 and 28 days for groups with and without PRF. HE staining.

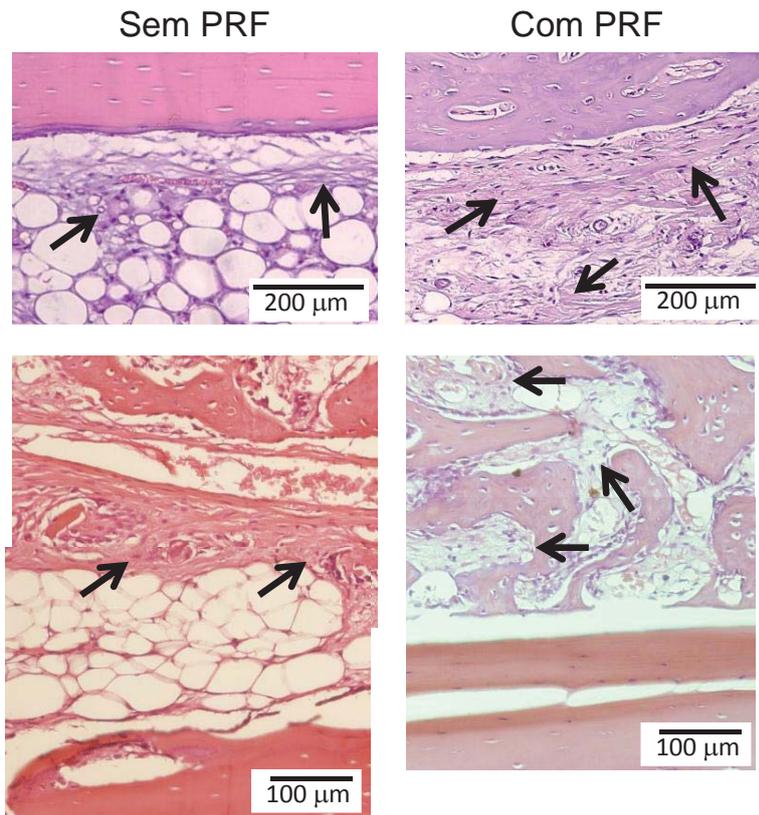


Figure 2 – Host tissue and cortical graft interface showing extracellular matrix with higher density of collagen fibrils (arrows) in the PRF group, in 14 and 28 days. HE staining.

Table 1 - Description of histological characteristics of glass slides from groups with and without PRF.

GROUP WITHOUT PRF	GROUP WITH PRF
Disorganized bone formation	Better organized bone formation
Less compact bone	More compact bone
Lower collagen fibrils density in the 14 days group	Higher collagen fibrils density in the 14 days group
Similar bone distribution in the 28 days group without PRF and the 14 days group with PRF	
Lower presence of osteocytes in the 28 days group	Higher presence of osteocytes in the 28 days group

In Figure 3, higher presence of blood vessels was observed in the period of 14 days. Moreover, the vessels in the group with PRF seem to have more defined endothelium and lumen when compared to the group without PRF.

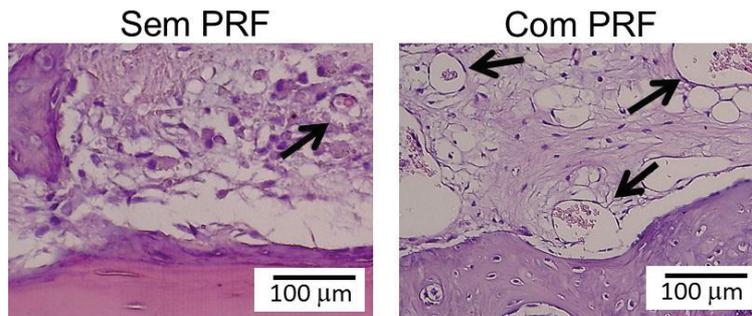


Figure 3 – Host tissue and cortical graft interface showing presence of blood vessels (arrows) in both groups in 14 days (HE staining).

In Figure 4, it was observed at 14 days, in the group with PRF, that around bone matrices the cells were stained with higher density by the Toluidine Blue technique when compared to the control group, suggesting that in this region the osteoblastic cells present intense mitotic activity [19]

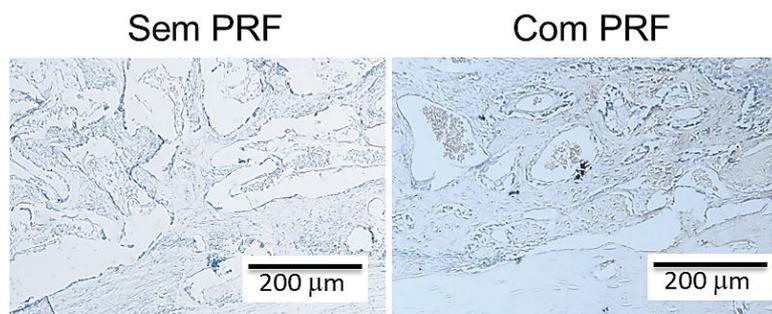


Figure 4 – Host tissue and cortical graft interface showing presence of higher osteoblastic activity in the PRF group, in 14 days. Toluidine Blue.

In the Toluidine Blue staining at 28 days, the contrary was observed: lower intensity of the blue color of cells in the group with PRF, and higher staining of cells in the group without PRF. (Figure 5).

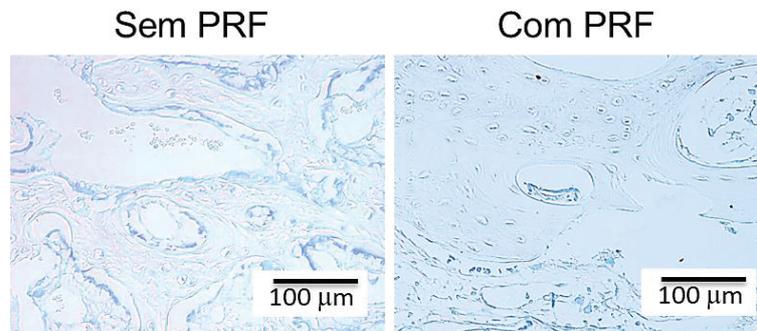


Figure 5 – Host tissue and cortical graft interface showing presence of lower osteoblastic activity in the group with PRF, in 28 days. Toluidine Blue.

DISCUSSION

The "gold standard" among therapy options for bone grafting is the autogenous graft [20], due to its osteogenic properties.[21,22,23]. Autogenous grafts may be used either in particles or in blocks, depending on the size of the defect [24]

Bone graft consolidation depends mainly on four factors: a) cell interaction [25]; b) extracellular matrix [26]; c) vascularization [27], and d) cytokines [28]. The PRF acts on these four factors mentioned. It presents growth factors and cytokines in its fibrin meshes, which work over cell interaction [10,29], operating as an extracellular matrix for the migration of undifferentiated mesenchymal cells [30,31], and increasing angiogenesis [32].

The PRF membrane continually releases growth factors for up to 7 days after its application [10], working over undifferentiated mesenchymal cells, angiogenesis, collagen I synthesis, and fibronectin

[25,33]. Such PRF features may explain a more compact bone formation in the 14 and 28 days groups that received the PRF membrane, as observed in qualitative histological analyses.

In comparison with the 28 days group without PRF, the 14 days group with PRF presents similar results regarding the conformation of newly formed bone in the interface. This suggests that the association of PRF to autogenous bone results in fast graft maturation and consolidation, increased bone density, increased osteogenesis rate, and better quality of the new bone [34,35].

It was also observed a higher amount of blood vessels in the period of 14 days for the group with PRF. Moreover, the vessels in the group with PRF seem to have more defined endothelium and lumen when compared to the group without PRF. The fibrin matrix could promote angiogenesis [36,37] by the presence of the vascular endothelial growth factor (VEGF) [38], which is an angiogenesis inducer [39]. The PRF seems to favor the presence of VEGF when associated with xenogeneic bone.

In histological analyses of 14 days by Toluidine Blue, it was verified that in bone matrices the cells were stained with higher density in the group with PRF, suggesting that osteoblastic cells present intense mitotic activity in this region [40]. This may be explained by the release of TGF- β by PRF; such growth factor stimulates mitogenesis of pre-osteoblasts and osteoblasts [29] by its immediate effect on the expression of RUNX2 factor, which activation is essential for osteoblastic differentiation [41].

The TGF- β is released from the PRF for up to 14 days in the regeneration site [42]. The more compact conformation of the newly

formed bone after 28 days might come from the ongoing release of this growth factor (Figures 1 and 2), besides the group without PRF presenting stained cells with higher intensity in this period of time, which shows that from this moment on its osteoblastic differentiation was starting, that is, its physiological bone consolidation.

Furthermore, the success of the autogenous bone graft depends on close contact with the host tissue [43] The PRF membrane interposed between the graft and the host tissue does not impair bone formation in this region, it rather improves the formation and organization of the bone callus in the periods of time studied, thus working as a connective tissue between host tissue and bone graft.

A rabbit animal model was used in the present study, considering such animals present bone density, fracture resistance, and post-trauma bone repairing similar to human beings [44] However, studies show that PRF attainment in rabbits is not recommended because the time for blood collection in their veins and arteries do not allow fast blood sampling due to the lack of blood volume and pressure, so that blood partially clots outside the tube, which impairs PRF formation and makes it useless for clinical application [45] The use of the vacuum system was crucial for the success of PRF membrane attainment in the rabbits of the present research; it enabled fast collection (without blood clotting before centrifugation) with the required volume, allowing de attainment of the PRF membrane, thus representing the protocol adopted for obtaining PRF in rabbits.

Moreover, the time of 14 days and 28 days for assessment of results allowed verifying the difference of bone formation in initial moments of the graft consolidation process, considering the full cycle of

cortical bone remodeling of rabbits is faster than that of human beings, which was observed after 42 days. Therefore, it may be assumed that the findings in the time of sacrifice of 60 days correspond to a 6-month period in human beings [46] which is the required waiting time for the installation of osseointegrated implants in areas submitted to bone reconstruction .[47]

CONCLUSION

The hypothesis of the study was accepted once histological data showed that in the PRF group bone remodeling occurred more intensively. The interposition of the platelet-rich fibrin membrane between bone graft and host tissue seems to be a feasible method in rabbits with potential to work with a connective tissue in the interface.

REFERENCES

1. MISCH C.M.; MISCH, C.E. Intraoral autogenous donor bone grafts for implant dentistry. In: MISCH CE, ed. *Contemporary Implant Dentistry*. St. Louis Mosby Year-Book Inc; 1998:497–508.
2. Ueda JK, Francischone CE, Ramalho LTO, Scarso JF. Estudo comparativo da substituição óssea frente a enxerto de osso autógeno e proteína morfogenética óssea ao lado de implantes de titânio. *Rev Dent Press Perio Implan 2007*; 1: 76-84.
3. ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M. Plasma rich in growth factor. *Dental Dialogue*, v.3, p. 1-10, 2004.
4. SOHN, D.S.; MOON, J.W.; MONN, Y.S.; PARK J.S.; JUNG, H.S. The use of concentrated growth factors (CGF) for sinus augmentation. *Journal of Oral Implant (Japan,)*, v.38, p.25–35, 2009.

5. CARLSON, NE.; ROACH, RB JR. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry, *Journal of the American Dental Association*, v.133 n.10, p.1383-6, 2002.
6. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie* 2000;42:55-62. French.
7. SUNITHA, V.; MUNIRATHNAM, E. Platelet rich fi brin: evolution of a second generation plateletconcentrate. *Indian Journal of Dental Research*, v.39, p. 42-46, 2008.
8. PRAKASH, S.; THAKUR, A. Platelet Concentrates: Past, Present and Future . *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.10, p.45–49, jan-mar, 2011.
9. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (PRP)—an immunohistochemical analysis. *Biomater* 2005; 26: 2575-83.
10. EHRENFEST, D.M.; DE PEPPA, G.M, DOGLIOLI, P.; SAMMARTINO, G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, v. 27, p. 63-69, 2009.
11. EHRENFEST, D.M.; DOGLIOLI, P.; DE PEPPA, G.M.; DEL CORSO, M.; CHARRIER, J.B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way . *Archives of oral biology*, v. 55, p. 185-194, 2010.
12. JANG, E.S.; PARK, J.W.; KWEON, H.Y.; LEE, K.G.; KANG S.W.; BAEK, D.H. CHOI, J.Y.; KIM, S.G. Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 109, p. 831-836, 2010.
13. PRIPATNANONT, P.; NUNTANARANONT, T.; VONGVATCHARANON, S.; PHURISAT, K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *Journal of Cranio-Maxillo Facial Surgery*, v.1, p.1-10, 2013.

14. OZDEMIR, H.; EZIRGANLI, S.; KARA, M.I.; MIHMANLI, A.; BARIS, E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Archives of oral biology*, v.1, p.1-8, 2012.
15. YOON, J.S.; LEE, S.H.; YOON, H.J. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, v. 1, p.1-7, 2014.
16. KIM TH; KIM, S.H.; SANDOR, G..K.; KIM, Y.D. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of oral biology*, v. 59, p. 550-558, 2014.
17. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts. In: Lunch SE.; Genco RJ, Marx RE. – *Tissue Engineering*. Illinois, Quintessence 1999: 71-101.
18. Dohan ADM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:37-44.
19. BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS, N.A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Edart; 1976. p.109-31
20. Groeneveld EHJ, Van Den Bergh JPA, Holzmann P, Ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH. Histomorphometrical analysis of bone formed in human maxillary sinus floor elevations grafted with OP-1 device, demineralized bone matrix or autogenous bone. Comparison with non-grafted sites in a series of case reports. *Clin Oral Impl Research* 1999; 10: 499-509.
21. MISCH, C. *Contemporary Implant dentistry*. St. Louis: Mosby; 1999. p.508
22. KLONGNOI B.; RUPPRECHT, S.; KESSLER, P.; ZIMMERMANN, R.; THORWARTH, M.; PONGSIRI, S. Lack of beneficial effects of platelet-rich plasma on sinus augmentation using a fluorohydroxyapatite or autogenous bone: an explorative study. *Journal of Clinical Periodontology*, v.33, p.500-509, 2006.
23. INTINI, G.; ANDREANA, S.; BUHITE, RJ.; BOBEK, LA. A Comparative analysis of bone formation induced by human desmineralized freeze-dried and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defect. *Journal of Periodontology*, v. 79, n.4, p.1217-1224, 2008.

24. BEZERRA, J.F.B.; LENHARO, A. *Terapia Clínica Avançada em Implantodontia*. v.1 36-38. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p 313.v.1 36-38
25. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:56-60.
26. Damsky CH. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone* 1999; 25: 96.
27. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macrom Biosc* 2010; 10: 12-27.
28. Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Rossler S, Sewing A, Meyer J, Hoogestraat D. Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Imp Research*, v. 13, p. 312-319, 2002
29. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:45-50
30. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg* 2002;13(2):231-9; discussion 240-3.
31. Gassling V, Hedderich J, Açil Y, Purcz N, Wilftang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications *Clin. Oral Impl. Res* 2011; 0: 1-9.
32. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, S, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:299-303.
33. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. – *Tissue Engineering*. Illinois, Quintessence 1999: 71-101

34. Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan S, Dohan A, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101: 51-5.
35. Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Aust Dent J* 2012; 57 (2): 207-212.
36. Pelissier PH, Masquelet AC, Bareille R, Mathoulin S, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and cold stimulate bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Research* 2004; 22: 73-79.
37. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987;57:673-86.
38. Van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:426-37
39. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Tratado de anatomia Veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 11-16.
40. Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart; 1976. Coloração do tecido conjuntivo; p.109-31
41. Li Q, Pan S, Dangaria S, Gopinathan G, Kolokythas A, Chu S, Geng Y, Zhou Y, Luan X. Platelet-Rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Augmentation. *BioMed Resear Internat* 2013; 13: 1-13.
42. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu A. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 707-713.
43. BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, Gainesville, v.1, n.174, p. 28-38, 1983.
44. HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, p. 2529-4, 2000.

45. EHRENFEST, D.M.; LEMO, N.; JIMBO, R.; SAMMARTINO, G. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): Rabbit tricks and traps, Letters to the Editor. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 110, n. 4, 2010.
46. ROBERTS, E. Bone physiology and metabolism. *Journal of the California Dental Association*, v. 15, p. 54-61, 1987.
47. TONG L.; BUCHMAN, S.R. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *The Journal of Craniomaxillofacial Trauma*, v. 6, n.1, p. 31-41, 2000.