

KAREN RAWEN TONINI

**Avaliação da Eficácia da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP)
em Defeito Crítico de Calota de Ratos Induzidos à
Hipercolesterolemia**

KAREN RAWEN TONINI

**Avaliação da Eficácia da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP)
em Defeito Crítico de Calota de Ratos Induzidos à
Hipercolesterolemia**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos
requisitos para obtenção do título de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”- UNESP.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho
Coorientação: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba – SP
2018

Agradeço à Deus,

Que nunca me desamparou, mesmo nos momentos mais difíceis e complicados, sempre me deu forças, tanto físicas, como psicológicas e emocionais para seguir em frente, mostrando que não importa a adversidade ou dificuldade, ele está conosco, e tudo dará certo.

Aos meus pais Marcelo Tonini e Andréa Cristina Rawen,

Que são a base e o suporte de tudo que posso agradecer hoje. Que tanto fizeram por mim, que tanto abdicaram de seus desejos para que todos os meus fossem realizados. Infelizmente não há palavras que consigam transmitir minha imensa gratidão, nenhum texto conseguirá expressar a real admiração, respeito, e principalmente amor que sinto por vocês.

Aos meus avós Victor Waldemar Rawen e Regina Aparecida do Amaral Rawen

Que são o meu maior exemplo de força, fé, perseverança, garra e amor que um dia terei. Obrigado pelo amor incondicional, e pelo incansável apoio que foi me dado por todos esses anos. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer todos que foram responsáveis por fazer desde trabalho uma realidade.

Ao meu Orientador Professor **Osvaldo Magro Filho** pela oportunidade e pelos conhecimentos compartilhados, paciência e disponibilidade,

Ao meu Co-orientador Professor **Leonardo Perez Faverani** pela orientação e oportunidade,

Ao André Oliva, grande **Azeite**, que viveu todos os passos dessas pesquisas comigo, desde os desesperos até as alegrias por ter dado tudo certo, e pela paciência de me ensinar todos os procedimentos,

À professora **Ana Paula Bassi**, que mostrou uma humanidade fora do comum. Infelizmente não é comum encontrarmos professores que se importem e se dediquem tanto aos alunos como ela. Obrigada por cada conversa, cada orientação, pela paciência, e principalmente pelo carinho.

À **Jaqueline Hassumi** e ao **Ciro Duailibe**, pela ajuda na punção cardíaca dos ratos, tarefa extremamente delicada e complexa.

Aos meus amigos, que com certeza sem eles não teria forças, coragem, nem estrutura emocional para terminar o curso de graduação. Obrigada por serem meus alicerces, por terem me reerguido todas as vezes que cai, por estarem sempre ao meu lado em todas as vezes que chorei e senti que estava no caminho errado, obrigada por terem sido o motivo de minhas risadas, e de onde muitas vezes tirei forças para seguir adiante. Vocês são mais que amigos, agora são minha família também.

Um agradecimento em especial para os amigos **Ana Daniela Spínola Silva Antunes**, por todos conselhos dados, cada bronca, cada palavra sincera, sendo ela um elogio ou uma crítica. Obrigada por me mostrar qualidades que nem eu mesma sabia que tinha, e por sutilmente (ou não) pontuar alguns defeitos, com certeza foram suas palavras que me fizeram crescer e amadurecer todos esse anos. Obrigada por ser essa “maezona, a qual eu sempre corro quando o assunto é um pouco mais sério, e quem me passa uma paz inacreditável, obrigada também por ter elevado minha espiritualidade, sua crença realmente é incrível, e me encantou. Pra sempre serei sua cotista, te amo muito! ,

À **Débora Spegiorin Migliorucci** (meu eterno balãozinho, inflado ou

murcho), obrigada por esse seu humor ácido e rabugento, mas que no fundo é tão sensível e chora quanto eu, obrigada por sempre me socorrer, por cada ida desesperada no hospital, mas que no final nunca era nada, e só servia pra eu te atrapalhar, obrigada por sempre me amparar, e **SEMPRE** comprar todas as minhas brigas, desde um simples “SAAAAAI DAAQUIIIII” em uma festa, até de me tirar de uma situação descontrolada e me levar pra sua casa, obrigada por toda proteção, atenção e cuidado, e pelas suas implicâncias e zoeiras também, senão como eu saberia que você me ama?! Retribuo nas mesmas brincadeiras, pra você também saber que te amo do mesmo jeito, muito obrigada balãozinho, sem seu suporte e amizade o caminho teria sido muito mais difícil,

Ao Bart, **vulgo Guilherme Felício Biaggi**, que me deu a prova que sempre estaria ao meu lado pra me defender, e me levantar de cada queda que eu tivesse. Obrigada por cada momento com você, sendo fazendo churrascos, vendo jogo de futebol (e jogando amendoim na Dé), escolhendo seus contatinhos no tinder, sendo acordada por travesseiradas sutis na cara, por cada conversa sincera e pelos conselhos dados e recebidos. Obrigada por sempre me dar total atenção quando tinha algum problema pra desabafar, ou simplesmente quando só queria te encher o saco, espero ter sido tão companheira pra você quanto você foi pra mim, te amo muito!

E por último, mas não menos importante, à **Nathália Cristina Dos Santos Maciel**, o pequeno Nathálio, que só faz trapalhadas, que vive de teorias das conspirações, mas que me arranca sorrisos todos os dias, a toda hora. Obrigada por sempre estar do meu lado, me dando uma força sempre que pode, por nossos momentos de reflexão na sacada, e de desabafos também. Obrigada por sempre cuidar de mim, pela parceria e cumplicidade, por me virar a cabeça, me tirar do sério, mas sempre conseguir contornar a situação e me fazer rir mais ainda, obrigada por ser minha alegria diária, por ter me agüentado nesses dias de loucura fazendo o tcc, ainda bem que você estava por perto pra me acalmar e dizer que tudo ia dar certo, como você sempre fez! Obrigada por tudo, não tenho palavras te agradecer, te amo muito!

Muito obrigada meus amigos, vocês foram meu suporte emocional nesses longos anos de graduação, que agora me despeço, já com saudades. Amo vocês!

Aos meus Pais **Marcelo Tonini e Andréa Cristina Rawen**, que tanto se privaram de luxos, para que eu pudesse realizar um sonho, obrigada por todas a

dedicação, carinho, amor, e por todas as oportunidades que me foram dadas e pelo apoio em tudo que fiz, sem vocês eu nada seria. Espero um dia poder retribuir pelo menos metade de tudo o que vocês fizeram e ainda fazem por mim! Essa conquista não é só minha, é nossa! Obrigada, amo muito vocês.

Aos meus avós **Victor Waldemar Rawen e Regina Aparecida do Amaral Rawen**, por terem sido simplesmente os melhores avós que alguém poderia ter, obrigada por todo o cuidado, toda a preocupação, todo o amor que me foi dado (de todas as formas possíveis), por cada oração feita em meu nome para que eu conseguisse tudo que consegui até hoje. Obrigado por serem exemplo de seres humanos incríveis, não me canso de aprender com vocês, minha admiração por vocês só aumenta.

À Beth Cristina, minha filha de quatro patas, que sempre me acompanhou nas tardes e noites de estudos, e que tanto me alegra com sua existência.

Obrigado!

“Pensamento positivo, tudo vai dar certo. Você já conseguiu.”

Regina Aparecida do Amaral Rawen

TONINI, K.R. **Avaliação da eficácia da fibrina rica em plaquetas (FRP) em defeito crítico de calota de ratos induzidos à hipercolesterolemia.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da eficácia da fibrina rica em plaquetas (PRF) em defeitos ósseos em ratos induzidos à hipercolesterolemia. Foram utilizados quatro grupos experimentais, grupo coágulo controle (GC), grupo PRF (GPRF), grupo coágulo induzido à hipercolesterolemia (GCH) e grupo PRF induzido à hipercolesterolemia (GPRFH), em um total de 24 animais. A hipercolesterolemia foi induzida por meio de dieta especial. Para confecção do PRF nos grupos experimentais, foi coletado em um tubo seco de 4ml, 1,5ml de sangue, e imediatamente posicionados em uma centrífuga, permanecendo durante 10 minutos à 3000 rotações por minuto (RPM). O defeito crítico foi realizado nas calotas dos animais com uma trefina de 6mm de diâmetro. Após 28 dias pós-operatórios foi realizada a eutanásia, para a análise histológica e microtomográfica, evidenciando um aumento de formação óssea em todos os grupos da pesquisa. O PRF sobre o efeito da hipercolesterolemia tende a uma maior formação óssea.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia. Fibrina rica em plaquetas. Regeneração óssea.

TONINI, K.R. Evaluation of the efficacy of platelet rich fibrin (PRF) in surgical critical-size calvarial defect in rats with diet-induced hypercholesterolemia.

2018. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the efficacy of platelet rich fibrin (PRF) in bone defects in rats induced hypercholesterolemia. Four experimental groups were used: a control group (CG), group PRF (GPRF), hypercholesterolemia induced clot (GCH) group and hypercholesterolemia induced PRF group, in a total of 24 animals. Hypercholesterolemia was induced by means of a special diet. To prepare the PRF in the experimental groups, it was collected in a 4ml dry tube, 1.5ml of blood, and immediately placed in a centrifuge, remaining for 10 minutes at 3000 RPM. The critical defect was performed in the calotas of the animals with a trephine of 6mm in diameter. After 28 postoperative days, euthanasia was performed for histological and microtomographic analysis, evidencing an increase in bone formation in all groups of the study. PRF on the effect of hypercholesterolemia tends to increase bone formation.

Keywords: Hypercholesterolemia. Platelet-rich fibrin. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Punção cardíaca de 1,5ml de sangue _____	17
Figura 2 - Centrifugação por 10 minutos em 3000 rpm _____	17
Figura 3 - Obtenção da fibrina rica em plaquetas após centrifugação _____	18
Figura 4 - Tricotomia em região de calota craniana _____	19
Figura 5 - Antissepsia em região de calota craniana _____	19
Figura 6 – Incisão realizada _____	19
Figura 7 - Confeção defeito ósseo de 6mm de diâmetro _____	20
Figura 8 - Defeito ósseo _____	20
Figura 9 - Colocação da fibrina rica em plaquetas no defeito ósseo _____	21
Figura 10 - Aumento de massa corporal em relação à pesagem pré operatória e pré eutanásia _____	24
Figura 11 - Porcentagem de matriz óssea formada nos grupos GC, GCH, GPRF e GPRFH _____	25
Figura 12 - Porcentagem de tecido conjuntivo formada nos grupos GC, GCH, GPRF e GPRFH _____	25
Figura 13 - Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GC, aos 28 dias pós-operatórios _____	26
Figura 14 - Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GPRF, aos 28 dias pós-operatórios _____	26
Figura 15 - Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GCH, aos 28 dias pós-operatórios _____	27
Figura 16 - Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GPRH, aos 28 dias pós-operatórios _____	27
Figura 17 - Ilustração de reconstrução em 3 dimensões das microtomografias computadorizadas dos grupos GC,GCH,GPRF e GPRFH _____	28
Figura 18 - Gráfico da área da quantificação de volume ósseo (BV) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós operatórios _____	28
Figura 19 - Gráfico do volume ósseo formado por volume total do defeito (BV/TV) nos defeitos de calotas cranianas de ratos nos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância de 5% entre; GC e GPRFH ($p=0,0024$); GPRFH e GCPRF ($p=0,0038$); GPRFH e GCH ($p<0,0001$) _____	29
Figura 20 - Gráfico da área da espessura das trabéculas ósseas formadas(Tb.Th) _____	

nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância entre os grupos GCH e GPRF ($p=0,0224$)_____ 29

Figura 21 - Gráfico do representando os valores do espaçamento entre as trabéculas ósseas por milímetro (Tb.Sp) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores mensurados entre os grupos_____30

Figura 22 - Gráfico do número de trabéculas ósseas por milímetro (Tb.N) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores mensurados entre os grupos_30

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP = Proteína morfogenética óssea

BMP-2= Proteína morfogenética óssea-2

BV/TV = Percentual de volume ósseo

EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético

FGFB= Fator de crescimento de fibroblasto

g = Grama

GC = Grupo coágulo controle

GCH = Grupo coágulo induzido à hipercolesterolemia

GPRF= Grupo com aplicação de fibrina rica em plaquetas

GPRFH = Grupo aplicação de PRF induzido à hipercolesterolemia

HDL = Lipoproteínas de alta densidade

HE = Hematoxilina e Eosina

Kg = Quilograma

Kv - Quilovolt

LDL = Lipoproteína de baixa densidade

mg = Miligramas

mg/dl = Miligramas por decilitro

ml = Mililitro

mm = Milímetros

mm³ = Milímetro cúbico

mRNA= RNA mensageiro

PRF= Fibrina rica em plaquetas

PRP= Plasma rico em plaquetas

RUNX-2 = Fator de transcrição

Tb.N = Número de trabéculas

Tb.Sp = Separação entre as trabéculas

Tb.Th = Espessura trabecular óssea

VEGEF= Fator de crescimento endotelial vascular

°C = Graus Celsius

% = Porcento

µm = Micrômetro

µl= Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.01 Ética e desenho do estudo	16
2.02 Preparo da dieta e indução à hipercolesterolemia	16
2.03 Preparo da Fibrina Rica em Plaquetas	16
2.04 Procedimentos cirúrgicos	18
2.05 Análise bioquímica	21
2.06 Processamentos em parafina	21
2.07 Análises Histológicas	22
2.08 Análises Histométrica	22
2.09 Análises Microtomográfica	22
2.10 Análises Estatística	23
3 RESULTADOS	24
3.01 Análise Bioquímica e massa corpora	24
3.02 Análise Histométrica	25
3.03 Análise Histológica	26
3.04 Análise Microtomográfica	27
4 DISCUSSÃO	31
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXO	40

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a hipercolesterolemia é uma desordem metabólica recorrente, acometendo aproximadamente 39% da população mundial e 44,2% da população brasileira¹. Sendo uma das principais causas de problemas vasculares, tais como doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral e hipertensão. Esta condição também está associada a alterações de função das plaquetas, podendo ocasionar hiperagregabilidade^{2,3}. Sua etiologia está diretamente ligada à obesidade e à ingestão de uma dieta não balanceada rica em lipídeos^{4,5}.

A literatura é controversa sobre a associação da hipercolesterolemia com o aumento da formação óssea⁶. Existem pesquisas na literatura em que se associa o aumento sérico do colesterol com o ganho de densidade óssea, como em uma pesquisa no centro de tratamento e prevenção de osteoporose, que avaliou 982 indivíduos, onde os resultados mostraram que quanto maior o nível de LDL melhor a densidade óssea⁷. Porém também há estudos mostrando a influência negativa do colesterol sobre o tecido ósseo pela alteração do turnover ósseo^{8,9}.

A questão da estimulação de regeneração óssea com ajuda do PRP e PRF ainda é muito complexa, pois mesmo analisando a literatura ainda não há uma resposta concreta. Entretanto, a utilização dos mesmos e seus resultados na área de cirurgia bucomaxilofacial aparecem como uma alternativa de sucesso^{10,11}. Quando compara-se resultados de reparo tecidual de PRF e PRP, percebe-se que o reparo tecidual e a neoformação óssea apresentada pelo PRF são mais significativos¹².

O PRF é um concentrado imunológico de plaquetas, que favorece a cicatrização. A matriz de fibrina possui propriedade angiogênica, ocasionando uma neovascularização intensa, o que leva a uma cicatrização mais acelerada, que é explicada pela estrutura do gel de fibrina, e pela ação simultânea de citocinas. Modelos “in vitro” mostraram que a estrutura e propriedade mecânica do coágulo também são importantes para um resultado de cicatrização positivo. A rigidez da matriz influencia consideravelmente na formação de células endoteliais em resposta à estimulação do fator de crescimento de fibroblasto (FGFB) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGEF)¹³. A quantidade de citocinas e fatores de crescimento presentes nos primeiros momentos da reação inflamatória influenciam no reparo do tecido afetado em indivíduos saudáveis. Como o PRF forma uma rede

de fibrina complexa que libera citocinas e tem maior estimulação de fatores de crescimento que o PRP, foi demonstrado melhores resultados em relação ao uso do PRP^{14,15,16}.

Desta forma, poder avaliar o processo de reparo em indivíduos com hipercolesterolemia associada ao uso do PRF, parece oportuno, sendo este o objetivo deste estudo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.01 Ética e desenho do estudo

Após a aprovação do Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA nº 00527-2016) (Anexo A), foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), que foram divididos em quatro grupos : grupo coágulo controle (GC), grupo com fibrina rica em plaquetas (GPRF), grupo coágulo induzido à hipercolesterolemia (GCH) e grupo com fibrina rica em plaquetas induzido à hipercolesterolemia (GPRFH). Os grupos induzidos à hipercolesterolemia tiveram como alimentação uma dieta hipercalórica e água durante 30 dias¹⁷, e os ratos que não foram induzidos à hipercolesterolemia foram alimentados com ração sólida padrão e água.

2.02 Preparo da dieta e indução à hipercolesterolemia

Foi necessário moer 15 gramas de ração padrão normocalórica, 10 gramas de amendoim, 10 gramas de chocolate ao leite e 5 gramas de bolacha de amido de milho, para a obtenção da dieta hipercalórica, sendo mantida por 30 dias¹⁷.

2.03 Preparo da Fibrina Rica em Plaquetas

Antes da realização da cirurgia para obtenção dos defeitos críticos nas calotas, é realizada a punção cardíaca dos ratos, coletando-se 1,5ml de sangue em tubo seco de 4ml.

Figura 1- Punção cardíaca de 1,5ml de sangue.



Fonte: Elaborada pelo autor

O tubo contendo sangue é colocado durante 10 minutos na centrífuga a 3000 rotações por minuto (RPM) (400g), a 22°C (Hermle Z323K, HermleLabortechnikGmbH., Wehingen, Baden-Württemberg, Alemanha)¹⁸.

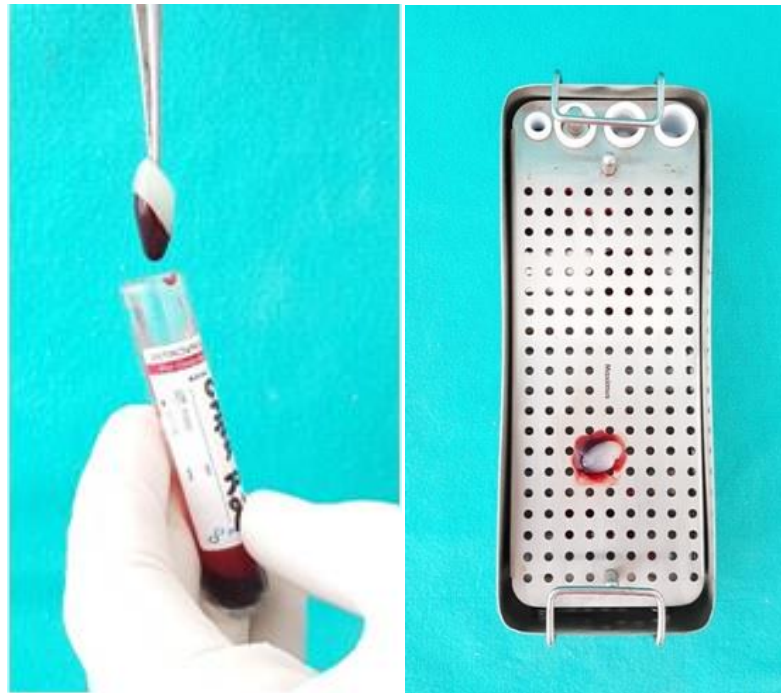
Figura 2 - Centrifugação por 10 minutos em 3000 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor

O coágulo de fibrina (PRF) foi formado entre os corpúsculos vermelhos e o plasma acelular (PPP). Com auxílio de uma pinça e movimentos delicados, o PRF foi removido do tubo e utilizando uma lâmina de bisturi número 15 os corpúsculos vermelhos foram removidos do PRF. Após a obtenção do PRF, o mesmo foi posicionado sobre os defeitos críticos nas calotas.

Figura 3 – Obtenção da fibrina rica em plaquetas após centrifugação.



Fonte: Elaborada pelo autor

2.04 Procedimento cirúrgico

Para a realização da cirurgia foi necessário que os animais estivessem em jejum por 12 horas. Os mesmos foram anestesiados com cloridrato de xilazina (0,03 ml/100 g de peso corporal [pc] / intraperitoneal [ip]; Dopaser® Laboratórios Calier AS, Espanha) e ketamina (7 µl / kg pc / ip; Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brasil) via intramuscular.

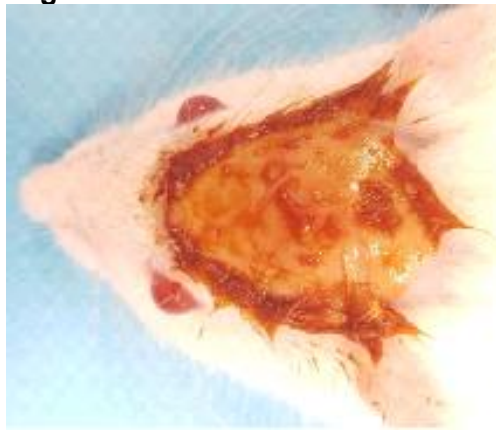
Após a anestesia foi realizada a tricotomia e antissepsia na região da calota craniana.

Figura 4 - Tricotomia em região de calota craniana.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 - Antissepsia em região de calota craniana.



Fonte: Elaborada pelo autor

Feita a tricotomia e antissepsia, foi realizada a incisão e deslocamento do retalho na calota dos animais.

Figura 6 – Incisão realizada.



Fonte: Elaborada pelo autor

Para obtenção do defeito crítico foi utilizada uma broca trefina de 6mm de diâmetro externo (3i ImplantInnovations, Inc., EUA).

Figura 7 - Confecção defeito ósseo de 6mm de diâmetro.



Fonte: Elaborada pelo autor

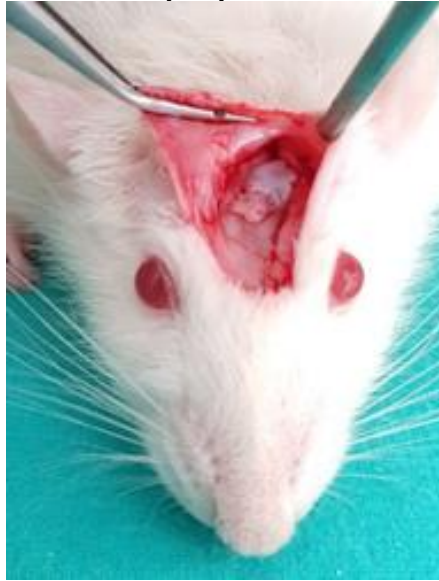
Figura 8 – Defeito ósseo.



Fonte: Elaborada pelo autor

No grupo com fibrina rica em plaquetas (GPRF) e no grupo com fibrina rica em plaquetas induzidos à hipercolesterolemia (GPRFH), após realizado o defeito crítico, o PRF foi posicionado sobre o defeito e os tecidos moles foram reposicionados e suturados.

Figura 9 – Aplicação da fibrina rica em plaquetas no defeito ósseo.



Fonte: Elaborada pelo autor

Já nos grupos coágulo (GC) e grupo coágulo induzidos à hipercolesterolemia (GCH), após a realização do defeito crítico, os tecidos moles foram posicionados e suturados.

Após 28 dias estes animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica.

2.05 Análise bioquímica

O sangue dos animais foi coletado em tubos secos durante a eutanásia. O soro necessita ser separado do sangue, para que a análise bioquímica seja possível, sendo assim, os tubos foram submetidos a uma centrifugação de 10 minutos a 3500 rpm, para que o soro fosse separado. Os parâmetros bioquímicos foram analisados pelo analisador automatizado ABBOTT, modelo ARCHITECT 8000.

2.06 Processamento em parafina

Após a eutanásia as calotas cranianas foram coletadas para que fosse possível analisar os defeitos ósseos e a formação óssea. Estas peças foram fixadas em formol 4% durante três dias e após este período foram submersas em solução

de EDTA a 18% durante seis semanas, para que fossem descalcificadas.

Para que as peças pudessem ser incluídas em parafina, fez-se a desidratação das mesmas, seguindo uma sequência de alcoóis e depois diafanização com xilol (álcool 90% durante uma hora, álcool 95% durante uma hora, três sequências de álcool 100% durante uma hora cada, álcool mais xilol durante 30 minuto, xilol 1 durante 45 minutos e por fim xilol 2 durante 45 minutos). Após a desidratação e diafanização, as peças foram incluídas em parafina.

Já incluídos em parafina, os blocos foram cortados pelo micrótomo em cortes de 5 µm de espessura para a confecção de lâminas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

2.07 Análise Histológica

As lâminas coradas foram analisadas no microscópio óptico (Leica® DMLB, Suíça), com uma câmera de captação de imagem acoplada (Leica® DC 300F Microsystems Ltda., Suíça) e conectada a um microcomputador Pentium III com software analisador de imagens (ImageLab 2000, Software de Processamento e Análise de Imagens, Canadá), para que as áreas de interesse fossem registradas. A análise se estendeu entre o espaços das duas bordas do defeito ósseo.

2.08 Análise Histométrica

Para análise histométrica foi utilizado software Image J, aonde foi possível fazer a contagem de células de tecido ósseo, tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório presente nas lâminas.

2.09 Análise Microtomográfica

Para a análise microtomográfica as maxilas necessitaram ser lavadas por 48 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%. O microtomógrafo utilizado foi SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), presente na faculdade FOA/UNESP, que escaneou cortes de 9 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Alumínio de 0,15 mm. As imagens foram reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão

1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área de interesse para avaliação tridimensional (ROI circular de 6x6mm) e avaliação dos 20 slices, começando superiormente ao defeito e direcionando-se inferiormente. O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 31-153 tons de cinza, que possibilitará obter o volume de osso formado.

2.10 Análise Estatística

Para a análise estatística o software Sigma GraphPad Prism 7.01 (Windows) foi utilizado. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. A análise de variância One-Way (ANOVA One-Way) foi utilizada para análise dos dados paramétricos dos valores de micro-CT de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N), e então realizado o pós-teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

Para a análise dos dados histométricos foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. . A análise de variância One-Way (ANOVA One-Way) foi utilizada para análise dos dados paramétricos para os valores de tecido conjuntivo, e a análise de variância Kruskal-Wallis foi utilizado para análise dos dados paramétricos para os valores de matriz óssea.

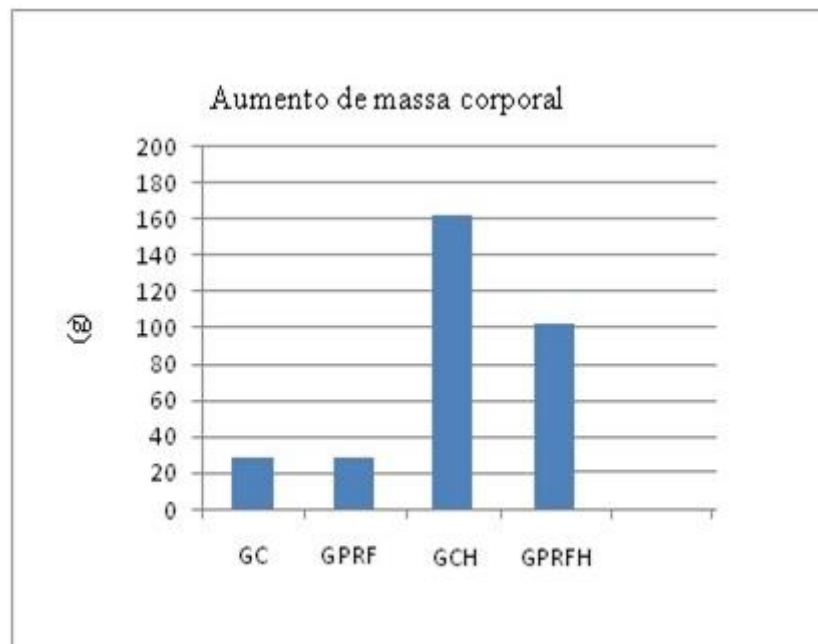
3 RESULTADOS

3.01 Análise Bioquímica e massa corporal

Os resultados obtidos na análise bioquímica dos animais induzidos à hipercolesterolemia para colesterolemíase foram uma média de 96mg/dl, e para triglicerídeos uma média de 122 mg/dl. Nos grupos em que não houve a indução, os resultados para colesterolemíase foram uma média de 60mg/dl, e para triglicerídeos uma média de 53mg/dl. Também foi feita a análise da glicemia, observando-se que nos ratos induzidos à hipercolesterolemia a média foi de 130mg/dl e para os ratos não induzidos a média foi de 95mg/dl. Com estes dados é possível constatar que a hipercolesterolemia foi induzida nos animais que foram submetidos à dieta hipercalórica e que a glicose estava na faixa de normalidade em todos os grupos¹⁹.

Os animais foram pesados antes das cirurgias para obtenção dos defeitos ósseos e imediatamente antes da eutanásia. Ao se analisar a diferença entre os pesos, constatou-se a diferença estatística do aumento das massas mensuradas nos animais induzidos à hipercolesterolemia. Já nos grupos restantes não houve diferença estatística significativa.

Figura 10 – Aumento de massa corporal em relação à pesagem pré operatória e pré eutanásia.



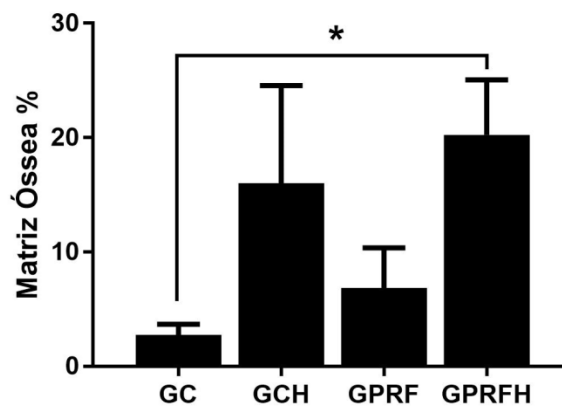
Fonte: Elaborada pelo autor

3.02 Análise Histométrica

Para análise histométrica foram contadas células de tecido conjuntivo, tecido ósseo e infiltrado inflamatório presentes nas áreas de coto e defeito ósseo.

Os resultados observados para presença de tecido ósseo nos grupos foi uma média de 2,73% para o grupo GC, 16,16% para o grupo GCH, 6,84% para o grupo GPRF, e 20,23% para o grupo GPRFH, apresentando diferença estatística significativa entre os grupos GC e GPRFH.

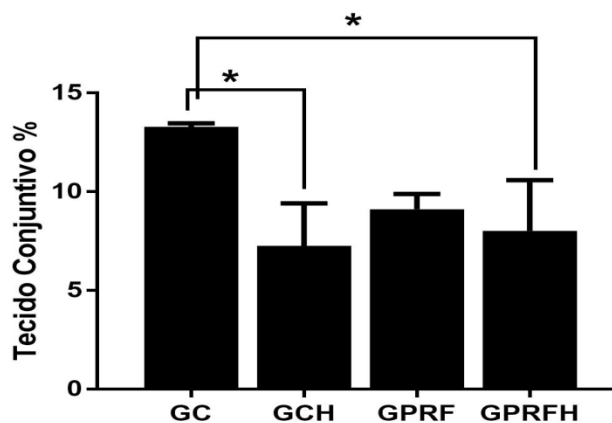
Figura 11 – Porcentagem de matriz óssea formada nos grupos GC, GCH, GPRF e GPRFH.



Fonte: Elaborada pelo autor

Já para a presença de tecido conjuntivo foi observada uma média de 13,27% para o grupo GC, 7,25% para o grupo GCH, 9,11% para o grupo GPRF, e 9,43% para o grupo GPRFH, apresentando diferença estatística significativa GC e GCH, e GC e GPRFH.

Figura 12 – Porcentagem de tecido conjuntivo formada nos grupos GC, GCH, GPRF e GPRFH.



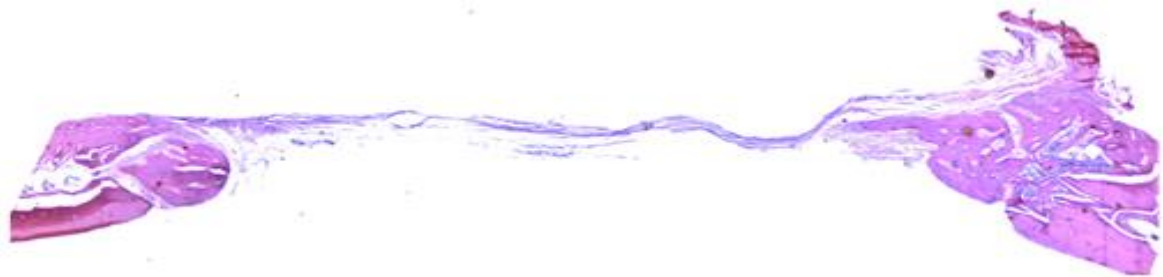
Fonte: elaborada pelo autor

Para presença de infiltrado inflamatório foi observada uma média de 0,60% para o grupo GC, 0,08% para o grupo GCH, 0% para o grupo GPRF e 0,35% para o grupo GPRFH, não mostrando dados estatísticos significantes.

3.03 Análise Histológica

No grupo coágulo (GC) Observou-se formação de tecido ósseo próximo aos cotos do defeito, porém com edemaciado tecido conjuntivo ao redor.

Figura 13 – Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GC, aos 28 dias pós-operatórios.



Fonte: Elaborada pelo autor

No grupo GPRF observou-se uma maior formação de tecido ósseo nas bordas dos defeitos, com presença de tecido ósseo ao centro do defeito, porém ao centro do defeito também houve formação de tecido conjuntivo. Não foi observado infiltrado inflamatório significativo.

Figura 14 – Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GPRF, aos 28 dias pós-operatórios.



Fonte: Elaborado pelo autor

No grupo GCH observou-se formação contínua de tecido ósseo maduro de média espessura bastante celularizado com presença de vasos sanguíneos, envolvendo praticamente todo o defeito. Não foi observado infiltrado inflamatório significativo.

Figura 15 – Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GCH, aos 28 dias pós-operatórios.



Fonte: Elaborada pelo autor

No grupo GPRFH observou-se formação óssea de média espessura, porém esta espessura diminui em direção ao centro do defeito. As bordas demonstram áreas de reabsorção e áreas preenchidas com tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório.

Figura 16 – Imagem histológica do defeito da calota craniana de ratos dos grupos GPRH, aos 28 dias pós-operatórios.

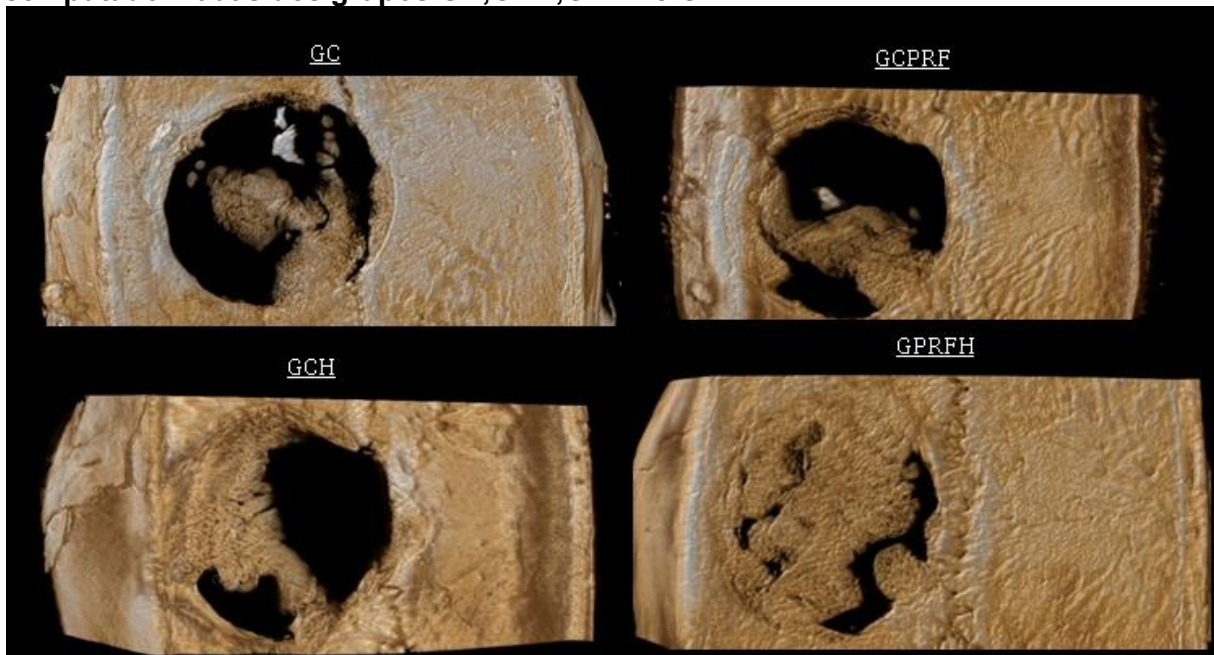


Fonte: Elaborada pelo autor

3.04 Análise Microtomográfica

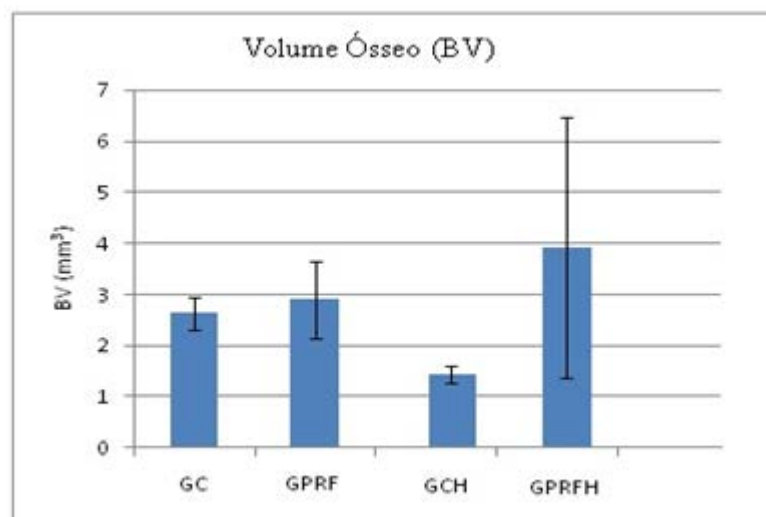
O grupo GC obteve uma média de volume ósseo de $2,64\text{mm}^3$ apresentando diferença numérica superior com o grupo GCPRFH, que apresentou média de $3,909\text{mm}^3$ e diferença numérica menor para inferior com o grupo GCH, que obteve média $1,109\text{mm}^3$. Entretanto, esses resultados não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Figura 17 - Ilustração de reconstrução em 3 dimensões das microtomografias computadorizadas dos grupos GC,GCH,GPRF e GPRFH.



Fonte: Elaborada pelo autor

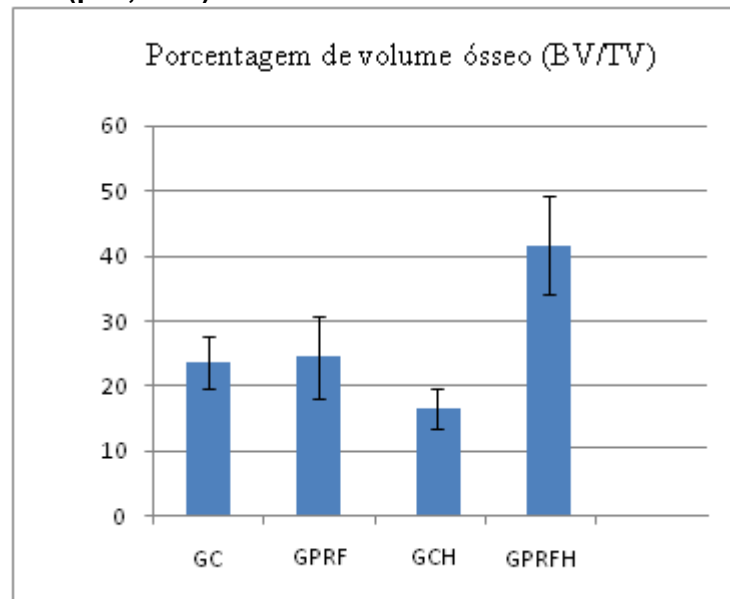
Figura 18 - Gráfico da área da quantificação de volume ósseo (BV) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós operatórios.



Fonte: Elaborada pelo autor

Quanto à avaliação da porcentagem de volume ósseo (BV/TV), houve diferença estatística significativa do grupo GPRFH (41,58%) comparado com os outros grupos.

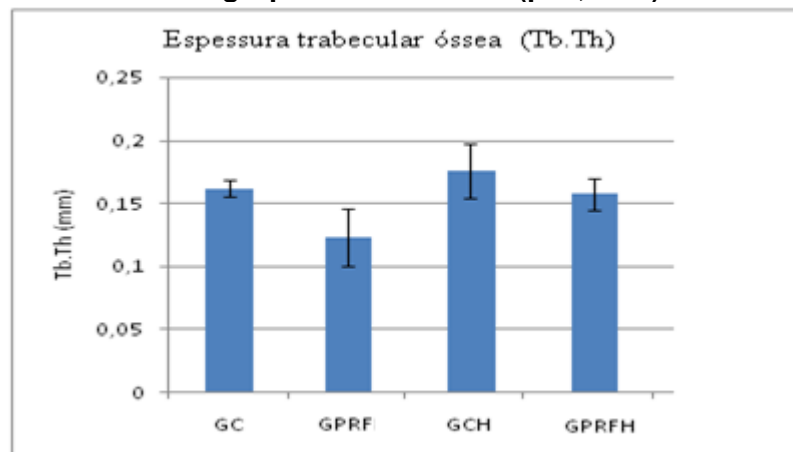
Figura 19 - Gráfico do volume ósseo formado por volume total do defeito (BV/TV) nos defeitos de calotas cranianas de ratos nos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância de 5% entre; GC e GPRFH ($p=0,0024$); GPRFH e GPRF ($p=0,0038$); GPRFH e GCH ($p<0,0001$).



Fonte: Elaborada pelo autor

Na análise de espessura trabecular óssea (Tb.Th), observou-se diferença significativa nos grupos GCH ($0,176\text{mm}^3$) comparados ao grupo GPRF ($0,1232\text{mm}^3$).

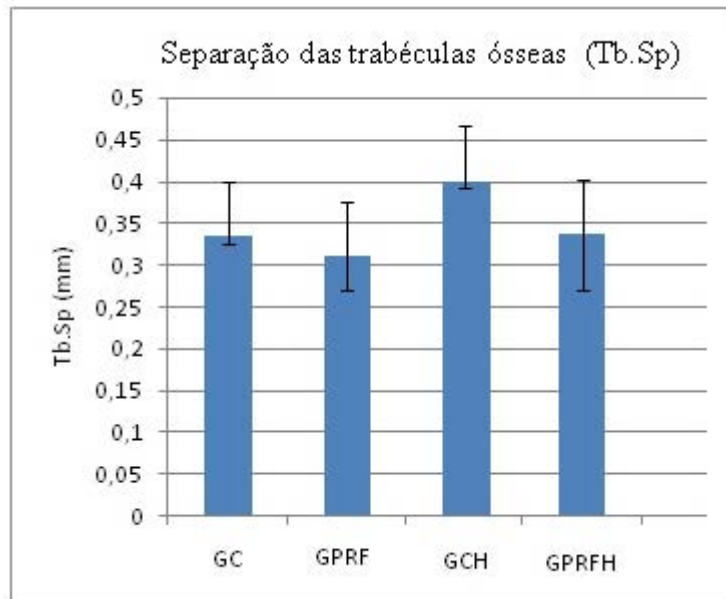
Figura 20 - Gráfico da área da espessura das trabéculas ósseas formadas (Tb.Th) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância entre os grupos GCH e GPRF ($p=0,0224$).



Fonte: Elaborada pelo autor

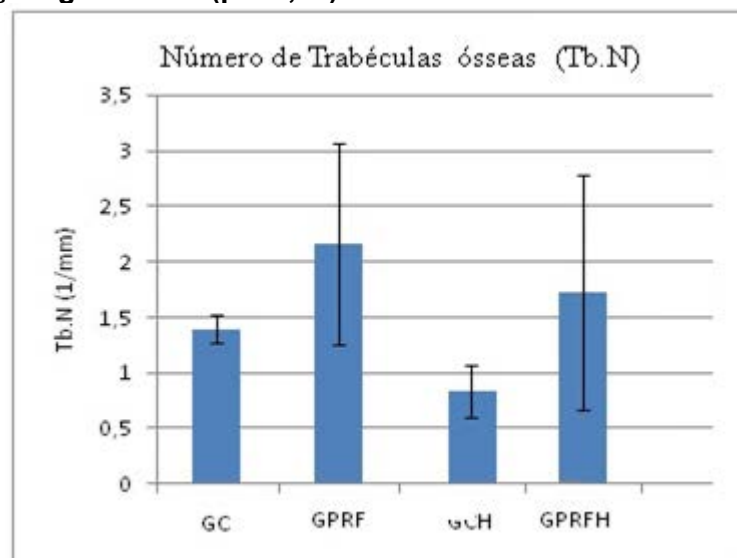
No entanto, na análise de número de trabéculas ósseas (Tb.N) e o espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp), não houve diferença estatística significativa entre os grupos .

Figura 21 - Gráfico do representando os valores do espaçamento entre as trabéculas ósseas por milímetro (Tb.Sp) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores mensurados entre os grupos.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 22 - Gráfico do número de trabéculas ósseas por milímetro (Tb.N) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores mensurados entre os grupos.



Fonte: Elaborada pelo autor

4 DISCUSSÃO

Atualmente a incidência de utilização de concentrados plaquetários cresceu consideravelmente devido ao seu potencial de reparo tecidual. A eficácia do PRP é contestável, devido à rápida liberação de fatores de crescimento, produzindo um efeito imediato e transitório, insignificante para o reparo tecidual¹³. As aplicações clínicas do PRF mostram uma excelente cicatrização tecidual, devido à neovascularização, obtendo um fechamento acelerado da ferida, havendo remodelação do tecido cicatricial. Devido à neovascularização, há um aprisionamento de células tronco trazidas pelo coágulo da fibrina. As células tronco medulares contribuem para regeneração de células ósseas. A fibrina é uma matriz de suporte para proteína óssea morfogenética (BMP), consequentemente a matriz de fibrina esta relacionada à BMP e tem propriedade ósseo condutiva. Para formação de novos vasos sanguíneos é necessário uma matriz que permita a migração e alteração das células epiteliais, função que a matriz de fibrina desempenha, os fatores de crescimento e citocinas são capturados nas malhas de rede de fibrina, sendo liberados lentamente, tendo um efeito gradual e duradouro, auxiliando no processo de reparo tecidual. Com isso autores relatam vantagens do uso do PRF para o reparo de tecidos, incluindo regeneração óssea²⁰. Porém estudos mostram que os níveis de fatores de crescimento, como TGF- β 1 e PDGF-AB que foram liberados aumentaram e atingiram sua maior quantidade em 14 dias, depois seus níveis foram diminuídos, assim como a proliferação e diferenciação de osteoblastos²¹. Assim como observado em nossos resultados, que apesar de haver uma diferença numérica entre os grupos GC e GPRF, não houve uma diferença estatística, provavelmente devido ao fato dos fatores de crescimento serem diminuídos após 14 dias.

A hipercolesterolemia é uma alteração metabólica em que os níveis de colesterol no sangue apresentam-se aumentados, principalmente os níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade). Esta condição está relacionada ao hábito de uma alimentação hipercalórica rica em gorduras. Infelizmente este hábito esta cada vez mais difundido na sociedade, com o aumento dos níveis séricos do colesterol tem-se como consequência direta no aumento de riscos de doenças cardíacas, diabetes, obesidade e osteoporose^{4,5}.

Estudos mostram uma relação positiva entre doença cardiovascular e risco de osteoporose, devido aos altos níveis séricos de colesterol, principalmente LDL serem correlacionados com baixa densidade mineral óssea^{8,9}. Existem pesquisas na literatura em que se associa o aumento sérico do colesterol com o ganho de densidade óssea, como em uma pesquisa no centro de tratamento e prevenção de osteoporose, que avaliou 982 indivíduos, onde os resultados mostraram que quanto maior o nível de LDL melhor a densidade óssea⁷. Um estudo mostrou que os níveis lipídicos de HDL ou LDL estão relacionados à formação óssea, densidade mineral, e às funções de osteoblastos e osteoclastos. Neste estudo as células mesenquimais indiferenciadas foram tratadas com um inibidor de BMP, bloqueando respostas celulares por ele mediadas, com isso há também o bloqueio da Runx2. Os níveis de proteína mRNA regulados pela suplementação do colesterol, sugerem que o colesterol ativa a BMP, através da produção de BMP2, reforçando a possibilidade do colesterol ativar indiretamente a sinalização de BMP²². Como observado nos resultados histométricos deste estudo, onde houve uma diferença numérica na formação de tecido ósseo entre os grupo GC e GCH, uma diferença estatística na formação de tecido ósseo entre os grupos GPRF e GPRFH, e nos resultados microtomográficos onde observou-se que o grupo GPRH obteve maior formação de volume ósseo.

Estudos investigam a ação do PRF na regeneração óssea quando utilizado puramente ou quando está associado a outros materiais. Estes estudos mostraram que há promoção da mineralização do osso alveolar utilizando apenas o PRF, devido à fibrina ter um potencial de diferenciação osteocondutora, sugerindo que o PRF quando utilizado puramente promove regeneração óssea. Entretanto, quando comparado os resultados do PRF puro com os resultados do PRF associado a outros materiais, houve melhores resultados de mineralização óssea quando o PRF esta associado à outros materiais¹³. Como foi observado em nossos resultados histométricos, onde houve uma diferença numérica entre os grupos GPRF e GPRFH, e nos resultados microtomográficos, onde os animais do grupo GC não mostraram aumento da formação de massa óssea estatisticamente significativa, já o grupo GPRFH sim, provavelmente devido à associação da fibrina que é uma matriz de suporte para proteína óssea morfogenética (BMP), com o colesterol que ativa indiretamente a sinalização de BMP.

5 CONCLUSÃO

Com a metodologia empregada, a fibrina rica em plaquetas mostrou-se eficaz na formação óssea quando associada à condição de hipercolesterolemia.

REFERÊNCIAS

1. OMS. Raised cholesterol (2008), disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_text/en/ .
2. SANTOS, P.; NORONHA, J.F.; GROTO, H . Evaluation of reticulated platelets and platelet activation in patients with dyslipidemia. **International Journal of Laboratory Hematol.**, v.29, p.87-87, 2007.
3. KUMAR, S.; VIKRAM, A.; KIM, Y.; JACOBS, J.S.; IRANI, K. P66Shc mediates increased platelet activation and aggregation in hypercholesterolemia. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 449, n. 4, p.496 -501. Jul. 2014.
4. DURRINGTON, P. Dyslipidaemia. **The Lancet**, v. 362, n. 9385, p. 717-731, 2003.
5. KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635, 2000.
6. HERNÁNDEZ, J.L.; OLMOS, J.M.; RAMOS, C.; MARTÍNEZ, J.; JUAN, J.; VALERO, C.; NAN, D.; GONZÁLEZ-MACÍAS, J. Serum Lipids and Bone Metabolism in Spanish Men: The Camargo Cohort Study. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 1, p. 51-60, 2010.
7. ADAMI, S.; BRAGA, V.; ZAMBONI, M.; GATTI, D.; ROSSINI, M.; BAKRI, J.; BATTAGLIA, E. Relationship between lipids and bone mass in 2 cohorts of healthy women and men. **Calcif Tissue Int.**, v. 74, n. 2, p. 136-142, apr. 2004.
8. MACRI, E.V.; ZAGO, V.; SCHREIER, L.; RODRIGUEZ, P.; ZENI, S.; FRIEDMAN, S. Hypercholesterolemia and bone metabolism, **Bone**, v. 41, n. 6, p. 5, 2007.

9. YOU, L.; SHENG, Z.; TANG, C.; CHEN, L.; PAN, L.; CHEN, J. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 32, n. 12, p. 1498-504, dec. 2011.

10. DAY, H.J.; ANG, A.T.; HOLMES, H. Platelet Release Reaction During Clotting of Native Human Platelet-Rich Plasma. **ExpBiol Med.**,v. 139, p.717-721, 1972.

11. ROSS, R.; GLOMSET, J.; HARKER, K.B. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. **Proc Natl AcadSci**, v. 71, p. 1207–1210, 1974.

12. HE, L.; LIN, Y.; HU, X.; ZHANG, Y.; WU, H. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.Endod.**, v.108, n. 5, p. 707-713, nov. 2009.

13. OLIVEIRA, M.R.; DEC SILVA, A.; FERREIRA, S.; AVELINO, C.C.; GARCIA, I.R.JR.; MARIANO, R.C. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 44, n. 5, p. 649-55, 2015.

14. SCHÄR, M.O.; DIAZ-ROMERO, J.; KOHL, S.; ZUMSTEIN, M.A.; NESIC, D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. **ClinOrthopRelat Res.**, n. 473, v. 5, p. 1635-1643, may. 2015.

15. GIANNINI, S.; CIELO, A.; BONANOME, L.; RASTELLI, C.; DERLA, C.; CORPACI, F. ET AL. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. **EurRevMedPharmacolSci.**, v. 19, n. 6, p. 927-930, 2015.

16. RANGANATHAN, A.T.; CHANDRAN, C.R. Platelet-rich fibrin in the

treatment of periodontal bone defects. **J ContempDentPract.**, v. 15, n. 3, p. 372-375, may. 2014.

17. MUSIAL, D.C.; BECKER, T.C.A.; ISOLANI, A.P.; BRACHT, L.; BIAZON, A.C.B. Hypercholesterolemia and hepatic steatosis in mice fed on low-cost high-fat diet. **ActaScientiarum.Health Sciences**, v. 35, n.1, p. 23, 2013.

18. DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.; MOUHYI, J.; et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, v. 101, n. 3, p. 37-44, mar. 2006.

19. LIMA, A.K.; MELO, M.G.D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos(*Rattus novergicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes . **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9. 2004.

20. CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.L. ET AL. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, v. 101, n. 3, p. 56-60, mar. 2006.

21. ZHANG, N.; ZHANG, Y.; LIN, J.; QIU, X.; CHEN, L.; PAN, X.; LU, Y.; ZHANG, J.; WANG, Y.; LI, D.; WANG, L. Low-density receptor deficiency impaired mice osteoblastogenesis in vitro. **Biosci Trends.**, v. 11, n.6, p.658-666, jan. 2018.

22. HAIFANG, L.; GUO, H.; HAN, L. Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells. **Steroids.**, v.78, n.4, p.426-433, apr. 2013.

23. AL-HAMED, F.S.; TAWFIK, M.A.; ABDELFADEL, E.; AL-SALEH, M.A.Q. Efficacy of Platelet-Rich Fibrin After Mandibular Third Molar Extraction: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 75, n. 6, p. 1124-1135, jun. 2017.

24. HAIFANG, L.; GUO, H.; HAN, L. Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells. **Steroids**, v.78, n.4, p.426-433, apr. 2013.

25. BABIJ, P. ; ZHAO, W. ; SMALL, C. ; KHARODE, Y. ; YAWORSKY, P.J. ; BOUXSEIN, M.L. ; REDDY, P.S.; BODINE, P.VN. ; ROBINSON, J.A. ; BHAT, B.; MARZOLF, J.; A MORAN, R.; BEX, F. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. **Journal of bone and mineral research**, v. 18, n. 6, p. 960-974, 2003.

26. AKHTER, M.P.; WELLS, D.J.; SHORT, S.J.; CULLEN, M.L.; HAYNATZKI, G.R.; BABIJ, P.; ALLEN, K.M.; BEX, F.; RECKER, AND R.R. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162-169, July. 2004.

27. DE PASCALE, M.R.; SOMMESE, L.; CASAMASSIMI, A.; NAPOLI, C. (2015) Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. **Transfus Med Rev.**, v. 29, n. 1, p. 52-61, jan. 2015.

28. SIMONPIERI, A.; DEL CORSO, M.; VERVELLE, A.; JIMBO, R.; INCHINGOLO, F.; SAMMARTINO, G.; ET AL. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, n. 7, p. 1231-1256, jun. 2012.

29. DEL FABBRO, M.; BORTOLIN, M.; TASCHIERI, S. Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.40, n. 9, p. 891-900, sep.

2011.

30. SINGH, A.; KOHLI, M.; GUPTA, N. Platelet rich fibrin: a novel approach for osseous regeneration. **J Maxillofac Oral Surg**, v. 11, n. 4, p. 430-434, dec. 2012.

31. SAMMARTINO , G.; DOHANEHRENFEST, D.M.; CARILE, F.; TIA, M.; BUCCI, P. Prevention of hemorrhagic complications after dental extractions into open heart surgery patients under anticoagulant therapy: the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. **J Oral Implantol.**, v. 37, n. 6, p. 681-690, dec 2011.

32. TATULLO, M.; MARRELLI, M.; CASSETTA, M.; PACIFICI, A.; STEFANELLI, L.V.; SCACCO, S. ET AL. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. **Int J Med Sci**, n. 9, v. 10, p. 872-880, nov. 2012.

33. Kim, T.H.; Kim, S.H.; Sándor, 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. **Arch Oral Biol.**, v. 59, n. 5, p. 550-558, 2014.

34. DOHAN EHRENFEST, D.M.; BIELECKI, T.; JIMBO, R.; BARBÉ, G.; DEL CORSO, M.; INCHINGOLO, F. ET AL. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 13, n. 7, p. 1145-1152, 2012.

35. CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.L. ET AL. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.**, v. 101, n. 3, p. 299-303, 2006.

36. MAJIMA, T.; SHIMATSU, A.; KOMATSU, Y.; SATOH, O.; FUKAO, A.; NINOMIYA, K.; MATSUMURA, T.; NAKAO, K. Increase bone turnover in patients with hypercholesterolemia. **Endocr. Journal**, v. 55, n. 1, p. 143-151, 2008.

37. MANDAL, C.C. High cholesterol deteriorates bone health: New insights into molecular mechanisms. **Frontiers in Endocrinol.**; v. 6, p. 165, oct. 2015.

38. ADAMI, S.; BRAGA, V.; GATTI, D. Association between bone mineral density and serum lipids in men. **JAMA**, v. 286, p. 791-792, 2001.

39. DENNISON, E.M.; SYDDALL, H.E.; AITIE SAYER, A.; MARTIN, H.J.; COOPER, C. ET AL. Lipid profile, obesity and bone mineral density: the Hertfordshire Cohort Study. **QJM**, v. 100, n. 5, p. 297-303, may. 2007.

40. CUI, L.H.; SHIN, M.H.; CHUNG, E.K. ET AL. Association between bone mineral densities and serum lipid profiles of pre- and post-menopausal rural women in South Korea. **Osteoporosis Int.**, v. 16, p. 1975–1981, 2005.

41. LIN, S.; HUANG, J.; FU, Z.; LIANG, Y.; WU, H.; XU, L. ET AL. The effects of atorvastatin on the prevention of osteoporosis and dyslipidemia in the high-fat-fed ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int.**, v. 96, n. 6, p. 541-51, jun. 2015.

ANEXO A – Comitê de ética no uso de animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da eficácia da fibrina rica em plaquetas (FRP) em defeito crítico de calota de ratos induzidos à hipercolesterolemia tratados ou não com atorvastatina**", Processo FOA nº 00527-2016, sob responsabilidade de Osvaldo Magro Filho apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Outubro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 17 de Maio de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 17 de Junho de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of efficacy of Platelet Rich Fibrin (PRF) in critical-size calvarial defect in rats with diet-induced hypercholesterolemia treated or not with atorvastatin**", Protocol FOA nº 00527-2016, under the supervision of Osvaldo Magro Filho presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 17, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 17, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 17, 2018.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br