



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

THAÍS PALMEIRA DE SÁ GENESINI

**Efeito da fibrina rica em plaquetas (FRP) sobre o
processo inflamatório e reparador associada ou
não a um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) na
calvária de ratos**

Araçatuba

2018

THAÍS PALMEIRA DE SÁ GENESINI

**Efeito da fibrina rica em plaquetas (FRP) sobre o
processo inflamatório e reparador associada ou
não a um anti-inflamatório não esteroideal (AINE) na
calvária de ratos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba

2018

Dedico este trabalho primeiramente à minha família que sempre me apoiou e esteve ao meu lado para que eu chegasse até aqui e ao meu professor orientador Léo o qual sempre teve paciência e dedicação e com sua sabedoria e conhecimento junto com os demais colaboradores fizeram esse trabalho se tornar possível.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Wilson Roberto Poi e vice diretor João Eduardo Gomes Filho.

Ao Prof. Dr. Ass. Leonardo Perez Faverani que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Aos membros do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade, Valthierre Nunes, William Phillip e Gustavo Momesso pela atenção e apoio durante todo o processo de definição e orientação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de iniciação científica referente ao processo 2017/04068-0, fundamental para a realização desta pesquisa.

À minha família que sempre me apoiou e esteve ao meu lado sempre, principalmente aos meus pais Helder e Denilce e minha irmã Laís que fizeram meu sonho de se tornar cirurgiã -dentista realidade.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos supera-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

GENESINI, TPS. **Efeito da fibrina rica em plaquetas (FRP) sobre o processo inflamatório e reparador associada ou não a um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) na calvária de ratos.** 2018. 54 f. Trabalho de conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP) no processo inflamatório em reparo tecidual em calvária de ratos e sua consequente reparação tecidual associada ou não a um anti-inflamatório não esteroidal (AINE). Foram utilizados neste estudo 96 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), adultos, com peso corporal entre 400 e 450g. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=6), onde no grupo coágulo (GC) foi realizado o defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) preenchido com coágulo sanguíneo; grupo anti-inflamatório não esteroidal (GC + AINE) com defeito de tamanho crítico preenchido com coágulo sanguíneo e administrado cetoprofeno (10mg/kg/dia); o grupo fibrina rica em plaquetas (FRP) com defeito de tamanho crítico preenchido com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga; e o grupo fibrina rica em plaquetas mais anti-inflamatório não esteroidal (FRP + AINE) com defeito de tamanho crítico preenchido com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga e administrado cetoprofeno pela via intramuscular (10mg/kg/dia) durante 3 dias de pós operatório. Cada grupo foi avaliado nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias através de análises histométricas de área de osso neoformado (AON) e contagem de células inflamatórias pelo programa IMAGE J. Os resultados histométricos evidenciaram maior formação óssea e uma maior modulação do processo inflamatório, desde os períodos iniciais até os mais tardios, para o grupo FRP de forma isolada quando comparada á sua associação com o AINE, evidenciando assim um retardo na reparação tecidual para este último grupo. O grupo AINE isoladamente mostrou não conter o processo inflamatório mesmo nos períodos mais tardios de análise, promovendo, portanto, um atraso no reparo da ferida. Conclui-se que a FRP sem associação com o AINE foi favorável nas análises dos períodos

experimentais, auxiliando na resposta inflamatória e promovendo uma maior neoformação óssea.

Palavras-chave: Células sanguíneas. Inflamação. Plaquetas. Reação hospedeiro-enxerto. Regeneração óssea. Sangue.

GENESINI, TPS. **Effect of platelet rich fibrin (FRP) on the inflammatory and repair process associated or not with a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) in rat calvaria**. 2018. 54 f. Trabalho de conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of Rich Fibrin on Platelets (FRP) in the inflammatory process in tissue repair in calvaria of rats and its consequent tissue repair associated or not with a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). In this study, 96 adult rats (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) were weighed between 400 and 450g. The animals were randomly divided into 4 groups (n = 6), in which the critical size defect (5 mm diameter) filled with blood clot was performed in the clot (GC) group; non-steroidal anti-inflammatory group (GC + NSAID) with critical size defect filled with blood clot and given ketoprofen (10mg / kg / day); the critical-defect platelet-rich fibrin group (FRP) filled with autologous platelet-rich fibrin preparation; and the non-steroidal anti-inflammatory platelet-rich fibrin group (CRP + NSAID) with critical size defect filled with autologous platelet-rich fibrin preparation and administered ketoprofen intramuscularly (10mg / kg / day) for 3 days post operative. Each group was evaluated at periods of 2, 7, 14 and 28 days by means of histological analyzes of neoformed bone area (AON) and count of inflammatory cells by the IMAGE J program. The histometric results showed greater bone formation and a greater modulation of the process inflammatory from the initial to the later periods for the FRP group alone when compared to its association with NSAID, thus evidencing a delay in tissue repair for the latter group. The NSAID group alone did not contain the inflammatory process even in the later periods of analysis, thus promoting a delay in bone repair. It was concluded that the FRP without association with the NSAID was favorable in the analyzes of the experimental periods, aiding in the inflammatory response and promoting a greater bone neoformation.

Keywords: Blood cells. Inflammation. Platelets. Host-graft reaction. Bone regeneration. Blood.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação esquemática dos grupos e tempos experimentais utilizados.....	20
FIGURA 2- Tricotomia da região fronto-parietal e anti-sepsia com PVPI.....	21
FIGURA 3- Acesso cirúrgico em formato de “V” com exposição de osso parietal e cortical interna e DTC de 5mm de diâmetro.....	22
FIGURA 4 – Obtenção da FRP para preenchimento de DTC.....	23
FIGURA 5- Fotomicrografias representativas dos grupos GC 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	26
FIGURA 6- Fotomicrografias representativas dos grupos AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	28
FIGURA 7- Fotomicrografias representativas dos grupos PRF 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	30
FIGURA 8 - Fotomicrografias representativas dos grupos PRF + AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	32
FIGURA 9: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos(GC, AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 2 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).....	34
FIGURA 10: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos(GC, AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 7 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).....	35
FIGURA 11: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos(GC, AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 14 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).....	36

FIGURA 12: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos(GC, AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 28 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).....	37
FIGURA 13- Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, FRP, AINE + FRP aos 2 dias.....	38
FIGURA 14: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC,FRP , AINE + FRP aos 7 dias.....	39
FIGURA 15: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, FRP, AINE + FRP aos 14 dias.....	40
FIGURA 16: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, FRP, AINE + FRP aos 28 dias.....	41
FIGURA 17- Porcentagem de células inflamatórias presente nos quatro grupos em função dos dias de análise (2,7,14 e 28 dias).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

FRP	Fibrina rica em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
GC	Grupo coágulo
AON	Área de osso neoformado
PVPI	Polivinilpirrolidona
DTC	Defeito de tamanho crítico
PI	Processo inflamatório
COX	Cicloxygenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	13
2 OBJETIVO.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Preparo da FRP.....	22
3.2 Processamento Laboratorial.....	24
3.3 Histometria.....	24
3.3.2 Análise Estatística.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Descrição da análise histológica.....	26
4.1.2. Análise estatística da área de osso neoformado (AON).....	38
4.1.3 Análise estatística da contagem de células inflamatórias.....	42
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	54

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Os derivados de plaquetas surgiram como uma ferramenta terapêutica promissora para periodontia, cirurgia bucomaxilofacial, ortopedia e dermatologia devido suas propriedades auxiliarem na reparação tecidual.^(1, 2) Diversos estudos foram desenvolvidos para verificar a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) na prática reconstrutiva odontológica. No entanto, é possível observar divergências e resultados conflitantes, sendo questionável seu efeito devido os diversos protocolos de obtenção.^(1, 3)

Uma segunda geração de concentrados plaquetários, proposta por Choukroun em 2001, realizada através do preparo do sangue autólogo com centrifugação única e sem adição de antiagregante plaquetários, vem sendo utilizado em trabalhos clínicos⁽⁴⁻⁷⁾ e laboratoriais⁽⁸⁻¹¹⁾. A centrifugação é obtida de acordo com o protocolo proposto por Choukron, realizando a coleta sanguínea através do tubo de vidro revestidos de plástico estéril é colocado na centrífuga à 2700 rpm durante 12 minutos^(12, 13). Apesar de menor número, quando comparado com o PRP, os estudos elucidando os efeitos do FRP apresentam mais homogeneidade, com os indicadores convergindo-se à melhora da reparação tecidual e neoformação óssea com o uso do FRP⁽⁴⁾. Por causa de resultados encorajadores de vários estudos clínicos^(9, 10, 14-16) o número de pesquisas que visam elucidar as nuances envolvidas na utilização de plaquetas em pacientes vem crescendo de forma expressiva⁽²⁾. A diferença de resultado do FRP comparado ao PRP pode ser justificada devido ao processamento do primeiro formar uma rede de fibrina complexa com encarceramento de células, plaquetas e componentes sanguíneos que são responsáveis pela liberação de citocinas e fatores de crescimento de maneira mais lenta do que o PRP. A presença destes fatores nos primeiros momentos inflamatórios podem influenciar o processo de reparação do sítio ósseo afetado⁽⁴⁾⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Para que ocorra a reparação tecidual são necessários três estágios do processo de reparação em que o primeiro é constituído inicialmente

pelo estágio inflamatório que deve durar de 3 a 5 dias, em que ocorrerá duas fases, a vascular e a celular. Inicialmente a vascular age causando vasoconstrição minimizando o efeito hemorrágico, em seguida na fase celular, histaminas e prostaglandinas liberadas por leucócitos iniciam a liberação de mediadores quimiotáticos, causando vasodilatação e abrindo pequenos espaços entre as células endoteliais, o que permite o extravasamento de plasma e a migração de leucócitos para o interior do tecido intersticial, causando edema. A migração de leucócitos polimorfonucleares tem como função primordial a eliminação de corpos estranhos e microorganismos invasores. Por apresentar estas características o estágio inflamatório se torna indispensável para reparação tecidual, mas quando ele ocorre de forma exacerbada leva ao atraso da cicatrização elevando a morbidade da ferida⁽²⁰⁻²⁴⁾.

Um evento fundamental observado durante o processo inflamatório é a liberação de ácido araquidônico a partir de membranas celulares danificadas, mediante exposição à enzima fosfolipase A2⁽²⁵⁾. Essa etapa pode ser inibida indiretamente pela ação de um grupo de potentes agentes anti-inflamatórios conhecidos como glicocorticoides. A partir desse ponto, o metabolismo oxidativo do ácido araquidônico pode prosseguir ao longo de duas vias divergentes. Uma dessas vias utiliza a enzima cicloxigenase (COX). A outra via utiliza a enzima lipoxigenase. Virtualmente todas as células do organismo, exceto as hemácias, possuem COX, enquanto a lipoxigenase parece limitar-se às células inflamatórias (neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos)⁽²⁶⁻³⁰⁾.

Atualmente está bem estabelecido que existem duas isoformas de COX. A COX- 1 é considerada uma isoforma constitutiva ou “de manutenção” (*housekeeping*), sendo a principal isoforma encontrada em tecidos normais. Essa isoforma está sempre presente em todos os tecidos, incluindo sistema nervoso central (SNC), mucosa gástrica, plaquetas e rins. Na mucosa gástrica, a COX-1 desempenha papel importante na síntese de PGs envolvidas na formação da barreira mucoprotetora contra a ação do ácido gástrico^(26, 27, 29). Nas plaquetas, a COX-1 é fundamental para a produção de tromboxana e suas subsequentes propriedades agregantes plaquetárias necessárias a uma adequada

homeostasia^(26, 31). A maior parte da COX-2 corresponde a uma isoforma induzível que é suprarregulada (*upregulated*) por citocinas, fatores de crescimento e mitógenos, entre outros produtos, os monócitos, macrófagos, células endoteliais, condrócitos, sinoviócitos e osteoblastos humanos^(31, 32). Essa isoforma está associada às elevadas concentrações de PGs observadas durante a inflamação, dor e febre. Embora inicialmente se esperasse que os produtos da COX-2 participassem somente na inflamação e em outros processos patológicos, atualmente sabe-se que os produtos de oxidação dessa isoforma auxiliam na regulação de alguns processos fisiológicos normais, tais como a manutenção da adequada eliminação de água e sódio (Na^+) através dos rins, a inibição da agregação plaquetária em excesso e a dilatação de certos leitos vasculares⁽³³⁻³⁵⁾.

As PGs e outros metabólitos ativos dos endoperóxidos intermediários (p. ex., PGI₂ e tromboxana A₂ [TXA₂]) exercem uma multiplicidade de efeitos em quase todos os processos biológicos examinados até o momento. Esses processos incluem a contração e o relaxamento da musculatura lisa, a permeabilidade vascular, o transporte renal de eletrólitos e água, a secreção gastrointestinal (GI) e pancreática, diversas funções do SNC e do sistema nervoso autônomo (SNA), liberação de hormônios (p. ex., hormônio do crescimento, esteroides e gonadotropinas), luteólise e parto, lipólise, reabsorção óssea e agregação plaquetária. Não só os processos afetados são diversos e os efeitos complexos, mas também as diferentes PGs e moléculas relacionadas parecem ocasionalmente exercer ações antagônicas. Assim, a PGE₂ e a PGI₂ geralmente causam vasodilatação e inibem a agregação plaquetária, enquanto a TXA₂ provoca vasoconstrição e induz agregação plaquetária⁽³⁶⁾.

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são metabolizados no fígado e excretados nos rins, além disso, os não seletivos para ciclooxigenase 2 (COX-2) possui ação de inibição da proteção gástrica fisiológica. Em pacientes hígidos, sua utilização no curto período pós-cirúrgico não representa risco no desenvolvimento de efeitos colaterais de suas funções normais, porém, em pacientes descompensados dos

sistemas gástrico, renal, hepático e cardiológicos podem representar risco de agravamento de sua condição⁽³⁷⁾.

A resposta inflamatória acarreta consequente morbidade devido aos sinais flogísticos que geram desconforto no período pós-cirúrgico que se resumem em dor, perda funcional e edema ao paciente. As citocinas endógenas presentes na FRP teoricamente poderiam servir de moduladores locais da resposta inflamatória pós- traumática através da liberação de fatores que influenciam na quimiotaxia⁽⁸⁾.

Quando inserido nos alvéolos pós exodontia de terceiros molares inferiores, além da melhora do reparo ósseo e cicatrização gengival, a FRP também proporcionou considerável diminuição da dor, indicando influência deste no controle de mediadores químicos da inflamação.⁽⁵⁾ Dohan et al, afirma que a FRP apresenta o potencial de ação antiinflamatório, mas apenas estudos *in vitro* até então foram conduzidos com o objetivo de avaliar o seu potencial efeito.^(38, 39)

A membrana confeccionada através da FRP tem uma rede semelhante a fibrina que leva a migração e proliferação celular mais eficiente, gerando assim a reparação tecidual mais rápida. Estudos recentes têm descrito a capacidade do aumento na proliferação de osteoblastos em ratos e humanos, causada pelo aumento da expressão osteoprotegerina e fosfatase alcalina^(4, 40). A melhoria de cicatrização de feridas, diminuição da dor e aumento da densidade óssea destaca o uso de FRP como um método válido para a promoção e aceleração da reparação tecidual. Estudos mais abrangentes são necessários para entender os aspectos fisiológicos e histológicos da FRP na cicatrização de tecido mole e duro.^(2, 5, 8).

As citocinas e fatores de crescimento presentes na FRP possuem grande influência na resposta inflamatória. Infelizmente seu impacto tem sido quase completamente negligenciado na literatura.⁽⁴¹⁾ Apesar de encontrarmos o aumento das pesquisas acerca da resposta celular e metabólica da FRP, estes se concentram quase que exclusivamente no potencial de reparo ósseo, epitelial e antimicrobiano ignorando o efeito de modulador da resposta inflamatória de tais citocinas e fatores de crescimento⁽⁸⁾.

Em relação ao modelo experimental, a calvária de ratos foi eleita, por ser um modelo já bastante consolidado na literatura⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾. O estudo do reparo ósseo com defeitos críticos é interessante por proporcionar a análise do comportamento de biomateriais durante o processo cronológico do reparo, bem como as respostas inflamatórias, nos diferentes momentos do reparo ósseo⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾.

2 OBJETIVO

O trabalho objetivou avaliar o efeito da FRP no processo inflamatório e reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos associada ou não a um anti-inflamatório não esteroideal (AINE).

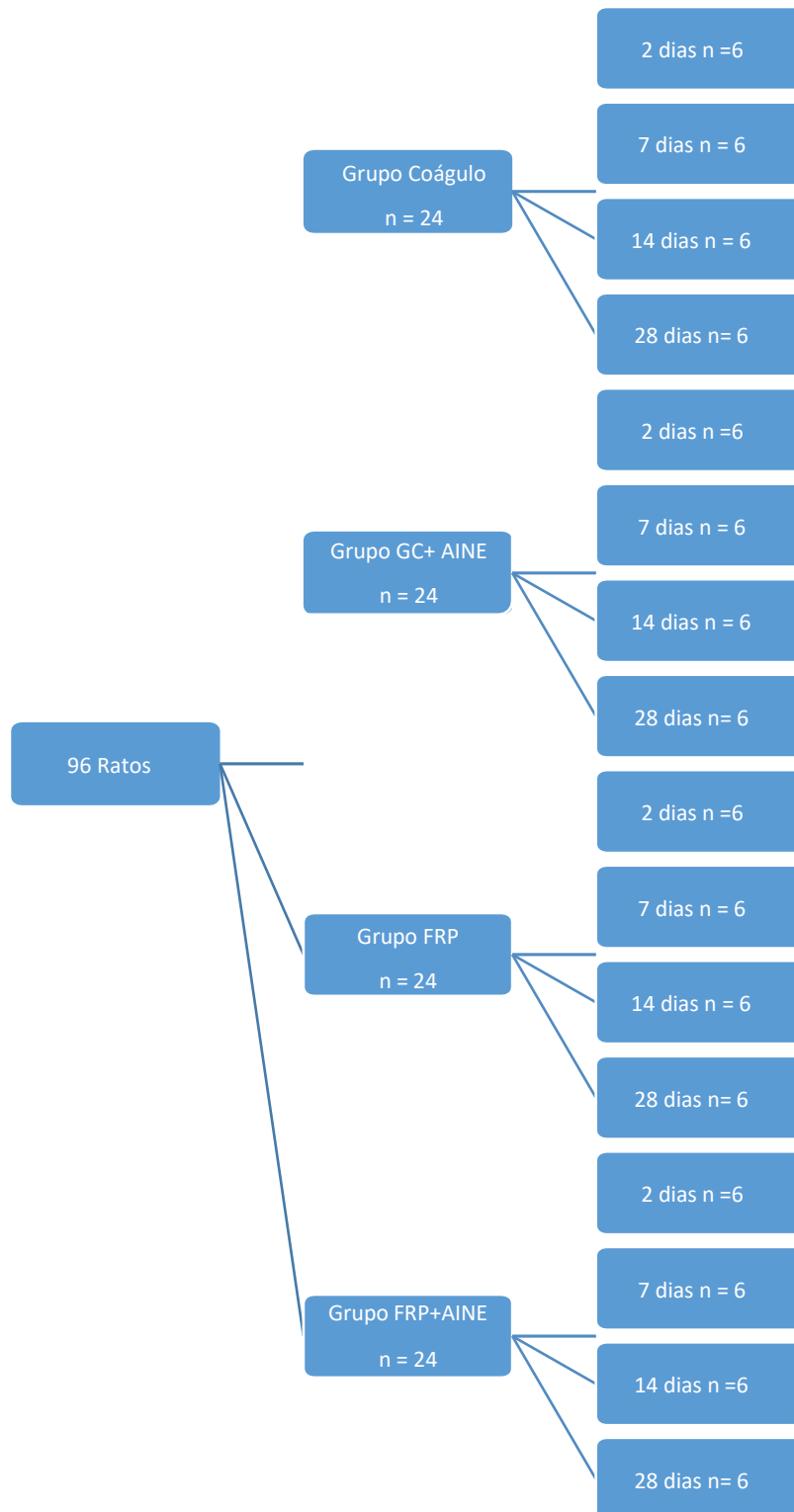
3 MATERIAIS E MÉTODOS

96 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), adultos, com peso corporal entre 400 e 450g, foram selecionados para os experimentos desta pesquisa. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas (com 5 até animais cada), em ambiente climatizado, e alimentados com ração sólida padrão e água “ad Libitum”, durante todo o experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos equitativos que compuseram a amostra do trabalho (Figura 1):

- **Grupo coágulo (GC):** defeito de tamanho crítico preenchido com coágulo sanguíneo;
- **Grupo anti-inflamatório não esteroidal (GC + AINE):** defeitos de tamanho crítico preenchidos com coágulo sanguíneo e administrado cetoprofeno (10mg/kg dia).⁽⁴⁹⁾
- **Grupo fibrina rica em plaquetas (FRP):** defeitos de tamanho crítico preenchidos com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga.
- **Grupo fibrina rica em plaquetas e AINE (FRP + AINE):** defeitos de tamanho crítico preenchidos com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga e administrado cetoprofeno (10mg/kg dia).⁽⁴⁹⁾

Cada grupo foi avaliado nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias pós-operatórios pois, são períodos adequados para observação e análise, desde o momento da instalação do processo inflamatório (2 dias) até o recrutamento celular de osteócitos, osteoblastos e demais células envolvidas (7 e 14 dias) para darem início da neoformação óssea (14 e 28 dias).

Figura 1: Representação esquemática dos grupos e tempos experimentais utilizados.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Após jejum de 12 horas, os animais foram submetidos à sedação, por meio da administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 70 mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser®– Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 7 mg/Kg. Após indução anestésica, realizou-se tricotomia na região fronto-parietal, posicionamento do animal em decúbito ventral, anti-sepsia da área com polivinilpirrolidona (PVPI) tópico e aposição de campos estéreis. Em seguida foi realizado o acesso cirúrgico por incisão em formato de “V”. O retalho total foi rebatido e realizou-se o afastamento com os descoladores para exposição do osso parietal de ambos os lados.

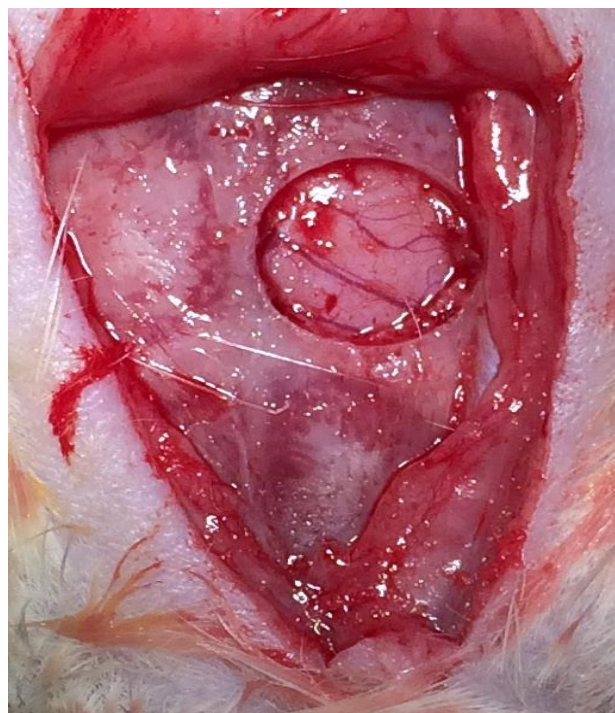
Com uma trefina cirúrgica de diâmetro interno de 4 mm e externo de 5 mm, e com auxílio de um motor de baixa rotação foi realizada a osteotomia na região mediana entre os parietais até a cortical interna. O osso parietal osteotomizado foi removido e a dura-máter mantida intacta, deixando um defeito de tamanho crítico (DTC) na magnitude de 5mm de diâmetro.

Figura 2- Tricotomia da região fronto-parietal e anti-sepsia com PVPI.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 3 – Acesso cirúrgico em formato de “V” com exposição de osso parietal e cortical interna e DTC de 5mm de diâmetro.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O defeito ósseo foi realizado em 96 animais, divididos em 4 grupos, e preenchidos com coágulo sanguíneo ou FRP. Já o grupo dos (AINES) e (FRP + AINE) recebeu no pós-operatório cetoprofeno (10mg/kg dia) por três dias. Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado e a sutura realizada com fio de Nylon 4-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

3.1 Preparo da FRP

Após a sedação dos animais, 1,5 ml de sangue de cada animal foi coletado por meio da punção cardíaca para os grupos FRP e FRP+AINE, utilizando uma seringa descartável de 5 ml, sem a adição de anticoagulante.

O preparo da FRP foi realizado de acordo com uma adaptação do protocolo de Dohan et al⁽⁹⁾. Cada amostra coletada foi imediatamente

centrifugada a 400 G durante 12 minutos, a 22°C (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH., Wehingen, Baden- Württemberg, Alemanha). Um coágulo de fibrina (FRP) foi obtido na porção intermediária do tubo, entre os corpúsculos vermelhos localizados na porção inferior e o plasma acelular (PPP) localizado na porção superior do tubo. Este PPP foi, então, descartado e a FRP pinçada do interior do tubo e separada da porção de corpúsculos vermelhos com o uso de uma lâmina de bisturi número 15.

A FRP foi utilizada imediatamente após a centrifugação ter sido finalizada, para evitar que esta sofra retração. Esta matriz de FRP, foi aplicada no defeito cirúrgico com o auxílio de uma pinça clínica.

Aos 2, 7, 14 ou 28 dias de pós-operatório, 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia por meio de dose excessiva de anestésicos (Tiopental sódico na dose de 150 mg/kg associado à lidocaína 10 mg/ml), pela via intraperitoneal.

Figura 4- Obtenção da FRP para preenchimento de DTC.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

3.2 Processamento laboratorial

Após a eutanásia de todos os animais, o osso parietal foi removido com margem de no mínimo 2 mm de tecido ósseo ao redor do defeito que por fim foi fixado em formol neutro a 10% tamponado. Após 48 horas, as amostras foram lavadas em água corrente por 12 horas e iniciou o processo de descalcificação em EDTA a 10%, por meio de trocas semanais durante 8 semanas. Em seguida, a desidratação com álcoois iniciando a 70% até a concentração de 100%. Prosseguiu-se com a diafanização em xilol em dois momentos de imersão e por fim, a inclusão em parafina, em 3 diferentes trocas, desde a parafina mais impura até a mais livre de sujidades.

As amostras foram codificadas de acordo com os grupos e microtomizadas na espessura de 5 micrometros na direção longitudinal e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histológica/histométrica.

Os cortes foram montados em lâminas histológicas e fixados com lamínula e resina histológica *permount*. Estas lâminas foram fotomicrografadas em microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica. As imagens foram obtidas com a objetiva de 25x, obtendo uma imagem ampliada na porção central do defeito crítico e com objetiva de 4x, obtendo a imagem panorâmica da lâmina.

3.3 Histometria

As imagens foram gravadas em arquivo TIF e analisadas em programa computacional IMAGE J (Programa Analisador de Imagens, Ontário, Canadá). A intensidade do processo inflamatório (PI) foi realizada pela contagem de células através da planimetria de pontos com o auxílio da ferramenta “gride”, pela qual o software nos forneceu a quantidade de células inflamatórias nos diferentes períodos, em função de um total de pontos presente na grade (planimetria). Assim, a quantidade de pontos nas áreas que representou o processo inflamatório em função do total de pontos da grade pré-conformada na imagem,

foi possível estabelecer a porcentagem de células inflamatórias presentes para cada grupo e período experimental.

Para o cálculo histométrico da área de osso neoformado (AON), na região do defeito crítico, inicialmente o programa foi calibrado por meio de régua fotomicrografada nas magnificações utilizadas (25x) na ferramenta “set scale”. Posteriormente, as imagens foram abertas no programa e assim, pela ferramenta “free hands” foi calculada a AON em μm^2 .

3.3.1 Análise Estatística

Os dados quantitativos (AON) e (PI) foram inicialmente submetidos ao teste estatístico de homocedasticidade e normalidade (Shapiro-Wilk). Uma vez observada homogeneidade, a análise de variância ANOVA a 2 fatores foi aplicada e pós-teste Tukey para as interações significativas, considerando nível de significância de 5%.

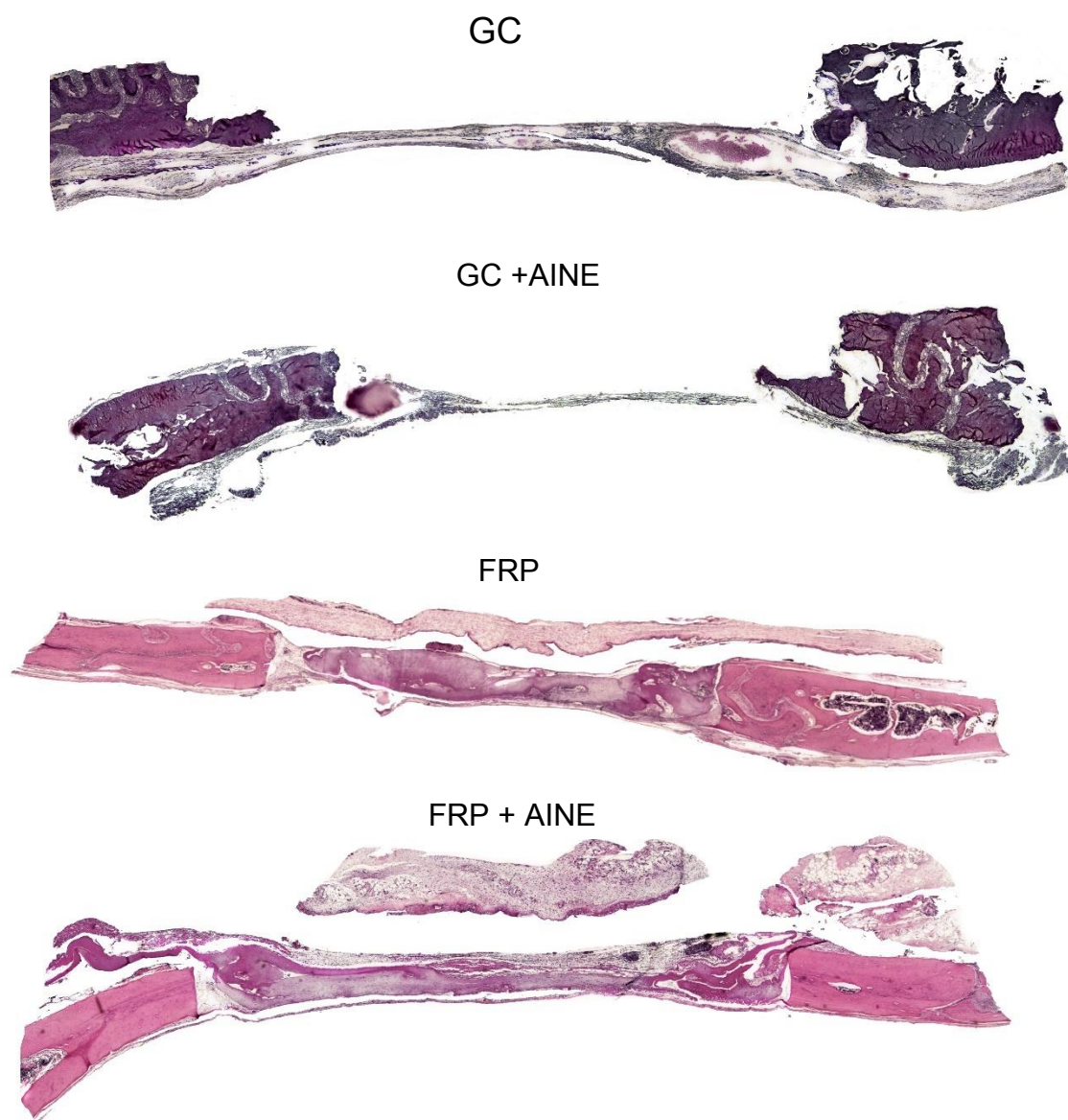
4 RESULTADOS

4.1 Descrição da análise histológica

A seguir, os principais aspectos histológicos serão apresentados em função do grupo experimental (GC, GC+AINE, FRP e PRF+AINE) e os tempos de análise (2,7,14 e 28 dias de pós-operatório) (Figuras 5,6,7,8,9, 10, 11 e 12):

✓ Panorâmicas (Aumento 4x)

Figura 5: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos (GC, GC +AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 2 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

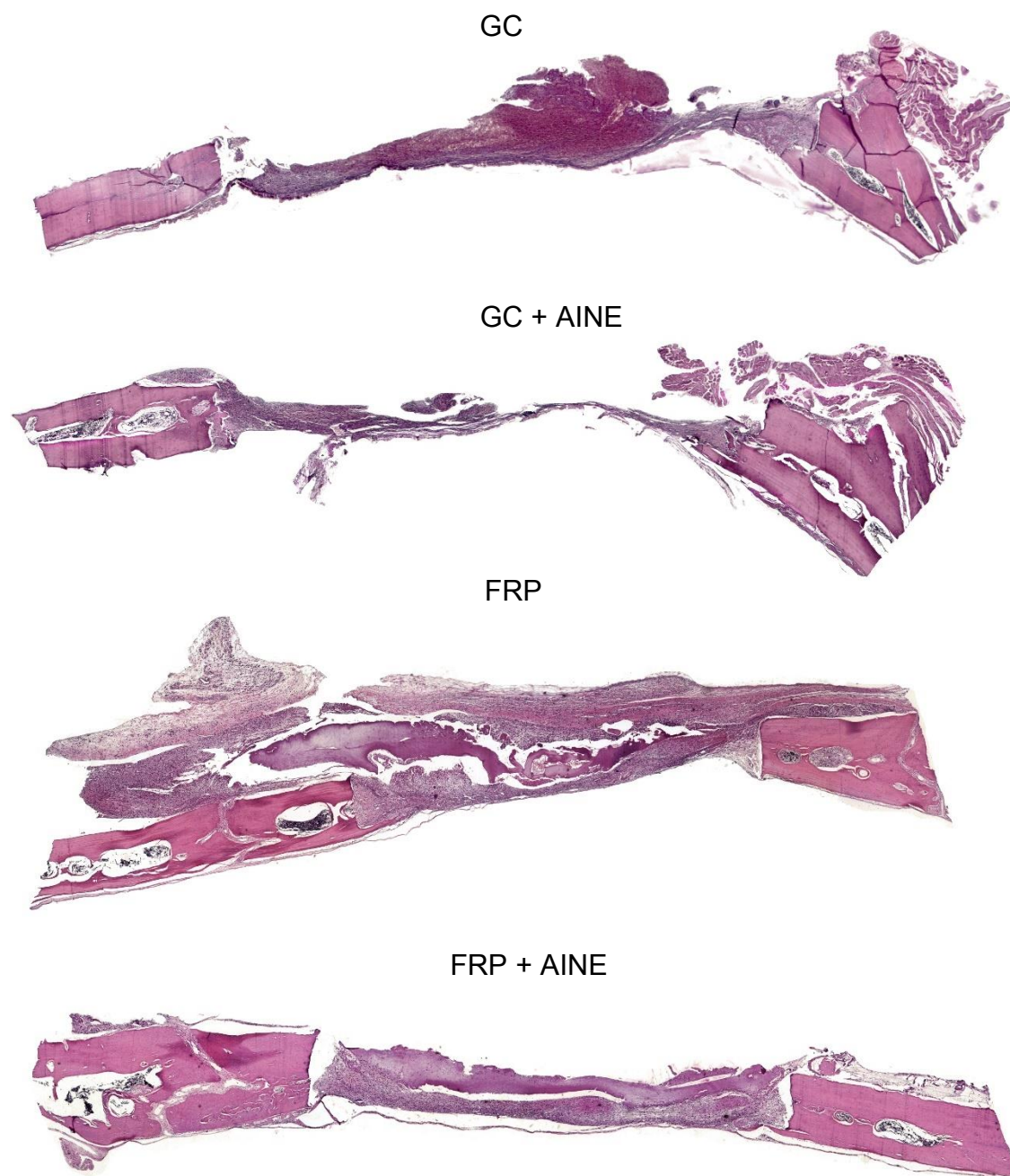
GC – Pode-se observar presença de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório.

GC + AINE – Pode-se observar presença de tecido conjuntivo fibroso

FRP – Pode-se observar área de intenso infiltrado inflamatório e área amorfa compatível com membrana de FRP

FRP + AINE – Pode-se observar área de intenso infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo fibroso e área amorfa compatível com membrana de FRP

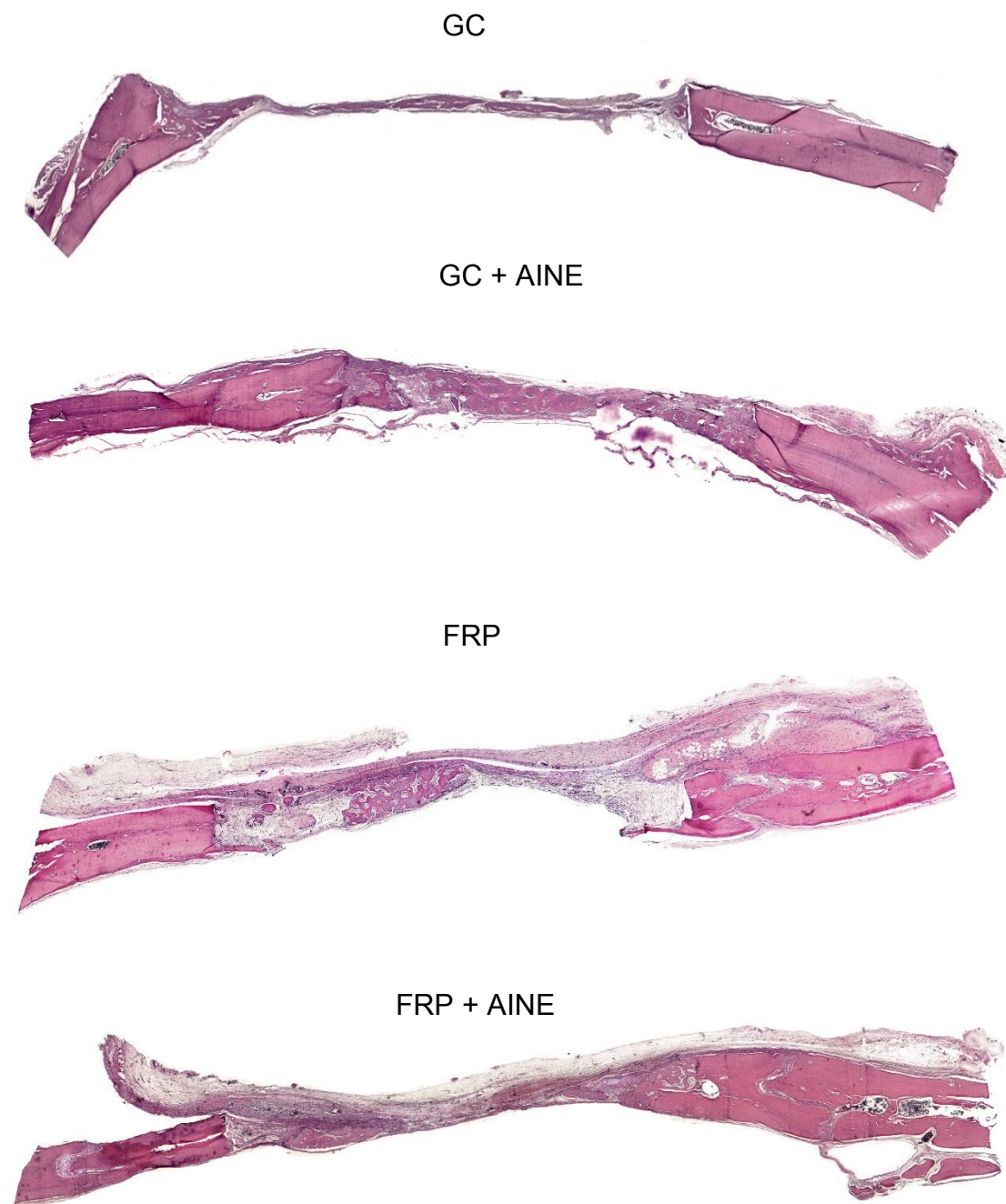
Figura 6: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos (GC,GC+ AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 7 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

- GC – Pode-se observar área de intenso infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo fibroso.
- GC + AINE – Pode-se observar presença de tecido conjuntivo fibroso com pouca área de infiltrado inflamatório.
- FRP – Pode-se observar tecido conjuntivo fibroso, área de intenso infiltrado inflamatório e início da degradação da área amorfa compatível com membrana de FRP
- FRP + AINE- Pode-se observar área de infiltrado inflamatório, pequena presença de tecido conjuntivo fibroso e início da degradação de área amorfa compatível com membrana de FRP.

Figura 7: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos (GC,GC+ AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 14 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).

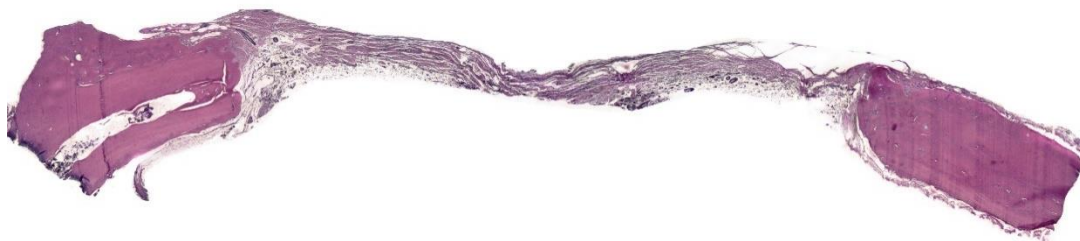


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

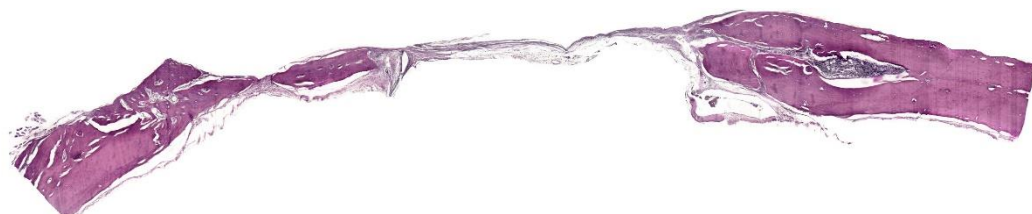
- GC- Pode-se observar presença de tecido conjuntivo fibroso.
- GC+AINE- Pode-se observar presença de infiltrado inflamatório com pequenas áreas de tecido conjuntivo fibroso
- FRP- Pode-se observar continuidade de degradação da membrana compatível com membrana de FRP, tecido conjuntivo fibroso e área de neoformação óssea.
- FRP + AINE- Pode-se observar presença de infiltrado inflamatório , tecido conjuntivo fibroso e início de neoformação óssea.

Figura 8: Fotomicrografias panorâmicas dos quatro grupos (GC,GC+ AINE, FRP e FRP + AINE) referente aos 28 dias de tempo experimental. (HE, Aumento original 4x).

GC



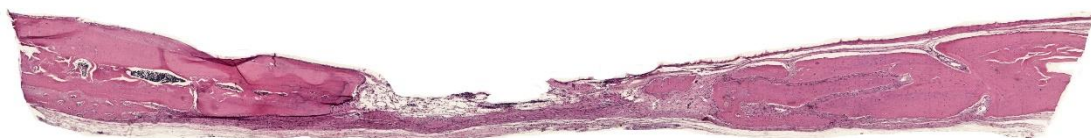
GC + AINE



FRP



FRP + AINE

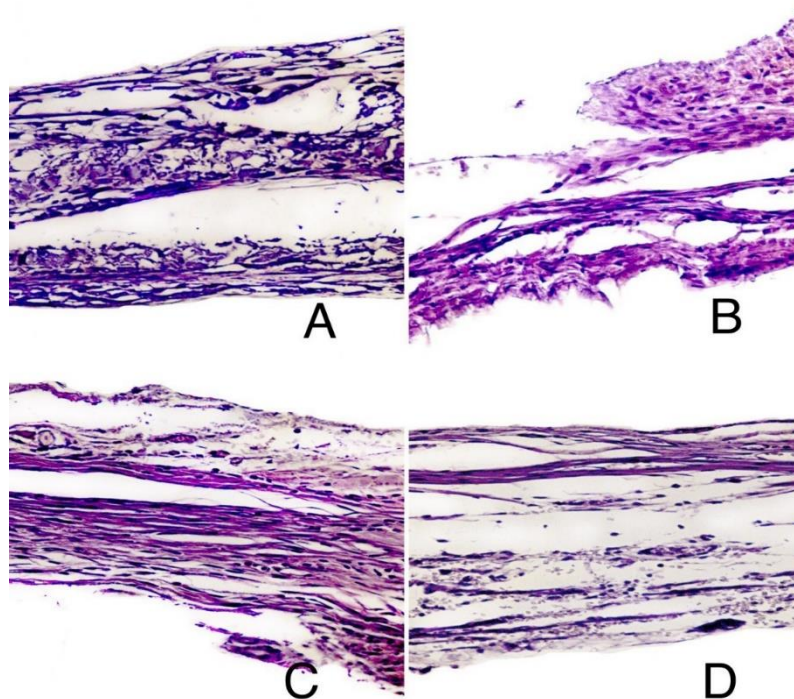


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

- GC- Pode-se observar presença de tecido conjuntivo fibroso e área de infiltrado inflamatório
- GC + AINE – Pode-se observar apenas presença de tecido conjuntivo fibroso
- FRP- Pode-se observar área extensa de neoformação óssea á caminho do fechamento completo da ferida e osteoblastos em atividade
- FRP + AINE – Pode-se observar presença de infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo e áreas de neoformação óssea.

✓ Centro do defeito (Aumento de 25x)

Figura 9: Fotomicrografias representativas dos grupos GC 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).



Fonte : Elaborado pelo próprio autor

- **GC**

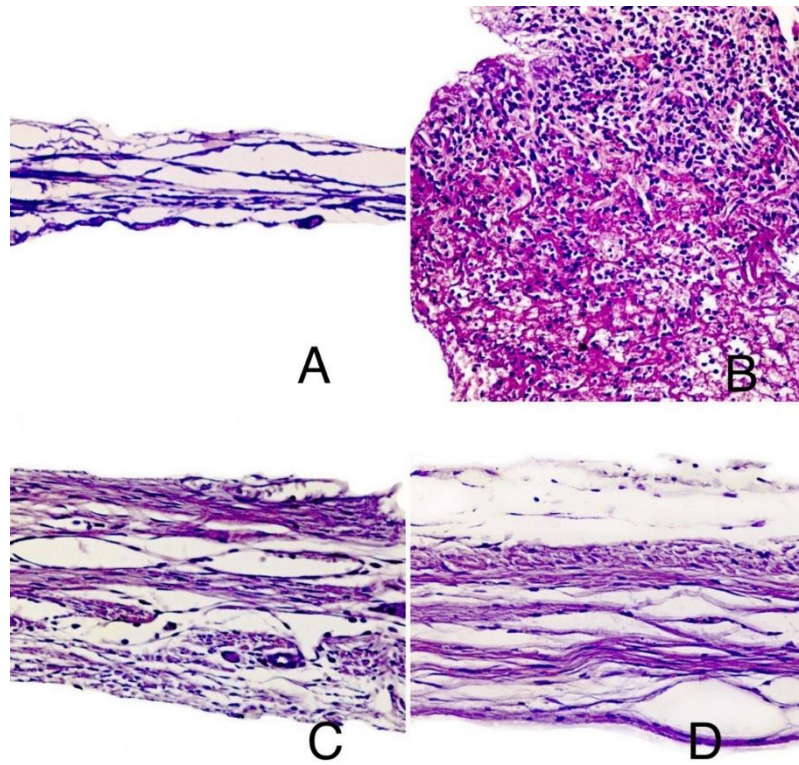
GC 2 dias – A - pode-se observar tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório mononuclear.

GC 7 dias – B - Pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso e intenso infiltrado inflamatório.

GC 14 dias – C - Pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório mononuclear.

GC 28 dias – D - Pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório mononuclear e áreas de necrose.

Figura 10: Fotomicrografias representativas dos grupos GC + AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).



Fonte : Elaborado pelo próprio autor

- **GC + AINE**

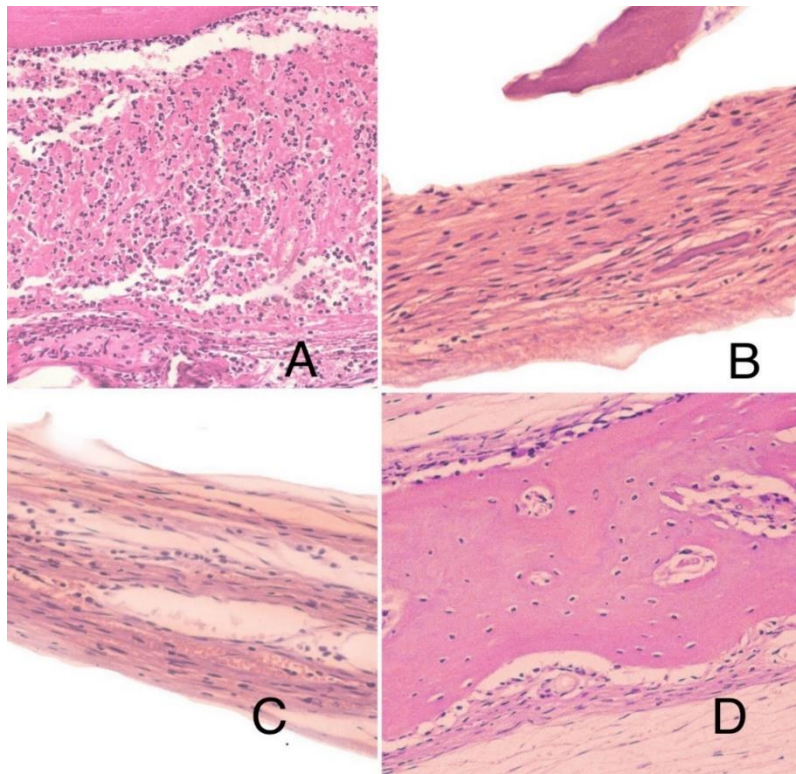
GC + AINE 2 dias – A - pode-se observar tecido conjuntivo fibroso.

GC + AINE 7 dias – B - Pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso e intenso infiltrado inflamatório.

GC + AINE 14 dias – C - Pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório mononuclear.

GC + AINE 28 dias – D - Pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório mononuclear.

Figura 11: Fotomicrografias representativas dos grupos FRP 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

- **FRP**

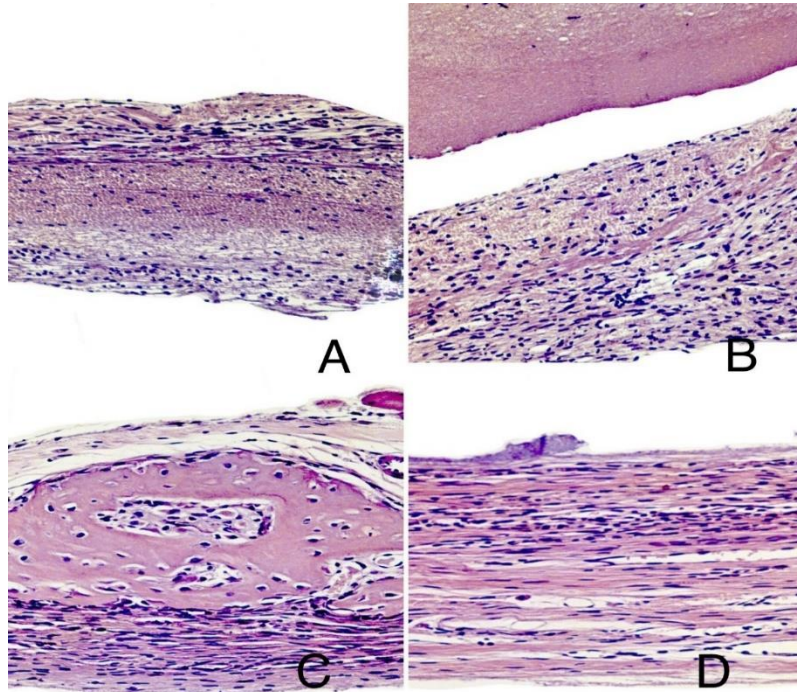
FRP 2 dias – A - pode-se observar área de hemorragia, tecido conjuntivo e área amorfa compatível com membrana de PRF

FRP 7 dias – B - Pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso e intenso infiltrado inflamatório, área amorfa compatível com membrana de PRF na porção superior da imagem.

FRP 14 dias – C - pode-se observar tecido conjuntivo fibroso, observa-se também vasos sanguíneos neoformados, degradação de área amorfa compatível com PRF

FRP 28 dias – D - pode-se observar neoformação óssea, com presença de osteoblastos ativos e tecido conjuntivo fibroso.

Figura 12: Fotomicrografias representativas dos grupos FRP + AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

- **FRP+AINE**

FRP + AINE 2 dias – A -pode-se observar, tecido conjuntivo e área de hemorragia.

FRP+ AINE 7 dias – B -pode-se observar área de tecido conjuntivo fibroso, área de hemorragia e intenso infiltrado inflamatório, área amorfa compatível com membrana de PRF.

FRP+AINE 14 dias – C - pode-se observar neof ormation óssea, com presença de osteoblastos ativos e tecido conjuntivo fibroso e vasos sanguíneos neof ormados.

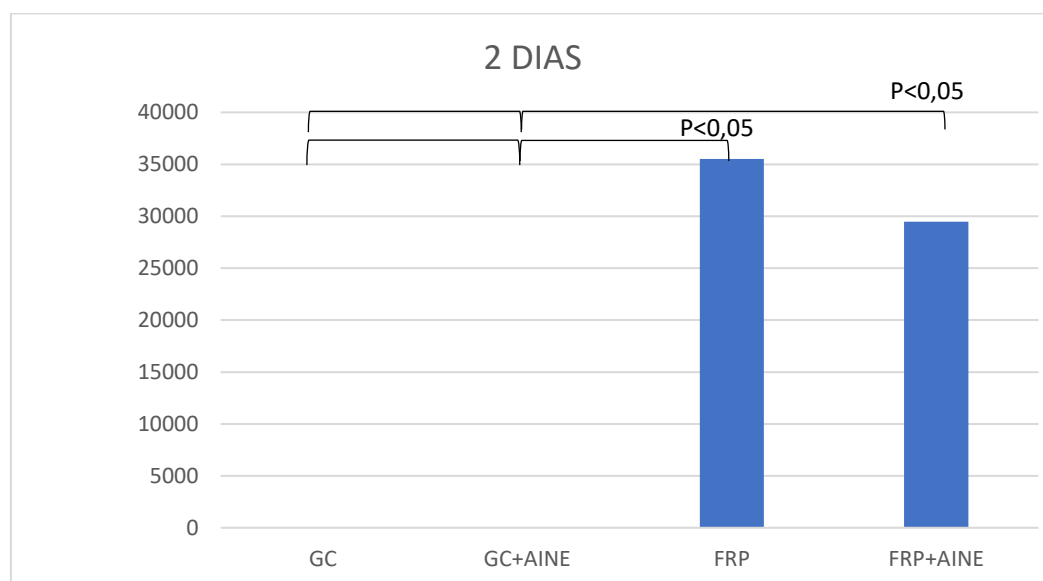
FRP+AINE 28 dias – D - pode-se observar tecido conjuntivo fibroso, observa-se também vasos sanguíneos neof ormados, juntamente com fibroblastos e osteoblastos.

4.1.2 Análise estatística da área de osso neoformado (AON)

- Análise de 2 dias (Figura 13)

Houve uma tendência a maior quantidade de osso neoformado no grupo FRP em comparação ao grupo FRP+AINE. Quando comparamos esses dois grupos (FRP e FRP +AINE) aos grupos GC+AINE e GC, os resultados mostraram maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($p < 0,01$) na comparação entre grupos FRP com GC+ AINE, FRP+AINE com GC+ AINE, FRP com GC e FRP+AINE com GC.

Figura 13: Os resultados mostrados em cada barra representam os valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais GC, GC + AINE, FRP, FRP +AINE aos 2 dias.

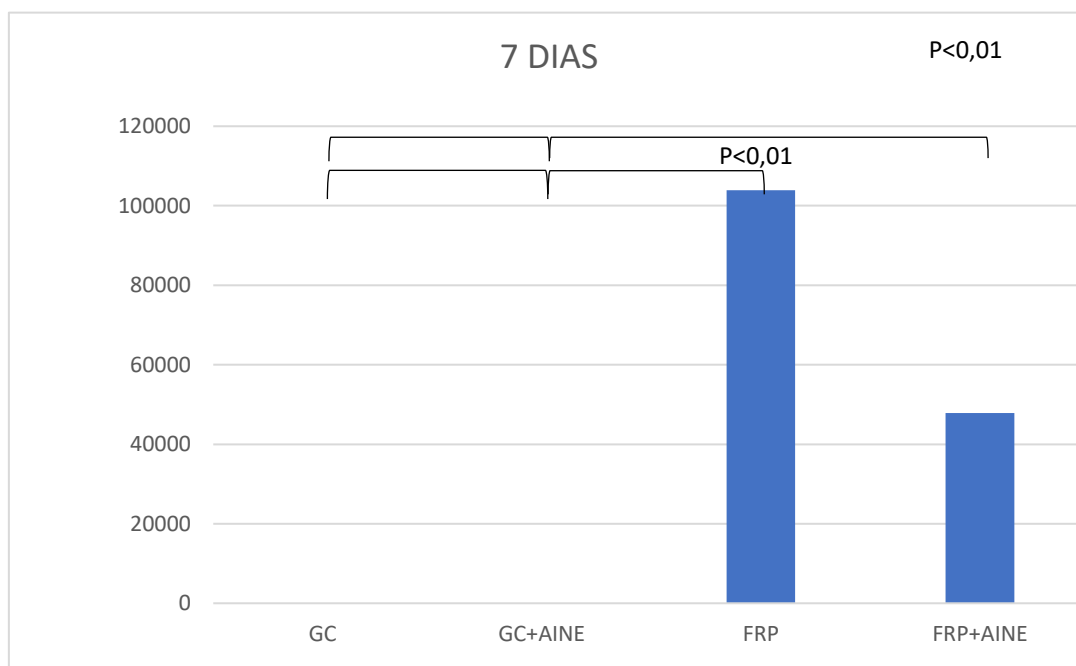


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

- Análise de 7 dias (Figura 14):

Houve uma tendência a maior quantidade de osso neoformado no grupo FRP em comparação ao grupo FRP+AINE. Comparando-se esses dois grupos (FRP e FRP +AINE) aos grupos GC+AINE e GC, os resultados mostraram uma maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($p < 0,01$) na comparação entre os grupos FRP com GC+AINE e FRP com GC.

Figura 14: Os resultados mostrados em cada barra representam os valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais GC, GC+AINE, FRP, FRP+AINE aos 7 dias.

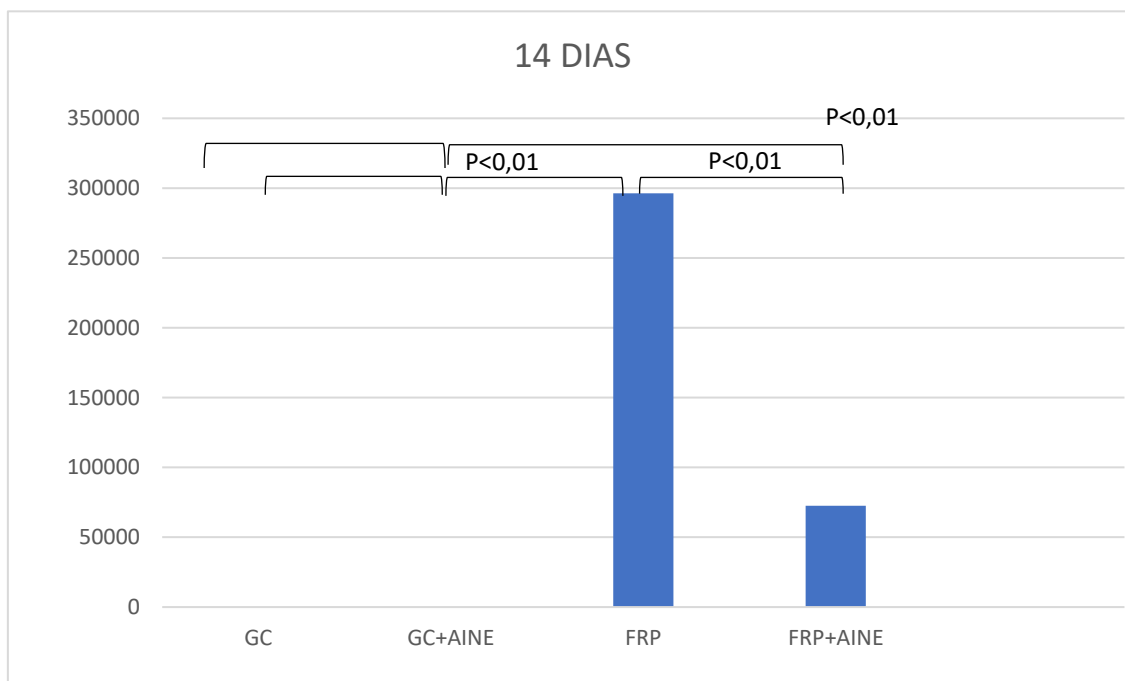


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

- Análise de 14 dias (Figura 15):

Houve maior quantidade de osso neoformado no grupo FRP em comparação ao grupo FRP+AINE, com diferença estatística entre eles ($p<0,01$). Comparando-se esses dois grupos (FRP e FRP +AINE) aos grupos GC+ AINE e GC, os resultados mostraram uma maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($p<0,01$) na comparação entre grupos FRP com GC+AINE, FRP com GC.

Figura 15: Os resultados mostrados em cada barra representam os valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais GC, GC+AINE, FRP, FRP+AINE aos 14 dias.

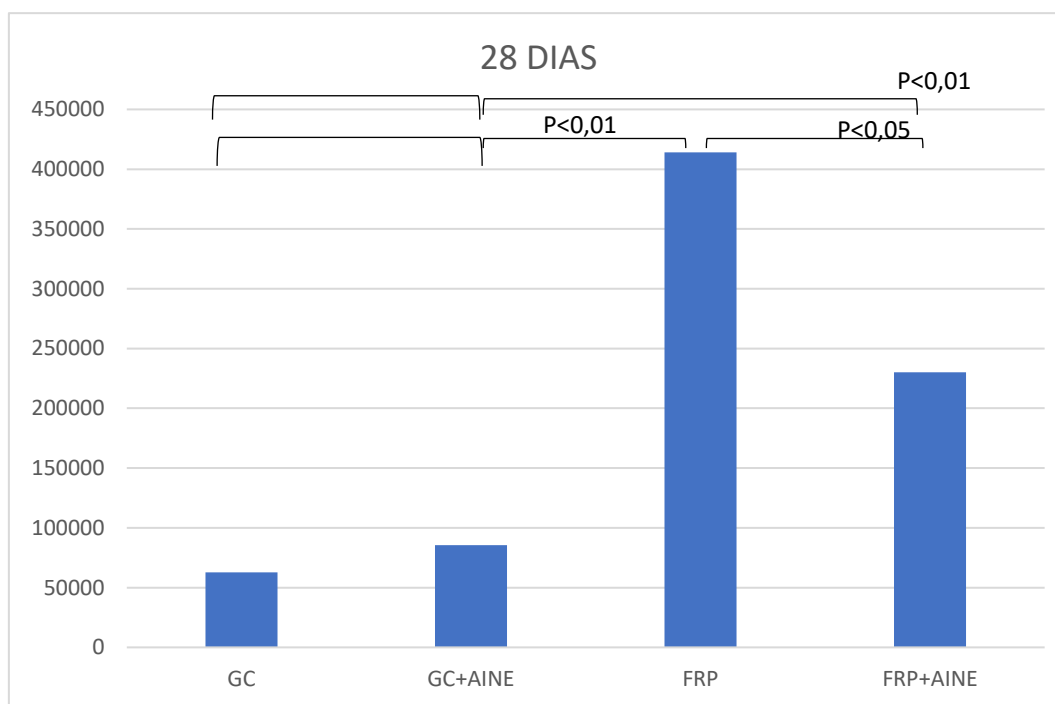


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

- Análise de 28 dias (Figura 16):

Houve uma maior quantidade de osso neoformado no grupo FRP em comparação ao grupo FRP+AINE, com diferença estatística entre eles ($p<0,05$). Comparando-se esses dois grupos (FRP e FRP+AINE) aos grupos GC+AINE e GC, os resultados mostraram uma maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($p<0,01$) na comparação entre grupos FRP com GC+AINE, FRP com GC.

Figura 16: Os resultados mostrados em cada barra representam os valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais GC, GC+AINE, FRP, FRP+AINE aos 28 dias.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.1.3 Análise estatística da contagem de células inflamatórias

- **FRP**

Notou-se um aumento progressivo na porcentagem de células inflamatórias nos períodos de 2 e 7 dias, atingindo seu máximo neste último período. Já nos dias seguintes, essa porcentagem diminuiu também de forma progressiva, atingindo seu mínimo aos 28 dias.

- **FRP + AINE**

Notou-se um aumento progressivo da porcentagem de células inflamatórias nos três primeiros períodos de análise (2,7 e 14 dias), que apenas apresentou diminuição aos 28 dias.

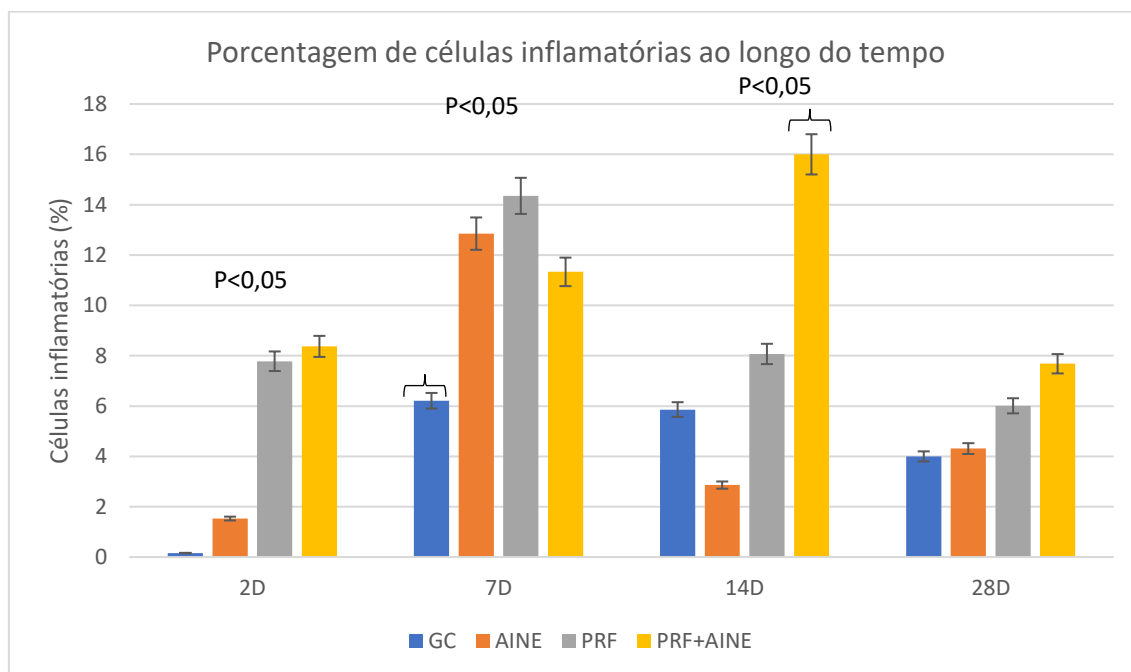
- **GC + AINE**

Notou-se aumento progressivo da porcentagem de células inflamatórias nos períodos de 2 e 7 dias. Já aos 14 dias essa porcentagem cai significativamente e volta a subir somente no último período, aos 28 dias, mostrando que mesmo com a administração do anti-inflamatorio o processo de inflamação não se mostrou contido.

- **GC**

Notou-se a presença mínima de células inflamatórias no estágio inicial (2 dias), que aumentou de forma progressiva até os 7 dias e manteve-se até os 14 dias. A diminuição dessa porcentagem ocorreu aos 28 dias, mas de forma muito leve, comparado aos demais grupos.

Figura 17- Porcentagem média de células inflamatórias presente nos quatro grupos em função dos tempos experimentais (2,7,14 e 28 dias)



Na comparação estatística intergrupos, aos 2 dias de pós-operatório, os grupos AINE e GC foram similares entre si ($p=0,961$), assim como FRP foi similar a FRP+AINE ($p=0,99$). Esses dois últimos grupos apresentaram maior quantidade de células inflamatórias seguidas dos grupos GC+ AINE e GC ($p<0,05$).

Aos 7 dias, GC apresentou menor contagem de células inflamatórias em comparação aos outros grupos ($p<0,05$), que não diferiram entre si (GC + AINE=FRP=FRP+AINE).

Aos 14 dias, os grupos GC + AINE e FRP mantiveram a quantidade de células inflamatórias, assemelhando-se ao GC ($p>0,05$), enquanto que a associação FRP+AINE apresentou a maior recrutamento de células inflamatórias ($p<0,05$).

Aos 28 dias, o grupo FRP+AINE reduziu a quantidade de células inflamatórias, não diferindo mais dos demais grupos ($p>0,05$).

5 DISCUSSÃO

As fotomicrografias da análise histológica, corroboradas pela histometria mostraram que a FRP isoladamente apresentou o melhor comportamento no intento de induzir/conduzir a formação de tecido ósseo no defeito crítico criado na calvária de ratos, inclusive sendo capaz de reduzir o processo inflamatório em comparação aos estágios tardios na comparação com os demais grupos. Aos 28 dias, a maior parte das lâminas histológicas do grupo FRP mostrou osteogênese em direção ao centro dos defeitos, muito próximo do fechamento dos mesmos.

O mecanismo fisiológico da ação da FRP no tecido ósseo em reparação se dá pelo fato da liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF β), que possui como atividades mais importantes a mitogênese, aumentando assim a população de células, principalmente as de reparação como osteoblastos e osteoclastos, e a angiogênese (mitose endotelial dentro de capilares em função), maior atividade de macrófagos, causando debridamento do local da ferida, e estímulo na deposição de matriz de colágeno na reparação da ferida e do osso, como descrito por Ross et al., 1986.

A proposta de analisar o efeito mediador do processo inflamatório com a administração de AINE (cetoprofeno), de forma isolada ou em associação a FRP evidenciou que o AINE isoladamente pareceu não conter o processo inflamatório nos estágios iniciais e no último período avaliado, ainda estava presente, apresentando assim, atraso no processo de reparo ósseo. É importante salientar que o processo inflamatório, após uma injúria tecidual não é um vilão da reparação, seja dos tecidos moles ou ósseo. O prejuízo acontece quando há exacerbação da inflamação.

Os AINEs inibem as prostaglandinas, que por sua vez são responsáveis pelo aparecimento da febre, edema e também pelo controle local do metabolismo ósseo. Quando encontradas em altas concentrações elas inibem a síntese de colágeno mas, em concentrações mais baixas, estimulam a função osteoblástica, sendo essencial no processo de remodelação do tecido ósseo. Ao se administrar o AINE, ocorre por consequência diminuição da permeabilidade

capilar e da quimiotaxia, o que pode levar a um atraso no reparo ósseo quando administrado em longo prazo (Lamano-Carvalho, 2007). Diante deste contexto, muito provavelmente nas reconstruções ósseas, o uso de AINE não deve ser de forma indiscriminada.

Na avaliação do comportamento inflamatório e reparacional da associação FRP+AINE ficou evidente que mesmo com o aumento da quantidade de osso neoformado em comparação aos grupos GC e GC+AINE, ainda foi inferior ao grupo FRP, assim provavelmente o AINE atrasou o reparo ósseo. De acordo com o conhecimento dos pesquisadores deste trabalho, nenhum trabalho havia investigado o efeito de AINE associado ou não a FRP em defeitos ósseos. Portanto, diante da fisiologia do processo inflamatório e o conhecimento da ação da FRP nos tecidos injuriados, acredita-se que tanto o AINE como a FRP competem na liberação dos autacoides, que apesar de haver a neoformação óssea, encontra-se diminuída em relação ao uso isolado da FRP.

6 CONCLUSÕES

Diante das limitações deste estudo *in vivo*, foi possível concluir que a FRP foi favorável desde os períodos iniciais até os mais tardios, auxiliando na resposta inflamatória e neoformação óssea. Entretanto, a administração de AINE de forma isolada ou associada a FRP não limitou o processo inflamatório e atrasou o reparo ósseo.

7 REFERÊNCIAS

1. De Pascale MR, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev.* 2015;29(1):52-61.
2. 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.* 2012;13(7):1231-56.
3. 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.* 2011;40(9):891-900.
4. 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.* 2009;108(5):707-13.
5. Singh A, Kohli M, Gupta N. Platelet rich fibrin: a novel approach for osseous regeneration. *J Maxillofac Oral Surg.* 2012;11(4):430-4.
6. Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM, 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.* 2011;37(6):681-90.
7. Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, 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.* 2012;9(10):872-80.
8. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, 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 Radiol Endod.* 2006;101(3):e56-60.

9. Dohan Ehrenfest DM, Lemo N, Jimbo R, Sammartino G. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): rabbit tricks and traps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(4):413-6; author reply 6-8.

10. Kim TH, Kim SH, Sándor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol.* 2014;59(5):550-8.

11. Acar AH, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem NF, Altundag Kahraman S. Micro- computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol.* 2015;60(4):606-14.

12. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* 2014;40(6):679-89.

13. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, 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 Radiol Endod.* 2006;101(3):e37-44.

14. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G, Charrier JB. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: growth factor release and contradictory results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(4):418-21; author reply 21-2.

15. Dohan Ehrenfest DM, 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.* 2012;13(7):1145-52.

16. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, 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 Radiol Endod*. 2006;101(3):299-303.
17. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(5):1635-43.
18. 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. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(6):927-30.
19. Ranganathan AT, Chandran CR. Platelet-rich fibrin in the treatment of periodontal bone defects. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15(3):372-5.
20. Dinarello CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(4):378-85.
21. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.
22. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol*. 2015.
23. Kizil C, Kyritsis N, Brand M. Effects of inflammation on stem cells: together they strive? *EMBO Rep*. 2015;16(4):416-26.
24. Scholtysek C, Krönke G, Schett G. Inflammation-associated changes in bone homeostasis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(3):188-95.
25. Flower RJ, Blackwell GJ. The importance of phospholipase-A2 in prostaglandin biosynthesis. *Biochem Pharmacol*. 1976;25(3):285-91.
26. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998;12(12):1063-73.
27. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res*. 2015;8:105-18.

28. Patrignani P, Patrono C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):422-32.
29. Capone ML, Tacconelli S, Di Francesco L, Sacchetti A, Sciulli MG, Patrignani P. Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007;82(1-4):85-94.
30. Capone ML, Tacconelli S, Sciulli MG, Patrignani P. Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2003;16(2 Suppl):49-58.
31. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*. 1997;49:15-9.
32. Yuan C, Smith WL. A Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin E2 Biosynthetic System in the Golgi Apparatus. *J Biol Chem*. 2015;290(9):5606-20.
33. Pairet M, van Ryn J. Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*. 1998;47 Suppl 2:S93-101.
34. Pairet M, Netter P. [Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: importance and limitations]. *Therapie*. 1999;54(4):433-45.
35. Pairet M, van Ryn J. Measurement of differential inhibition of COX-1 and COX-2 and the pharmacology of selective inhibitors. *Drugs Today (Barc)*. 1999;35(4-5):251-65.
36. Hersh EV, Lally ET, Moore PA. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin*. 2005;21(8):1217-26.
37. Hawkey C, Kahan A, Steinbrück K, Alegre C, Baumelou E, Bégaud B, et al. Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenac in osteoarthritis patients. International MELISSA Study Group. Meloxicam Large-scale International Study Safety Assessment. *Br J Rheumatol*. 1998;37(9):937-45.
38. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. 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(3):e51-5.

39. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015 May;473(5):1635-43.

40. Simon BI, Gupta P, Tajbakhsh S. Quantitative evaluation of extraction socket healing following the use of autologous platelet-rich fibrin matrix in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011;31(3):285-95.

41. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Leukocyte- and platelet-rich Plasma (L-PRP)/fibrin (L-PRF) in medicine - past, present, future. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):i-ii.

42. Messori MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008;43(6):723-9

43. Aguilar-Carrasco JC, Rodríguez-Silverio J, Jiménez-Andrade JM, Carrasco- Portugal MeC, Flores-Murrieta FJ. Relationship between blood levels and the anti-hyperalgesic effect of ketoprofen in the rat. *Drug Dev Res.* 2014;75(3):189-94.

44. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Aug;25(8):879-93.

45. Nau C, Henrich D, Seebach C, Schröder K, Barker JH, Marzi I, Frank J. Tissue engineered vascularized periosteal flap enriched with MSC/EPCs for the treatment of large bone defects in rats. *Int J Mol Med.* 2017 Feb 21.

46. Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa-Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, Noguchi K. Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. *Clin Oral Investig.* 2017 Feb 14.

47. Förster Y, Bernhardt R, Hintze V, Möller S, Schnabelrauch M, Scharnweber D, Rammelt S. Collagen/glycosaminoglycan coatings enhance new bone formation in a critical size bone defect - A pilot study in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Feb 1;71:84-92.
48. Lohmann P, Willuweit A, Neffe AT, Geisler S, Gebauer TP, Beer S, Coenen HH, Fischer H, Hermanns-Sachweh B, Lendlein A, Shah NJ, Kiessling F, Langen KJ. Bone regeneration induced by a 3D architected hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. *Biomaterials*. 2017 Jan;113:158-169.
49. Fish, R.E.; Brown, M.J.; Danneman, P.J.; Karas, A.Z. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. Elsevier. 1th edition. 1997.

ANEXO A – Comitê de Ética



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 dos efeitos da fibrina rica em plaquetas (FRP) comparada a um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) na resposta inflamatória e reparadora de defeitos críticos em calota de ratos", Processo FOA nº 2015-00693, 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 14 de Outubro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Agosto de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the effects of platelet rich fibrin (PRF) compared to nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs) in inflammatory response and regeneration of critical defect in rats calvaria", Protocol FOA nº 2015-00693, 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 14, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 31, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2016.


Profa. Dra. Maria Gisela Caranjeira
Coordenadora 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