



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

EDUARDO ANTONIO CHELIN SUÁREZ

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE
TAMANHO CRÍTICO TRATADOS COM MATRIZ ÓSSEA
MINERALIZADA DE OSSO BOVINO (BIO-OSS®) E FIBRINA
RICA EM PLAQUETAS: estudo histomorfométrico em ratos**

EDUARDO ANTONIO CHELIN SUÁREZ

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE TAMANHO
CRÍTICO TRATADOS COM MATRIZ ÓSSEA MINERALIZADA DE
OSSO BOVINO (BIO-OSS®) E FIBRINA RICA EM PLAQUETAS:
estudo histomorfométrico em ratos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Chelin Suárez, Eduardo Antonio

Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino (Bio-Oss®) e fibrina rica em plaquetas: estudo histomorfométrico e imunológico em ratos / Eduardo Antonio Chelin Suárez. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Andrea Carvalho De Marco.

1. Fibrina rica em plaquetas. 2. Regeneração óssea. 3. Materiais biomédicos. I. De Marco, Andrea Carvalho, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Fábio da Silva Matuda

Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP

Faculdade de Odontologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de agosto de 2021.

DEDICATÓRIA

À Deus, por ter me abençoado colocando pessoas maravilhosas em meu caminho que me ajudam a crescer diariamente.

Aos meus pais, Tony Chelin e Maira Suárez por toda dedicação, apoio e carinho. Vocês são meus exemplos de garra e superação, não há forma de agradecer por todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim, obrigado por me guiarem nesses anos, devo tudo a vocês.

Aos meus tios, Rafael Hernandez por ter me inspirado a estudar odontologia, Vinicio Nadal e Maribel Ortiz por ter me apoiado e animado para vir ao Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Ciência e Tecnologia - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dra. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof.Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, atual Programa Ciências Aplicadas à Saúde Bucal – CASB, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco, Prof. Dra. Maria Aparecida Neves Jardini, Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria e o Prof. Dr. Sérgio Lúcio P. de Castro Lopes.

Aos meus amigos da Pós-graduação, pelo companheirismo e ajuda diária.

Leticia Cavassini Torquato, Kauê Alberto Pereira, Clarissa Maciel.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado com o N° do processo (88887.466849/2019-00; 88887.505745/2020-00; 88887.529144/2020-00) no período 01/11/2019 – 31/01/2020, 01/05/2020 - 30/09/2020 e 01/10/2020 – 31/07/2021.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica aos estudantes de Ensino Médio (PIBIC Ensino Médio), pela concessão de bolsa para a Alice da Silva Santos nos anos 2020-2021.

À equipe técnica da clínica, Jacqueline Amaral Gomes Bueno, Marcia Cristina Lopes Garcia e Valeria Santos da Silva, pela ajuda e dedicação de sempre.

À minha orientadora Prof. Dra. Andréa Carvalho De Marco pela dedicação, disposição, companheirismo, respeito e exemplo de profissional nesses dois anos de trabalho.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.” Isaac Newton

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Cálculo da amostra.....	14
3.2 Animais e desenho do estudo.....	15
3.3 Anestesia.....	17
3.4 Procedimento cirúrgico.....	18
3.4.1 Biomaterial.....	19
3.4.2 Obtenção da fibrina rica em plaquetas	19
3.5 Eutanásia.....	22
3.6 Análise histológica e histomorfométrica	23
3.7 Análise imunológica	25
3.8 Análise estatística	25
4 RESULTADO	26
4.1 Análise histológica descritiva	26
4.2 Análise estatística	32
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES.....	48
ANEXO.....	64

Suárez EAC. Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino (Bio-Oss®) e fibrina rica em plaquetas: estudo histomorfométrico e imunológico em ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em ratos tratados com matriz óssea bovina (Bio-Oss®) e fibrina rica em plaquetas (PRF) por meio de análise histomorfométrica. Foram utilizados 54 ratos adultos (albinus, Wistar), com 90 dias de idade. Dois defeitos ósseos críticos com 5 mm de diâmetro foram confeccionados na calvária de cada rato. Os animais foram divididos em 4 grupos: C-Coágulo de sangue, B-Bio-Oss®, F-PRF, B+F-Bio-Oss® + PRF. Cada grupo foi subdividido nos períodos de observação de 30 e 60 dias. Todos os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, teste de Dunn e teste de sinais de postos de Wilcoxon, o nível de confiança foi de 5%. Todos os grupos apresentaram resultados semelhantes quanto à proporção de neoformação óssea. Aos 30 dias na proporção de neoformação lamelar, GF apresentou maiores resultados estatisticamente com GB (GBvs.GF, $p = 0,0256$). Em relação ao fechamento do defeito, aos 30 dias o GF apresentou diferença estatística ao GC (GFvs.GC, $p = 0,0374$) e aos 60 dias o GB apresentou diferença estatística ao GC (GBvs.GC, $p = 0,0374$). Por meio da estatística descritiva, foi possível observar que o FRP tem ação positiva para o processo inicial de neoformação óssea. A associação Bio-Oss® e L-PRF parece estar relacionada à manutenção da arquitetura de neoformação óssea. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esse achado.

Palavras-chave: Fibrina rica em plaquetas. Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis.

Suárez EAC. Bone repair evaluation of critical sized defects treated with bovine bone mineralized bone matrix (Bio-oss®) and platelet-rich fibrin: histomorphometric study in rats [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the bone repair of critical size defects in rats treated with bovine bone matrix (Bio-Oss®) and platelet rich fibrin (PRF) through histomorphometric analysis. Fifty-four adult rats (albinus, Wistar), 90 days old, were used. Two critical bone defects with 5mm of diameter were made in the calvaria. The animals were divided into 4 groups: C-Blood clot, B-Bio-Oss®, F-PRF, B+F-Bio-Oss®+PRF. Each group was subdivided in the observation periods of 30 and 60 days. All data was analyzed by Kruskal-Wallis test, Dunn test and Wilcoxon signed-rank test, confidence level was 5%. All groups presented similar results regards proportion of bone neoformation. At 30 days in the proportion of lamellar neoformation, GF presented higher results when compared with GB (GBvs.GF, $p=0.0256$). Regarding the closure of the defect, at 30 days the GF and GC presented statistically different (GFvs.GC, $p=0.0374$) and at 60 days the GB and GC were statistically different (GBvs.GC, $p=0.0374$). Through descriptive statistics, it was possible to observe that FRP has positive action for the initial bone neoformation process. The association Bio-Oss and L-PRF seems to be related to the maintenance of the bone neoformation architecture. However, more studies are needed to confirm this finding.

Keywords: Platelet rich fibrin. Bone regeneration. Biocompatible materials.

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de enxertos ósseos para promover a regeneração óssea vem tornando-se um procedimento de rotina, principalmente na presença de grandes defeitos ósseos (Elgali et al., 2013). O osso autógeno é reconhecido como o padrão-ouro para o enxerto ósseo, fornecendo células osteogênicas, matriz extracelular, e sinais moleculares para a indução e diferenciação óssea (Khoury et al., 1996; Rather et al., 2019; Springfield, 1992). As vantagens dos enxertos autógenos são: osteocondução, osteoindução e efeitos osteogênicos que promovem elevado potencial regenerativo (Klijn et al., 2010). Porém, a remoção de enxertos autógenos implica em um segundo sítio cirúrgico doador e aumenta a morbidade do paciente (Chaushu et al., 2009; Loyola et al., 2018; Sbordone et al., 2009; Zhao et al., 2011).

Atualmente, uma variedade de materiais substitutos ósseos vem sendo demonstrada clinicamente para promover resultados aceitáveis (Iezzi et al., 2008; Klijn et al., 2010; Stavropoulos et al., 2003). O ideal é que os substitutos ósseos possuam boa integração óssea, osteoindução e estabilidade a longo prazo, além de uma boa interação com o tecido adjacente (Bow et al., 2019). No entanto, tal material substituto ósseo, na sua forma pura, ainda não existe (Schmitt et al., 2013).

Um dos materiais de enxertia que vem apresentando bons resultados clínicos, é o xenoenxerto Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials GmbH), que é constituído de uma matriz mineral óssea de origem natural, porosa e bovina, cortical ou esponjosa (Iezzi et al., 2008; Stavropoulos et al., 2003). É um dos materiais biocompatíveis que mais se assemelham à hidroxiapatita do osso humano e sua desproteínização, eliminação dos componentes orgânicos, é feita com tratamento com uma solução alcalina forte e

sinterização a 3001°C (Tapety et al., 2004). Como vantagens, sua utilização oferece excelente compatibilidade com a matriz óssea humana e estimula a osteogênese devido à compatibilidade que oferece, porém deve-se notar que as partículas ósseas do xenoenxerto não são reabsorvíveis (Li et al., 2017; Oliveira et al., 2015). O Bio-Oss® apresenta características osteocondutoras e possibilita a compensação pela reabsorção óssea natural causada pela remodelação (Shamsoddin et al., 2019).

A Fibrina Rica em Plaquetas (FRP), descrita por Choukroun em 2001 é um concentrado plaquetário, classificado como de segunda geração, que contém plaquetas e fatores de crescimento, responsáveis pelas seguintes cadeias de eventos: aumento da produção de colágeno, mitose celular, angiogênese, recrutamento de células, indução de diferenciação celular, entre outros. Durante o processamento da FRP por centrifugação, as plaquetas são ativadas e a degranulação maciça implica em uma liberação de citocinas muito significativa. Este resultado implica na liberação progressiva de citocinas durante a remodelação da matriz de fibrina. Tal mecanismo pode explicar as propriedades clinicamente observadas com a utilização da FRP, como promover uma melhor e mais rápida reparação das feridas cirúrgicas, tendo sua aplicação na cirurgia oral e maxilofacial (Borie et al., 2015; Dohan et al., 2006).

A FRP pode estimular a regeneração óssea sem complicações indesejáveis e com o mínimo de resposta inflamatória. Esses concentrados possuem fatores de crescimento que são essenciais para os mecanismos de reparo do tecido duro e tecido mole, e seu uso foi derivado justamente por conta do alto teor desses fatores de crescimento que podem ser liberados das plaquetas no momento do dano ao tecido (Awadeen et al., 2020).

Nas últimas décadas, estudos em larga escala de biomarcadores foram habilitados por tecnologias analíticas modernas, como a análise imunológica multiplex, que devem melhorar a transição de novas abordagens de

biomarcadores da pesquisa básica para a aplicação clínica (Windrichova et al., 2018). Kirian et al. (2011) sugerem que as combinações dos fatores de crescimento encontradas na FRP com enxertos ósseos podem aumentar a densidade óssea. Neste sentido, biomarcadores como osteoprotegerina (fator inibidor da osteoclastogênese, promovendo assim maior formação óssea), insulina (pode estimular a diferenciação dos osteoblastos, o que por sua vez aumenta a produção de osteocalcina) e a leptina (hormônio peptídico versátil que regula diretamente o tecido ósseo pelo aumento da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e inibe o crescimento de osteoclastos) são relatados na literatura por desempenharem papel importante no metabolismo ósseo (Klein, 2014; Legiran, Brandi, 2012; Rasouli Ghahroudi et al., 2014).

Existem estudos que descrevem os benefícios da FRP quando usada como material de enxerto exclusivo ou combinada com outros substitutos ósseos, como osso liofilizado, osso bovino desproteinizado e osso autógeno, mostrando resultados otimistas (Nacopoulos et al., 2014; Pripatnanont et al., 2013).

Estudos clínicos e *in vitro* sugerem que a membrana de FRP tem uma maior estimulação das células (fibroblastos, queratinócitos, pre-adipócitos, osteoblastos, células trocomesenquimáticas ósseas) e da diferenciação óssea em comparação com a membrana de colágeno (Dohan Ehrenfest et al., 2009a; Mahajan et al., 2018).

A combinação da FRP com o osso bovino é uma interessante alternativa para a regeneração óssea em defeitos de tamanhos críticos. A junção da função osteocondutora dos xenoenxertos bovinos com as citocinas e fatores de crescimento da FRP mostram-se promissores na tentativa de crescimento ósseo (Oliveira et al., 2015).

Embora tenham sido demonstrados efeitos positivos da matriz óssea de origem bovina com FRP na proliferação de células ósseas, a evidência da eficácia terapêutica dessa associação ainda é controversa (Dohan Ehrenfest et al., 2009b). Desse modo, o objetivo desse estudo é avaliar através de análise histomorfométrica a reparação óssea de defeitos críticos em ratos tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino e fibrina rica plaquetas.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo é avaliar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em ratos tratados entre fibrina rica em plaquetas e matriz óssea mineralizada de osso bovino por meio de análises, histológica, histomorfométrica e imunológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA, após ser aprovado pelo Comitê de Ética Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP sob número de protocolo nº 07-2019 (Anexo A). A descrição deste trabalho foi feita seguindo as diretrizes do *Animal Research: Reporting in vivo experiments – ARRIVE* guidelines 2.0 (Percie du Sert et al., 2020).

3.1 Cálculo da amostra

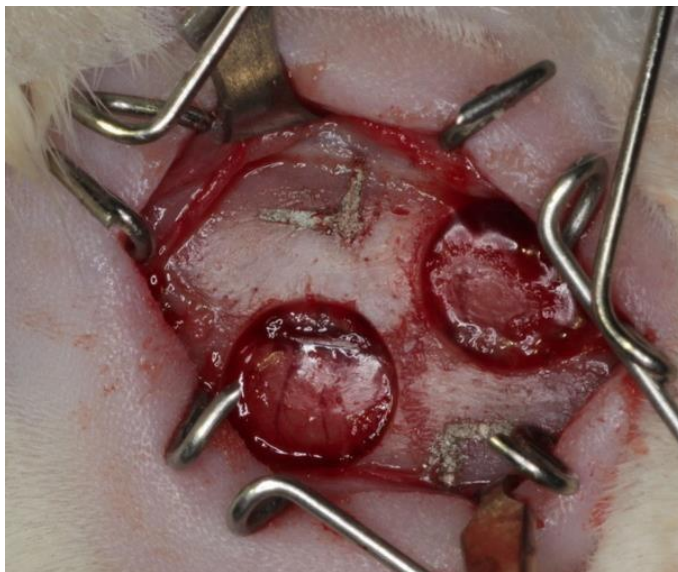
A partir de estudos anteriores pode-se obter a variabilidade dos dados ao redor de 0.5 mm^2 para a área de neoformação óssea. Assim, com a ajuda do programa Minitab (versão 17.1, 2013) e do programa estatístico *PIFACE Russ Lenth* (Softpedia, Bucharest, Romania) Russel V. Lenth (versão 1.76, 2011) foi realizado um estudo de poder de teste. Verificou-se que com $n = 6$ é possível detectar uma diferença média do efeito “Tratamento” igual a 0.8 mm^2 com poder de 80%.

3.2 Animais e desenho do estudo

Para este estudo foram utilizados 54 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g, fornecidas pelo Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu-SP. Os ratos foram armazenados em gaiolas apropriadas e receberam dieta e água *ad libitum*. Dos 54 animais, 06 foram destinados como doadores de sangue para o preparo da Fibrina Rica em Plaqueta (FRP); os outros 48 ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Grupo Controle (GC) – defeito ósseo + coágulo sanguíneo, Grupo Bio-Oss® (GB) – defeito ósseo + Bio-Oss®, Grupo Fibrina Rica em Plaquetas (GF) – defeito ósseo + FRP, Grupo Bio-Oss® + Fibrina Rica em Plaquetas (GB+F) – defeito ósseo + Bio-Oss® + FRP. Cada grupo foi subdividido de acordo com os períodos de observação de 30 e 60 dias.

Foram realizados 2 defeitos por animal (Figura 1), de acordo com o princípio dos 3R's – “*Reduction*” (Flecknell, 2002). Para a histomorfometria foram operados 6 animais para os grupos C e B para o período de 30 dias e 6 animais para os grupos C e B para o período de 60 dias. Da mesma maneira ocorreu para os grupos F e B+F, sendo 6 animais necessários para o período de 30 dias e 6 animais para o período de 60 dias (Figura 2).

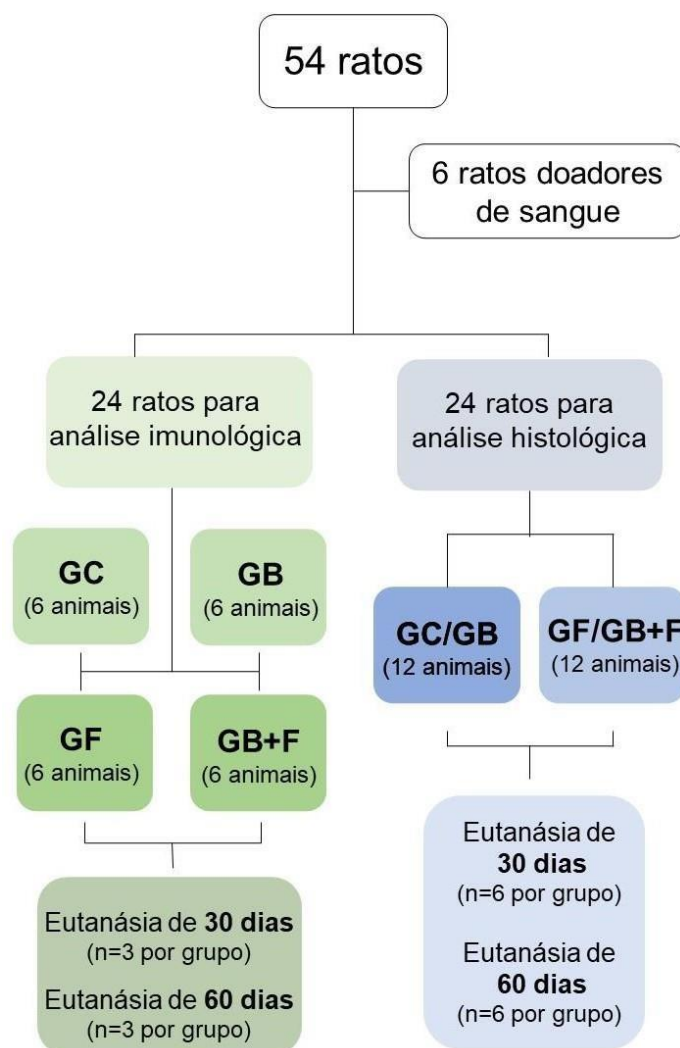
Figura 1 - Dois defeitos ósseos de tamanho crítico criados cirurgicamente na calvária do animal seguindo o princípio dos 3R's



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a análise imunológica, 3 animais foram necessários para cada grupo, C, B, F e B+F; para cada período de observação; sendo o total de 12 animais para a observação do período de 30 dias e 12 animais para o período de observação de 60 dias. Não foi possível a aplicação do princípio “*Reduction*” dos 3R's (2 defeitos por animal) nos animais que seguirão para o ensaio imunológico, devido à necessidade de maceração, no momento da eutanásia, das estruturas que serão analisadas (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma com desenho do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Anestesia

Para a realização das cirurgias e eutanásia, os animais foram anestesiados com uma solução de 5mg/kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino) -5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Anasedan – Bayer do Brasil), substância com

propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 75-95mg/kg de cetamina base (Dopalen – Agribands do Brasil), anestésico geral, via intramuscular. Como analgésico, instantes depois da anestesia foi administrada solução de 6mg/kg de Tramal (cloridrato de tramadol – Medley) que seguiu a cada 24h por 5 dias, via oral.

3.4 Procedimento cirúrgico

Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região superior da cabeça e assepsia com álcool iodado. Em seguida, uma incisão longitudinal na pele, com cerca de 1 cm foi feita ao longo da sutura sagital, expondo a calvária. O periósteo também foi incisado. Os tecidos moles foram afastados com o auxílio de afastadores de tamanho adequado à região de trabalho.

Foram realizados defeitos ósseos de tamanho crítico com 5 mm de diâmetro (Calixto et al., 2011; Nagata et al., 2013), utilizando-se um motor elétrico que permite velocidade controlada em 800 RPM e uma broca trefina sob constante irrigação com soro fisiológico estéril. Durante o procedimento cirúrgico houve cuidado para se evitar danos à dura-máter ou ao seio sagital superior. Em seguida, utilizando-se ponta de ultrassom em forma de lâmina (W1-0-CVDentus) em aparelho piezocirúrgico (DentSurg CVDentus São José, SP, Brasil) sob irrigação constante foi confeccionada uma marcação em formato de “L” a 2 mm da borda do defeito no local correspondente ao seu maior diâmetro, a marcação foi então preenchida com amálgama (Figura 1). Após essa etapa, o biomaterial e a fibrina rica em plaquetas (FRP) foram aplicados de acordo com o descrito anteriormente.

O tecido subcutâneo e a pele foram suturados com fio de seda 4,0 e foi administrada uma medicação analgésica anti-inflamatória (Meloxicam 0,2% na

dose de 2mg/kg, por via subcutânea a cada 24h por 3 dias) e o Pentabiótico 0,01ml cada 100g por via intramuscular em dose única). O dia da cirurgia será definido como dia zero.

3.4.1 Biomaterial

O Bio-Oss[®] (Geistlich Biomaterials GmbH) é um substituto ósseo xenógeno, que caracteriza-se por ser uma matriz óssea mineral porosa de osso bovino cortical ou esponjoso, a granulação utilizada neste estudo foi de 0,25-1,0 µm de diâmetro – 0,5g (Iezzi et al., 2008; Stavropoulos et al., 2003).

3.4.2 Obtenção da fibrina rica em plaquetas

Foram utilizados como doadores para a obtenção do sangue necessário para a preparação da fibrina rica em plaquetas (FRP) os 6 animais previstos como doadores e mais 10 animais da própria pesquisa no momento prévio à eutanásia. A coleta de sangue foi realizada pela punção intracardiaca com animal devidamente anestesiado (Figura 3). O volume de sangue extraído de cada animal doador foi de 10 ml. O sangue de cada animal foi processado para a produção das membranas de FRP, de acordo com o protocolo de Choukroun (Oliveira et al., 2015). O sangue foi coletado em tubos plásticos com sílica (9ml) e imediatamente colocados em uma centrífuga (Kasvi-Brasil) onde foram centrifugados por 12 minutos, numa velocidade de 2500 rotações por minuto, calculados para equivaler a 708g de força centrífuga máxima aproximadamente (Dohan et al., 2006a; Dohan et al., 2006b) para a obtenção de três fases.

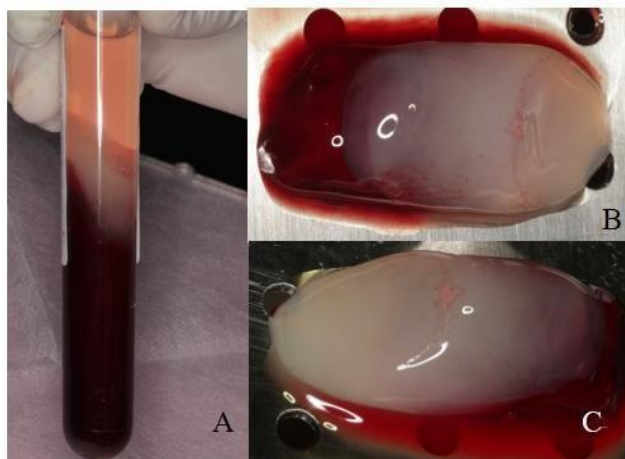
Após a centrifugação, os tubos foram removidos da centrífuga e colocados em um suporte, de onde foram retirados os coágulos localizados na região central de cada tubo. Com uma pinça, o operador segurava o coágulo de fibrina para separá-lo delicadamente das células vermelhas que fica aderido à sua porção distal, e então colocava os coágulos de fibrina numa caixa de metal perfurada do kit de preparo da FRP (Figura 4). Em seguida, cobriu-se as membranas da caixa perfurada com o peso de metal do kit, e fechava-se a caixa de metal com a tampa. A caixa foi reaberta e o peso de metal removido, e então as membranas estavam prontas para uso, apresentando espessura padronizada, reduzida e cor mais clara, devido ao escoamento do soro que estava presente em seu conteúdo (Figura 5). A membrana FRP considerada como rica em fatores de crescimento, foi utilizada para o preenchimento dos defeitos ósseos nos defeitos correspondentes ao GF e usada como membrana recobrindo o biomaterial nos defeitos correspondentes ao GB+F (Figura 6). Após a doação de sangue os animais foram eutanasiados.

Figura 3 – Punção intracardíaca



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Obtenção da Fibrina Rica em Plaquetas após a centrifugação



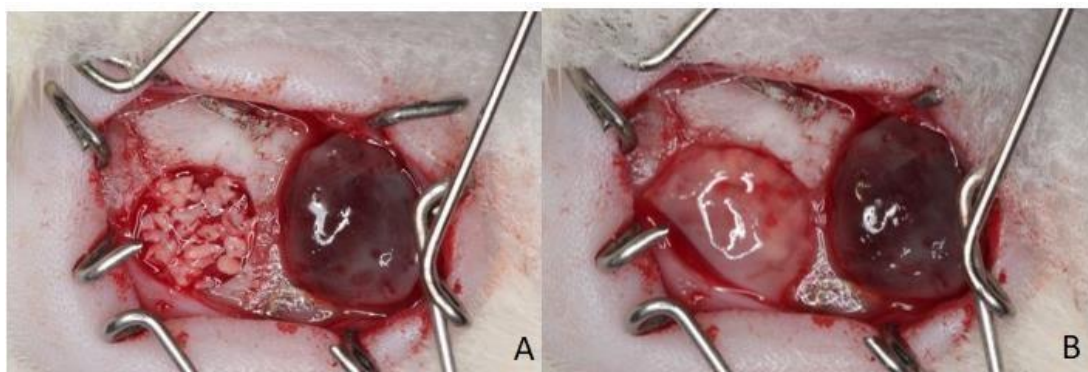
Legenda: A= três fases do agregado plaquetário, B e C= Fibrina rica em plaquetas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Membrana FRP



Legenda: A = membrana FRP; B = membrana FRP com a medição para o corte C = membrana após o corte.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Fotografias da aplicação de tratamento dos grupos F e B+F



Legenda: A e B - defeito ósseo da direita - GF e defeito ósseo da esquerda - GB+F.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Eutanásia

Nos tempos observacionais de 30 e 60 dias, os animais foram eutanasiados; utilizou-se o triplo da dose anestésica (mistura da cetamina e xilazina) indicada para os procedimentos cirúrgicos, e em seguida foi feita a decapitação para remoção da calvária. Antes do procedimento foi realizado o teste de sensibilidade a dor.

Os vinte e quatro espécimes que seguiram para análise histomorfométrica foram fixados no formol a 10%, enquanto os outros vinte e quatro (24) espécimes seguiram para a análise imunológica, perfazendo os períodos de 30 e 60 dias.

3.6 Análise histológica e histomorfométrica

Para as análises histológica e histomorfométrica, a área operada foi fixada em formol a 10% por um período máximo de 48 horas. Cada espécime foi catalogado. Em seguida teve início o processo de descalcificação em ácido fórmico (Merck KGaA, em Darmstadt, Alemanha) na concentração de 20%, durante aproximadamente sete dias. Após descalcificação os espécimes foram embebidos em parafina.

Nos espécimes que seguiram para análise histomorfométrica, foram realizados cortes no sentido longitudinal das peças. Assim que foi observado o aparecimento do amálgama, sinalizando a região de maior diâmetro do defeito se deu a aquisição dos cortes mais centrais com 5µm de espessura e foram realizados de forma semi seriada, de cada bloco. No total, foram realizados cortes com 5 µm de espessura para confecção de 10 lâminas de cada espécime, cada uma contendo pelo menos três cortes seriados, Em seguida, os cortes foram corados por hematoxilina-eosina e examinados em microscopia de luz.

A captura de imagens das lâminas foi realizada a partir de um microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Um único examinador fez as capturas das imagens que receberam códigos e posteriormente foram analisadas por um outro examinador, permitindo o cegamento dos dados.

A análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador devidamente calibrado. As medidas de duas análises da mesma estrutura foram submetidas ao teste Kappa e o examinador foi considerado calibrado quando o mesmo atingiu pelo menos 90% de concordância entre os exames.

As medidas histomorfométricas foram realizadas a partir de foto micrografias montadas em forma de fotografia panorâmica por meio da qual foi possível visualizar o defeito em toda a sua extensão. A análise histomorfométrica foi realizada com a utilização do programa computacional Axio Vision Release 4.7.2. O critério a seguir foi utilizado para padronizar a análise das imagens digitais (Messora et al., 2008): área total (em mm²) correspondente à área total do defeito cirúrgico original, foi determinada pela identificação das superfícies externa e interna do osso original da calvária e das bordas direita e esquerda do defeito cirúrgico. O osso imaturo neoformado foi identificado pela margem do defeito adjacente ao osso lamelar original. A área óssea recém-formada (em mm²) foi delineada dentro da área total do defeito. A área total foi considerada 100% da área a ser analisada. As áreas de neoformação óssea dentro dos defeitos foram calculadas como uma porcentagem da área total. O osso imaturo recém-formado foi identificado pelo crescimento ósseo no defeito adjacente ao osso lamelar original, não foram contabilizadas as áreas correspondentes às partículas de biomaterial remanescente no defeito. Estes foram tabulados e submetidos à análise estatística. Foram realizadas as seguintes medidas (Torquato et al., 2021):

- Área de neoformação total (AN): proporção da área de neoformação óssea dentro dos limites determinados entre as bordas do defeito em %.
- Área de neoformação lamelar (ANL): proporção de neoformação óssea em % das bordas do lado direito e esquerdo.
- Área de neoformação intramembranosa (ANI): proporção de neoformação óssea em % na região central do defeito, separado do osso formado nas bordas.
- Distância central entre as bordas de osso neoformado (MC): medida linear em mm da distância remanescente entre as bordas de osso neoformado.

3.7 Análise imunológica

Para a análise dos marcadores relacionados à neoformação óssea, no momento da eutanásia, o tecido neoformado correspondente à área interna do defeito ósseo de 5 mm de diâmetro foi coletado. As amostras foram armazenadas em microtubos estéreis (24 amostras) em um tubo estéril e seguiram para armazenamento em um freezer a -80°C até o momento da realização do ensaio “Multiplex”. O nível dos seguintes marcadores será mensurado: Osteoprotegerina (OPG), Insulina e Leptina. Será utilizado o kit de alta sensibilidade (Millipore Corporation, MERCK, MA, USA) de acordo com a instrução do fabricante. As amostras serão analisadas no programa Xponet (Millipore Corporation).

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos para as variáveis de proporção de neoformação óssea (%) em AN, ANL e ANI, e a variável de medida linear (mm) em MC foram submetidos por uma análise exploratória, onde se realizou a estatística descritiva (média, desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo e quartis) para avaliar o melhor teste a ser empregado. Observou-se que os dados seguiam distribuição não-paramétrica, assim optou-se como estatística inferencial o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações e o teste de Sinais de Postos de Wilcoxon, o valor adotado para nível de confiança foi de 5%. Os testes foram realizados pelos programas MINITAB (Minitab, versão 12.0, 1998) e GraphPAD PRISM (versão 6, 2013).

4 RESULTADO

No planejamento inicial, dos 54 animais, 06 seriam doadores de sangue para o preparo da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP); no entanto, mais dez animais foram utilizados como doadores, sendo esses, animais da própria pesquisa que seriam eutanasiados na sequência do experimento, não acarretando em maior número de animais.

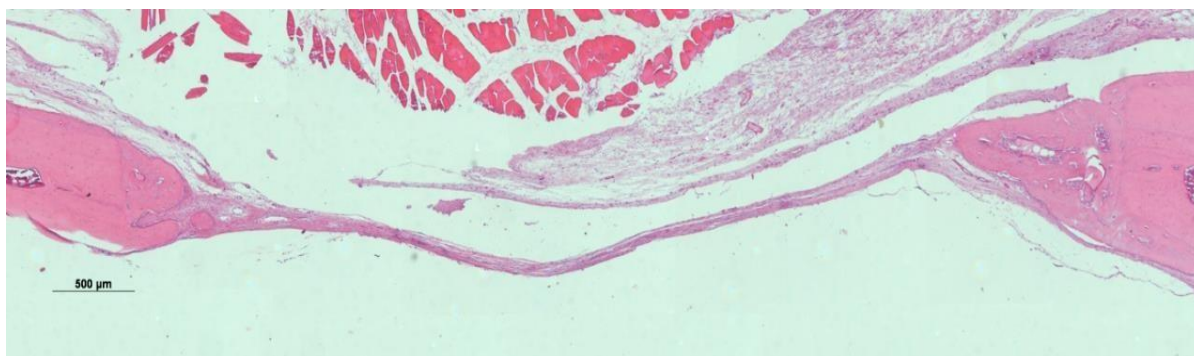
Ao final, todos os 48 ratos seguiram o período do experimento com bom estado de saúde, 24 ratos foram encaminhados para análise histomorfométrica e tiveram seus dados coletados. Os resultados da análise histológica e histomorfométrica apresentados a seguir são provenientes dos períodos de 30 e 60 dias (grupos: C, B, F e B+F).

Os outros 24 ratos serão encaminhados para análise imunológica, o material se mantém preservado no freezer a -80°C , e suas análises serão realizadas nos próximos meses.

4.1 Análise histológica descritiva

Em 30 dias após a cirurgia foi possível observar a presença de neoformação óssea em todos os espécimes, no geral de forma concentrada nas regiões perto das bordas do defeito cirúrgico (Figuras 7 e 10). Em alguns espécimes do grupo B-30 dias foi possível visualizar novo osso formado entre os espaços das partículas remanescentes de biomaterial (Figuras 8 e 9), no grupo B+F é possível observar novo osso formado de forma desorganizada ao lado e acima da borda do defeito cirúrgico (Figura 11).

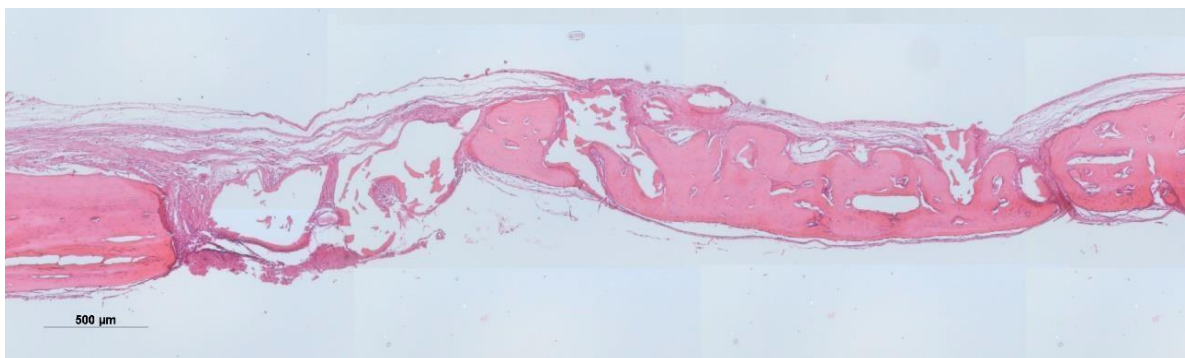
Figura 7 – Espécime do grupo C – 30 dias



Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

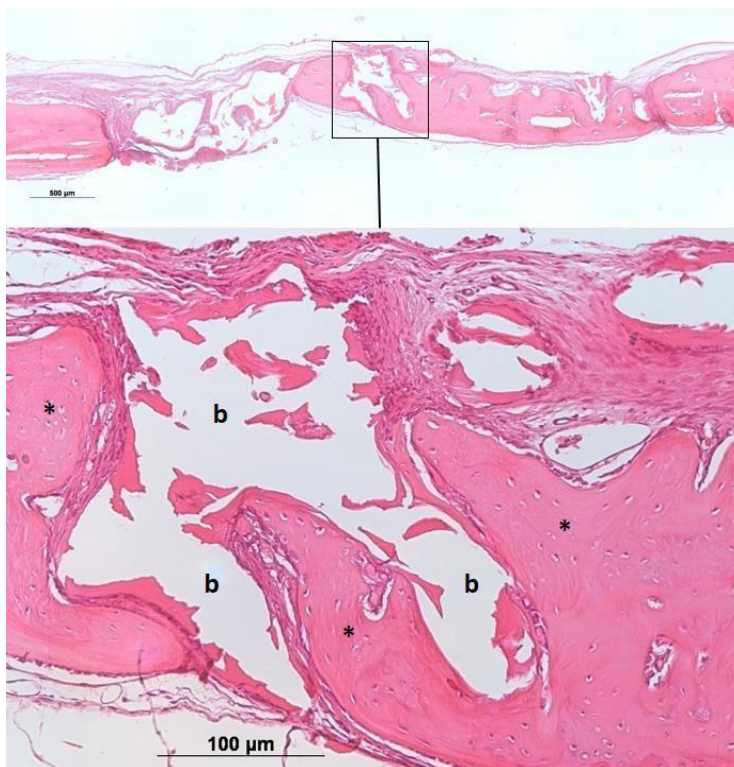
Figura 8 – Espécime do grupo B – 30 dias



Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

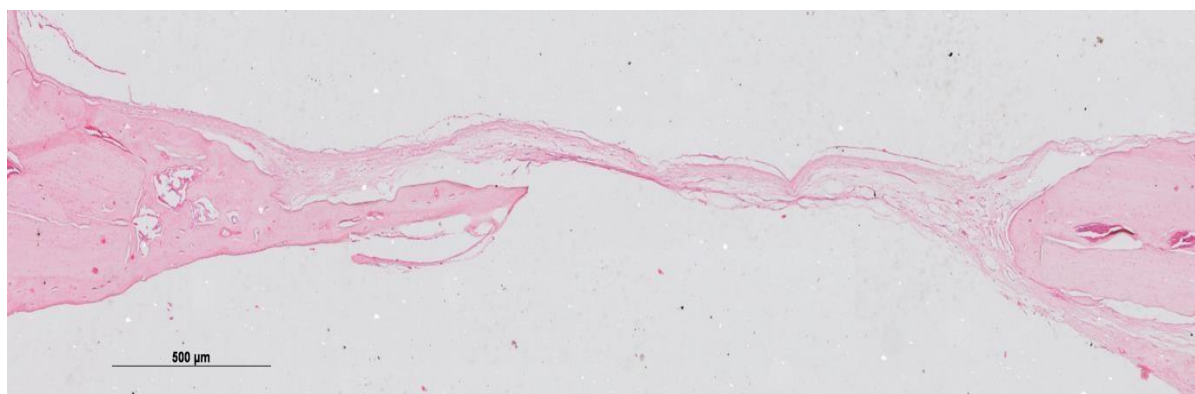
Figura 9 - Espécime do grupo B - 30dias



Legenda: Fotomicrografia do novo osso formado (*) no interior do defeito cirúrgico e espaços que seriam ocupados por partículas do biomaterial (b) (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X 10).

Fonte: Elaborado pelo autor.

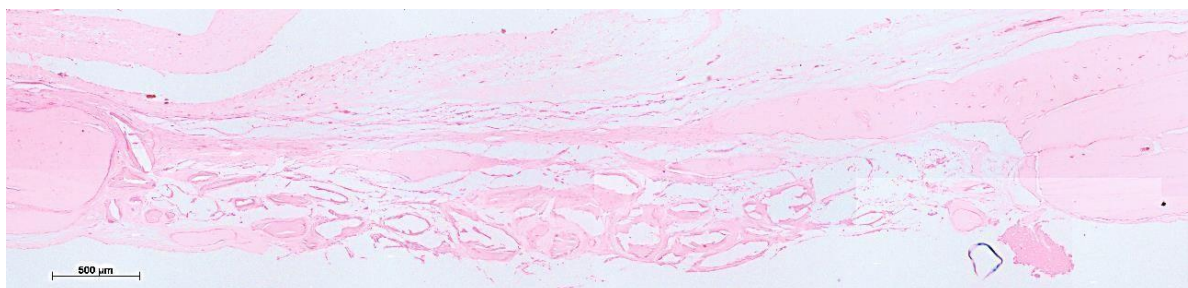
Figura 10 – Espécime do grupo F - 30dias



Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Espécime do grupo B+F - 30dias



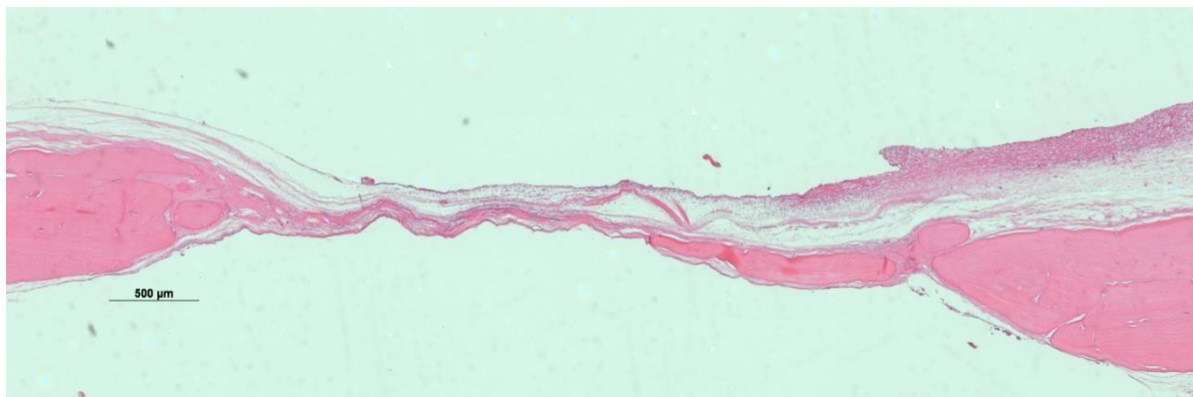
Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em 60 dias, a maioria dos espécimes apresentou neoformação óssea. Nos grupos C foi possível notar uma faixa estreita de osso neoformado ao longo de quase toda a extensão do defeito cirúrgico, entretanto mais fina do que o osso original da calvária. Já no grupo B, essa faixa de osso neoformado se apresenta mais larga e praticamente ao longo de todo o defeito cirúrgico. Também foi possível observar tecido conjuntivo denso e infiltrado inflamatório que se estendia por todo o defeito cirúrgico (Figuras 12 e 13). Nos espécimes do grupo F – 60 dias foi possível observar a neoformação óssea pronunciada para o centro do defeito cirúrgico em alguns espécimes, no entanto, concentrada na região das bordas do defeito, na maioria deles (Figura 14).

Nos espécimes do Grupo B e do Grupo B+F, foi possível notar a presença de espaços que seriam ocupados pelo biomaterial e/ou por partículas residuais do biomaterial (Figuras 14, 15 e 16).

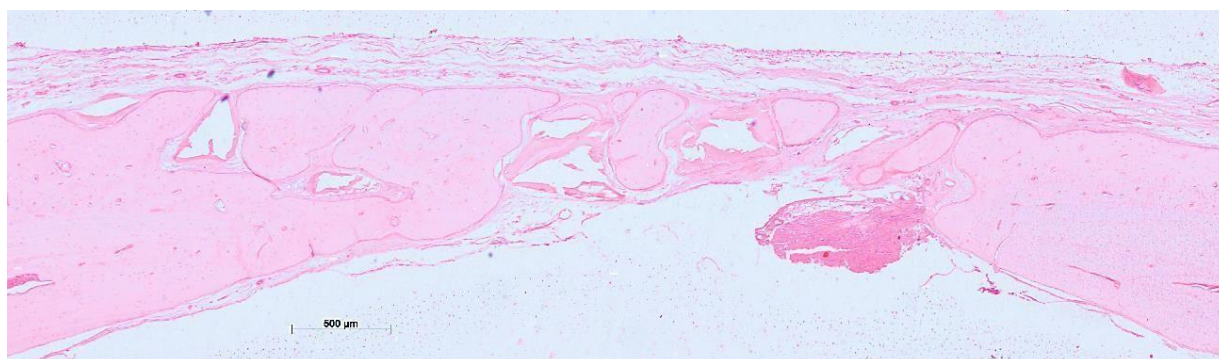
Figura 12 - Espécime do grupo C - 60 dias



Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

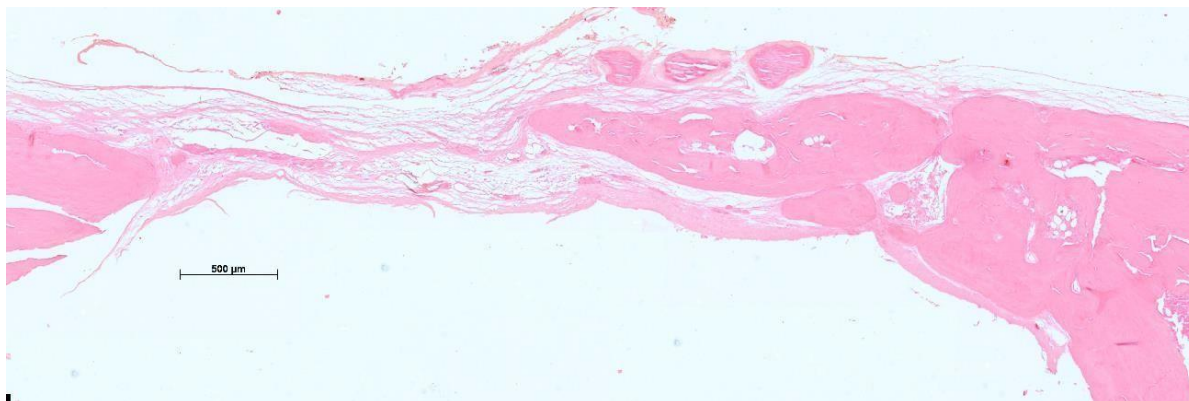
Figura 13 - Espécime do grupo B - 60 dias



Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

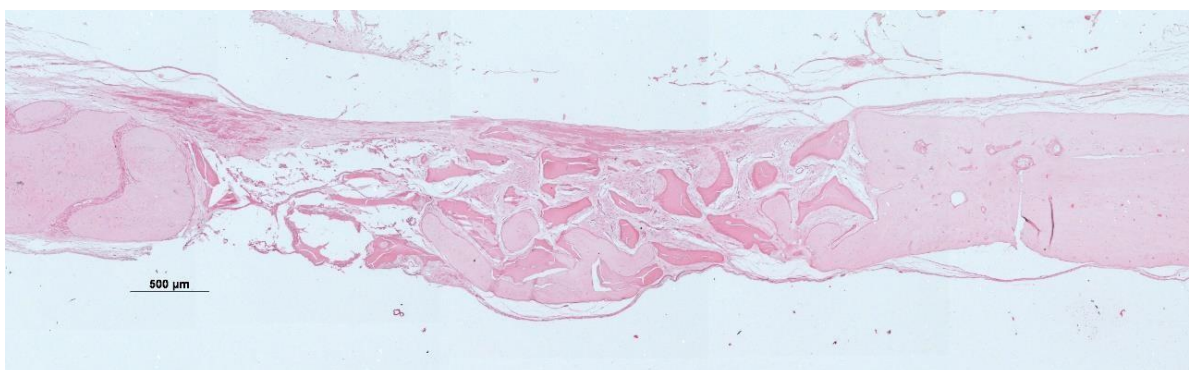
Figura 14 - Espécime do grupo F - 60 dias



Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

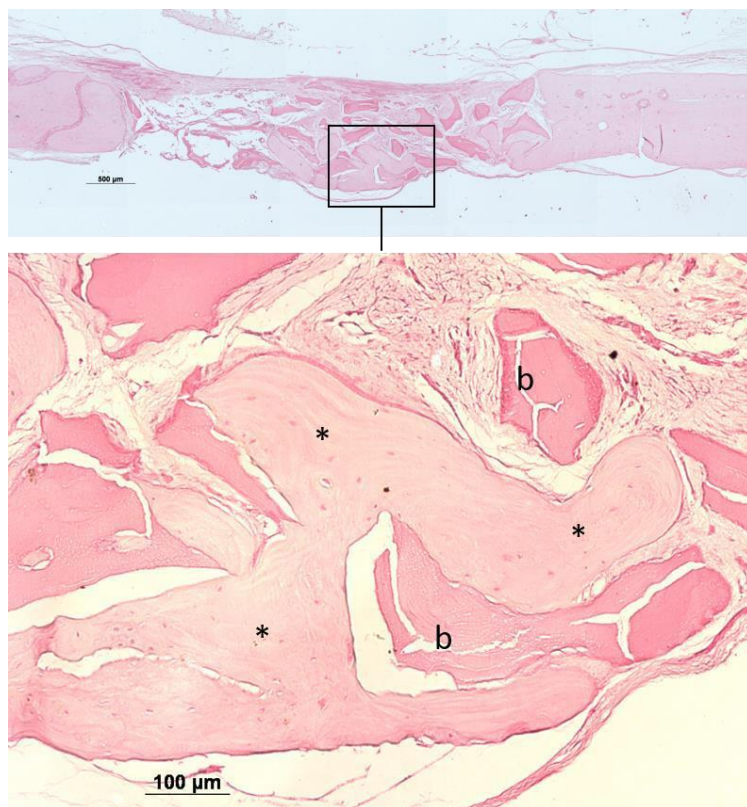
Figura 15 – Espécime do grupo B+F – 60 dias



Legenda: Fotomicrografia da visão panorâmica do defeito cirúrgico (Coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X5).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Espécime do grupo B+F - 60 dias



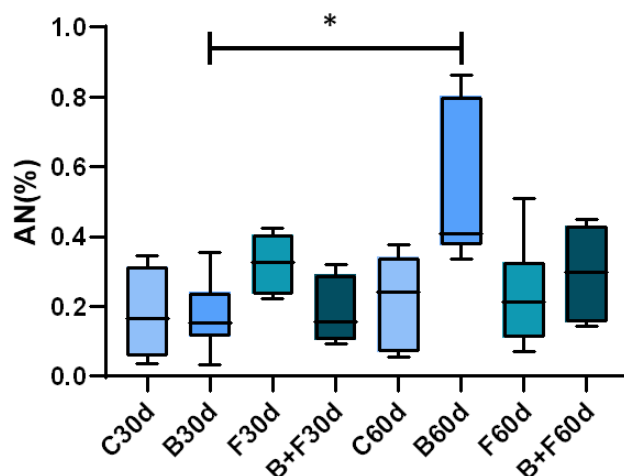
Legenda: Fotomicrografia do novo osso formado (*) no interior do defeito cirúrgico e espaços que seriam ocupados por partículas do biomaterial (b) (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original X 10).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise estatística

Na medida de Área de Neoformação (AN), aos 30 e 60 dias, não houve diferença estatística significativa entre as modalidades de tratamento aplicadas. Apenas o grupo B apresentou diferença estatística significativa na comparação intragrupo (B30vs.B60; $p=0.0313$) (Figura 17).

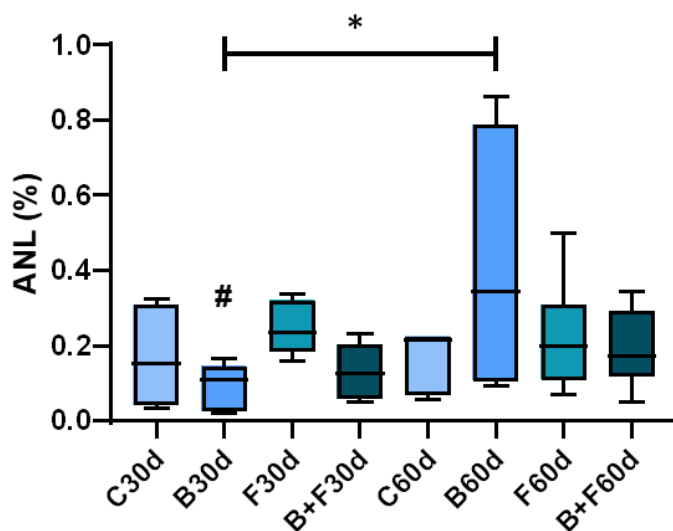
Figura 17 – Valor máximo e mínimo, mediana, 1º e 3º quartil da Área de Neoformação óssea (AN) em porcentagem



Legenda: Diferença estatística significativa intragrupo para Grupo B (*).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Na medida da proporção da Área de Neoformação Lamelar (ANL), aos 30 dias, o grupo F apresentou diferença estatística significativa relativa ao grupo B (Bvs.F, $p=0.0256$), enquanto, os grupos restantes se apresentaram semelhantes estatisticamente. Aos 60 dias, não houve diferença estatística significativa entre as modalidades de tratamento. Apenas o grupo B apresentou diferença estatística significativa dentro da comparação intragrupo (B30vs.B60, $p=0.0313$) com significativo incremento dentro da variável (Figura 18).

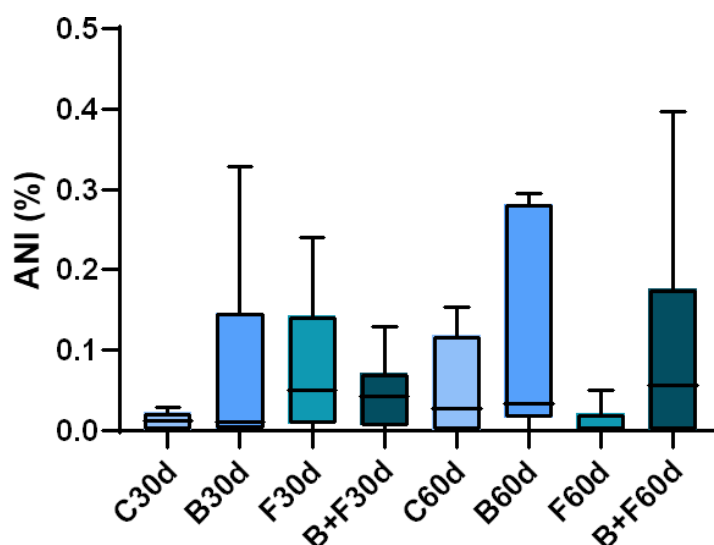
Figura 18 - Valor máximo e mínimo, mediana, 1º e 3º quartil da Área de Neoformação Lamelar (ANL) em porcentagem



Legenda: Diferença estatística significativa intragrupo para Grupo B (*), intergrupo para Grupo F (#).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na medida da Área de Neoformação Intramembranosa (ANI), aos 30 e 60 dias, os grupos de tratamento apresentaram resultados estatísticos semelhantes, não houve diferença estatística significativa na comparação intragrupo ou intergrupo (Figura 19).

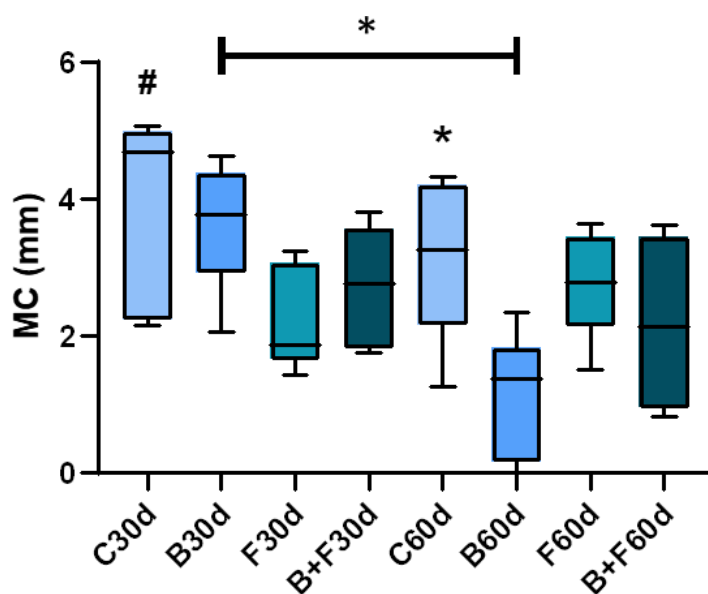
Figura 19 - Valor máximo e mínimo, mediana, 1º e 3º quartil da Área de Neoformação Intramembranosa (ANI) em porcentagem



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação às variáveis obtidas dentro da Medida Linear Central (MC), aos 30 dias, o grupo C apresentou diferença estatística significativa ao grupo F (Cvs.F, $p=0.0374$); que por sua vez se apresentou como semelhante aos grupos de B+F e B, apesar do grupo B+F apresenta segundo menor valor dentro da variável. Aos 60 dias, o grupo C apresentou diferença estatística em relação ao grupo B (Cvs.B, $p=0.0374$), os demais grupos não apresentaram diferença estatística, apenas o grupo B apresentou diferença estatística significativa dentro da análise intragrupo (B30vs.B60, $p=0.0313$) (Figura 20).

Figura 20 - Valor máximo e mínimo, mediana, 1º e 3º quartil da Medida Linear Central (MC) em mm



Legenda: Diferença estatística significativa intragrupo e intergrupo para Grupo B (*), intergrupo para Grupo F (#).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar através de análise histomorfométrica a reparação óssea de defeitos de tamanho crítico em ratos tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino e fibrina rica em plaquetas.

Aos 30 e 60 dias, dentro da variável de proporção de neoformação óssea (AN%) pôde-se constatar que não houve diferença estatística significativa entre as modalidades de tratamento aplicadas, apesar disso, aos 30 dias, é possível observar que os maiores valores de quartil, mediana e valores máximo e mínimo se concentram no grupo F, já aos 60 dias, os maiores valores são apresentados pelo grupo B, seguido pelo grupo B+F. Em estudos anteriores, a associação do Bio-Oss® com FRP apresentou resultados superiores em relação aos grupos de tratamentos individuais no período de 30 dias quando comparada a proporção de neoformação óssea (do Lago et al., 2020; Oliveira et al., 2015). Contudo, o resultado apresentado pelo presente estudo é justificável, uma vez que o FRP libera maior quantidade de fatores de crescimento nos primeiros 28 dias (Khang et al., 2011), e que em defeitos preenchidos com Bio-Oss®, maior quantidade de formação óssea é observada com períodos mais longos de acompanhamento (Oliveira et al., 2015), além disso, não há evidências demonstrando que a membrana de FRP pode manter o espaço para a regeneração tecidual por períodos suficientes, por conta da sua rápida degradação (Kawase et al., 2015).

Oliveira et al. (2015) e do Lago et al. (2020) concluíram que o Bio-Oss® associado à FRP apresenta maior proporção de neoformação óssea em relação ao uso da membrana isolada, o que diverge dos resultados do presente estudo, uma vez que não foi encontrada diferença estatística na comparação entre os grupos F e B+F. Essa divergência de resultados pode ser justificada devido à diferença nas formas de utilização da fibrina, enquanto Oliveira et al. (2015) e

do Lago et al. (2020) utilizaram FRP como material de preenchimento misturado ao biomaterial, o presente estudo utilizou a fibrina como uma membrana, apenas recobrando a região do defeito cirúrgico.

Histologicamente foi observado certa disparidade com relação a presença das partículas ou de seus espaços remanescentes dentro do defeito cirúrgico entre os espécimes do grupo B e grupo B+F, enquanto as partículas no grupo B eram escassas, no grupo B+F a presença do biomaterial dentro do defeito era recorrente, sugerindo que a membrana de FRP poderia atuar como mantenedora das partículas dentro do defeito. Ondur et al. (2020) concluíram que a utilização da FRP misturada ao biomaterial e como membrana, fornece um padrão de regeneração óssea semelhante em comparação com o uso do biomaterial em combinação com uma membrana de colágeno, além disso, o uso da FRP pode ser preferido devido à sua origem autógena, ser mais barato do que a membrana de colágeno e fácil de usar.

Com relação à variável de proporção da área de neoformação óssea lamelar (ANL%), aos 30 dias, o grupo F apresentou melhor desempenho que o grupo B, enquanto, os grupos restantes se apresentaram semelhantes estatisticamente. Já aos 60 dias, não houve diferença estatística significativa entre as modalidades de tratamento. Esse dado pode ser explicado pelo fato da liberação de fatores de crescimento pela fibrina ocorrer de forma lenta e gradual (Wu et al., 2012; Zhang et al., 2012), acontecendo entre a primeira semana até 28 dias após sua aplicação (Kang et al., 2011). Essa liberação de fatores de crescimento no período inicial tem grande influência no processo de reparação óssea, uma vez que os fatores de crescimento presentes na FRP, como fator de crescimento derivado de plaquetas, fator transformador de crescimento, fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento fibroblástico e fator de crescimento epitelial, durante o processo de cicatrização são conhecidos por promover angiogênese, além de contribuir para a síntese da matriz,

diferenciação celular, e formação de novo osso por meio de osteoblastos (Choukroun et al., 2006; Dohan et al., 2006; Dohan Ehrenfest et al., 2009; Nagareddy et al., 2006).

Com relação à proporção da área de neoformação óssea intramembranosa (ANI%), aos 30 e 60 dias, os grupos de tratamento apresentaram resultados estatísticos semelhantes, porém, é possível observar que aos 30 dias os grupos B e F apresentaram melhores valores, já aos 60 dias o grupo B se mantém com bom desempenho e o B+F tem uma melhora dentro da variável. Esses dados podem estar associados com a capacidade do Bio-Oss® de atuar como um *scaffold*, mantendo espaço viável para a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação óssea, como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos (do Lago et al., 2020), tendo uma influência positiva para neoformação óssea localizada na região central do defeito cirúrgico.

Pela microscopia de varredura o Bio-Oss® mostra macrotopografia com macroporos interconectados com nanoestruturas pontilhadas, feitas de grânulos com um tamanho de quase 50–100 nm de diâmetro; a presença dessas micro e nanoestruturas são importantes devido ao aumento da área de superfície, que auxilia na adsorção de fatores de crescimento e proteínas que podem desencadear nova formação óssea (Fan et al., 2018), o que justificaria os dados aqui apresentados, o Bio-Oss® atua de forma assertiva perante os processos de neoformação e remodelação óssea, assim como sua ação osteocondutora que possibilita a manutenção da arquitetura do osso original.

Os resultados das variáveis ANL e ANI estão parcialmente de acordo com estudo realizado por Oliveira et al. (2015), uma vez que nenhum biomaterial realizou o completo fechamento da ferida aos 60 dias, e a área de neoformação óssea se encontrava concentrada próxima às bordas dos defeitos

cirúrgicos e se estendiam para região central, justificável pela presença de aporte sanguíneo proveniente do osso medular nativo (Rasouli Ghahroudi et al., 2014).

A variável linear da medida central (MC mm) determina a distância remanescente entre as bordas de osso neoformado, isso nos possibilita avaliar o fechamento dos defeitos cirúrgicos. No presente estudo é possível observar que o grupo controle foi o que obteve pior desempenho neste parâmetro; ao todo, os tratamentos aplicados mostraram potencial ação para o fechamento do defeito, sendo o grupo F destaque aos 30 dias e o grupo B aos 60 dias. Apesar disso, nenhuma modalidade de tratamento obteve completo fechamento do defeito ao final do estudo. A capacidade do Bio-Oss® de atuar no fechamento do defeito já foi relatada previamente (Torquato et al., 2021).

Os dados apresentados pelo presente estudo devem ser analisados com atenção, uma vez que o mesmo possui algumas limitações. Uma das limitações seria a ausência de um período de observação inicial, próximo aos 15 dias após a cirurgia, uma vez que essa análise poderia fornecer dados importantes sobre o início da reparação de todos os grupos do estudo, especialmente a fibrina. Para este estudo os períodos de observação escolhidos possibilitaram a análise da capacidade de reparação óssea em defeitos ósseos a longo prazo, e foi constatado, apesar de suas limitações, que assim como no estudo de Oliveira et al. (2015), o Bio-Oss® apresentou significativa neoformação óssea após 60 dias. Outra limitação do estudo seria a ausência dos dados imunológicos, que podem esclarecer alguns eventos do processo de neoformação e remodelação óssea, espera-se que com estes dados alguns resultados sejam evidenciados e/ou justificados. Além disso, o preparo da fibrina rica em plaquetas pode ter grande influência nos resultados, e torna a comparação entre estudos desafiadora, uma vez que há na literatura uma considerável variação na forma de obtenção da fibrina, assim como nos períodos de observação e modelos de animais utilizados.

Deste modo, mais estudos devem ser realizados a fim de investigar a capacidade de reparação óssea dos biomateriais, com períodos de análise diferentes, e com análise de biomarcadores de formação óssea, desse modo, podendo estabelecer transposição dos resultados para a futura prática clínica.

6 CONCLUSÃO

Considerando a metodologia proposta, o período de avaliação e os resultados obtidos neste estudo, pôde-se concluir por meio da estatística descritiva, que a fibrina rica em plaquetas tem ação positiva para o processo inicial de reparação e neoformação óssea. Enquanto, a associação do xenoenxerto Bio-Oss® com a fibrina rica em plaquetas parece estar mais relacionada à manutenção da arquitetura de neoformação óssea. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esse achado.

REFERÊNCIAS*

Awadeen MA, Al-Belasy FA, Ameen LE, Helal ME, Grawish ME. Early therapeutic effect of platelet-rich fibrin combined with allogeneic bone marrow-derived stem cells on rats' critical-sized mandibular defects. *World J Stem Cells*. 2020;12(1):55-69.

Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V, et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):7922. PMID: 26221349.

Bow A, Anderson DE, Dhar M. Commercially available bone graft substitutes: the impact of origin and processing on graft functionality. *Drug Metab Rev*. 2019;51(4):533-44. doi:10.1080/03602532.2019.1671860.

Calixto JC, Lima CEV de C, Frederico L, Lima RP dos S de C, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011;39(3):215–20. doi: 10.1016/j.jcms.2010.03.009. PMID: 20456964.

Chaushu G, Mardinger O, Calderon S, Moses O, Nissan J. The use of cancellous block allograft for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the posterior atrophic maxilla. *J Periodontol*. 2009;80(3):422–8. doi: 10.1902/jop.2009.080451. PMID: 19254126.

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;101:56–60.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):e45–50. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.009. PMID: 16504850.

Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009a;108(3):341–52. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.04.020.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009b;27(3):158–67. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009. PMID: 19187989.

Do Lago ES, Ferreira S, Garcia Jr IR, Okamoto R, Mariano RC. Improvement of bone repair with l-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig.* 2020; 24:1637–50. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03018-4>.

Elgali I, Igawa K, Palmquist A, Lennerås M, Xia W, Choi S, et al. Molecular and structural patterns of bone regeneration in surgically created defects containing bone substitutes. *Biomaterials.* 2014 Mar;35(10):3229-42. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.084. Epub 2014 Jan15.

Fan YP, Lu JF, Xu AT, He FM. Physiochemical characterization and biological effect of anorganic bovine bone matrix and organic-containing bovine bone matrix in comparison with Bio-Oss in rabbits. *J Biomater Appl.* 2018 Oct;33(4):566-75. doi: 10.1177/0885328218804926.

Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX.* 2002;19(2):73–8. PMID: 12098013.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piattelli A. Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with anorganic bovine bone. *J Periodontol.* 2008;79(1):192–8. doi: 10.1902/jop.2008.070105. PMID: 18166111.

Kang YH, Jeon SH, Park, JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, et al. Platelet-rich fibrin is a biscallofold ans reservoir of growth factors for tissue regeneration. *J Tissue Eng.* 2011;17(3,4):349-59.

Karin NK, Mukunda KS, Raj TN, Lecturer S. Platelet concentrates: a promising innovation in dentistry. *J Dent Res.* 2011;2:50-61.

Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, et al. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2015;103(4): 825–31. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33262>.

Khouri RK, Brown DM, Kouksi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98(1):103–9. PMID: 8657761.

Klein GL. Insulin and bone: Recent developments. *World J Diabetes*. 2014;5(1):14. doi: 10.4239/wjd.v5.i1.14.

Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(5):493–507. doi: 10.1089/ten.TEB.2010.0035. PMID: 20334505.

Legiran S, Brandi ML. Bone mass regulation of leptin and postmenopausal osteoporosis with obesity. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2012;9(3):145–9. PMID: 23289027.

Li Y, Yang L, Zheng Z, Li Z, Deng T, Ren W, et al. Bio-Oss® modified by calcitonin gene-related peptide promotes osteogenesis in vitro. *Exp Ther Med*. 2017;14(5):4001–8. doi: 10.3892/etm.2017.5048. PMID: 29067095.

Loyola M, Ancoski T, Ramires MA, Mello F, Mello AMD. Enxertos ósseos autógenos e xenógenos como alternativa de manutenção do espaço alveolar. *Rev. G.est. Saúde* 2018;19(2): 8-18.

Mahajan M, Gupta MK, Bande C, Meshram V. Comparative evaluation of healing pattern after surgical excision of oral mucosal lesions by using platelet-rich fibrin (PRF) membrane and collagen membrane as grafting materials—a randomized clinical trial. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018;76(7):1469.e1-1469.e9. doi: 10.1016/j.joms.2018.02.031.

Messora 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 Dec;43(6):723-9.

Nacopoulos C, Dontas I, Lelovas P, Galanos A, Vesalas A-M, Raptou P, et al. Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft. *J Craniofac Surg*. 2014;25(6):2164–8. doi: 10.1097/SCS.0000000000001172. PMID: 25318438.

Nagata MJH, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messora MR, Bomfim SRM, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: A new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2013;121:6–14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013. PMID: 23474527.

Nagareddy PR, Lakshmana M. *Withania somnifera* improves bone calcification in calcium-deficient ovariectomized rats. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58: 513–19.

Oliveira MR, de Silva AC, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Mariano RC. 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*. 2015;44(5):649–55. doi: 10.1016/J.IJOM.2014.12.005.

Ondur E, Balcioglu NB, Tekkesin MS, Guzel O, Ersanli S. Effects of platelet-rich fibrin on hard tissue healing: A histomorphometric crossover trial in sheep. *Materials (Basel)*. 2020 Apr 4;13(7):1695. doi: 10.3390/ma13071695.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020. 18(7): e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Phurisat K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg*. 2013;41(8):e191-200. doi: 10.1016/j.jcms.2013.01.018. PMID: 23395296.

Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KAM, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro ALB, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: A double blind experimental study. *Lasers Med Sci*. 2014;29(3):925–32. doi: 10.1007/s10103-013-1403-5. PMID: 23996072.

Rather HA, Jhala D, Vasita R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Mater Sci Eng*. 2019; 103:15-31.

Shamsoddin E, Houshmand B, Golabgiran M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. *J Adv Pharm Technol Res*. 2019 Apr-Jun;10(2):46-50. doi: 10.4103/japtr.JAPTR_327_18. Review.

Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, Sbordone C, Guidetti F. Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(2):316–24. PMID: 19492648.

Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2013 May;24(5):576-85.

Springfield DS. Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. *Orthopedics*. 1992;15(10):1237–41. PMID: 1409132.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol*. 2003;30(7):636–43. PMID: 12834502.

Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Jun;15(3):315-24.

Torquato LC, Suárez EAC, Bernardo DV, Pinto ILR, Mantovani LO, Silva TIL, et al. Bone repair assessment of critical size defects in rats treated with mineralized bovine bone (Bio-Oss®) and photobiomodulation therapy: a histomorphometric and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci*. 2021 Jan 5. doi: 10.1007/s10103-020-03234-5. Online ahead of print. PMID: 33400010.

Windrichova J, Kucera R, Fuchsova R, Topolcan O, Fiala O, Svobodova J, et al. An assessment of novel biomarkers in bone metastatic disease using multiplex measurement and multivariate analysis. *Technol Cancer Res Treat*. 2018;17:1–7. doi: 10.1177/1533033818807466. PMID: 30343636.

Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increase cell attachment, proliferation and collagen – related protein expression of human osteoblasts. *Aust Dent. J*. 2012;57(2): 207-12.

Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with desproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation. A histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012 Jun;40(4):321-8. doi: 10.1016/j.jcms.2011.04.020. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21664828.

Zhao M, Zhou J, Li X, Fang T, Dai W, Yin W, et al. Repair of bone defect with vascularized tissueengineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits. *Microsurgery*. 2011;31(2):130-37.

APÊNDICES – Dissertação no formato de artigo para submissão para publicação na *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*

Bone repair evaluation of critical defects treated with bovine bone mineralized bone matrix (Bio-oss®) and platelet-rich fibrin: histomorphometric study in rats

Eduardo Antonio Chelin Suárez¹, Letícia Cavassini Torquato¹, Kauê Alberto Pereira¹, Clarissa Carvalho Martins Maciel¹, Maria Aparecida Neves Jardim², Mauro Pedrine Santamaria², Andréa Carvalho De Marco³

¹ Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology, Sao Jose dos Campos, SP, Brazil.

² Associated Professor, Department of Diagnosis and Surgery – Division of Periodontology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology, Sao Jose dos Campos, SP, Brazil.

³ Assistant Professor, Department of Diagnosis and Surgery – Division of Periodontology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology, Sao Jose dos Campos, SP, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR:

ANDRÉA CARVALHO DE MARCO

Av. Eng. Francisco José Longo, nº 777 - Jardim São Dimas, São José dos Campos – SP, Brazil,

ZIP CODE: 12245-000

Fone number: +55 (12) 3947-9323 / FAX: +55 (12) 3947-9010

andrea.marco@unesp.br / andreacdemarco@gmail.com

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the bone repair of critical size defects in rats treated with bovine bone matrix (Bio-Oss®) and platelet and leukocyte-rich fibrin (L-PRF) through histomorphometric analysis.

Material and Methods: Fifty-four adult rats (albinus, Wistar), 90 days old, were used. Two critical bone defects with 5mm of diameter were made in the calvaria. The animals were divided into 4 groups: C-Blood clot, B-Bio-Oss®, F-L-PRF, B+F-Bio-Oss®+L-PRF. Each group was subdivided in the observation periods of 30 and 60 days. All data were statistically analyzed, with a significance level of 5%.

Results: All groups presented similar results regards proportion of bone neoformation. At 30 days in the proportion of lamellar neoformation, GF showed statistically difference with GB (GBvs.GF, $p=0.0256$). Regarding the closure of the defect, at 30 days the FG showed difference to GC (GFvs.GC, $p=0.0374$) and at 60 days the GB showed difference to GC (GBvs.GC, $p=0.0374$).

Conclusion: Through descriptive statistics, it was possible to observe that FRP has positive action for the initial bone neoformation process. The association Bio-Oss and L-PRF seems to be related to the maintenance of the bone neoformation architecture. However, more studies are needed to confirm this finding.

Keyword: Platelet Rich Fibrin, Bone Regeneration, Biocompatible Materials

Introduction

Autogenous bone is recognized as the gold standard for bone grafting, providing osteogenic cells, extracellular matrix, and molecular signals for bone induction and differentiation (Khouri et al., 1996; Springfield, 1992). However, the removal of autogenous grafts implies a second donor surgical site and increases patient morbidity (Chaushu et al., 2009; Sbordone et al., 2009).

Ideally, bone substitute materials should have good bone integration, osteoinduction and long-term stability (Schmitt et al. 2013). One of the grafts that has been showing good results, together with good clinical documentation, is the Bio-Oss® xenograft (Geistlich Biomaterials GmbH), which consists of a bone mineral matrix of natural origin, porous and bovine, cortical or spongy (Iezzi et al., 2008; Stavropoulos et al., 2003). Its use offers

excellent compatibility with human bone matrix and stimulates osteogenesis, but xenograft bone particles are not resorbable (Li et al., 2017; Oliveira et al., 2015).

Platelet Rich Fibrin (PRF), described by Choukroun in 2001 is a platelet concentrate, classified as second generation, responsible for the following chains of events: increased collagen production, cell mitosis, angiogenesis, cell recruitment, induction of cell differentiation, among others. Having clinically observed properties with the use of PRF, such as promoting a better and faster repair of surgical wounds, having its application in oral and maxillofacial surgery (Borie et al., 2015; Dohan et al., 2006).

There are studies that describe the benefits of PRF when used as a sole graft material or combined with other bone substitutes, such as lyophilized bone, deproteinized bovine bone and autogenous bone, showing optimistic results (Nacopoulos et al., 2014; Pripatnanont et al., 2013). The junction of the osteoconductive function of bovine xenografts with PRF cytokines and growth factors shows promise in the attempt of bone growth (Oliveira et al., 2015).

Although positive effects of bovine bone matrix with PRF have been demonstrated on bone cell proliferation, the evidence for the therapeutic efficacy of this combination is still controversial (Dohan Ehrenfest et al., 2009b). Thus, the aim of this study is to evaluate through histomorphometric analysis the bone repair of critical defects in rats treated with bovine bone mineralized bone matrix and platelet-rich fibrin.

Materials and methods

Animals and experimental groups

This study was carried out in accordance with the Ethical Principles for Animal Experimentation, adopted by the National Council for Animal Experimentation – CONCEA, and approved by the Research Ethics Committee of the São José dos Campos Institute of Science and Technology/UNESP (nº 07/2019). The description of this work was done following the Animal Research guidelines: Reporting in vivo experiments – ARRIVE guidelines 2.0 (Percie du Sert et al., 2020). Fifty-four adult male rats (*Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar), 90 days old, weighing approximately 300g, supplied by the Central Animal Facility of Unesp – Campus de Botucatu-SP, were used. Rats were stored in appropriate cages and received *ad libitum* diet and water. Of the 54 animals, 06 were destined as blood donors for the preparation of Fibrin Rich Platelet (PRF); the other 48 rats were randomly divided into 4 groups: C – bone defect + blood clot, B – bone defect + Bio-Oss®, F – bone defect + PRF and B+F – bone defect + Bio-Oss® + PRF. Each group was subdivided according to observation periods of 30 and 60 days.

Anesthetic procedure

For surgery and euthanasia, the animals were anesthetized with a solution of 5mg/kg of 2-(2,6-xylidine)-5-6-dihydro-4H-1,3 thiazine hydrochloride (Anasedan – Bayer do Brasil) and 75-95mg/kg of ketamine base (Dopalen – Agribands do Brasil), intramuscularly. As

analgesic, a solution of 6mg/kg of Tramal (tramadol hydrochloride – Medley) was administered before surgery and followed every 24 hours for 5 days, orally.

Surgical procedure

A longitudinal incision was made in the skin, about 1 cm long, along the sagittal suture, exposing the calvaria.

On each side of the calvaria, two critical size bone defects with 5 mm in diameter were performed (Calixto et al., 2011; Nagata et al., 2013), using an electric motor that allows controlled speed at 800 RPM and one trephine drill under constant irrigation with sterile saline. Then, using a blade-shaped ultrasound tip (W1-0-CVDentus) in a piezosurgical device (DentSurg CVDentus São José, SP, Brazil) under constant irrigation, an “L”-shaped marking was made 2 mm from the edge of each defect in the place corresponding to its largest diameter, the marking was then filled with amalgam (Figure 1a). After this step, the designated treatment was applied.

The subcutaneous tissue and the skin were sutured with 4.0 silk thread and an anti-inflammatory analgesic medication was administered (Meloxicam 0.2% at a dose of 2mg/kg, subcutaneously every 24h for 3 days) and the Pentabiotic 0.01ml each 100g intramuscularly in a single dose) The day of surgery was defined as day zero.

Treatments

Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials GmbH) is a xenogeneic bone substitute, the granulation used in this study was 0.25-1.0 µm in diameter – 0.5g (Stavropoulos et al., 2003; Iezzi et al., 2008).

To obtain platelet-rich fibrin, the 6 animals initially foreseen were used as donors, as well as 10 animals from the research itself, prior to euthanasia. Blood collection was performed by intracardiac puncture with an animal properly anesthetized. The volume of blood extracted from each donor animal was 10 ml. Blood from each animal was processed for the production of PRF membranes according to the Choukroun protocol (Oliveira et al., 2015). Blood was collected in plastic tubes with silica (9ml) and immediately placed in a centrifuge (Kasvi-Brasil) where they were centrifuged for 12 minutes at a speed of 2500 rpm (Dohan et al. 2006 a and b).

After centrifugation, the tubes were removed from the centrifuge and placed in a support, from which the fibrin clots located in the central region of each tube were carefully removed. The PRF membrane, considered to be rich in growth factors, was used to fill the bone defects or as a membrana covering Bio-Oss® (Figure 1b e 1c). After blood donation the animals were euthanized.

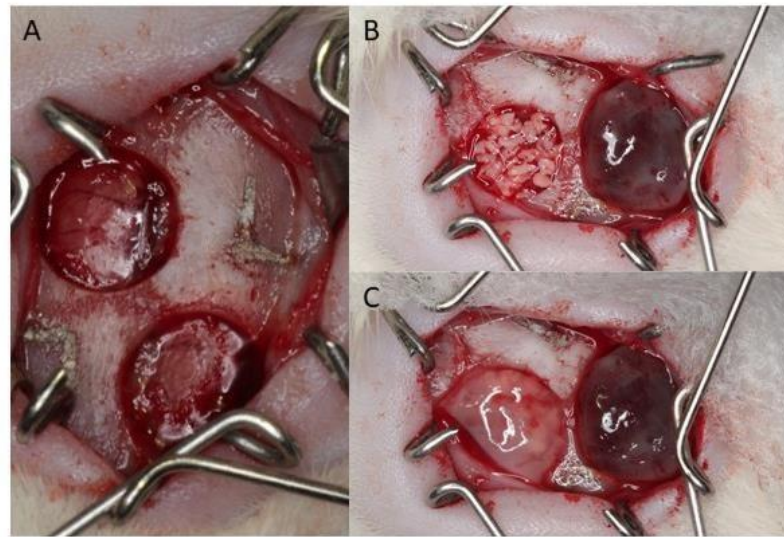


Figure 1: a) Two surgical defects with L-shape defect filled with amalgam photographs; b) Bone defect on the right filled with PRF (GF) and bone defect on the left filled with Bio-Oss® before covered with PRF; c) Bone defect on the left filled with Bio-Oss® and covered with PRF (GB+F).

Euthanasia

Animals were euthanized on its respective observation times of 30 and 60 days; for this, it was used a triple dose of anesthetic (mixture of ketamine and xylazine) indicated for surgical procedures, followed by decapitation to remove the calvaria.

Twenty-four specimens that followed for histomorphometric analysis were fixed in 10% formalin (n=6), while the other twenty-four specimens were followed for immunological analysis (n=3), covering periods of 30 and 60 days.

Histological and Histomorphometric Analysis

For histological and histomorphometric analyses, the operated area was fixed in 10% formalin for a maximum period of 48 hours. Each specimen has been catalogued. The decalcification process was made with 20% formic acid (Merck KGaA, in Darmstadt, Germany) for approximately seven days. After decalcification, specimens were embedded in paraffin.

Longitudinal cuts were performed on the 5µm thick pieces in a semi-serial way. In total, 10 slides were made from each specimen, then the sections were stained with hematoxylin-eosin and examined under light microscopy.

Three sections of each specimen were selected for image capture, the photos were taken using an Axiophot 2 light microscope (Carl Zeiss Oberkochen, Germany) coupled to an AxioCam MRc 5 digital camera (Carl Zeiss Oberkochen, Germany). A single examiner captured the images that received codes and were later analyzed by another examiner, allowing data to be blinded.

Histomorphometric analysis was performed by a single properly calibrated examiner. Histomorphometric analysis was performed using the computer program Axio Vision Release 4.7.2. The criterion used to standardize the analysis of digital images was to delimit the total area of the defect (in mm²) from the identification of the surgical edges on the right and left and the internal and external surfaces, the edges were identified by the difference between the neoformed bone and the original bone (Messora et al., 2008), this delimited area was

considered as 100%. Therefore, the areas of bone neoformation within the defects were calculated as a percentage of the total area, the areas corresponding to the particles of biomaterial remaining in the defect were not counted. Then, the following measurements were taken of the neoformation area (NA), the lamellar bone neoformation area (LBNA), the intramembranous bone neoformation area (IBNA) and the distance between neoformed bone edges (DBE-NB), these measurements were described previously (Torquato et al., 2021).

Immunological Analysis

At the time of euthanasia, the neoformed tissue corresponding to the inner area of the bone defect measuring 5 mm in diameter was collected. The samples were stored in sterile microtubes (24 samples) in a sterile tube and then stored in a freezer at -80°C until the time of performing the “Multiplex” assay. The level of the following markers will be measured: Osteoprotegerin (OPG), Insulin and Leptin. The high sensitivity kit (Millipore Corporation, MERCK, MA, USA) will be used according to the manufacturer's instructions. The samples will be analyzed using the Xponet program (Millipore Corporation).

Statistical analysis

The data obtained for the variables of proportion of bone neoformation (%) in AN, ANL and ANI, and the linear measurement variable (mm) in MC were submitted for an exploratory analysis, the data followed a non-parametric distribution, therefore, it was chosen the Kruskal-Wallis test was used as inferential statistics, followed by the Dunn test for multiple comparisons and the Wilcoxon signed-rank test, the value adopted for the confidence level was 5%. The tests were performed by MINITAB (Minitab, version 12.0, 1998) and GraphPAD PRISM (version 6, 2013) programs.

Results

All 48 rats followed the experiment period with good health status, 24 rats were referred for histomorphometric analysis and had their data collected. The other 24 rats will be sent for immunological analysis, the material is preserved in the freezer at -80°C, and their analyzes will be carried out in the coming months.

Descriptive histological analysis

Within 30 days after surgery, it was possible to observe the presence of bone neoformation in all specimens, generally concentrated in the regions close to the edges of the surgical defect (Figure 2a and 2c). In some specimens of group B-30 days, it is possible to visualize new bone formed between the spaces of the remaining particles of biomaterial (Figure 2b and 2e), in the group B+F, it is possible to observe new bone formed in a disorganized way beside and above the edge of the surgical defect, with blood vessels (Figure 2d).

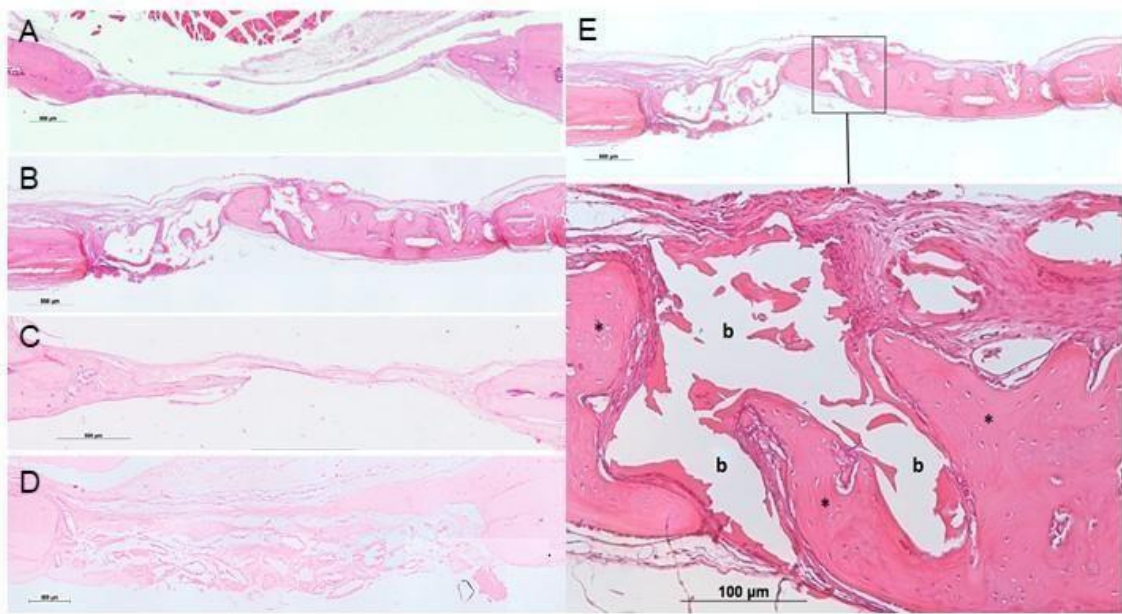


Figure 2: a) Photomicrographs of panoramic view of defects of group C-30 days, b) Photomicrographs of panoramic view of defects of group B-30 days, c) Photomicrographs of panoramic view of defects of group F-30 days, d) Photomicrographs of panoramic view of defects of group B+F-30 days, (hematoxylin and eosin stain, original magnification X5) e) Photomicrographs of specimen from Group B – 30 days; photomicrograph of neofomed bone (*) seen between the space occupied by the biomaterial particles (b) (hematoxylin and eosin stain, original magnification X10)

Within 60 days, most specimens had neoformation bone. In groups C and B, it was possible to notice a narrow band of newly formed bone along almost the entire length of the surgical defect, however thinner than the original bone of the calvaria. It was also possible to observe dense connective tissue and inflammatory infiltrate that extended throughout the surgical defect (Figure 3a and 3b). In specimens from group F – 60 days, it was possible to observe pronounced bone neoformation in some specimens, but concentrated in the region of the defect border (Figure 3c).

In specimens from Group B and Group B+F, it was possible to notice the presence of spaces that would be occupied by the biomaterial and/or residual particles of the biomaterial (Figure 3d, 3d and 3e).

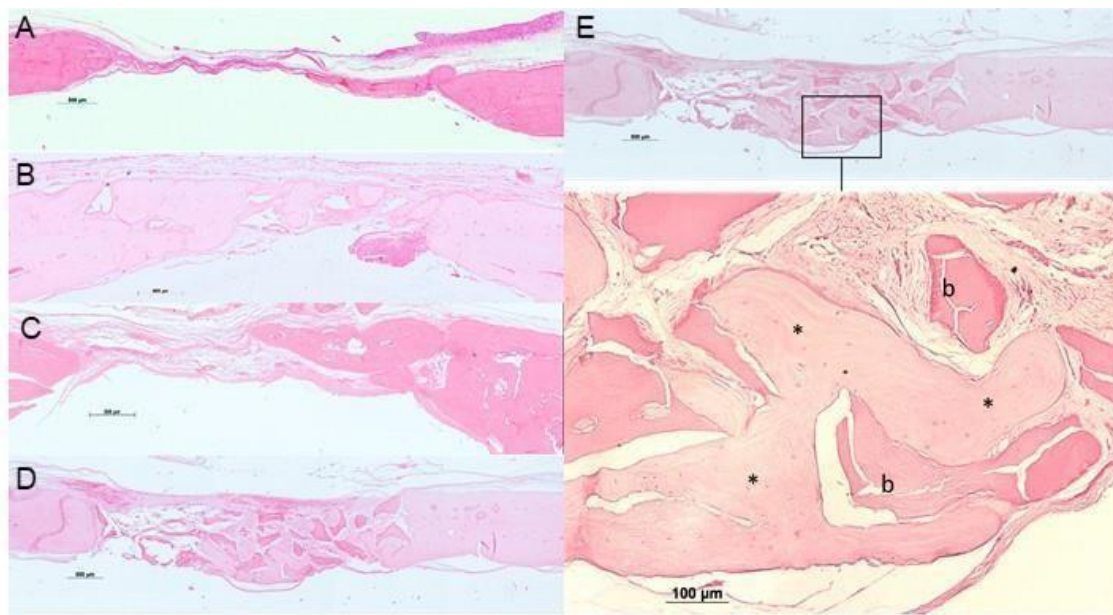


Figure 3: a) Photomicrographs of panoramic view of defects of group C-60 days, b) Photomicrographs of panoramic view of defects of group B-60 days, c) Photomicrographs of panoramic view of defects of group F-60 days, d) Photomicrographs of panoramic view of defects of group B+F-60 days, (hematoxylin and eosin stain, original magnification X5) e) Photomicrographs of specimen from Group B+F – 60 days; photomicrograph of neofomed bone (*) seen between the space occupied by the biomaterial particles (b) (hematoxylin and eosin stain, original magnification X10)

Histomorphometric analysis

In the measure of neoformation area (NA), at 30 and 60 days, there was no statistically significant difference between the applied treatment modalities. However, only group B showed a statistically significant difference in the intragroup comparison (B30vs.B60; $p=0.0313$) (Figure 4a).

Figure 14 – Maximum and minimum value, median and standard deviation of the Bone Neoformation Area (NA) in percentage.

In the measure of the proportion of the lamellar bone neoformation area (LBNA), at 30 days, group F showed a statistically significant difference relative to group B (Bvs.F, $p=0.0256$), while the remaining groups were statistically similar. At 60 days, there was no statistically significant difference between the treatment modalities. Only group B showed a statistically significant difference within the intragroup comparison (B30vs.B60, $p=0.0313$) with significant improvement within the variable (Figure 4b).

In the measure of the intramembranous bone neoformation area (IBNA), at 30 and 60 days, the treatment groups presented similar statistical results, there was no statistically significant difference in the intragroup or intergroup comparison (Figure 4c).

Regarding the variables obtained within the distance between neoformed bone edges (DBE-NB), at 30 days, group C presented a statistically significant difference to group F (Cvs.F, $p=0.0374$); which, in turn, presented itself as similar to groups B+F and B, although group B+F has the second lowest value within the variable. At 60 days, group C showed

statistical difference compared to group B (Cvs.B, $p=0.0374$), the other groups did not show statistical difference, only group B showed statistically significant difference within the intragroup analysis (B30vs.B60, $p=0.0313$) (Figure 4d).

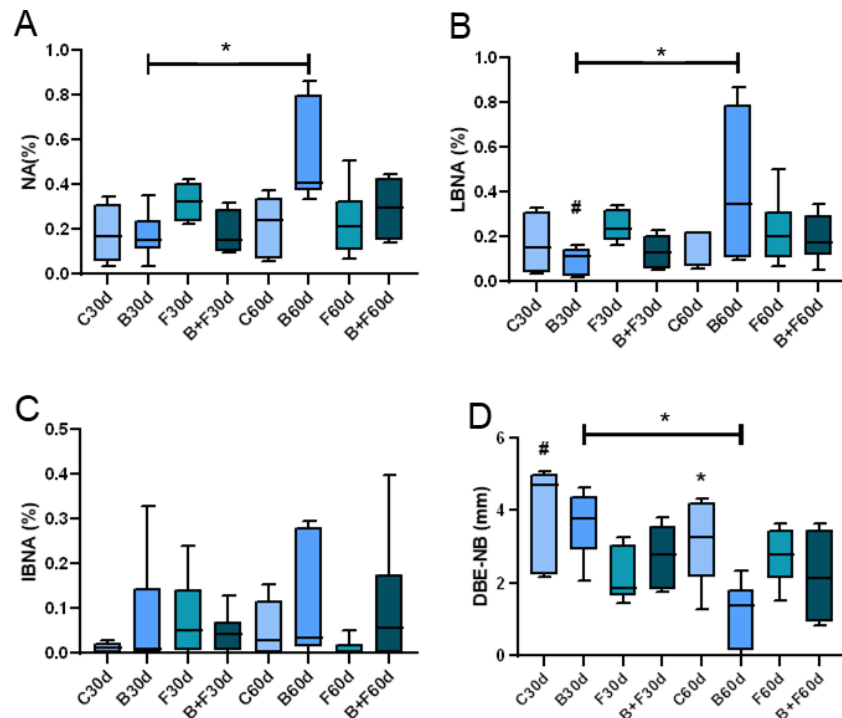


Figure 4: a) Maximum and minimum value, median and 1 and 3 quartiles of NA in percentage; b) Maximum and minimum value, median and 1 and 3 quartiles of LBNA in percentage; c) Maximum and minimum value, median and 1 and 3 quartiles of IBNA in percentage; c) Maximum and minimum value, median and 1 and 3 quartiles of DBE-NB in mm. Statistically significant intragroup and intergroup difference for GB (*), intergroup for FG (#). Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test for multiple comparisons and Wilcoxon signed-rank test, $p<0.05$.

Discussion

The aim of this study was to evaluate through histomorphometric analysis the bone repair of critical size defects in rats treated with bovine bone mineralized bone matrix and platelet-rich fibrin.

At 30 and 60 days, within the variable of proportion of bone neoformation (NA%) it was found that there was no statistically significant difference between the applied treatment modalities, although, at 30 days, it is possible to observe that the highest values of quartile, median and maximum and minimum values are concentrated in group F, whereas at 60 days, the highest values are presented by group B, followed by group B+F. In previous studies, the association of Bio-Oss® with FRP showed superior results compared to the individual treatment groups within a period of 30 days when compared to the proportion of bone neoformation (Oliveira et al., 2015; do Lago et al., 2020). However, the result presented by the present study is justifiable, since FRP releases a greater amount of growth factors in the first 28 days (Kang et al., 2011), and that in defects filled with Bio-Oss®, a greater amount of Bone formation is observed with longer periods of follow-up (Oliveira et al., 2015), in

addition, there is no evidence showing that the FRP membrane can maintain the space for tissue regeneration for sufficient periods, due to its rapid degradation (Kawase et al., 2015).

Oliveira et al. (2015) and do Lago et al. (2020) concluded that Bio-Oss® associated with FRP has a higher proportion of bone neoformation compared to the use of isolated membrane, which diverges from the results of the present study, since it does not statistical difference was found when comparing groups F and B+F. This divergence of results can be justified due to the difference in the ways of using fibrin, while Oliveira et al. (2015) and do Lago et al. (2020) used FRP as a filling material mixed with the biomaterial, the present study used fibrin as a membrane, just covering the region of the surgical defect.

Histologically, a certain disparity was observed regarding the presence of particles or their remaining spaces within the surgical defect between specimens in group B and group B+F, while particles in group B were scarce, in group B+F the presence of the biomaterial inside the defect was recurrent, suggesting that the FRP membrane could act as a maintainer of the particles inside the defect. Ondur et al. (2020) concluded that the use of FRP mixed with the biomaterial and as a membrane provides a similar bone regeneration pattern compared to the use of the biomaterial in combination with a collagen membrane, in addition to the use of FRP it may be preferred due to its autogenous origin, being cheaper than collagen membrane and easy to use.

Regarding the variable of proportion of the area of lamellar bone neoformation (ANL%), at 30 days, group F performed better than group B, while the remaining groups were statistically similar. At 60 days, there was no statistically significant difference between the treatment modalities. This data can be explained by the fact that the release of growth factors by fibrin occurs slowly and gradually (Zhang et al., 2012; Wu et al., 2012), taking place between the first week and 28 days after its application (Kang et al., 2011). This release of growth factors in the early period has a great influence on the bone repair process, since the growth factors present in FRP, such as platelet-derived growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor, factor of fibroblast growth and epithelial growth factor during the healing process are known to promote angiogenesis, in addition to contributing to matrix synthesis, cell differentiation, and new bone formation through osteoblasts (Choukroun et al., 2006; Dohan et al., 2006; Nagaredy et al., 2006; Dohan Ehrenfest et al., 2009).

Regarding the proportion of intramembranous bone neoformation area (ANI%), at 30 and 60 days, the treatment groups presented similar statistical results, however, it is possible to observe that at 30 days, groups B and F had better values, as compared to 60 days, group B keeps performing well and B+F has an improvement within the variable. These data may be associated with the ability of Bio-Oss® to act as a scaffold, maintaining a viable space for vascular infiltration and the internal migration of cellular elements involved in bone formation, such as undifferentiated mesenchymal cells, osteoblasts and osteoclasts (do Lago et al. al., 2020), having a positive influence on bone neoformation located in the central region of the surgical defect.

By scanning microscopy Bio-Oss® shows macrotopography with interconnected macropores with dotted nanostructures, made of granules with a size of almost 50–100 nm in diameter; the presence of these micro and nanostructures is important due to the increase in surface area, which helps in the adsorption of growth factors and proteins that can trigger new bone formation (Fan et al., 2018), which would justify the data presented here, the Bio-Oss® acts assertively in the face of bone neoformation and remodeling processes, as well as its osteoconductive action that enables the maintenance of the original bone architecture.

The results of the variables ANL and ANI are partially in agreement with the study carried out by Oliveira et al. (2015), since no biomaterial performed the complete wound closure after 60 days, and the area of bone neoformation was concentrated close to the edges

of the surgical defects and extended to the central region, justifiable by the presence of blood supply from the bone native spinal cord (Rasouli et al., 2014).

The linear variable of the central measure (MC mm) determines the remaining distance between the edges of the newly formed bone, which allows us to assess the closure of surgical defects. In the present study, it is possible to observe that the control group had the worst performance in this parameter; Overall, the treatments applied showed potential action to close the defect, with group F being highlighted at 30 days and group B at 60 days. Despite this, no treatment modality achieved complete closure of the defect at the end of the study. The ability of Bio-Oss® to act on defect closure has been previously reported (Torquato et al., 2021).

The data presented in this study should be carefully analyzed, as it has some limitations. One of the limitations would be the absence of an initial observation period, close to 15 days after surgery, as this analysis could provide important data on the beginning of repair in all study groups, especially fibrin. For this study, the observation periods chosen made it possible to analyze the bone repair capacity in bone defects in the long term, and it was found, despite its limitations, that, as in the study by Oliveira et al. (2015), Bio-Oss® showed significant bone neoformation after 60 days. Another limitation of the study would be the absence of immunological data, which can clarify some events in the process of bone neoformation and remodeling, it is expected that with these data some results will be evidenced and/or justified. In addition, the preparation of platelet-rich fibrin can have a great influence on the results, and makes the comparison between studies challenging, since there is considerable variation in the literature in the way fibrin is obtained, as well as in the observation periods and models of animals used.

Thus, further studies should be carried out in order to investigate the bone repair capacity of biomaterials, with different periods of analysis, and with analysis of bone formation biomarkers, thus, being able to establish transposition of the results for future clinical practice.

Conclusions

Considering the proposed methodology, the evaluation period and the results obtained in this study, it was possible to conclude, through descriptive statistics, that platelet-rich fibrin has a positive action for the initial process of bone repair and neoformation. Meanwhile, the association of Bio-Oss® xenograft with platelet-rich fibrin seems to be more related to the maintenance of the new bone formation architecture. However, more studies are needed to confirm this finding.

References

- Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V, et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):7922. PMID: 26221349.
- Calixto JC, Lima CEV de C, Frederico L, Lima RP dos S de C, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011;39(3):215–20. doi: 10.1016/j.jcms.2010.03.009. PMID: 20456964.
- Chaushu G, Mardinger O, Calderon S, Moses O, Nissan J. The Use of Cancellous Block Allograft for Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement in the Posterior Atrophic Maxilla. *J Periodontol*. 2009;80(3):422–8. doi: 10.1902/jop.2009.080451.

PMID: 19254126.

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: 56–60.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101(3):e45–50. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.009. PMID: 16504850.

Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2009a;108(3):341–52. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.04.020.

Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009b;27(3):158–67. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009. PMID: 19187989.

Do Lago ES, Ferreira S, Garcia Jr IR, Okamoto R, Mariano RC. Improvement of bone repair with L-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. *Clinical Oral Investigations* (2020) 24:1637–1650. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03018-4>.

Fan YP, Lu JF, Xu AT, He FM. Physiochemical characterization and biological effect of anorganic bovine bone matrix and organic-containing bovine bone matrix in comparison with Bio-Oss in rabbits. *J Biomater Appl.* 2018 Oct;33(4):566-575. doi: 10.1177/0885328218804926.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cirotti B, Piattelli A. Histologic Results From a Human Implant Retrieved Due to Fracture 5 Years After Insertion in a Sinus Augmented With Anorganic Bovine Bone. *J Periodontol.* 2008;79(1):192–8. doi: 10.1902/jop.2008.070105. PMID: 18166111.

Kang YH, Jeon SH, Park, JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, et al. Platelet-rich fibrin is a bioresorbable reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Engineering.* 2011; 17(3,4): 349-59.

Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials.* 2015; 103(4): 825–31. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33262>.

Khoury RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98(1):103–9. PMID: 8657761.

Li Y, Yang L, Zheng Z, Li Z, Deng T, Ren W, et al. Bio-Oss® modified by calcitonin gene-related peptide promotes osteogenesis in vitro. *Exp Ther Med.* 2017;14(5):4001–8. doi: 10.3892/etm.2017.5048. PMID: 29067095.

Messora MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, Deliberador TM, Bosco AF, Garcia VG, Fucini SE. 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 Dec;43(6):723-9.

Nacopoulos C, Dontas I, Lelovas P, Galanos A, Vesalas A-M, Raptou P, et al. Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft. *J Craniofac Surg.* 2014;25(6):2164–8. doi: 10.1097/SCS.0000000000001172. PMID: 25318438.

Nagata MJH, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messora MR, Bomfim SRM, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: A new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2013;121:6–14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013. PMID: 23474527.

Nagareddy PR, Lakshmana M. Withania somnifera improves bone calcification in calcium-deficient ovariectomized rats. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58: 513–519.

Oliveira M.R., de Silva AC, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Mariano RC. 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.* 2015;44(5):649–55. doi: 10.1016/J.IJOM.2014.12.005.

Ondur E, Balcioglu NB, Tekkesin MS, Guzel O, Ersanli S. Effects of Platelet-Rich Fibrin on Hard Tissue Healing: A Histomorphometric Crossover Trial in Sheep. *Materials (Basel).* 2020 Apr 4;13(7):1695. doi: 10.3390/ma13071695.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020. 18(7): e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Phurisat K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;41(8):e191-200. doi: 10.1016/j.jcms.2013.01.018. PMID: 23395296.

Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KAM, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro ALB, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: A double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2014;29(3):925–32. doi: 10.1007/s10103-013-1403-5. PMID: 23996072.

Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, Sbordone C, Guidetti F. Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(2):316–24. PMID: 19492648.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol.* 2003;30(7):636–43. PMID: 12834502.

Torquato LC, Suárez EAC, Bernardo DV, Pinto ILR, Mantovani LO, Silva TIL, Jardim MAN, Santamaria MP, De Marco AC. Bone repair assessment of critical size defects in rats

treated with mineralized bovine bone (Bio-Oss®) and photobiomodulation therapy: a histomorphometric and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci.* 2021 Jan 5. doi: 10.1007/s10103-020-03234-5. Online ahead of print. PMID: 33400010.

Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increase cell attachment, proliferation and collagen – related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal.* 2012; 57(2): 207-12.

Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with desproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation. A histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio Maxillofacial Surgery.* 2012; 40(4): 321-28.

– Estatística descritiva dos dados histomorfométricos

ESTATÍSTICA DESCRITIVA

PROPORÇÃO DA ÁREA DE NEOFORMAÇÃO (AN)

	C30	B30	F30	B+F30	C60	B60	F60	B+F60
Number of values	6	6	6	6	6	6	6	6
Minimum	0,03747	0,03371	0,2220	0,09485	0,05664	0,3369	0,06994	0,1426
25% Percentile	0,05674	0,1123	0,2347	0,1039	0,06869	0,3745	0,1091	0,1529
Median	0,1659	0,1526	0,3261	0,1549	0,2432	0,4094	0,2128	0,2979
75% Percentile	0,3148	0,2413	0,4060	0,2908	0,3413	0,8026	0,3272	0,4315
Maximum	0,3457	0,3547	0,4234	0,3212	0,3772	0,8633	0,5094	0,4490
Range	0,3082	0,3210	0,2014	0,2264	0,3205	0,5264	0,4395	0,3064
Mean	0,1804	0,1726	0,3228	0,1856	0,2204	0,5314	0,2323	0,2949
Std. Deviation	0,1244	0,1055	0,08282	0,09796	0,1318	0,2288	0,1545	0,1389
Std. Error of Mean	0,05079	0,04307	0,03381	0,03999	0,05380	0,09341	0,06309	0,05671

PROPORÇÃO DA ÁREA DE NEOFORMAÇÃO LAMELAR (ANL)

	C30d	B30d	F30d	B+F30d	C60d	B60d	F60d	B+F60d
Number of values	6	6	6	6	6	6	6	6
Minimum	0,03293	0,02023	0,1592	0,05061	0,05664	0,09265	0,06994	0,05176
25% Percentile	0,04139	0,02479	0,1838	0,05750	0,06869	0,1052	0,1091	0,1199
Median	0,1522	0,1107	0,2362	0,1276	0,2149	0,3441	0,1977	0,1718
75% Percentile	0,3096	0,1451	0,3198	0,2030	0,2242	0,7876	0,3091	0,2931
Maximum	0,3251	0,1642	0,3370	0,2304	0,2243	0,8633	0,4983	0,3441
Range	0,2922	0,1440	0,1778	0,1798	0,1676	0,7707	0,4284	0,2923
Mean	0,1685	0,09515	0,2458	0,1316	0,1679	0,4193	0,2220	0,1930
Std. Deviation	0,1245	0,06042	0,06866	0,07244	0,08042	0,3257	0,1496	0,1035
Std. Error of Mean	0,05083	0,02467	0,02803	0,02957	0,03283	0,1330	0,06107	0,04227

PROPORÇÃO DA ÁREA DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA INTRAMEMBRANOSA (ANI)

	C30d	B30d	F30d	B+F30d	C60d	B60d	F60d	B+F60d
Number of values	6	6	6	6	6	6	6	6
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25% Percentile	0,000	0,001991	0,008272	0,005603	0,000	0,01502	0,000	0,000
Median	0,01175	0,01041	0,05091	0,04266	0,02774	0,03313	0,000	0,05542
75% Percentile	0,02258	0,1464	0,1431	0,07153	0,1179	0,2819	0,02097	0,1766
Maximum	0,02861	0,3290	0,2411	0,1297	0,1529	0,2943	0,05066	0,3972

Range	0,02861	0,3290	0,2411	0,1297	0,1529	0,2943	0,05066	0,3972
Mean	0,01211	0,07301	0,07741	0,04577	0,05245	0,1097	0,01029	0,1019
Std. Deviation	0,01218	0,1295	0,08997	0,04642	0,06520	0,1374	0,02027	0,1508
Std. Error of Mean	0,00497						0,00827	
	1	0,05286	0,03673	0,01895	0,02662	0,05611	4	0,06156

MEDIDA LINEAR CENTRAL (MC)

	C30d	B30d	F30d	B+F30d	C60d	B60d	F60d	B+F60d
Number of values	6	6	6	6	6	6	6	6
Minimum	2,153	2,060	1,430	1,750	1,263	0,000	1,500	0,8170
25% Percentile	2,239	2,920	1,657	1,823	2,161	0,1500	2,145	0,9490
Median	4,690	3,775	1,865	2,774	3,265	1,380	2,790	2,140
75% Percentile	4,990	4,381	3,069	3,571	4,213	1,825	3,445	3,453
Maximum	5,080	4,633	3,253	3,813	4,320	2,350	3,640	3,633
Range	2,927	2,573	1,823	2,063	3,057	2,350	2,140	2,816
Mean	3,973	3,625	2,192	2,741	3,125	1,160	2,743	2,186
Std. Deviation	1,383	0,9559	0,7487	0,8740	1,157	0,9094	0,7627	1,198
Std. Error of Mean	0,5647	0,3903	0,3057	0,3568	0,4724	0,3713	0,3114	0,4890

ANEXO A -Certificado CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

 UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" Campus de São José dos Campos	 ICT Instituto de Ciência e Tecnologia UNESP	
--	---	--

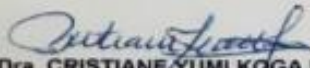


CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 07/2019, intitulado:- **"Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos tratados com matriz óssea mineralizada de osso bovino (Bio-Oss®) e fibrina rica em plaquetas. Estudo histomorfométrico em ratos.."** sob a responsabilidade de **ANDREA CARVALHO DE MARCO**, tendo como colaboradores:- **Maria Aparecida Neves Jardini, Mauro Pedrine Santamaria, Leticia Cavassini Torquato e Eduardo Antonio Chelin Suárez;** e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 09/08/2019.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	10/08/2019 a 10/12/2020	
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar	
Nº de Animais	54 ratos	
Peso/Idade	90 dias /300 grs.	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP	

São José dos Campos, 09 de agosto de 2019



Profa.Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora em exercício

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
 CEP: 12201-970 – F: (12) 3947-9028 / 9076
 Fax: (12) 3947-9010 / gusloes@fosjc.unesp.br / komori@fosjc.unesp.br