

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

André Hergesel de Oliva

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS
EM DEFEITO CRÍTICO CIRURGICAMENTE CRIADO EM
CALOTA DE RATOS INDUZIDOS À HIPERCOLESTEROLEMIA
TRATADOS OU NÃO COM ATORVASTATINA**

Araçatuba – SP

2018

André Hergesel de Oliva

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS
EM DEFEITO CRÍTICO CIRURGICAMENTE CRIADO EM
CALOTA DE RATOS INDUZIDOS À HIPERCOLESTEROLEMIA
TRATADOS OU NÃO COM ATORVASTATINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do
Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de
concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Facial).

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho

Coorientação: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba – SP

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48a Oliva, André Hergesel de.
Avaliação do papel da fibrina rica em plaquetas em defeito crítico cirurgicamente criado em calota de ratos induzidos à hipercolesterolemia tratados ou não com atorvastatina / André Hergesel de Oliva.– Araçatuba, 2018
47 f. : il.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Osvaldo Magro Filho

Coorientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Hipercolesterolemia 2. Atorvastatina cálcica 3. Regeneração óssea 4. Plaquetas I. T.

Black D7

CDD 617.6

Claudio Hideo MatsumotoCRB-8/5550

Dedicatória

À Deus,

O nosso Pai celestial. Ele que nunca deixa seus filhos desamparados. Toda honra e glória ao Senhor. Mesmo nos momentos mais nebulosos, difíceis, eu pude sentir Sua presença como um alicerce forte que nunca me deixou desabar. Obrigado meu Deus, meu Senhor, meu Pai, que sempre me acompanhou na jornada de vida, dando-me suporte físico, emocional, psicológico para encarar o que o mundo nos proporciona. Nunca duvidei do Seu Poder. Às vezes nas horas mais complicadas, Deus testa nossa fé, mas Ele nunca nos deixa sós. Todos os meus anseios profissionais e pessoais são Tua vontade meu Deus.

Aos meus pais Leonel de Oliva e Solange Aparecida Hergesel

São a base e o suporte de tudo que posso agradecer hoje. São a ética, a perseverança e a moralidade que quero almejar um dia. São mais que pais, são amigos que sempre lutam e lutarão ao meu lado e, podem ter certeza, também estarei ao lado de vocês. É impossível transmitir a gratidão com palavras em um texto, um agradecimento expresso em palavras não alcança a transcendência do sentimento.

Aos meus avós Antônio e Rosette (*in memoriam*) e Luiz e Aparecida

Além de avós, são amigos e conselheiros. Pessoas que admiro muito e que são meus segundos pais neste mundo. Muito obrigado pelos ensinamentos que não estão presentes nos livros, mas àqueles que aprendemos com a vida. Exemplos de seres humanos, pacatos, tranquilos e serenos, que transmitem amor e carinho na medida certa. Amo vocês!

Agradecimentos

Meu real agradecimento a todos que foram responsáveis por fazer deste trabalho hoje uma realidade.

Ao meu Orientador Professor **Oswaldo Magro Filho** pela oportunidade e pelos conhecimentos compartilhados,,

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

A **Professora Roberta Okamoto** pela paciência, orientação , humanidade e profundo conhecimento compartilhado,

Ao **Professor André Fabris**, pela amizade, humildade, companherismo, disponibilidade a oportunidade do meu primeiro contato com a traumatologia bucomaxilofacial,

A Professora **Marisa Akemi Matsumoto** que além da ciência me ensina também a perseverança, dedicação, respeito e humildade,

À **todos os funcionários** que permitiram, através de seus esforços diários, que hoje este trabalho e toda a minha graduação tenham sido concluídos com êxito e sucesso,

Aos demais professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - **UNESP**, de outras áreas, em que pude ter contato e aprender sempre mais.

Ao Sr. Arnaldo, pela ajuda indispensável e reconhecidamente árdua para que prestou a mim e à todos os alunos com dedicação e vontade,

Aos funcionários do serviço técnico do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Renato, Paulo, Marco, Odair, Dirce, Gilmar, Cleide, Tina, Joílson e Arnaldo** e todos aqueles que tive o prazer de conhecer e conviver.

Obrigado pelo suporte e carinho.

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação, **Valéria, Cristiane e Lilian**, pela paciência e ajuda constante e disponibilidade ágil.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – **UNESP**, pelos cuidados e carinho que possuem com todos.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – **UNESP**, sempre tratando a todos, e não somente a mim, com muito esmero e altruísmo.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos da pós-graduação **Gustavo Momesso, Valthierre Nunes, João Paulo Bonardi, Pedro Henrique,**

Leonardo Freitas, Erick Neiva, Fábio Batista, Gabriel Mulinari, Ciro Duailibe,
Rodrigo Pereira, William Ricardo, Sabrina Ferreira, Tarik Polo, Juliana Zorzi,
Raquel, Lara Cerevantes, Luara Colombo, Cassio Beija-flor, Thiago
machado, Laís e a todos os outros pelos momentos compartilhados,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pela
possibilidade de realizar um sonho de fazer pós-graduação. Obrigado pelo
incentivo e obrigado mais ainda por ter feito parte do meu crescimento
como um todo.

Aos meus Pais por sempre fazerem o que estava em seu alcance ou além
dele para que me fosse possível crescer, por me darem amor, por sempre me
darem apoio, por sempre me darem suporte e por terem acreditado em mim,
E por fim a **Deus**, por ter sido sempre benevolente à mim.

Obrigado!

Epígrafe

“Diante da noite, não acuse as trevas. Aprenda a fazer lume.”

-Chico Xavier

Oliva AH. Avaliação do papel da fibrina rica em plaquetas em defeito crítico cirurgicamente criado em calota de ratos induzidos à hipercolesterolemia tratados ou não com atorvastatina [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

Resumo

Objetivos: avaliar a ação da membrana de fibrina rica em plaquetas, na reparação óssea, em defeito crítico de calota de ratos induzidos à hipercolesterolemia, bem como a atuação do tratamento de atorvastatina nesse processo

Materiais e método: 40 defeitos críticos de 6 mm de diâmetro foram criados em calotas cranianas de ratos. Cada defeito foi aleatoriamente dividido em 8 grupos experimentais (GC, GCPRF, GCA, GCH, GHA, GPRFA, GPRFH, GPRFHA), avaliados aos 28 dias pós-operatórios com análises histológica e microtomográfica.

Resultados: Os resultados mostraram que houve formação óssea em todos os grupos analisados. O grupo GPRFH apresentou formação óssea mais acentuada com relação aos demais grupos. Dos grupos em que foi administrado atorvastatina, o GPRFHA apresentou maior taxa de formação óssea ($p < 0,05$).

Conclusão: Com a metodologia utilizada, a fibrina rica em plaquetas, quando associada à condição de hipercolesterolemia, induziu ao aumento da formação óssea.

Relevância clínica: Baseado nestes resultados, é necessário desvendar os mecanismos da associação da fibrina rica em plaquetas quando sob condição de hipercolesterolemia, tanto quanto à sua microestrutura, quanto à sua biossinalização óssea, para conferir previsibilidade clínica em pacientes nessa condição que serão submetidos à reconstruções ósseas e reabilitações com implantes.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia, Atorvastatina cálcica, regeneração óssea, plaquetas.

Oliva AH. Evaluation of the role of Platelet Rich Fibrin in surgical critical-size calvarial defect in rats with diet-induced hypercholesterolemia treated or not with atorvastatin [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2018.

Abstract

Objectives: The aim of this study was to evaluate the efficacy of Platelet Rich Fibrin (PRF) in the healing process of surgically created critical-size defects in rat calvarial induced to hypercholesterolemia treated or not with atorvastatin.

Materials and method: 40 critical defects were created with 6 mm diameter calvaria of rats. Each defect was randomly divided into eight experimental groups (GC, GCPRF, GCA, GCH, GHA, GPRFA, GPRFH, GPRFHA), evaluated at 28 postoperative days for histomorphometry and microtomography.

Results: The results showed new bone formation in all groups. The GPRFH group just did differ from all groups in the new bone formation ($p < 0.05$). Among the groups treated with atorvastatin, the GPRFHA group showed the highest bone formation rate.

Conclusion: With the methodology used, the platelet-rich fibrin associated with the hypercholesterolemia induced to new bone formation.

Clinical relevance: Based on these results, it is necessary to unveil the mechanisms of the association of platelet-rich fibrin with hypercholesterolemia and how it interferes in PRF microstructure and bone regeneration, to confer clinical predictability in patients in this condition who will undergo bone reconstruction and implant rehabilitation.

Keywords: Hypercholesterolemia, Atorvastatin calcium, bone regeneration, platelets.

Lista de figuras

Figura 1.....	36
Figura 2.....	37
Figura 3.....	38
Figura 4.....	38
Figura 5.....	39
Figura 6.....	40
Figura 7.....	40
Figura 8.....	41
Ilustrações da fase cirúrgica.....	46
Suplemento de imagens da análise histológica.....	48
Ilustração das reconstruções em 3 dimensões das Microtomografias Computadorizadas.....	49

Lista de Abreviaturas

FRP = Fibrina Rica em Plaquetas
PRF= Platelet-Rich Fibrin
PRP= Plasma Rico em Plaquetas
BMP-2= Proteína morfogenética óssea-2
OCN= Osteocalcina
VEGF= Fator de crescimento de endotélio vascular
MicroCT= Microtomografia Computadorizada
HE= Hematoxilina e Eosina
DMO= Densidade Mineral Óssea
BV/TV = Percentual de volume ósseo
Tb.Th = Espessura trabecular óssea
Tb.N = Número de trabéculas
Tb.Sp = Separação entre as trabéculas
mg/kg/dia - Miligrama por quilograma por dia
EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
g = grama
h = horas
HE = hematoxicilina e eosina
mg = miligrama
ml = mililitro
mm = milímetro
mm³= Milímetros cúbicos
OC = osteocalcina
pH = potencial hidrogeniônico
RUNX-2 = fator de transcrição
TRAP = fosfatase ácida tartarato resistente
UI = unidade internacional
Kv - Quilovolt
°C = graus Celsius
% = por cento
µm = micrômetro
GC = Grupo Coágulo
GCPRF= Grupo coágulo com aplicação de fibrina rica em plaquetas
GCA= Grupo coágulo tratado com atorvastatina
GCH= Grupo coágulo induzido à hipercolesterolemia
GHA= Grupo induzido à hipercolesterolemia tratado com atorvastatina
GPRFA= Grupo aplicação de PRF tratado com atorvastatina
GPRFH= Grupo aplicação de PRF induzido à hipercolesterolemia
GPRFHA= Grupo aplicação de PRF induzido à hipercolesterolemia tratado com atorvastatina

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAL E MÉTODO.....	15
2.01 Ética e desenho do estudo.....	15
2.02 Preparo da dieta e indução à hipercolesterolemia.....	16
2.03 Tratamento com Atorvastatina Cálcica.....	16
2.04 Preparo da fibrina rica em plaquetas.....	17
2.05 Procedimento cirúrgico.....	17
2.06 Análise Bioquímica.....	18
2.07 Processamento em parafina.....	18
2.08 Análise histológica.....	19
2.09 Análise microtomográfica.....	19
2.10 Análise Estatística.....	20
3 RESULTADOS.....	20
3.1 Análise bioquímica e massa corporal.....	20
3.2 Análise histológica.....	21
3.3 Análise microtomográfica.....	23
4 DISCUSSÃO.....	24
5 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
ANEXO A.....	42
ANEXO B.....	43
ANEXO C.....	46
ANEXO D.....	48
ANEXO E.....	49

1 INTRODUÇÃO

O efeito dos derivados plaquetários no processo de reparo tem sido motivo de estudo incessante há mais de 4 décadas [1, 2] e surgiu como uma alternativa terapêutica promissora para diversas áreas do conhecimento médico-odontológico, como cirurgia bucomaxilofacial, periodontia, ortopedia e dermatologia, pelo fato de suas características corroborarem para reparação tecidual. Diversos estudos [3, 4] foram desenvolvidos para verificar a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) na prática reconstrutiva odontológica. No entanto, ainda notam-se divergências e resultados conflitantes, sendo questionável seu efeito devido aos diversos protocolos de obtenção. [3-5]

Uma segunda geração de concentrados plaquetários, proposta recentemente por Choukroun em 2001, realizada através do preparo do sangue autólogo com centrifugação única e sem adição de antiagregantes plaquetários, vem sendo utilizada em trabalhos clínicos[6-9] e laboratoriais[10-13]. A centrifugação é obtida de acordo com o protocolo proposto por Choukroun, realizando a coleta sanguínea e, com auxílio do tubo de vidro de 10ml revestido de plástico estéril, é colocado na centrífuga à 3000 rpm durante 10 minutos para se alcançar 400G[14, 15]. Apesar de menor número, quando comparado com o PRP, os estudos elucidando os efeitos do PRF apresentam mais homogeneidade, com os indicadores convergindo-se à melhora da reparação tecidual e neoformação óssea com o uso do PRF [6]. Por causa de resultados encorajadores de vários estudos clínicos [11,12, 16-18], o número de pesquisas que visam elucidar as nuances envolvidas na utilização de plaquetas em seus pacientes vem crescendo satisfatoriamente[4].

A diferença de resultado do PRF comparado ao PRP pode ser justificada devido ao processamento do primeiro formar uma rede de fibrina complexa com encarceramento de células, plaquetas e componentes sanguíneos que são responsáveis pela liberação de

citocinas e fatores de crescimento de maneira mais lenta do que o PRP. A presença destes fatores nos primeiros momentos inflamatórios podem influenciar o processo de reparação do sítio ósseo afetado em condições ideais ou em organismos saudáveis [6, 19, 20, 21]

Os hábitos alimentares desequilibrados que a população tem se submetido, torna cada vez mais frequente as desordens metabólicas. Uma desordem metabólica muito evidente na atualidade é a hipercolesterolemia devido sua prevalência, que de acordo com a OMS, atinge 44,2% dos brasileiros e aproximadamente 39% da população mundial [22]. A hipercolesterolemia é uma alteração metabólica caracterizada pelo aumento dos níveis de colesterol sérico e apresenta como principais causas: distúrbios alimentares, intrínseca (genética), obesidade, diabetes e outras doenças[23,24]. Apesar de ainda haver controvérsias [25], a literatura tem discutido sobre a influência possivelmente negativa dessa condição no metabolismo ósseo, através da alteração do turnover e densidade mineral óssea [26-29]. A hipercolesterolemia também está associada à alterações nas funções, forma e disposição espacial plaquetárias, podendo provocar eventos de ativação e hiperagregabilidade[30, 31].

A classe medicamentosa de eleição para tratamento da hipercolesterolemia é a classe das estatinas, sendo composta, principalmente, por: sinvastatina, atorvastatina, lovastatina, pravastatina e rosuvastatina. Sua atuação se dá pela inibição da HMG-CoAredutase (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductase), coenzima que participa da biossíntese do colesterol [32]. A atorvastatina foi o medicamento mais vendido nos EUA em 2010, arrecadando mais de 7 bilhões de dólares [33]. Além de apresentar efeito hipolipemiante, são descritos efeitos como imunomodulação, anti-inflamatório, antioxidante e possivelmente osteogênico [34-38]. A osteogenicidade pode ser explicada pela estimulação da diferenciação osteoblástica e expressão da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), osteocalcina (OCN) e fator de crescimento de endotélio vascular

(VEGF)[36, 37, 38].

O PRF tem sido amplamente utilizado nas cirurgias reconstrutivas e de enxertia devido à sua aplicabilidade facilitada com relação ao PRP e bons resultados [3,4,5], da mesma forma, tem sido largamente estudada, porém, principalmente em organismos saudáveis ou condições ideais [6, 19, 20]. Na prática clínica, o paciente pode apresentar-se em desequilíbrio sistêmico ou com doença controlada. Foi demonstrado que a hipercolesterolemia é uma realidade clínica no cenário brasileiro e mundial [22] e exerce influência no tecido ósseo e plaquetas, matéria orgânica e constituinte do PRF [26-31]. Da mesma forma, as estatinas e sua atuação no tecido ósseo [36-38]. Porém não existem estudos que avaliem a eficácia do PRF no reparo ósseo sob a condição de hipercolesterolemia tratada ou não por estatinas.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.01 *Ética e desenho do estudo*

Após a aprovação do Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA nº 00527-2016) (Anexo A).

Foram utilizados para a realização deste estudo 40 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), adultos, com peso corporal entre 450 e 500g. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, os animais controle foram alimentados com ração sólida padrão e água “ad Libitum”, durante todo o experimento e, para a indução da hipercolesterolemia, os respectivos animais foram alimentados com dieta hipercalórica por 30 dias [39]. Os grupos tratados com atorvastatina cálcica (suspensão aquosa) receberam o medicamento por gavagem em concentração de 3,6mg/kg/dia [40], iniciando-se 3 dias antes do procedimento cirúrgico e administrado

até o dia da eutanásia. Os demais animais foram submetidos à gavagem com placebo (água milli-q). Os grupos estudados foram: [1] coágulo (GC); [2] coágulo + fibrina rica em plaquetas (GCPRF), [3] coágulo + atorvastatina 3,6mg/kg/dia via oral (GCA); [4] coágulo + hipercolesterolemia (GCH); [5] coágulo + hipercolesterolemia + atorvastatina 3,6mg/kg/dia, via oral (GHA); [6] coágulo + fibrina rica em plaquetas + atorvastatina 3,6mg/kg/dia, via oral (GPRFA) ; [7] coágulo + fibrina rica em plaquetas + hipercolesterolemia (GPRFH) [8] coágulo + fibrina rica em plaquetas + hipercolesterolemia + atorvastatina 3,6mg/kg/dia, via oral (GPRFHA).

2.02. Preparo da dieta e indução à hipercolesterolemia

O preparo da dieta hipercalórica foi realizado sendo moído, misturado e moldados os seguintes ingredientes e suas respectivas proporções: 15 gramas de ração padrão normocalórica, 10 gramas de amendoim moído, 10 gramas de chocolate ao leite e 5 gramas de bolacha de amido de milho. A dieta hipercalórica permaneceu por 30 dias para indução de hipercolesterolemia, como descrito no protocolo seguido.[41]

2.03. Tratamento com Atorvastatina Cálcica

Foi adotada a dose de 3,6 mg/kg/dia pois equivale a maior dose apresentada para humanos (80mg)[40]. Foi realizada a manipulação farmacêutica de atorvastatina cálcica trihidratada à 3,6 mg/kg/dia em veículo aquoso e agente suspensor (SyrSpend® SF, Fagron Inc.- Bélgica), para promover homogeneidade ao produto. Devido a quantidade reduzida de volume suportada pelo estômago do animal, a proporção foi ajustada para conter quantidade de soluto suficiente em 0,2ml. Desta forma, foi administrado em 2,16 mg/0,2ml, proporção referente a animais com 600g. O ajuste da dose foi realizado de acordo com o peso de cada animal, variando a quantidade em frações de mililitro a ser

administrada.

2.04. Preparo da Fibrina Rica em Plaquetas

O preparo da fibrina rica em plaquetas foi realizado de acordo com uma adaptação do protocolo de Dohan *et al.* [15]. Após a coleta de 1,5ml de sangue em tudo seco de 4ml, através de punção cardíaca imediatamente antes do procedimento cirúrgico, cada amostra coletada foi imediatamente centrifugada a 3000 rpm (400g) durante 10 minutos, a 22°C (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH., Wehingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Um coágulo de fibrina (PRF) foi obtido na porção intermediária do tubo, entre os corpúsculos vermelhos localizados na porção inferior e o plasma acelular (PPP), na porção superior do tubo. Este PPP foi, então, descartado e o PRF foi pinçado do interior do tubo e separado da porção de corpúsculos vermelhos com o uso de uma lâmina de bisturi número 15.

A membrana de PRF foi confeccionada e utilizada imediatamente após a centrifugação ter sido finalizada, para evitar que esta sofra retração. Desta forma, a membrana foi acomodada com o auxílio de uma pinça clínica, de modo a cobrir o defeito cirúrgico.

2.05 Procedimento cirúrgico

Após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (0,03 ml/100 g de peso corporal [pc] / intraperitoneal [ip]; Dopaser® Laboratórios Calier AS, Espanha) e ketamina (7 µl / kg pc / ip; Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brasil) via intramuscular. Além disso, receberam uma infiltração de solução anestésica local contendo cloridrato de mepivacaína (0,3 ml / kg, Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) para hemostasia do campo operatório. Em seguida foi realizada tricotomia e antissepsia da região da calota craniana, incisão e descolamento do

retalho total para a realização dos defeitos ósseos de tamanho crítico, obtidos por meio da utilização de uma broca trefina de 6 mm de diâmetro externo (3i ImplantInnovations, Inc., EUA). Cada defeito foi preenchido de acordo com o grupo a qual pertencia, como especificado anteriormente, e os tecidos moles devidamente reposicionados e suturados. No pós-operatório imediato, cada animal recebeu uma dose única de 24.000 UI de Penicilina G-Benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Brasil). Os animais foram submetidos à eutanásia aos 28 dias pós-operatórios por meio de sobredosagem anestésica.

2.06 Análise bioquímica

A coleta sanguínea foi realizada imediatamente após a eutanásia, sendo o sangue distribuído em tubos secos para realização dos parâmetros bioquímicos. Após a coagulação do sangue em tubo seco, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 3500 rpm (rotações por minuto) para a separação do soro. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através de analisador automatizado ABBOTT, modelo, ARCHITECT C 8000.

2.07 Processamento em parafina

As peças de interesse foram coletadas e fixadas em formol a 4%. Após três dias, foram colocadas em solução de EDTA a 18% para sofrerem o processo de descalcificação por aproximadamente seis semanas. Durante esta fase, as peças foram devidamente reduzidas, permanecendo apenas a região a ser analisada. Em seguida, foram desidratadas por uma sequência de álcoois e realizada a diafanização com xilol sendo incluídas em parafina posteriormente. Os blocos foram então cortados com um auxílio de micrótomo obtendo-se cortes com 5 μ m de espessura e montados em lâminas. As lâminas foram

coradas com hematoxilina e eosina (HE).

2.08 Análise histológica

As mensurações foram realizadas pela examinadora E. R. L. As lâminas coradas foram inspecionadas no microscópio óptico (Leica® DMLB, Suíça) e as áreas de interesse foram registradas por uma câmera de captação de imagem (Leica® DC 300F Microsystems Ltda., Suíça) acoplado ao microscópio e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Canadá). A análise se restringiu ao espaço compreendido entre as duas bordas do defeito ósseo.

2.09 Análise Microtomográfica

Ao término da etapa de fixação, as maxilas foram lavadas por 48 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%, a fim de serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (FOA/UNESP). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Alumínio de 0,15 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área de interesse para avaliação tridimensional (ROI circular de 6x6mm) e avaliação dos 20 slices começando

superiormente ao defeito e direcionando-se inferiormente. O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 31-153 tons de cinza, que possibilitará obter o volume de osso formado.

2.10 Análise estatística

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

3 RESULTADOS

3.1 Análise Bioquímica e massa corporal

A mensuração do colesterol sistêmico mostrou-se elevada nos grupos que receberam a dieta especial, com média de 96mg/dl para colesterolemia e 122mg/dl para triglicerídeos. Já os grupos controle apresentaram média de 60mg/dl para colesterolemia e 53mg/dl para triglicerídeos. Da mesma forma, a glicemia também foi mensurada com média de 130mg/dl para os animais submetidos à dieta especial hipercalórica e 95mg/dl. Tais dados demonstram que houve a indução de hipercolesterolemia e as médias da glicemia de todos os grupos estavam na faixa de normalidade [40].

A mensuração da massa corpórea dos animais foi realizada imediatamente antes do procedimento cirúrgico e imediatamente antes da eutanásia. Quando comparadas as

massas corporais dos animais nos momentos antes e depois descritos acima, constatou-se diferença estatística significativa do aumento das massas mensuradas de todos os grupos com administração da dieta hiperlipídica (tratados e não tratados com atorvastatina). O mesmo não ocorreu quando avaliada a diferença das massas corpóreas no momento antes e depois dos grupos controles sem administração da dieta hiperlipídica (tratados e não tratados com atorvastatina), que representa o ganho de massa de cada grupo. (Fig. 1)

3.2 Análise histológica

Grupo Coágulo (GC)

Observou-se ausência de tecido ósseo ao centro do defeito, sendo este preenchido principalmente por fina camada de tecido conjuntivo. De um modo geral, evidenciou-se formações ósseas próximas aos cotos do defeito cirúrgico, mas ainda com bastante tecido conjuntivo ao redor com predominância maior de fibroblastos em relação às células inflamatórias. (Fig. 2)

Grupo PRF (GCPRF)

Notou-se maior formação de tecido ósseo nas bordas do defeito e presença de ilhotas de tecido ósseo ao centro do defeito. O tecido conjuntivo apresentou-se principalmente como uma camada de média espessura que recobre todo o defeito. Não foi observado infiltrado inflamatório significativo. (Fig.2)

Grupo Coágulo + Atorvastatina (GCA)

Observou-se formação de tecido ósseo maduro de média espessura, e com abundância de vasos sanguíneos, próximo ao coto ósseo e adelgaçando-se próximo ao centro do defeito. Há formação óssea em quase toda a extensão do defeito, com exceção

de pequena área ao centro, sobreposta por tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo apresenta-se bastante celularizado e interpõe-se entre o osso formado no defeito e o coto ósseo. Não foi observado infiltrado inflamatório significativo. (Fig. 2)

Grupo Coágulo + Hipercolesterolemia (GCH)

Observou-se formação contínua e ilha de tecido ósseo maduro de média espessura bastante celularizado e com abundância de vasos sanguíneos, envolvendo praticamente todo o defeito. A espessura média não se altera significativamente ao longo do defeito. Não foi observado infiltrado inflamatório significativo. (Fig. 2)

Grupo Coágulo + Hipercolesterolemia + Atorvastatina (GHA)

Foi observado pequena formação óssea concentrada principalmente nas bordas do defeito, com projeção óssea delgada em direção ao centro do defeito. O tecido ósseo encontra-se bastante celularizado, com presença significativa de infiltrado inflamatório e, nas bordas do defeito, é possível observar áreas de reabsorção óssea, bem como presença de osteoclastos. (Fig. 2)

Grupo PRF + Atorvastatina (GPRFA)

Observou-se delgada formação óssea nas bordas do defeito com projeção óssea e ilhotas ósseas em direção ao centro do defeito. O tecido ósseo apresenta-se bastante celularizado e as bordas apresentam áreas de reabsorção óssea com infiltrado inflamatório presente. (Fig. 3)

Grupo PRF + Hipercolesterolemia (GPRFH)

Evidencia-se formação óssea de média espessura que se adelgaça em direção ao

centro do defeito e integrando quase a totalidade do defeito. Apresenta-se bastante celularizado e as bordas demonstram áreas de reabsorção e áreas preenchidas com tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório.(Fig. 3)

Grupo PRF + Hipercolesterolemia + Atorvastatina (GPRFHA)

Evidencia-se delgada formação de tecido ósseo nas bordas e ilhotas, também delgadas no defeito. Observa-se fina camada de tecido conjuntivo ao longo do defeito e ausência de infiltrado inflamatório.(Fig. 3)

3.3 Análise Microtomográfica

Das variáveis analisadas, foi obtida diferença estatística significativa entre os grupos propostos apenas no que se refere à porcentagem de volume ósseo (BV/TV) e espessura trabecular óssea (Tb,Th).

Quantitativamente, na avaliação microtomográfica referente à mensuração, dada em média, do volume ósseo (BV), no grupo GC foi de 2,64mm³, apresentando principal diferença numérica superior com os grupos GCPRFH, que apresentou 3,909mm³, e GCPRFHA, com 3,225mm³. E principal diferença numérica para inferior com o grupo GHA, que apresentou 1,209mm³, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Tukey test), como é apontado pelo gráfico (Figura 4). Na avaliação da porcentagem de volume ósseo (BV/TV) foi constatada, com diferença estatística significativa; que pode ser observado pelo gráfico (Figura 5) uma maior formação óssea no grupo GPRFH (41,58%), quando comparado com todos os demais grupos GC, GCPRF, GCA, GCH, GHA, GPRFA, GPRFHA. Da mesma forma, foi constatado que, dos grupos tratados com atorvastatina, o grupo GPRFHA (27,28%) apresentou diferença estatística significativa no aumento da formação óssea quando comparado com os demais

GCA (14,98%), GHA (10,23%), GPRFA (14,76%). A mensuração da formação óssea do grupo GHA (10,23%), se mostrou significativamente menor que os grupos GC, GCPRF, GPRFHA, GPRFH.

A espessura trabecular óssea (Tb.Th) mostrou diferença significativa nos grupos GCH ($0,176\text{mm}^3$) e GPRFA ($0,1761\text{mm}^3$), quando comparados com o grupo GCPRF ($0,1232\text{mm}^3$).(Fig. 6).

O número de trabéculas ósseas (Tb.N) e o espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos avaliados (Fig. 7 e Fig. 8)

4 DISCUSSÃO

Os hemoderivados mostraram-se como uma ferramenta adicional a ser utilizada no auxílio do reparo ósseo. A Fibrina Rica em Plaquetas, vêm sendo estudada ostensivamente e os resultados têm se mostrado favoráveis ao ganho de massa óssea. [11-12] Entretanto, sua efetividade tem sido relatada, principalmente quando em associação com algum material adjuvante,[13, 42] sendo que, quando aplicada sozinha, não apresenta resultado consensual na literatura para ganhos na formação óssea e apresentando divergências tanto em estudos realizados em animais[42] quanto em estudos clínicos[43]. Da mesma forma, o presente estudo não encontrou diferença significativa entre o grupo controle tratado com coágulo e do grupo com aplicação da membrana de fibrina rica em plaquetas sozinha.

A influência sistêmica e de fármacos sobre a fibrina rica em plaquetas e sua atuação não recebeu suficiente atenção da literatura, o que pode gerar imprevisibilidade na utilização da fibrina rica em plaquetas nesses casos. Como observado nos resultados do presente estudo, a aplicação da fibrina rica em plaquetas sob a condição de hipercolesterolemia (GPRFH) mostrou-se, quando comparado com todos os demais

grupos, como o grupo de maior ganho de massa óssea, evidenciado estatisticamente pelo significativo aumento da porcentagem de volume ósseo (BV/TV) e condizente com os achados histológicos. A correlação dos níveis séricos de colesterol com desordens sistêmicas como doenças cardiovasculares e osteoporose é evidente na literatura [26-29]. Apesar disso, a atuação e efeitos do colesterol e lipídeos no tecido ósseo ainda apresentam-se controversos: Se por um lado existem estudos que correlacionam negativamente a hipercolesterolemia à osteoporose [27-29], por outro, estudos clínicos sugerem uma correlação positiva entre o desequilíbrio lipídico sanguíneo e a densidade mineral óssea, evidenciando aumento da massa óssea nesses pacientes [43-46]. Da mesma forma, autores [44-48] ainda questionam sobre a existência de uma relação direta da hipercolesterolemia com a densidade mineral óssea ou se está relacionada à outros fatores como por exemplo ao estrogênio, uma vez que substancial parte das pesquisas clínicas que correlaciona densidade mineral óssea com perfil lipídico avalia pacientes do sexo feminino em diferentes períodos da menopausa [44-48]. Adami e colaboradores [46] avaliaram, em dois estudos clínicos de coorte, com um total de 982 pacientes, homens e mulheres, de um centro de tratamento e prevenção de osteoporose para verificar a relação da densidade mineral óssea e o perfil lipídico e observaram que quanto maior a proporção de LDL/HDL e de triglicerídeos dos pacientes avaliados, melhor a densidade mineral óssea. Da mesma forma, em outro estudo coorte, avaliando 289 pacientes do sexo masculino, evidenciou-se que há uma correlação positiva entre a hipercolesterolemia e a densidade mineral óssea [44].

De fato, estudos *in vitro* também já observaram o papel osteogênico do colesterol que atua através da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, atuando através da estimulação da síntese de BMP2 e induzindo a transcrição de RUNX2, estimulando a osteoblastogênese e o potencial osteogênico dos osteoblastos. [49].

Por outro lado, os animais que foram submetidos apenas à indução da hipercolesterolemia sem a aplicação da fibrina rica em plaquetas no defeito crítico ósseo confeccionado (GCH), não mostraram aumento da formação de massa óssea estatisticamente significativa, o que reforça que a hipótese que a hipercolesterolemia influencia positivamente na atuação da membrana de fibrina rica em plaquetas no reparo ósseo. Adicionalmente, é observado também que essa correlação positiva entre níveis séricos de colesterol e a fibrina rica em plaquetas acontece mesmo quando há o tratamento do animal com atorvastatina (GPRFHA). Observou-se que apesar dessa associação mostrar aumento da taxa de volume ósseo quando comparada aos grupos em que foi administrado o tratamento com atorvastatina (GCA, GHA e GPRFA), o tratamento com atorvastatina resultou em um déficit no aumento de massa óssea, quando comparamos com o grupo que apresenta também o PRF e a condição de hipercolesterolemia, porém não tratado com atorvastatina (GPRFH).

O tratamento com atorvastatina não influenciou no volume da formação óssea dos grupos analisados, porém observa-se que há um aumento significativo na espessura trabecular óssea ao associar o PRF com o tratamento de atorvastatina (GPRFA), quando comparado com o grupo não tratado com o medicamento (GCPRF). O fato da atorvastatina não ter promovido aumento da regeneração óssea converge semelhantemente ao tratamento com sinvastatina sob a administração oral em que foi demonstrado que, apesar de estimular o tecido ósseo no processo de remodelação [50], não apresenta influência no processo de regeneração óssea [51].

A elucidação da influência sistêmica oriunda de patologias e medicamentos, como a hipercolesterolemia e a atorvastatina, na eficácia da fibrina rica em plaquetas ainda necessita de mais estudos, uma vez que as próprias variáveis analisadas neste estudo (hipercolesterolemia e tratamento com atorvastatina) apresentam-se ainda em fase de

elucidação no que diz respeito à sua atuação no tecido ósseo através do delineamento proposto. De modo que próximos estudos devem objetivar o entendimento dos mecanismos bioquímicos, sinalizatórios e estruturais que podem atuar na composição do PRF e sua resposta biológica.

5 CONCLUSÃO

Com a metodologia empregada, a fibrina rica em plaquetas mostrou-se eficaz na formação óssea quando associada à condição de hipercolesterolemia, sendo que a atorvastatina, por via de administração oral, não apresentou influência direta na ação da membrana de fibrina rica em plaquetas no reparo do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

- 1- Day HJ, Ang A T & Holmes, H (1972) Platelet Release Reaction During Clotting of Native Human Platelet-Rich Plasma. *ExpBiol Med* 139: 717-721.
2. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl AcadSci* 71:1207–1210.
3. De Pascale MR, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C (2015) Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev.* 29(1):52-61.
4. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. (2012) Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(7):1231-56 .
5. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S (2011) Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 40(9):891-900.
6. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H (2009) A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 108(5):707-13.

7. Singh A, Kohli M, Gupta N (2012) Platelet rich fibrin: a novel approach for osseous regeneration. *J Maxillofac Oral Surg.* 11(4):430-4.

8. Sammartino G, DohanEhrenfest DM, Carile F, Tia M, Bucci P (2011) Prevention of hemorrhagic complications after dental extractions in open heart surgery patients under anticoagulant therapy: the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. *J Oral Implantol.* 37(6):681-90.

9. Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, et al. (2012) Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci.* 9(10):872-80

10. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. (2006) 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.* 101(3):e56-60.

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

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

13. Acar H, Yolcu Ü, Gül M, Keles, Erdem NF, ItundagKahraman S (2015) Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol.* 60(4):606-14.

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

15. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 101(3):e37-44.

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

17. . Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, et al. (2012) Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.* 13(7):1145-52.

18. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL (2006) et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 101(3):299-303.

19. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D (2015) Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. ClinOrthopRelat Res. 473(5):1635-43.

20. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, et al. (2015) Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. EurRevMedPharmacolSci. 19(6):927-30.

21. Ranganathan AT, Chandran CR. (2014) Platelet-rich fibrin in the treatment of periodontal bone defects. J ContempDentPract.15(3):372-5.

22. OMS.Raised cholesterol (2008) Disponível em:
http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_text/en/ , acessado em 08/12/2017.

23. Durrington, P (2003) Dyslipidaemia. The Lancet 362(9385):717-31.

24. Kopelman, PG (2000) Obesity as a medical problem. Nature 404(6778):635.

25. Hernández JL, Olmos JM, Ramos C, Martínez J, Juan J, Valero C, Nan D, González-macías J (2010) Serum lipids and bone metabolism in Spanish men: The camargo cohort

study. *Endocrine Journal* 57 (1):51 -60.

26. Macri EV, Zago V, Schreier L, Rodriguez P, Zeni S, Friedman S (2007) Hypercholesterolemia and bone metabolism. *Bone* 41(6):5.

27. Majima T, Shimatsu A, Komatsu Y, Satoh O, Fukao A, Ninomiya K, Matsumura T, Nakao K (2008) Increase bone turnover in patients with hypercholesterolemia. *Endocrine Journal* 55:143-151.

28. Mandal CC (2015) High cholesterol deteriorates bone health: New insights into molecular mechanisms. *Frontiers in Endocrinology* 6:165.

29. You L, Sheng Z, Tang C, Chen L, Pan L, Chen J (2011) High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. *Acta Pharmacol Sin* 32(12):1498-504.

30. Santos P, Noronha JF, Grotto H (2007) Evaluation of reticulated platelets and platelet activation in patients with dyslipidemia. *International Journal of Laboratory Hematology* (29):87 -87.

31. Kumar S, Vikram A, Kim Y, Jacobs JS, Irani K (2014) P66Shc mediates increased platelet activation and aggregation in hypercholesterolemia. *Biochemical and biophysical research communications* 449(4):496 -501.

32. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of

cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344:1383–1389.

33. U.S. Spending and prescription information. IMS Health (2010) Disponível em: <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth/menuitem.a46c6d4df3db4b3d88f611019418c22a/?vgnextoid=ed2e5a6b5895f210VgnVCM100000ed152ca2RCRD&cpsexcurrchannel=1> acessado em 20/12/2017

34. Almog Y, Novack V, Eisinger M et al. (2007) The effect of statin therapy on infection-related mortality in patients with atherosclerotic diseases. *Crit Care Med* 35: 372–8

35. Hackam DG, Mamdani M, Li P et al. (2006) Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *Lancet* 367: 413–8

36. Majima T, Komatsu Y, Fukao A, Ninomiya N, Matsumura T, Nakao K (2007) Short-term effects of atorvastatin on bone turnover in male patients with hypercholesterolemia. *Endocr J.* 54(1):145-51.

37. Horiuchi N, Maeda T (2006) Statins and bone metabolism. *Oral diseases* 12: 85-101.

38. Oryan A, Kamali A, Moshiri A (2015) Potential mechanisms and applications of statins on osteogenesis: Current modalities, conflicts and future directions. *J Control Release* 215:12 -24.

39. Musial DC, Becker TCA, Isolani AP, Bracht L, Biazon ACB (2013)

Hypercholesterolemia and hepatic steatosis in mice fed on low-cost high-fat diet. *ActaScientiarum. Health Sciences* 35(1)23.

40. Lin S, Huang J, Fu Z, Liang Y, Wu H, Xu L et al., (2015) The effects of atorvastatin on the prevention of osteoporosis and dyslipidemia in the high-fat-fed ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 96(6):541-51

41.x`ze Lima CM, Lima AK, Melo MGD et al. (2014) Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus novergicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes *Scientia Plena* 10(3):1-9.

42. Oliveira MR, deC Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR Jr, Mariano RC (2015) 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.* 44(5):649-55.

43. Al-Hamed FS, Tawfik MA, Abdelfadil E, Al-Saleh MAQ (2017) Efficacy of Platelet-Rich Fibrin After Mandibular Third Molar Extraction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 75(6):1124-1135.

44. Hernández JL, Olmos JM, Ramos C, Martínez J, Juan J, Valero C, Nan D, González-macías J (2009) Serum Lipids and Bone Metabolism in Spanish Men: The Camargo Cohort Study. *Endocrine Journal* 57(1):51-60.

45. Adami S, Braga V, Gatti D (2001) Association between bone mineral density and serum lipids in men. *JAMA* 286: 791-792.

46. Adami S, Braga V, Zamboni M, Gatti D, Rossini M, Bakri J Battaglia E (2004) Relationship between lipids and bone mass in 2 cohorts of healthy women and men. *Calcif Tissue Int* 74: 136-142.

47. Dennison EM, Syddall HE, Aihie Sayer A, Martin HJ, Cooper C et al. (2007) Lipid profile, obesity and bone mineral density: the Hertfordshire Cohort Study. *QJM* 100(5):297-303.

48. Cui LH, Shin MH, Chung EK, et al. (2005) Association between bone mineral densities and serum lipid profiles of pre- and post-menopausal rural women in South Korea. *Osteoporosis Int.* 16:1975–1981.

49. Li H, Guo H, Li H (2013) Cholesterol loading affects osteoblastic differentiation in mouse mesenchymal stem cells.. *Steroids* 78(4):426-33.

50. Mundy G, Garrett R, Harris S et al. (1999) Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286:1946-1949.

51. Anbinder AL, Junqueira JC, Mancini MN, Balducci I, Rocha RF, Carvalho YR (2006) Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. *Braz Dent J.* 17(4):267-73

FIGURAS:

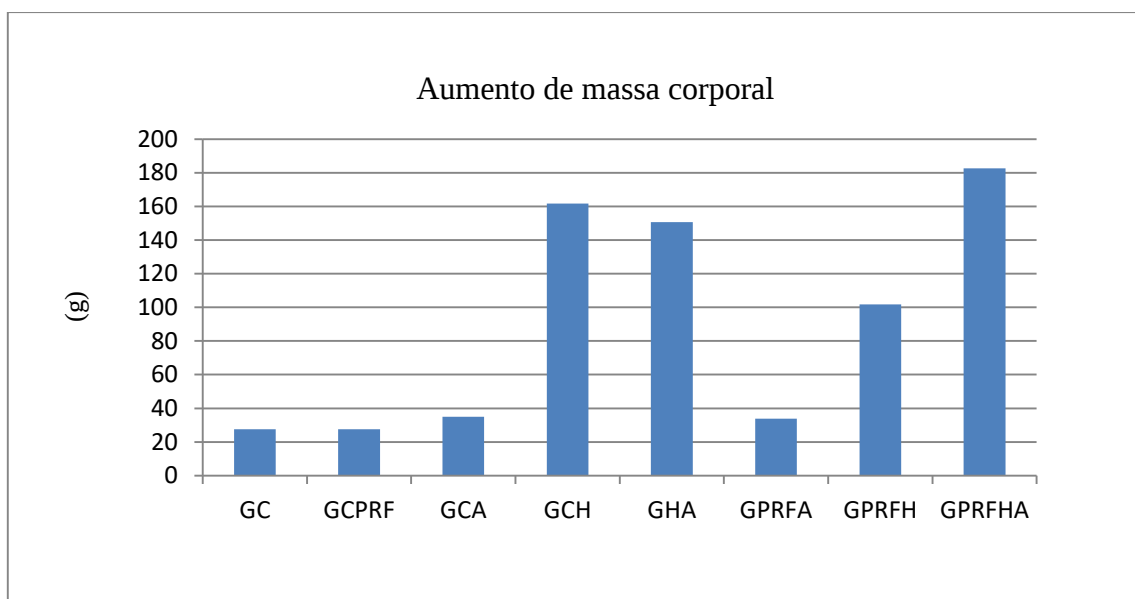


Fig.1- Gráfico representando o aumento da massa corporal (em gramas) dos animais, medido através da diferença da massa corporal da pesagem final, na data da eutanásia, e da pesagem inicial, na data de início da implementação da dieta hipercalórica.

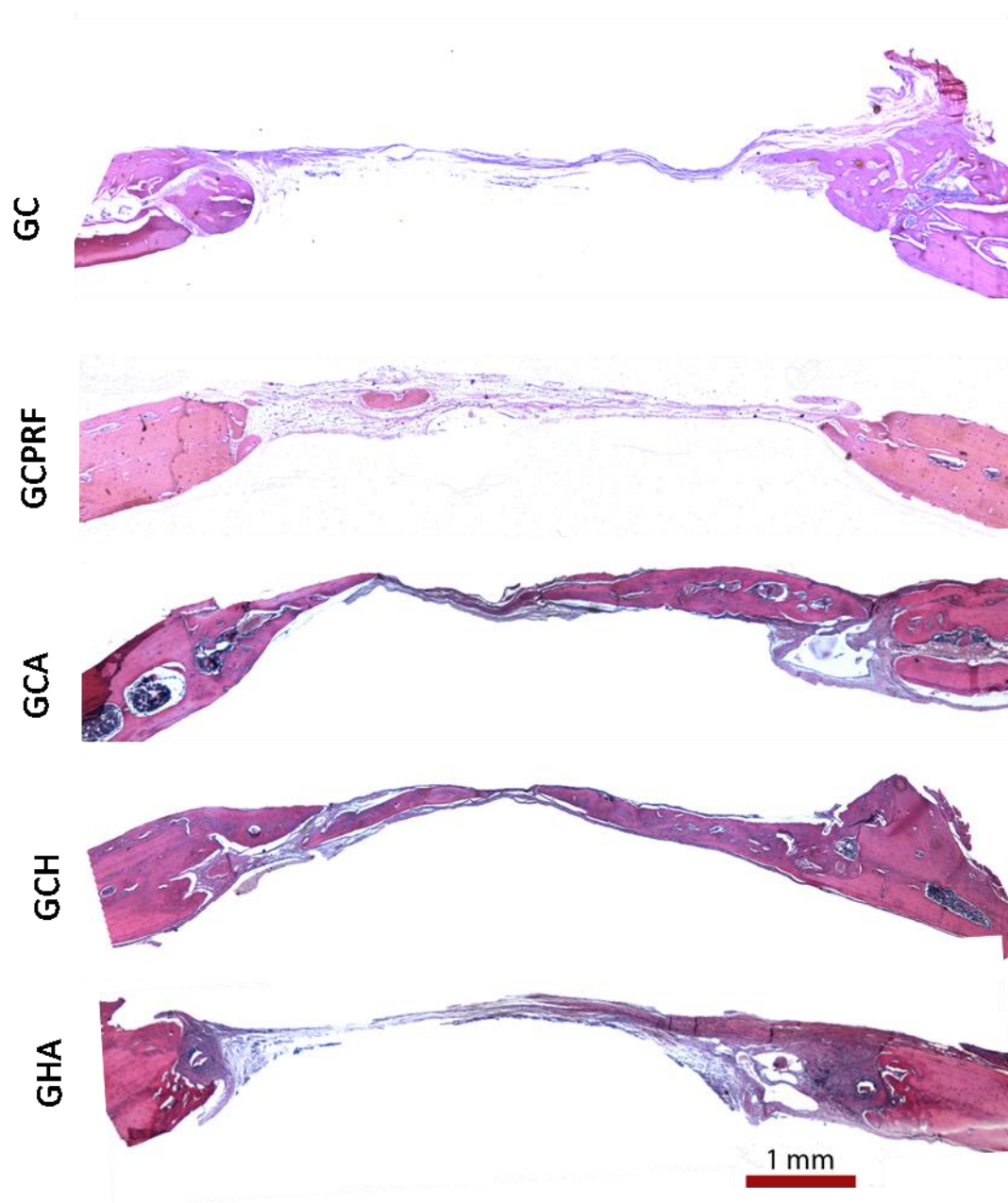


Fig. 2- Imagens histológicas dos defeitos de calotas cranianas de ratos dos grupos GC, GCPRF, GCA, GCH, GHA aos 28 dias pós-operatórios. (coloração de HE, e magnificação de 125x).

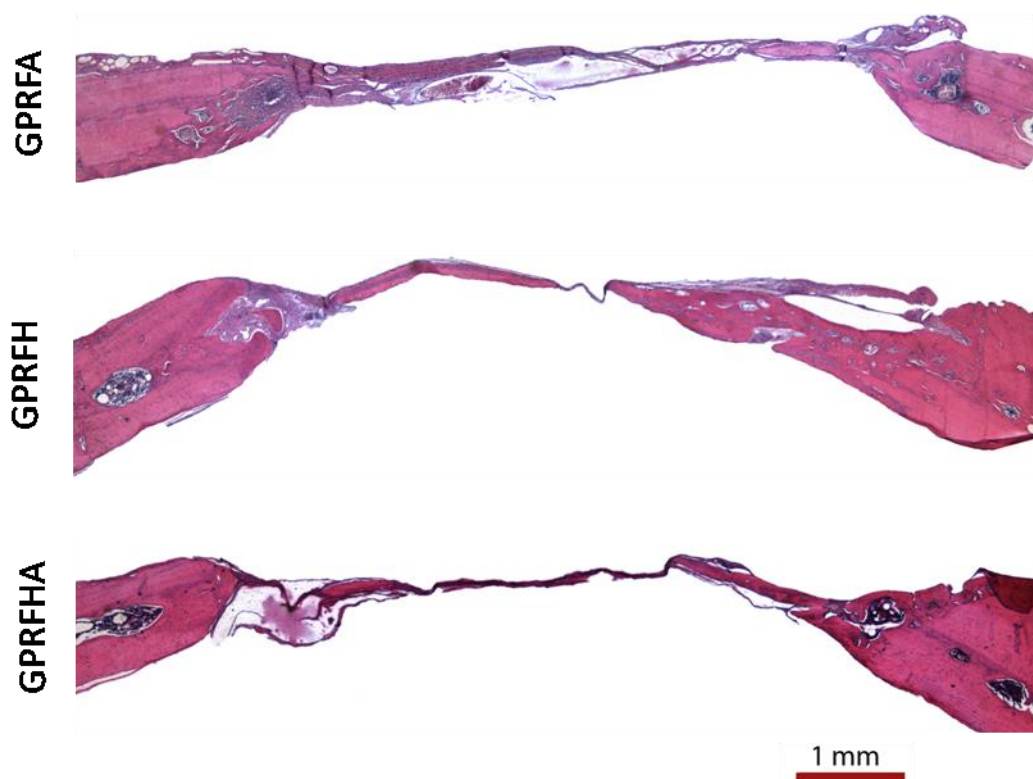


Fig. 3- Imagens histológicas dos defeitos de calotas cranianas de ratos dos grupos GPRFA, GPRFH, GPRFHA aos 28 dias pós-operatórios, em que observamos que a associação entre a membrana de PRF e a condição de hipercolesterolemia proporcionou aumento da formação óssea com os biomateriais testados comparado com a figura anterior. (coloração de HE, e magnificação de 125x).

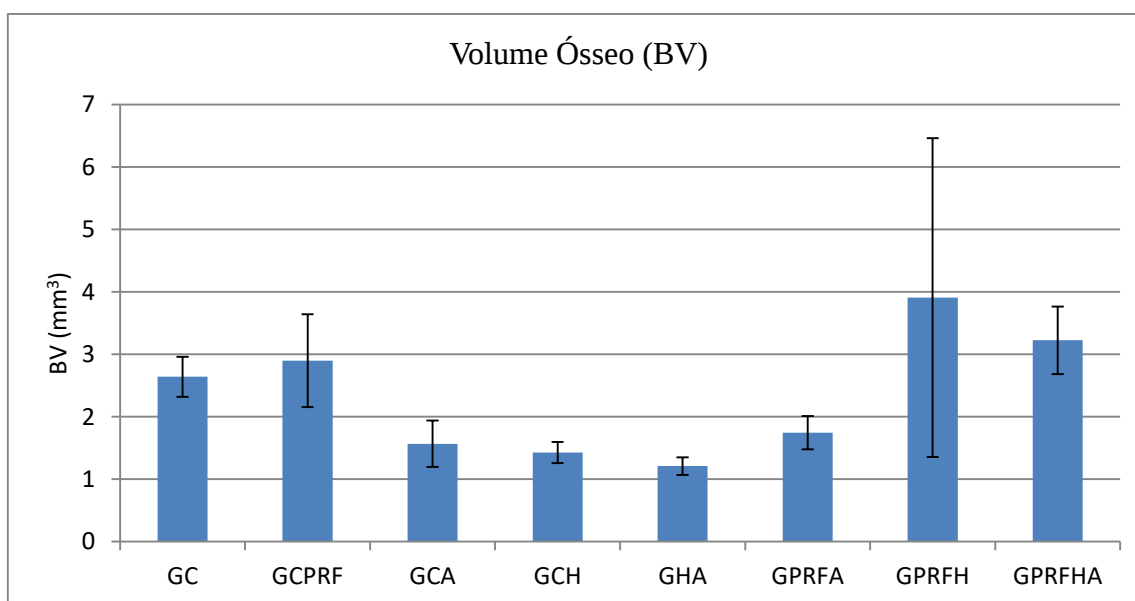


Fig. 4- Gráfico da área da quantificação de volume ósseo (BV) nos defeitos de calotas cranianas de ratos

aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores mensurados entre os grupos.

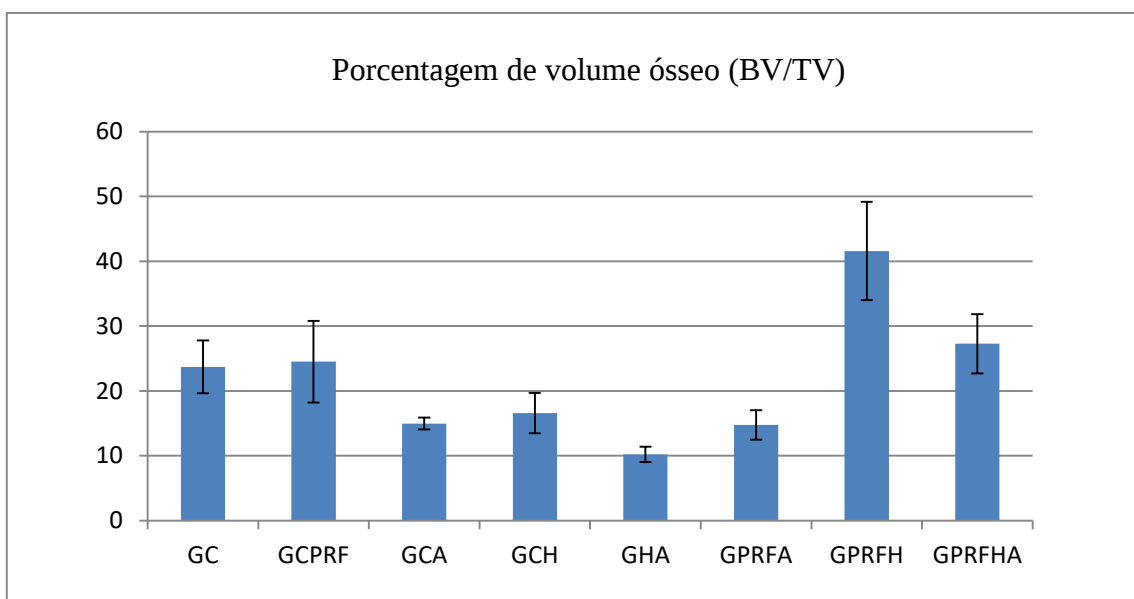


Fig. 5- Gráfico do volume ósseo formado por volume total do defeito (BV/TV) nos defeitos de calotas cranianas de ratos nos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância de 5% entre GC e GCA ($p=0,0264$); GC e GPRFH ($p=0,0024$); GCPRF e GHA ($p=0,0169$); GPRFH e GCPRF ($p=0,0038$); GPRFH e GCA ($p<0,0001$); GPRFH e GCA ($p=0,0049$); GPRFH e GCH ($p<0,0001$); GPRFH e GHA ($p<0,0001$), GPRFH e GPRFA ($p<0,0001$), GPRFH e GPRFHA ($p=0,0169$), GPRFHA e GCA ($p=0,0499$), GPRFHA e GHA ($p=0,0037$), GPRFHA e GPRFA ($p=0,0444$).

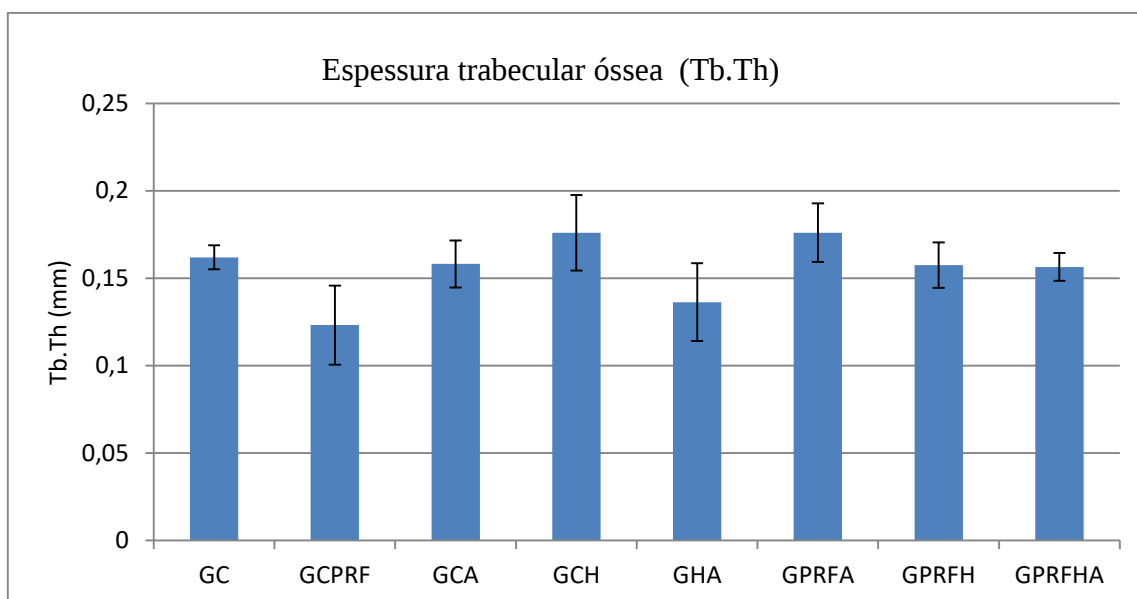


Fig. 6- Gráfico da área da espessura das trabéculas ósseas formadas (Tb.Th) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística indicou significância entre os grupos GCH e GCPRF ($p=0,0224$), GPRFA e GCPRF ($p=0,0223$).

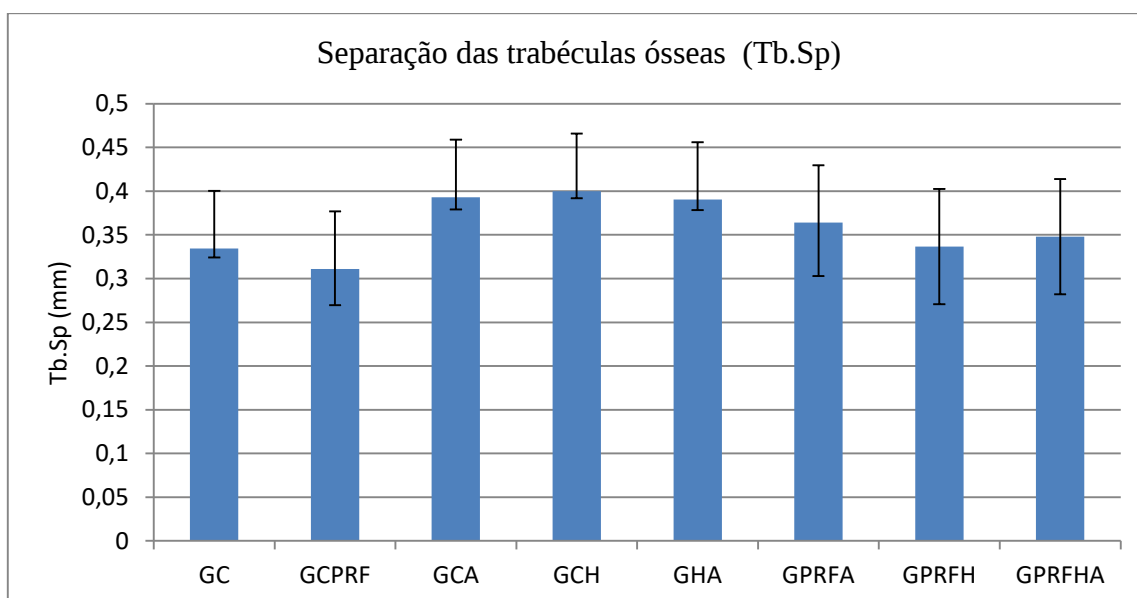


Fig. 7- Gráfico do representando os valores do espaçamento entre as trabéculas ósseas por milímetro (Tb.Sp) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores mensurados entre os grupos.

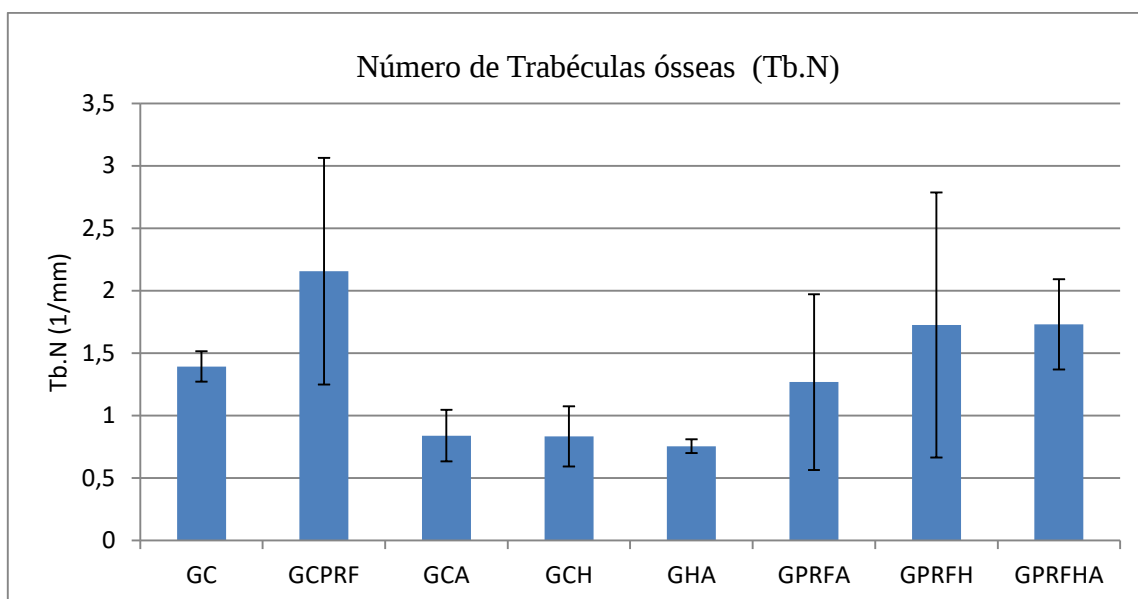


Fig. 8- Gráfico do número de trabéculas ósseas por milímetro (Tb.N) nos defeitos de calotas cranianas de ratos aos 28 dias pós-operatórios. Análise estatística não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) dos valores mensurados entre os grupos.

ANEXO A – Comitê de ética no uso de animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 17 de Maio de 2018.

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

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 17, 2018.

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

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

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

ANEXO B – Normas da revista selecionada para a publicação do artigo.



Instructions for Authors

Title Page

The title page should include:

- ✦ The name(s) of the author(s)
- ✦ A concise and informative title
- ✦ The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- ✦ The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- ✦ Objectives (stating the main purposes and research question)
- ✦ Materials and Methods
- ✦ Results
- ✦ Conclusions
- ✦ Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ✦ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ✦ Use italics for emphasis.
- ✦ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ✦ Do not use field functions.
- ✦ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ✦ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ✦ Use the equation editor or MathType for equations.
- ✦ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

» LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

✦ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

✱ Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

✱ Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

✱ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230–257

✱ Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

✱ Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

✱ ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

» EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- ✱ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ✱ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ✱ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ✱ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ✱ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- ✱ Supply all figures electronically.
- ✱ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ✱ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- ✱ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ✱ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

ANEXO C – Ilustrações da fase cirúrgica.



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



Fig.2- Centrifugação por 10 minutos em 3000 rpm

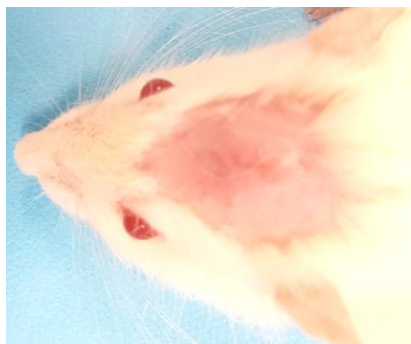


Fig.3- Tricotomia da região da calota craniana

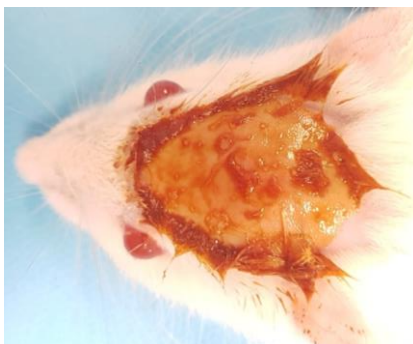


Fig.4- Antissepsia da região da calota craniana

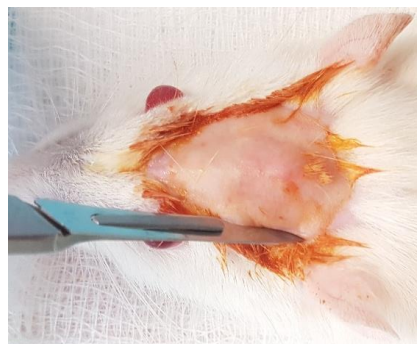


Fig.5- Lâmina de bisturi posicionada para realização da incisão



Fig.6- Incisão realizada



Fig.7- Confecção do defeito ósseo de 6mm de diâmetro

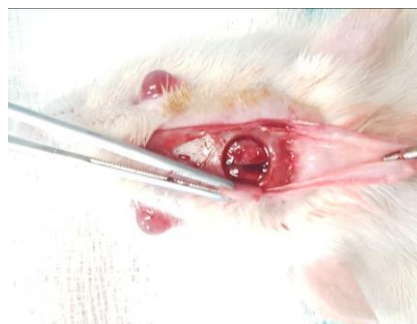


Fig.8- Defeito ósseo realizado



Fig.8- Obtenção da fibrina rica em plaquetas após centrifugação

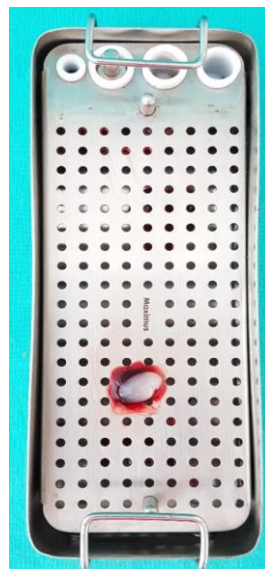


Fig.9- Confecção da membrana de fibrina rica em plaquetas



Fig.10- Aplicação da fibrina rica em plaquetas no defeito ósseo

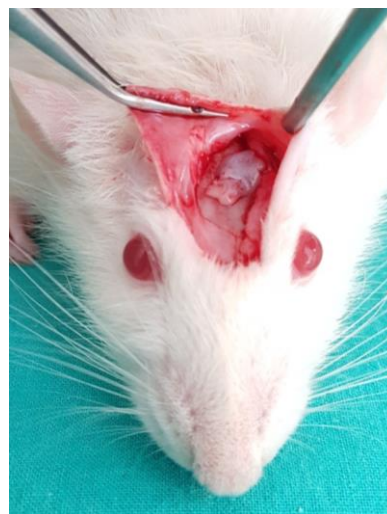
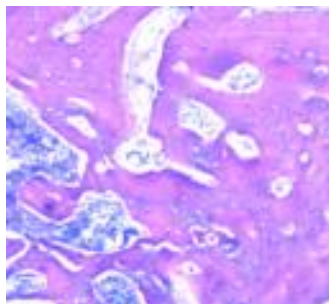


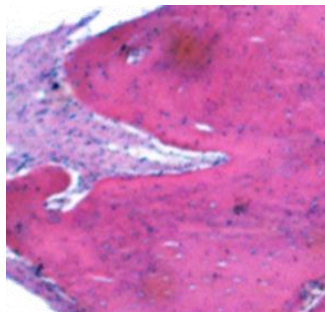
Fig.11- Acomodação da fibrina rica em plaquetas no defeito ósseo

ANEXO D – Suplemento de imagens da análise histológica - coloração HE.

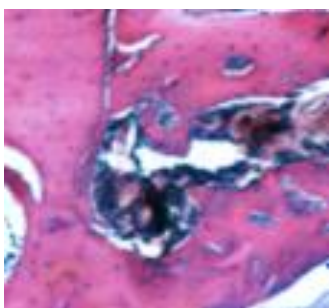
GC



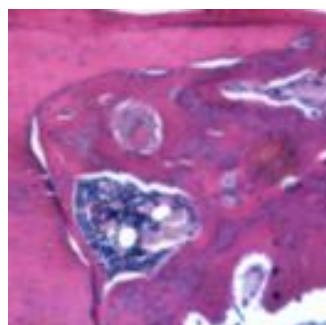
GCPRF



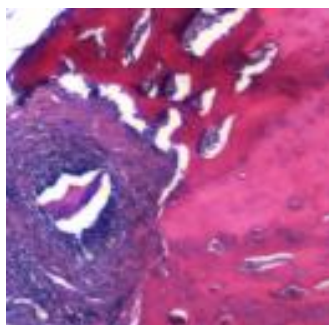
GCA



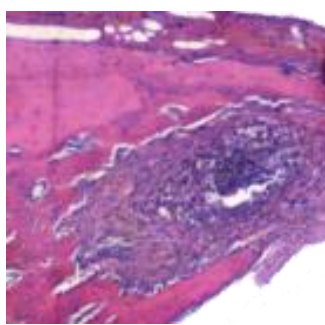
GCH



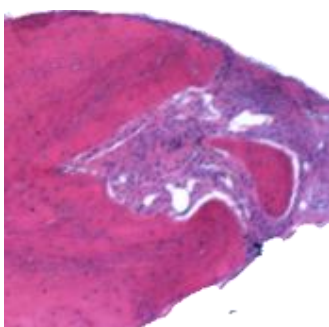
GHA



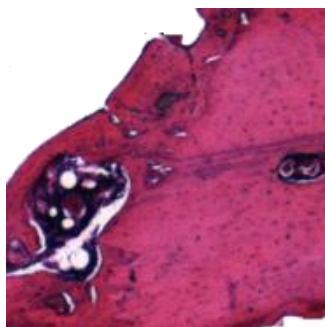
GPRFA



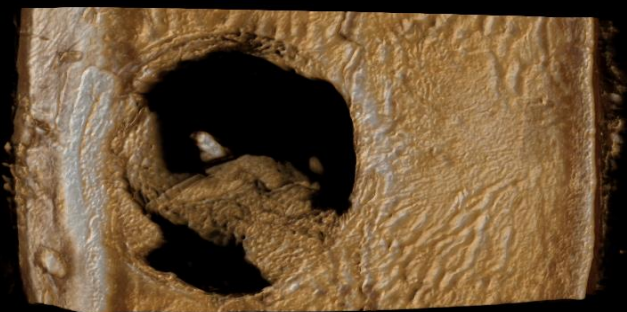
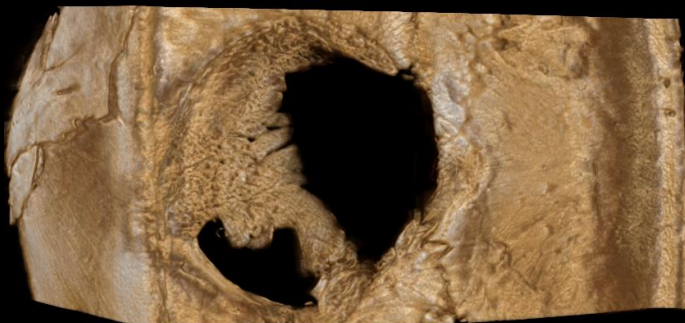
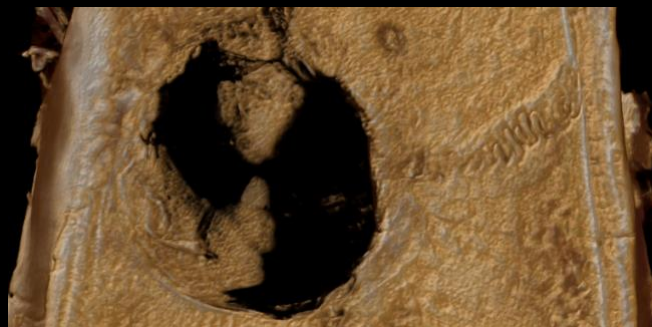
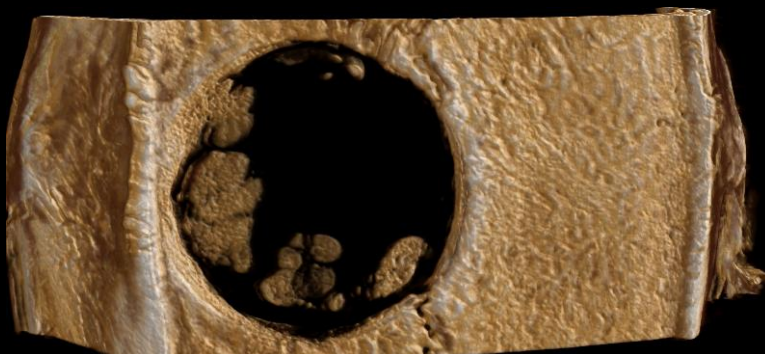
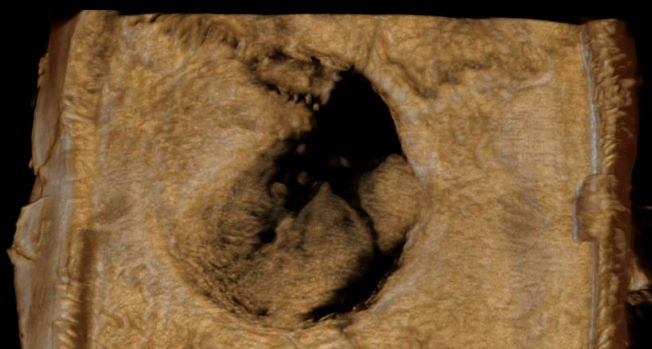
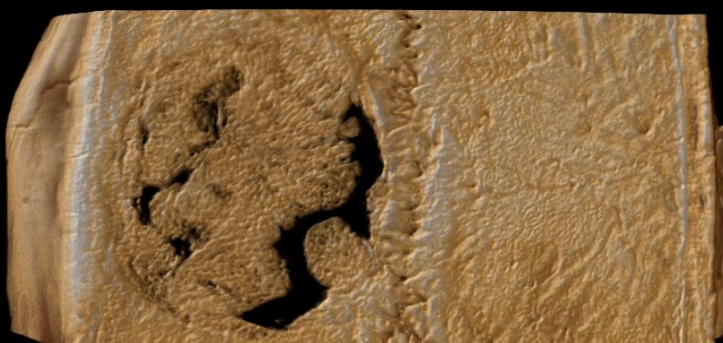
GPRFH



GPRFHA



ANEXO E- Ilustração das reconstruções em 3 dimensões das Microtomografias
Computadorizadas.

GCGCPRFGCHGCAGHAGPRFAGPRFHGPRFHA