



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E EENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

**BÁRBARA GRESSY DUARTE SOUZA CARNEIRO**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E  
ENXERTO XENÓGENO NA REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRITICOS EM  
CALVÁRIAS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

**FORTALEZA**

**2020**

BÁRBARA GRESSY DUARTE SOUZA CARNEIRO

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E  
ENXERTO XENÓGENO NA REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRITICOS EM  
CALVÁRIAS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica. Área de concentração Curricular: Morfologia/Histologia Oral

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Delane Viana Gondim

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C287a Carneiro, Bárbara Gressy Duarte Souza.  
Avaliação do Efeito da Fibrina Rica em Plaquetas e Enxerto Xenógeno na Remodulação Óssea de Defeitos em Calvárias de Ratos Tratados com Ácido Zoledrônico / Bárbara Gressy Duarte Souza Carneiro. – 2019.  
40 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra.  
Coorientação: Prof. Dr. Delane Viana Gondim.

1. Fibrina Rica em Plaqueta. 2. Bifosfonato. 3. Osso. I. Título.

CDD 617.6

---

BÁRBARA GRESSY DUARTE SOUZA CARNEIRO

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E  
ENXERTO XENÓGENO NA REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRITICOS EM  
CALVÁRIAS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica. Área de Concentração: Morfologia/Histologia Oral

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Malena Regina de Freitas e Silva  
Universidade Christus (UNICHRISTUS)

Dedico ao meu pai.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter proporcionado minha vida, minha saúde, por todas as oportunidades boas e ruins, que me tornaram uma pessoa melhor, capaz de valorizar cada experiência vivida.

Agradeço a **minha família**, pois sem ela nada seria possível, pela dedicação, amor e esforço para que eu conquistasse meus sonhos, mesmo quando eram tão distantes da nossa realidade. À minha **mãe, Aurivam**, pelo amor incondicional, por toda a confiança, suporte e paciência que dedicou a mim, por ter me ensinado os valores e a ética que levarei por toda a vida. Ao meu **pai, Arruda**, que não pode participar deste momento, embora com todas as dificuldades foi meu maior incentivador. Acreditou muito em mim e com certeza foi o meu maior porto seguro. À minha **irmã, Brenda**, pelo apoio em todos os momentos da vida, por todo o amor, amizade, preocupação e seus conselhos. Em você tenho uma grande bênção de Deus, sei que tenho sempre com quem contar. Ao meu **noivo, Márcio**, que vivenciou todos os momentos desta e de outras conquistas, estando ao meu lado, incentivando e apoiando nos momentos mais difíceis, você é um exemplo de fortaleza, esforço, determinação e companheirismo, obrigada por ter abraçado a minha família como sua. Ao meu **cunhado, Davi**, pessoa ímpar, íntegra, um irmão que Deus me deu, obrigada por todo cuidado que você tem dado a minha família, por estar conosco em todos os momentos, enfrentando tudo com tanto amor e maturidade. A minha **sogra, Delane**, pelo incentivo, pela torcida, pelos puxões-de-orelha e pelo carinho e cuidado que você tem a mim e a minha carreira, você é meu exemplo de força, garra, compromisso e determinação; você exerce vários papéis importantes na minha vida: sogra, amiga e co-orientadora. A **Magu**, minha companheira fiel de estudos até de madrugada a qual tenho um amor imenso. Todos vocês me fazem encontrar sentido em todo esforço realizado na minha vida profissional e tornam a caminhada mais leve.

A minha **orientadora, Dra. Paula Goes**, por ter acreditado em mim, apoiado minhas idéias desde a confecção do projeto, por ter contribuído em todas as partes dessa dissertação, pela disponibilidade em me orientador, pela confiança, pela paciência na orientação. Você é um grande exemplo de determinação, de mulher e de profissional.

Agradeço meus eternos professores, **Dr. Alexandre Nogueira, Dr. Marcelo Ferraro e Dr. Fábio Wildson**, grandes exemplos de profissionais, tanto em conhecimentos técnicos como na ética, presente em todas as fases da minha carreira profissional. Obrigada por sempre terem acreditado em mim, terem me dado oportunidades e incentivo. Obrigada **Dr. Alexandre Nogueira**, o qual considero meu pai na Odontologia, o responsável por despertar

em mim o amor pela Odontologia, o cuidado, a humanidade ao acolher os pacientes, o entusiasmo de sempre fazer uma odontologia de excelência, cada vez mais de qualidade e acessível a todos. Vocês são responsáveis por despertar em mim o amor pela cirurgia e docência, a vocês tenho eterna gratidão e carinho, sempre procuro me espelhar em vocês.

Obrigada a todas as pessoas, que não foram poucas, que Deus colocou na minha vida para ajudar na caminhada profissional, às várias pessoas que morei aqui em Fortaleza, que me abrigaram, me apoiaram, deram oportunidade (**Tia Soraia, Suellen, Dam, Tia Sandra, Leiriane, Dona Luciene, Professora Delane, Dedé, Leane Tio Tadeu** e tantas outras). A vocês dedico essa vitória, pois vocês são com toda certeza enviados de Deus na minha vida. Obrigada a todos meus amigos, primas-irmãs e familiares, considero-me uma pessoa privilegiada por tê-los em minha vida.

Obrigada as amigas de pós-graduação, **Carol, Raquel, Vanessa, Cíntia e Luane** pela disponibilidade e paciência em ajudar para execução dessa pesquisa. **Carolzinha, Diego e Gisele**, obrigada pela paciência, amizade e troca de angústias nesse mestrado. Obrigada **Vanessa** por me receber em sua casa várias vezes, em pleno resguardo, para me ajudar e orientar nas análises. Obrigada **Bruno** do NPDM por ter me ajudado cordialmente no dia do experimento depois do desespero de todos terem desmarcado em cima da hora. Obrigada aos meus colegas da patologia, **Paulinho, Osias, Dayrine** por ter disponibilizado seus valiosos tempo para ajudar nas análises do meu experimento com tanta cordialidade e disposição. Obrigada **Samuel** pela amizade de sempre, pelos conselhos, por sempre ter paciência em me escutar, por em plena férias, e mesmo não fazendo mais parte do programa, ter me ajudado nas análises.

Obrigada a todos os integrantes do NEPDIO, pelo apoio, incentivo e inspiração. Obrigada professora **Karuza**, por todos ensinamentos e exemplo desde a época da graduação, por ter participado da qualificação e pré-defesa, você é outro grande exemplo e que tenho muito carinho desde a disciplina de Métodos diagnóstico na UFC-Sobral. Obrigada aos ICs e alunos de graduação e técnicos que se disponibilizaram ajudar nos meus experimentos, **Taís, Lucas, Lara, Suelen, Nilton, Luanda**, sem vocês esse experimento não teria dado certo, vocês foram super dedicados e generosos por terem disponibilizado o tempo de vocês.

Obrigada aos veterinários **Gabriela, Wesley, Augusto e Helson**, obrigada mesmo, porque vocês se fizeram muito presentes nos momentos mais angustiantes da minha pesquisa, ajudaram imensamente, obrigada pelo carinho e parceria. Obrigada aos técnicos do NEMPI, **Flávia e Júnior**, pela disponibilidade e ajuda nos preparos das amostras do meu experimento, pelos ensinamentos e paciência. Obrigada ao **Rafael e Joana** da PPGO, pela paciência e

carinho como conduziam nos momentos de desespero e como sempre tentavam de alguma forma ajudar. Obrigada à **Universidade Federal do Ceará** por me proporcionar grande aprendizado e oportunidades.

Nesta dissertação existe a contribuição direta e indireta de todos vocês, meu muito obrigada a todos!



## RESUMO

O osso é um órgão dinâmico que apresenta uma capacidade auto-regenerativa importante, mediada por células ósseas viáveis, vascularização adequada e fatores de crescimento. No entanto, em casos de má-formação congênita, defeitos devido a trauma ou ressecção de tumores e defeitos craniofaciais extensos, onde essa capacidade óssea é excedida, geralmente faz-se necessário o uso de biomateriais para auxiliar o completo reparo ósseo. Dentre os biomateriais utilizados na prática clínica, o Bio-Oss se destaca como um substituto ósseo padrão-ouro, apesar de apresentar apenas propriedades osteocondutoras. Por isso, em situações onde o metabolismo ósseo está comprometido, como no caso de pacientes usuários de bisfosfonatos, torna-se interessante a combinação deste enxerto xenógeno com amplificadores biológicos, por exemplo fatores de crescimento. Neste contexto, se destaca a fibrina rica em plaquetas (PRF), um complexo imunológico rico em plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento embebidos em arcabouço de fibrina, que apesar de ser conhecidamente osteoindutora, ainda carece de estudos sobre sua eficácia clínica na regeneração tecidual o que nos leva a investigar o efeito da associação entre PRF e Bio-Oss no reparo ósseo durante terapia com bisfosfonatos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da associação de PRF e Bio-Oss (BO) na remodelação óssea de defeitos crítico em calvárias de ratos tratados ácido zoledrônico (AZ). Para isto, 36 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando 300 g, foram utilizados. Vinte e quatro ratos receberam previamente AZ em dose única de 120 µg/kg, via s.c., equivalente ao tratamento de osteoporose humano. Sete dias depois foram submetidos a cirurgia para criação de um defeito crítico de 8 mm na calvária e foram divididos nos seguintes grupos (n=6) de acordo com o tratamento: AZ – não recebeu enxerto; BO - teve o defeito preenchido com 0,04 ml de Bio-Oss; PRF - teve o defeito preenchido com 0,04 ml de PRF; BO+PRF - teve o defeito preenchido com BO e PRF. Os animais do grupo controle (C) (n=6) receberam solução salina e sem qualquer preenchimento do defeito. Todos os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de colágeno bovino reabsorvível antes da sutura. Adicionalmente foi utilizado 6 animais doadores de sangue para obtenção do PRF alogênico. Após 12 semanas todos os animais foram eutanasiados e as calvárias foram removidas e submetidas às análises histológica e histomorfométrica. Os dados obtidos foram analisados através do software GraphPad Prisma 8.3, e foram apresentados com média±E.P.M utilizando os testes ANOVA seguido de Tukey. Os animais que receberam apenas AZ não mantiveram a anatomia da calota, além de apresentarem redução de 34% de osteoblastos, 79% de osteoclastos, 77% vasos sanguíneos e 35% colágeno total, marcada pela redução de colágeno tipo I quando comparado ao controle (p<0,05). O tratamento com Bio-Oss apesar de manter a estrutura dimensional do tecido não foi capaz de reverter os efeitos deletérios do AZ sobre células ósseas e vasos. No entanto, o tratamento com PRF promoveu aumento de 37% de osteoblastos, 72% de osteoclastos, 74% vasos sanguíneos e 39% colágeno total, marcado pelo aumento de colágeno tipo I (p<0,05). A associação BO+PRF ainda mostrou melhor aspecto de reparo pois além da manutenção da altura de tecido, as partículas de BO estavam em menor tamanho com maior formação óssea entre essas partículas, ou com invaginação de tecido ósseo em fissuras formadas nas próprias partículas de Bio-Oss. Desta forma podemos concluir que o uso de PRF associado ao Bio-Oss pode auxiliar o processo de reparo ósseo por estimular a remodelação óssea, promover angiogênese, estimular a produção de colágeno e manter a anatomia do tecido, atenuando os efeitos negativos em tecido ósseo causados pelo ácido zoledrônico, sugerindo que esta associação pode ser uma ferramenta importante no tratamento de defeitos ósseos críticos em pacientes que utilizam bisfosfonatos.

**Palavras-chave:** fibrina rica em plaquetas, Bio-Oss, bisfosfonato, defeito crítico de calvária, reparo ósseo.

## ABSTRACT

Bone is a dynamic tissue that presents important self-regenerative capacity, mediated by viable bone cells, adequate vascularity and growth factors. Nevertheless, in cases of congenital malformation, defects due trauma or tumor resection, and extensive craniofacial defects, where this bone capacity it is exceeded, biomaterial are often needed in order to support complete bone repair. Among the most used biomaterials in the clinical practice, Bio-Oss has stood out as a gold-standard bone substitute, despite having only an osteoconductor characteristics. Therefore, in situations where bone metabolism is compromised, as in patients under bisphosphonate therapy, becomes interesting the combination of xenogenous bone graft with biological amplifiers, such as growth factors. In this context, highlights platelet-rich fibrin (PRF), an immunological complex rich in platelets, leukocytes and growth factors embedded in a fibrin scaffold, that in spite of being well-known osteoinductor, still needs studies about its clinical efficacy in tissue regeneration, which led us to investigate the effect of the association between PRF and Bio-Oss on bone repair during bisphosphonate therapy. So, the aim of this work was to evaluate the effect of the association between PRF and Bio-Oss (BO) on bone remodeling in critical size-defect in rat calvaria treated with zoledronic acid (ZA). For this 36 Wistar male rats (*Rattus norvegicus*), weighing 300 g, were used. Twenty-four rats received previously ZA in single dose of 120 µg/kg, via s.c., similar to an osteoporosis treatment in humans. Seven days later, they were subjected to a surgery to create an 8 mm critical size defect in rat calvaria, and then, were divided into the following groups (n=6 animals/group) according to the treatment: ZA – did not receive bone graft; BO – had the defect filled with 0,04 ml of Bio-Oss; PRF - had the defect filled with 0,04 ml of PRF; BO+PRF - had the defect filled with BO and PRF. The animals of control group (C) (n=6) received saline solution and did not have the defect filled with any graft. All defects were recovered with a collagen membrane before suture. In addition, it was used 6 animals for blood donation in order to obtain the allogenic PRF. After 12 weeks, all animals were euthanized and calvaria was removed and submitted to histological and histomorphometric analyses. Data obtained were analyzed by GraphPad Prisma 8.3 software and were presented as mean±S.E.M using ANOVA followed by Tukey. The animals that received only ZA did not keep the calvaria anatomy, moreover they presented reduction of 34% on osteoblast, 79% on osteoclast, 77% on blood vessel counts and 35% reduction of total collagen, marked by reduction on type I collagen when compared to control (p<0,05). The treatment with Bio-Oss despite keeping the dimensional structure of the tissue, was not able to reverse the deleterious effect of ZA over bone cells and vessels. Meanwhile, the treatment with PRF caused increase of 37% on osteoblast, 72% on osteoclast, 74% on blood vessels counts and 39% of total collagen marked by increase of type I collagen (p<0,05). The association of BO+PRF still, showed better repair aspect, maintaining the tissue architecture. In this group (BO+PRF), BO particles were in smaller size with greater bone formation between these particles, or with fissure particles filled with bone tissue. In this way, we can conclude that the use of PRF associated to Bio-Oss can support the repair process by stimulation of bone remodeling, promoting angiogenesis, stimulating collagen production, keeping tissue anatomy and mitigating the negative effects on bone caused by zoledronic acid, suggesting that this association can be an important tool to the treatment of critical bone defects in patients using bisphosphonates.

**Key words:** platelet-rich fibrin, Bio-Oss, bisphosphonate, critical size calvaria defect., bone repair.

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ANOVA: Análise de Variância  
ARRIVE: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments  
BFs: Bisfosfonatos  
BO: Bio-Oss  
BO+PRF: Bio-Oss associado a Fibrina rica em plaquetas  
CEUA: Comitê de Ética em Uso de Animais  
C: Controle  
EDTA: Ácido etilenodiamina tetraacético  
EGF: Fator de crescimento epitalial  
FC: Fatores de crescimento  
HE: Hematoxilina-eosina  
IGF: Fator de crescimento semelhante a insulina  
IP: Intraperitoneal  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta  
PRF: Fibrina rica em plaquetas  
ROG: Regeneração óssea guiada  
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular  
TGF-beta 1: Fator de crescimento transformador beta

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>I- INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>II- PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>III- Capítulo .....</b>	<b>16</b>
<b>IV- CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>48</b>

## I- INTRODUÇÃO GERAL

Os dentes perdidos podem resultar em um déficit funcional e estético e tradicionalmente são substituídos por próteses dentárias removíveis ou fixas, sendo os implantes dentários uma alternativa para reabilitação oral (ESPOSITO et al., 2010). O uso de implantes dentários tornou-se comum e atualmente a Implantodontia é uma importante parte da Odontologia moderna (PENG et al., 2016). No entanto, quando da realização desta cirurgia, por vezes, são encontrados vários desafios relacionados a deficiência de suporte ósseo, especialmente em idosos. Nesses casos, tem sido recomendado o aumento ósseo através de enxertos, para realização do tratamento com segurança e maior taxa de sucesso (ESPOSITO et al., 2009).

O aumento de volume ósseo com enxertos é realizado através da regeneração óssea guiada (ROG), técnica cirúrgica que utiliza membranas como barreira contra invasão de células epiteliais e fibroblastos (de rápido crescimento) e torna o meio propício para proliferação de células osteogênicas. Na ROG, pode-se fazer uso ou não de enxertos ósseos ou substitutos ósseos (ELGALI et al., 2017; LIU et al., 2014). Quando presentes, o enxerto ósseo ideal deve apresentar uma tríade de características: osteogênese, osteoindução e osteocondução (D'SOUZA et al., 2019).

O enxerto autógeno é o único que reúne todas essas características, entretanto apresenta desvantagens como necessidade de mais um leito cirúrgico, chamado leito doador, aumentando a morbidade e além de dispor de uma quantidade óssea limitada. Com o intuito de minimizar essas desvantagens cada vez mais se faz uso de enxertos ósseos homogêneos, xenógenos ou sintéticos e, em sua maioria, esses biomateriais apresentam apenas características osteocondutoras. Nesse contexto, destaca-se o Bio-Oss (Ed Geistlich Sons, Wolhusen, Suíça) um biomaterial (osso bovino inorgânico) que apresenta propriedades osteocondutivas, e age auxiliando na formação óssea, pois é constituído por carbonato de apatita com macro e micro configurações semelhantes à estrutura óssea humana. Seu uso evita uma abordagem cirúrgica adicional no leito doador, como acontece em enxertos autógenos, pode ser usado isolado ou em associação com enxerto autógeno, além de ser livre de antigenicidade (DENICOLO et al., 2015). Por vezes, Proteínas Morfogênicas Ósseas (BMPs), células-tronco e fatores de crescimento, que apresentam propriedades osteoindutivas, podem ser usadas em associação com biomateriais osteocondutores a fim e potencializar este efeito regenerativo ósseo (GARCIA-GARETA et al., 2015; FILLINGHAM et al., 2016).

A maior prevalência de pacientes desdentados que procuram tratamento reabilitador e necessitam dessas reconstruções ósseas são indivíduos idosos (ROBERTO et al., 2019). Adicionalmente eles apresentam alto índice de doenças que repercutem no metabolismo ósseo, como a osteoporose (DE-FREITAS et al., 2016; LOPEZ-JORNET et al., 2016) que apresenta uma prevalência entre 15 a 33% na população de mulheres brasileiras (BACCARO et al., 2015). Diante dessa realidade, muitos destes pacientes fazem uso de bisfosfonatos (BFs), um medicamento análogo do pirofosfato, que possui alta afinidade pela hidroxiapatita e importante ação antirreabsortiva (CASTRO et al., 2014).

Os BFs são divididos em primeira geração (não nitrogenados: clodronato, etidronato e tiludronato) e segunda geração (nitrogenados: alendronato, risedronato, ibandronato e ácido zoledrônico (AZ) (DE-FREITAS et al., 2016) que possuem efeitos mais intensos de antirreabsorção e estão associados a maiores riscos de inflamação e necrose (SHIMA et al., 2017). Os BFs possuem um efeito específico sobre os osteoclastos bastante conhecido, mas também tem sido relato que eles podem inibir a angiogênese (ASAKA et al., 2017), contribuindo assim para um prejuízo maior do reparo ósseo (OLEJNIK et al., 2016), podendo levar a osteonecrose dos maxilares, o maior efeito adverso decorrente do uso desse fármaco (ASAKA et al., 2017). Com o objetivo de diminuir os efeitos causados pelo uso sistêmico de BFs após procedimentos cirúrgicos, estudos recentes buscaram sistemas alternativos locais tais como laserterapia, aplicação tópica de células mesenquimais e mais recentemente o uso de concentrados plaquetários (GUIMARÃES et al., 2017).

A fibrina rica em plaquetas (PRF), um concentrado plaquetário, é um complexo imunológico capaz de estimular mecanismos de defesa. Ela é formada por plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento embebidos em arcabouço de fibrina (MIRON et al., 2017 a; KANG et al., 2011). A PRF foi descrita pela primeira vez por Choukroun em 2000, onde o sangue coletado do próprio paciente foi centrifugado sem adição de fatores anticoagulantes, ou seja, sem risco de antigenicidade, e utilizado, inicialmente, para cirurgia bucomaxilofacial (DOHAN et al., 2006 a). Atualmente, diversas áreas da médicas e odontológicas apresentam estudos com resultados positivos sobre o uso da PRF (ALBILIA et al., 2018; PATEL et al., 2017; FEMMINELLA et al., 2016; HOAGLIN et al., 2013; SUTTAPREYASRI et al., 2013), especialmente na ROG (MIRON et al., 2017b; CASTRO et al., 2017a; CASTRO et al., 2017b; ALI et al., 2015) em procedimentos de elevação de seio maxilar, aumento do rebordo alveolar, reconstrução mandibular, reparação de fenda maxilar, tratamento de defeitos periodontais, tratamento de alvéolos pós-extração (DEL FABRO et al., 2015), bem como em

procedimentos relacionados a colocação de implantes osseointegrados, com o intuito de aumentar qualitativamente a formação óssea (PENG et al., 2016)

Cada constituinte da PRF tem um papel crucial para o processo de regeneração óssea. Os leucócitos contribuem para a angiogênese (MIRON et al., 2017; HERATH et al., 2017) e osteogênese (HERATH et al., 2017). As plaquetas, quando ativadas, promovem além da angiogênese, o recrutamento de células mesenquimais e são fontes de fatores de crescimento necessários para cicatrização óssea (GRIFFIN et al., 2009). Os fatores de crescimento agem diretamente na proliferação e diferenciação de osteoblastos e células endoteliais (KANG et al., 2011), com destaque para: Fator de crescimento transformador-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), Fator de crescimento endotelial (VEGF), Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e Fator de crescimento epidermal (EGF). E finalmente, tem-se a rede complexa de fibrina que incorpora uma grande quantidade de citocinas e fatores de crescimento, permitindo sua liberação gradativa, proporcional a degradação de fibrina, o que implica em uma vida útil aumentada de todas essas substâncias, mantendo-as *in situ* por um período conveniente para regeneração óssea (DOHAN et al., 2006 b)

Segundo TAJIMA et al. (2015), a influência dos concentrados plaquetários sobre a cicatrização óssea parece estar concentrado exclusivamente no início do processo e outros tratamentos duradouros são pensados para potencializar o benefício. O Bio-Oss não é completamente reabsorvível e fornece um veículo transportador apropriado para fatores de crescimento e assim permitir reparo rápido de defeitos ósseos, em maior extensão quando comparados com cada material utilizado separadamente (DENICOLO et al., 2015). Vários estudos mostram o efeito superior da associação de BO e PRF no processo de reparo ósseo (ENGLER-PINTO et al., 2019; DO LAGO et al., 2019; YOU et al., 2019; OLIVEIRA et al. 2015). Entretanto, ainda são escassos os estudos avaliando o papel dessa associação em situações onde o metabolismo ósseo está alterado, como no caso de pacientes sob terapia com bisfosfonatos.

## II- PROPOSIÇÃO

- **OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o efeito da associação da PRF e enxerto bovino xenógeno na remodelação óssea de defeitos críticos em calvárias de ratos tratados com ácido zoledrônico.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o efeito da associação da PRF e enxerto bovino xenógeno em ratos pré-tratados com ácido zoledrônico considerando:

- O padrão de reparo da área de defeito de calvária através de análise histológica qualitativa;
- A contagem de osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e vasos sanguíneos nas bordas do defeito através de análise histométrica;
- O percentual de colágeno total nas bordas e na área do defeito de calvária por meio de coloração de *Picrosirius Red* sob microscopia óptica;
- A birrefringência de colágeno nas bordas e na área do defeito por meio de coloração de *Picrosirius Red* sob microscopia de luz polarizada.



### III- CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal do Ceará (UFC), que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato.

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob o protocolo nº 820906021, (Anexo I). Assim sendo, esta dissertação é composta de 01 capítulo, contendo o artigo redigido de acordo com a revista científica escolhida, conforme descrito abaixo:

**“Avaliação da associação de fibrina rica em plaquetas e enxerto xenógeno na reparo ósseo de defeitos críticos em calvárias de ratos tratados com ácido zoledrônico”**

Autores: Bárbara Gressy Duarte Souza Carneiro, Paula Goes

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico: *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*

ISSN 0901-5027

Qualis capes: A1

Fator de impacto: 1.961

### 3.1 Capítulo 1

## **AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E ENXERTO XENÓGENO NA REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIAS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO**

### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da associação entre fibrina rica em plaquetas (PRF) e enxerto bovino xenógeno, Bio-oss (BO), na remodelação óssea de defeitos críticos em calvárias de ratos tratados com ácido zoledrônico (AZ). Para isto, 36 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando 300 g, foram utilizados. Vinte e quatro ratos receberam previamente AZ em dose única de 120 µg/kg, via s.c. Sete dias depois foram submetidos a cirurgia para criação de um defeito crítico de 8 mm na calvária e foram divididos nos seguintes grupos (n=6) de acordo com o tratamento: AZ – não recebeu enxerto; BO - teve o defeito preenchido com 0,03 ml de Bio-Oss; PRF - teve o defeito preenchido com 500 µl de PRF; BO+PRF - teve o defeito preenchido com BO e PRF. Os animais do grupo controle (C) (n=6) receberam solução salina e sem qualquer preenchimento do defeito. Todos os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de colágeno bovino reabsorvível antes da sutura. Adicionalmente foi utilizado 6 animais doadores de sangue para obtenção do PRF alogênico. Após 12 semanas todos os animais foram eutanasiados e as calvárias foram removidas e submetidas às análises histológica e histomorfométrica. O tratamento com PRF promoveu aumento de 37% de osteoblastos, 72% de osteoclastos, 74% vasos sanguíneos e 39% colágeno total, marcado pelo aumento de colágeno tipo I quando comparado ao grupo AZ (p<0,05). A associação BO+PRF ainda mostrou melhor aspecto de reparo pois além da manutenção da altura de tecido, as partículas de BO estavam em menor tamanho com maior formação óssea entre essas partículas. Desta forma podemos concluir que o uso de PRF associado ao Bio-Oss pode auxiliar o processo de reparo ósseo estimulando a remodelação óssea, promovendo angiogênese, estimulando a produção de colágeno e mantendo a anatomia do tecido, atenuando os efeitos negativos em tecido ósseo causados pelo ácido zoledrônico, sugerindo que esta associação pode ser uma ferramenta importante no tratamento de defeitos ósseos críticos em pacientes que utilizam bisfosfonatos.

**Palavras-chave:** fibrina rica em plaquetas, Bio-Oss, bisfosfonato, defeito crítico de calvária, reparo ósseo

## INTRODUÇÃO

Na cirurgia bucomaxilofacial, a prática de regeneração óssea guiada (ROG) é frequentemente utilizada a fim de reestabelecer o volume de osso alveolar perdido após a perda dentária, e assim, permitir a instalação de implantes na posição correta, proporcionar um posicionamento tridimensional da coroa protética ideal e intensificar os resultados estéticos e funcionais, especialmente da gengiva adjacente (MARTIN et al., 2018).

Apesar de tantos avanços tecnológicos, o padrão-ouro dos enxertos ósseos ainda é o osso autógeno, pois é o único que apresenta características de osteogênese, osteoindução e osteocondução (D´SOUZA et al., 2019). Vale salientar, entretanto que este tipo de enxerto apresenta desvantagens importantes tais como: suprimento ósseo limitado e morbidade adicional do leito doador. Portanto, o uso de biomateriais vem ganhando destaque (D´SOUZA et al., 2019), especialmente o osso bovino liofilizado (GARCÍA-GARETA et al., 2015), pois é biocompatível, livre de antigenicidade, não necessita de um leito doador e apresenta resultados clínicos bem promissores, apesar de apresentar apenas propriedades osteocondutoras (DENICOLO et al., 2015).

Algumas condições sistêmicas e o uso de medicamentos, como os bisfosfonatos (BFs), podem interferir no metabolismo ósseo e prejudicar a ROG. Os BFs são indicados para tratamento da osteoporose pós-menopausa ou masculina, devido sua eficácia contra fraturas (ANAGNOSTIS et al., 2017). Estudos apontam, por outro lado, que o uso de BFs pode prejudicar o reparo ósseo devido seu efeito deletério na angiogênese e inibição maciça de osteoclastos, podendo desencadear inclusive osteonecrose dos maxilares, após cirurgias orais (ROSINI et al., 2015). Assim, a realização de procedimentos cirúrgicos em pacientes em que fazem uso de bisfosfonatos tem se tornado um ponto crucial para cirurgiões-dentista. Neste contexto, medidas que tentem evitar ou minimizar os danos dos BFs ao tecido ósseo são cada vez mais estudadas.

Um dos eventos mais importantes na regeneração óssea é a angiogênese que é mediada por fatores de crescimento (FC), estes podem ser associados a biomateriais osteocondutores para melhorar o processo de cicatrização óssea (DENICOLO et al., 2015; KASTEN et al., 2012). Sabendo da importância desses FCs na remodelação óssea, ganha destaque o uso de concentrados plaquetários, especialmente a Fibrina Rica em Plaquetas (PRF). Ele consiste de um complexo imunológico capaz de estimular mecanismos de defesa, formado por plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento embebidos em arcabouço de fibrina (MIRON et al., 2017a; KANG et al., 2011). Atualmente diversos estudos em áreas médicas e odontológicas

tem apresentado resultados positivos na ROG com o uso de PRF (CASTRO et al., 2017a; CASTRO et al., 2017b; MIRON et al., 2017b; ALI et al., 2015).

Nesse contexto, sabendo dos efeitos deletérios do AZ sobre as células ósseas e a vascularização, especialmente durante o processo de reparo ósseo, este trabalho objetivou avaliar o efeito da associação entre PRF e enxerto bovino liofilizado no reparo ósseo de defeitos em calvárias de ratos tratados com AZ.

## **METODOLOGIA**

### **2.1. Delineamento do Estudo**

Este foi um estudo pré-clínico prospectivo, randomizado, controlado e cego, utilizando modelos de animais. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no ARRIVE (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) *guidelines* para uso de animais experimentais (KILKENNY et al., 2010). O projeto foi aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC) sob o protocolo 820906021 (anexo I).

### **2.2. Animais**

Foram utilizados 36 ratos de linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com idade média de 13 semanas, peso médio de 300 g. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidos para o Biotério da Faculdade do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 3 animais em cada. Todos receberam ração comercial balanceada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 22°C durante todo o experimento.

### **2.3. Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, cada grupo foi constituído de 6 ratos (ABDULLAH et al., 2016):

1- Grupo controle (Grupo C): os animais receberam solução salina, foram submetidos ao defeito crítico na calvária o qual foi recoberto apenas a membrana bovina reabsorvível;

2- Grupo Ácido zoledrônico (Grupo AZ): os animais receberam ácido zoledrônico, foram submetidos ao defeito crítico na calvária o qual foi recoberto apenas a membrana bovina reabsorvível;

3- Grupo Bio-Oss (Grupo BO): os animais receberam ácido zoledrônico, foram submetidos ao defeito crítico na calvária o qual foi preenchido por Bio-Oss (0,03 ml) e recoberto pela membrana bovina reabsorvível;

4- Grupo PRF (Grupo PRF): os animais receberam ácido zoledrônico, foram submetidos ao defeito crítico na calvária o qual foi preenchido por PRF alogênico (500 µl) recoberto pela membrana bovina reabsorvível;

5- Grupo associação PRF e Bio-Oss (grupo BO+PRF): os animais receberam ácido zoledrônico, foram submetidos ao defeito crítico na calvária o qual foi preenchido por BO saturado em PRF (0,03 ml) e recoberto pela membrana bovina reabsorvível;

Seis ratos foram utilizados como doadores de sangue para produção da PRF.

#### **2.4. Tratamento com Ácido Zoledrônico**

Os animais dos grupos AZ, BO, PRF e BO+PRF receberam ácido zoledrônico (Zometa®, Novartis Pharma AG, Basel, Suíça) na dose única de 120 µg/kg, via subcutânea (OLEJNIK et al., 2016), equivalente ao tratamento de osteoporose humano (5mg 1x/ano). O grupo C, recebeu 0,1 ml/kg de solução salina 0,9% por via s.c.

#### **2.5. Cirurgia de Defeito Crítico em Calvária e Preparação do Sítio do Enxerto**

Após sete dias da administração de AZ ou NaCl, as cirurgias foram realizadas em condições estéreis. Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via i.p. A pele que cobre a calvária foi raspada e realizada antissepsia com clorexidina 2%. Uma incisão cutânea, semilunar, de aproximadamente 6,0 cm de comprimento foi feita sobre a linha média, um retalho de espessura total foi deslocado e a calvária exposta. Uma craniotomia foi realizada com o auxílio de uma broca trefina, de 8 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) (VAJGEL et al., 2014), e sob irrigação abundante de solução salina, na região de linha média. Todo cuidado foi realizado para não romper dura-máter. Em cada animal foi realizado apenas um defeito.

A membrana biológica de colágeno bovino reabsorvível (Lumina coat – Critéria), de dimensões 6 x 6 cm foi posicionada. Em seguida o retalho foi reposicionado e suturado com fio reabsorvível poliglactina (vicryl - Ethicon 1,5cm nº4-0 - Johnson & Johnson). Após a cirurgia os animais receberam 5 mg/kg de cetoprofeno em dose única. A eutanásia foi realizada 12<sup>a</sup> semana após a cirurgia.

## 2.6. Preparação da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

A PRF homogênea foi obtida a partir de amostra de sangue periférico de 6 ratos Wistar doadores saudáveis, coletado por punção intracardíaca (MESSORA et al., 2008) com auxílio de agulha 25 x 8 e seringa de 20 ml (aproximadamente 3,5 ml de sangue coletado por animal doador) sob anestesia geral (conforme descrito anteriormente) e imediatamente transferidos para tubos à vácuo de 9 ml, específicos para centrífuga (Fibrin Fuge 25 Montserrat – Brasil). Os animais exsanguinados foram então eutanasiados, quando necessário, por uma alta dosagem de anestésico e relaxante muscular (quetamina 300 mg/kg e xilazina 70mg/kg). A amostra de sangue foi processada imediatamente para preparar a membrana de PRF com o protocolo de 3000 rpm por 14 min e em cada defeito crítico dos animais dos grupos PRF e BO+PRF foram colocados 0,04 ml de PRF (adaptado de OLIVEIRA et al., 2015) (Quadro 1).

## 2.7. Preparação do material osteocondutor

Foi utilizado como material osteocondutor Bio-Oss (Geistlich Pharma Wolhusen - Suíça) tamanho de partícula 0,25-1,0 mm, cada defeito crítico na calvária dos animais dos grupos BO e BO+PRF recebeu 0,04 ml de BO. Para criar a associação da PRF e BO, o Bio-Oss foi hidratado com excesso de PRF de acordo com o grupo a qual pertence (Quadro 1).

Quadro 1 – Quantidade de Bio-Oss e PRF utilizado nos defeitos de calvária

GRUPO BO	GRUPO PRF	GRUPO BO+PRF
0,04 ml de BO	0,04 ml de PRF	0,04 ml de PRF + 0,04 ml de BO

**BO = Bio-Oss, PRF = Fibrina Rica em Plaquetas**

## 2.8 Análise Histológica

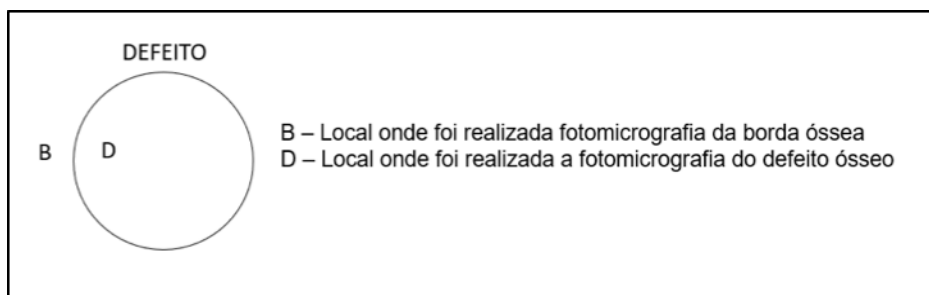
Doze semanas após a cirurgia, os animais foram eutanasiados por uma alta dosagem de anestésico e relaxante muscular (cetamina 240 mg/kg e xilazina 30mg/kg). A pele foi dissecada, e os sítios defeituosos foram removidos juntamente com o osso circundante em bloco. A calvária foi fixada em formol tamponado a 10%, e em seguida descalcificada com ácido fórmico a 10%. Após a descalcificação completa, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, em seguida, foram processados e emblocados em parafina.

Seções de 6 µm de espessura, foram cortados em uma direção longitudinal. As seções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise por microscopia óptica.

Quatro campos próximos das bordas do defeito das lâminas coradas com HE, em magnificação de 400x, foram selecionados para contagem no número de osteoblastos, osteoclastos por perímetro ósseo (N.Ob/B.Pm e N.Oc/B.Pm) usando o Software Image J (GOES et al., 2019). Também foi realizada a contagem de número de osteócitos e vasos sanguíneos por área óssea (N.Ocy/B.S. e N.Bv/B.S).

## 2.9. Análise da Quantidade e Tipo de Colágeno

A fim de identificar o tipo de colágeno fibrilar uma nova secção de 6 µm foi coletada a partir dos blocos de parafina previamente preparados. Essas secções foram coradas com *Picrosirius Red* e as lâminas foram avaliadas em microscópio de luz polarizada para análise da birrefringência de colágeno como: tipo I - coloração amarelo-avermelhada e tipo III - coloração verde-esbranquiçada. Para cada amostra foram analisados 2 campos em um aumento de 400x (Microscópio Leica) nas regiões de borda óssea e defeito próximo a borda (Figura 1). Esses campos foram avaliados quantitativamente antes e após a polarização da luz através de fotomicrografias pelo software de análise de imagem ImageJ® conforme adaptação do protocolo de ALVES et al. (2015).



**Figura 1. Disposição das áreas fotografadas para análise da quantidade e tipo de colágeno**

## 2.10. Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentam com distribuição normal. Os dados paramétricos foram apresentados com média ± E.P.M., analisados através do teste de ANOVA seguido de teste de Tukey. O nível de significância foi definido como  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### *Análise histológica qualitativa*

#### *GRUPO C*

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito, pequena formação óssea foi observada nas margens do defeito. Estas margens eram regulares, espessas e arredondadas. O tecido conjuntivo ao longo do defeito apresentou grande quantidade de fibras colágenas e espessura bem menor que a espessura da calvária original

#### *GRUPO AZ*

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito, pequena formação óssea foi observada nas margens do defeito. Estas margens apresentavam irregulares e com menor espessura, na maioria das amostras, que o grupo Controle e eram mais afiladas. Algumas amostras apresentavam invaginação de tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo ao longo do defeito apresentou grande quantidade de fibras colágenas e espessura bem menor que a espessura da calvária original

#### *GRUPO BO*

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito, as margens apresentavam irregulares e com menor espessura, porém arredondadas em sua maioria. e eram mais afiladas. A espessura da calvária original manteve-se constante devido a presença das partículas de Bio-Oss. Havia invaginação de tecido conjuntivo tanto no tecido ósseo quanto nas partículas do xenoinxerto. Ao redor deste, havia presença de tecido conjuntivo organizado e tecido osteóide, além de vários pontos de formações ósseas isoladas.

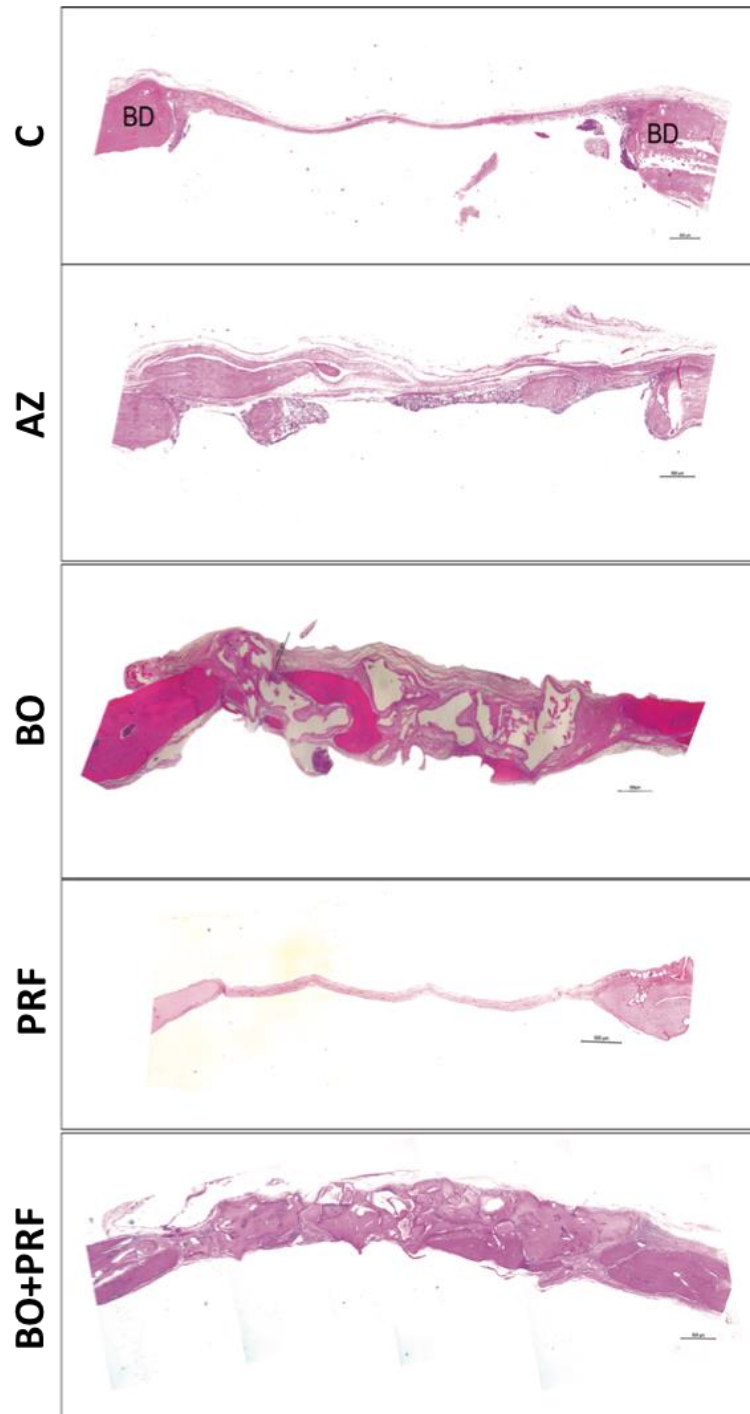
#### *GRUPO PRF*

Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito, pequena formação óssea foi observada nas margens do defeito. Estas margens apresentavam irregulares e com menor espessura, na maioria das amostras, que o grupo Controle e eram mais afiladas. Algumas amostras apresentaram locais de formação óssea ao longo do defeito. Algumas amostras apresentavam invaginação de tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo ao longo do defeito apresentou bem organizado e com grande quantidade de fibras colágenas e espessura menor que a espessura da calvária original



*GRUPO BO+PRF*

As características são semelhantes ao grupo BO, entretanto as bordas, em sua maioria, eram mais espessas, as partículas de Bio-Oss eram menores e havia maior formação de tecido osteóide e mais formações ósseas isoladas.



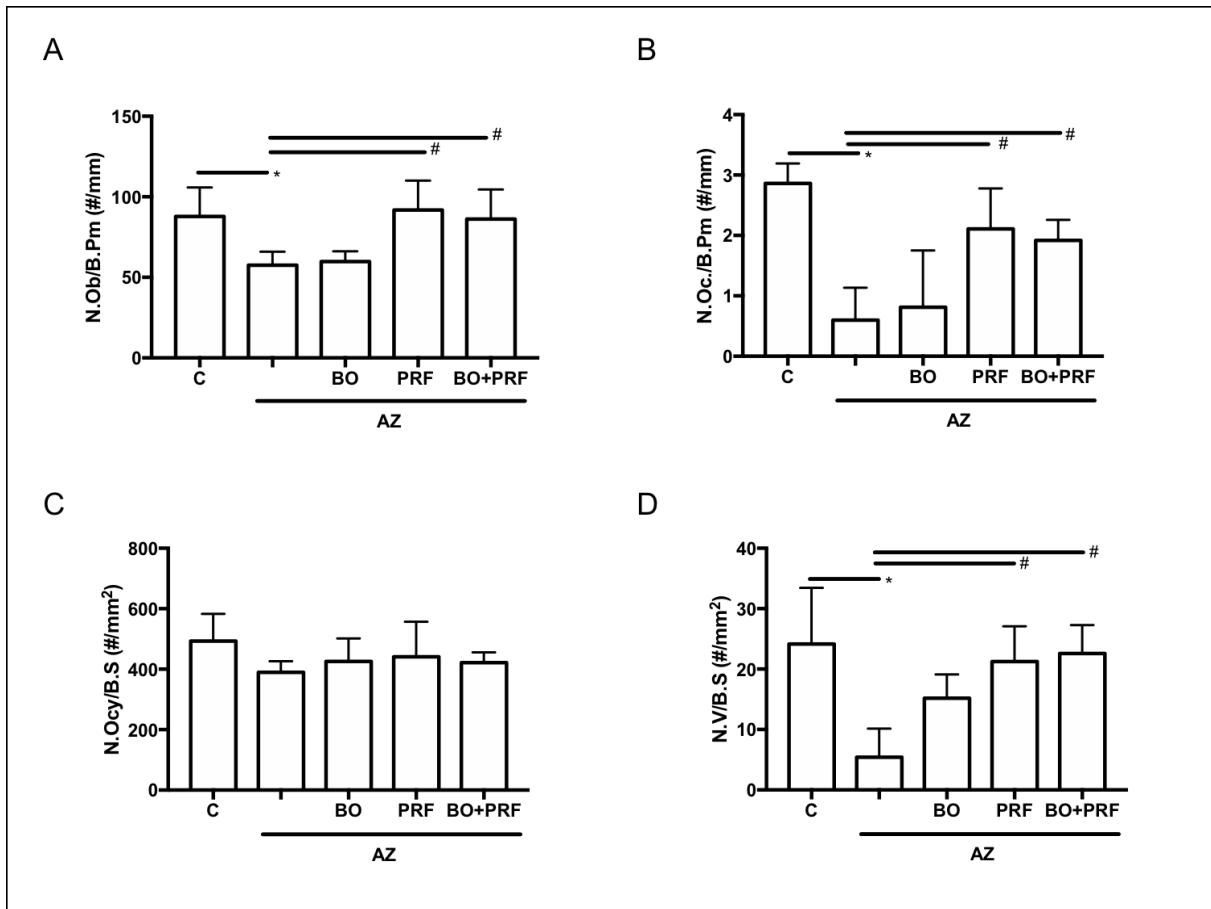
**Figura 2. Efeito do PRF e BO + PRF na área do defeito.** Fotomicrografias após o período experimental de 12 semanas, da área do defeito da calvária de animais do grupo C; AZ, BO, PRF, BO+PRF. H&E. Magnificação de 40x. BD = Borda do defeito.

### *Análise histométrica*

A análise histométrica pode ser observada na Figura 3. Os animais tratados com AZ apresentaram redução significativa do número de osteoblastos por perímetro ósseo ( $57,56 \pm 4,83$  N.Ob/mm) quando comparado ao grupo C ( $87,85 \pm 8,97$ ). Não houve diferença estatística em relação aos grupos AZ e BO ( $59,85 \pm 2,81$ ) na contagem de osteoblastos. Entretanto, os grupos PRF ( $91,79 \pm 9,10$ ) e BO+PRF ( $86,22 \pm 8,17$ ) reverteram a redução no número de osteoblastos por perímetro ósseo quando comparados ao grupo AZ ( $p < 0,05$ ) (Figura 3A).

Quanto a contagem de osteoclastos, o AZ ( $0,59 \pm 0,26$  N.Oc/mm) reduziu de forma significativa o número destas células quando comparado ao grupo C ( $2,86 \pm 0,19$ ). O tratamento com BO ( $0,81 \pm 0,46$ ) não reverteu a redução de osteoclastos quando comparado a AZ. Enquanto os tratamentos com PRF ( $2,11 \pm 0,38$ ) e BO+PRF ( $1,91 \pm 0,19$ ) preveniram a redução do número de osteoclastos observada no grupo AZ ( $p < 0,05$ ) (Figura 3B).

Não houve alterações significantes entre os grupos, quanto a contagem de osteócitos (Figura 3C). Considerando o número de vasos sanguíneos, os animais que receberam AZ ( $5,42 \pm 2,72$  N.Bv/mm<sup>2</sup>) apresentaram redução importante deste parâmetro quando comparado ao grupo C ( $24,15 \pm 5,37$ ) ( $p < 0,05$ ). Os animais que receberam BO apesar não apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo AZ, apesar da tendência ao aumento do número de vasos ( $p > 0,05$ ). Apenas os grupos tratados com PRF ( $21,24 \pm 2,92$ ) e BO+PRF ( $22,58 \pm 2,09$ ) foram capazes de impedir a redução acentuada do número de vasos sanguíneos na região do defeito quando comparado AZ ( $p < 0,05$ ) (Figura 3D).

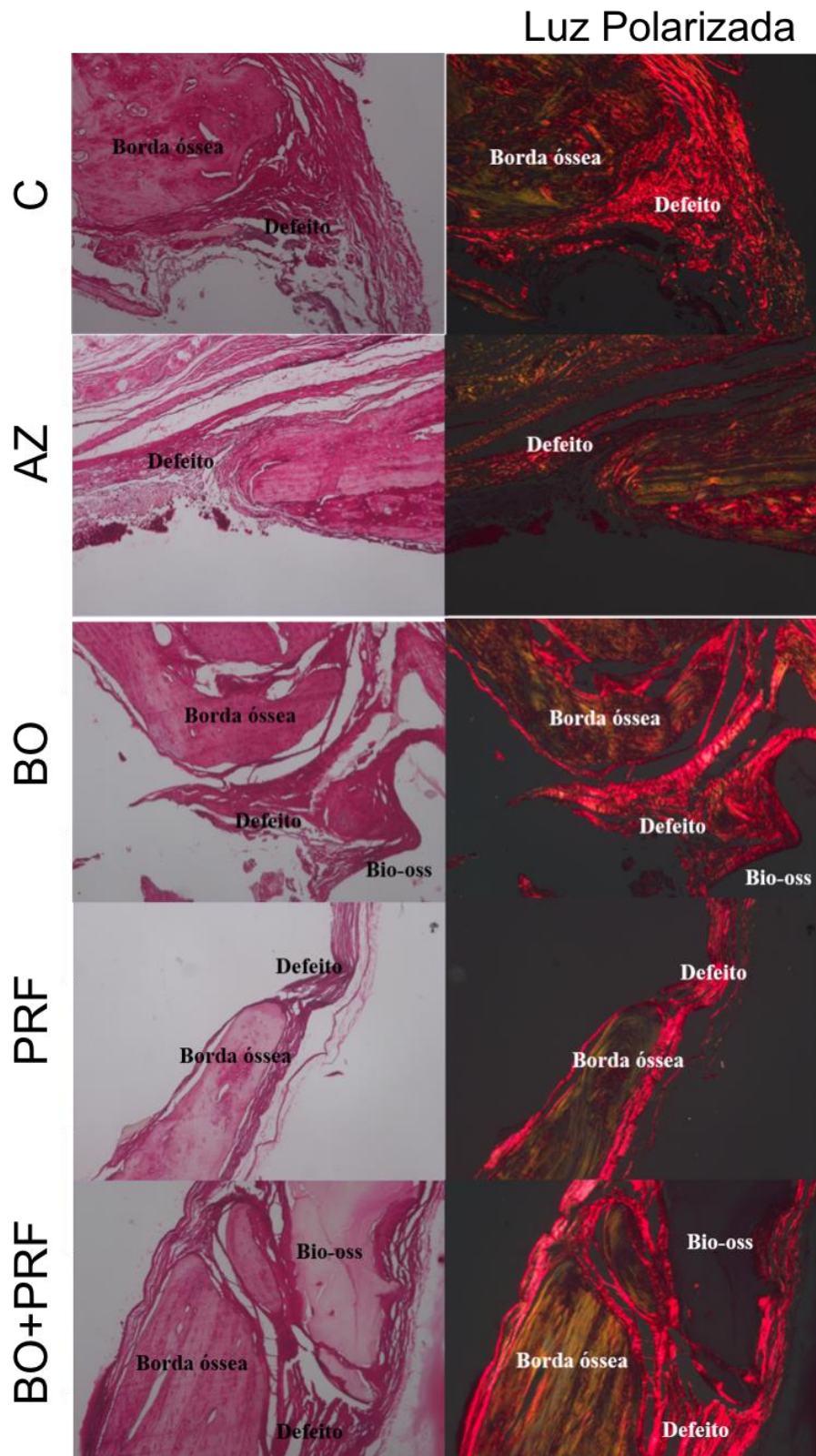


**Figura 3. Efeito associação de BO+PRF sobre o número de células ósseas e vasos na área do defeito.** (A) número de osteoblastos/peímetro ósseo (N.Ob/B.Pm); (B) número de osteoclastos/perímetro ósseo (N.Oc/B.Pm); (C) número de osteócitos/área de tecido ósseo (N.Ocy/B.S); (D) número de vasos sanguíneos/área de tecido ósseo (N.V/B.S.). Dados representam média±E.P.M. de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado a C. # $p < 0,05$  quando comparado a AZ. (ANOVA seguido de Teste de Tukey).

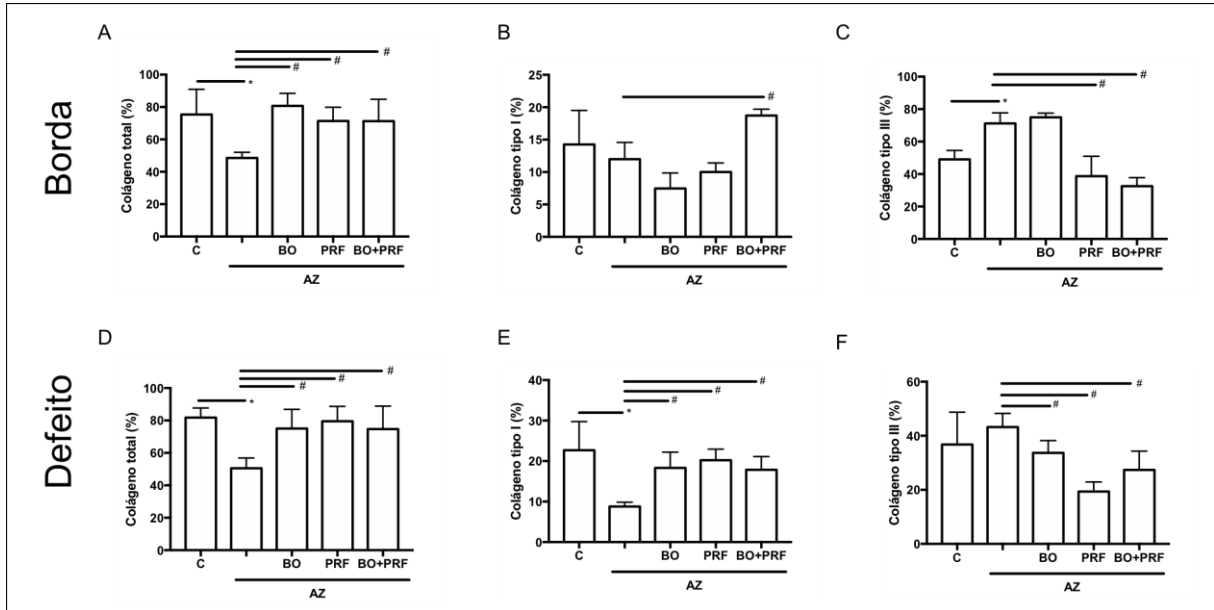
### *Análise da quantidade e tipo de colágeno*

As figuras 4 e 5 mostram a análise da quantidade e do tipo de colágeno na região de borda óssea e defeito de calvária. Nos animais o grupo C foi possível observar uma grande quantidade de colágeno total (Figura 4) sendo 74% na borda (Figura 5A) e 81% no defeito (Figura 5D). Considerando a análise qualitativa do colágeno (Figura 4), nas bordas 14% era do tipo I (Figura 5B) e 49% do tipo III (Figura 5B), e na região do defeito, 22% era do tipo I (Figura 5E) e 36% do tipo III (figura 5F). O AZ reduziu de forma significativa a quantidade de colágeno (Figura 4), tanto nas bordas (48%) quanto no defeito (50%) quando comparado ao grupo C, havendo aumento de colágeno tipo III nas bordas ósseas (Figura 5C) associado a redução de colágeno tipo I no defeito (Figura 5E) ( $p < 0,05$ ). O tratamento com BO provocou aumento do colágeno total nas bordas (80%) e no defeito (75%) quando comparado a AZ ( $p < 0,05$ ). Tal aumento foi marcado pela grande quantidade de colágeno tipo III nas bordas (74%), e tipo I no defeito (15%).

Os tratamentos com PRF e BO+PRF também apresentaram grande quantidade de colágeno total (PRF borda = 71%, PRF defeito = 79%; BO+PRF borda = 71%, BO+PRF defeito = 74%) (Figuras 4, 5A e 5D), sendo que em ambos os grupos esse aumento foi marcado pela redução de colágeno tipo III nas bordas (PRF borda = 36%; BO+PRF borda = 32%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 5C) com destaque especial para o aumento significativo do aumento de colágeno tipo I no grupo BO+PRF (18%) quando comparado a AZ (Figura 5B). A região do defeito de ambos os grupos tratados com PRF e BO+PRF foi marcada pelo aumento de colágeno tipo I (PRF defeito = 14%, BO+PRF defeito = 17%) (Figura 5E) e redução de colágeno tipo III (PRF defeito = 19%, BO+PRF defeito = 27%) comparado a AZ (Figura 5F).



**Figura 4.** Fotomicrografia do efeito da associação de BO+PRF sobre fibras colágenas nas áreas de borda e defeito. Coloração com *Picosirus Red* em microscopia óptica (coluna esquerda), em microscopia de luz polarizada (coluna direita). Magnificação 100x.



**Figura 5. Efeito da associação de BO+PRF sobre fibras colágenas nas áreas de borda e defeito.** (A) colágeno total da borda óssea; (B) colágeno tipo I da borda óssea; (C) colágeno tipo III da borda óssea; (D) colágeno total na área de defeito; (E) colágeno tipo I na área de defeito; (F) colágeno tipo III na área de defeito. Dados representam média±E.P.M. de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado a C. # $p < 0,05$  quando comparado a AZ. (ANOVA seguido de Teste de Tukey).

## DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a associação da PRF com Bio-Oss manteve a espessura óssea do defeito, com formação de tecido osteóide entre as partículas de Bio-Oss e diminuição dos tamanhos das mesmas em animais submetidos a terapia com Ácido Zoledrônico (AZ). Além disso, foi observado nos grupos que receberam PRF, houve aumento no número de osteoblastos, osteoclastos e vasos sanguíneos, revertendo os achados observados nos animais após o pré-tratamento com AZ. Adicionalmente, o tratamento com PRF promoveu aumento do percentual de colágeno total na área de defeito crítico em calvária, sendo marcado por aumento de colágeno tipo I e redução do colágeno tipo III.

Atualmente a avaliação da regeneração óssea e a interação entre osso e biomaterial pode ser estudada através de diversos modelos *in vivo* tais como: segmentação de osso longos e mandíbula, defeitos parciais na cortical e osso trabecular, e modelos de calvária, com destaque para este último por permitir avaliação de materiais complexos e a construção de modelos de engenharia tecidual para regeneração de defeitos crânio faciais quando comparado

aos demais modelos. Dentre os diversos animais que podem ser utilizados para o modelo de calvária, os mais usados são os coelhos e os ratos. Entretanto os ratos são de mais fácil manuseio e apresentam melhor relação custo-benefício (GOMES & FERNANDES, 2011). Além disso do animal, o uso do modelo de calvária implica na seleção de tamanho do defeito, que varia de acordo com a espécie, linhagem, sexo, idade, sítio anatômico, forma, tamanho e ambiente micromecânico. Em ratos, apesar dos dados controversos sobre as dimensões de um defeito crítico de calvária, tem sido descrito por diversos autores (GOMES & FERNANDES, 2011; HONMA et al., 2008; VIATEAU et al., 2008) que um defeito de 8 mm, incapaz de cicatrizar espontaneamente, tem sido considerado como padrão-ouro para avaliar diferentes estratégias terapêuticas ósseas (VAJGEL et al., 2014), corroborando com a metodologia deste trabalho.

Este estudo mostrou que o reparo ósseo foi prejudicado na presença de ácido zoledrônico, mesmo este sendo utilizado em doses baixas reproduzindo o protocolo terapêutico de osteoporose em humanos (BIVER et al., 2010; OLEJNIK et al., 2016). Os animais que receberam AZ apresentaram redução na contagem de osteoblastos e osteoclastos. Embora as ações inibitórias do AZ sobre osteoclastos já estejam bem descritas (ROSINI et al., 2015) pouco ainda se sabe sobre seu efeito na função de osteoblastos. Tem sido descrito que o AZ diminui a expressão de fatores de crescimento sobre uma grande diversidade de linhagens celulares, além de reduzir a proliferação e viabilidade tanto de precursores de osteoblastos (CASTRO et al., 2019; HUANG et al., 2016) como de osteoblastos (MANZANO-MORENO et al., 2015; WALTER et al., 2010). Em altas concentrações (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) o AZ estimula a morte de osteoblastos (BAYRAM et al., 2013) via aumento de Caspase-3 (CASTRO et al., 2019). Adicionalmente foi observado nos animais do grupo AZ uma importante redução de colágeno total, marcada por redução de colágeno tipo I. Sabendo que osteoblastos são importantes secretores de colágeno tipo I (LU et al., 2011), a redução no percentual de colágeno pode ser explicada pelo menor número de osteoblastos nesse grupo.

Em relação aos vasos sanguíneos, os resultados deste estudo mostraram que o pré-tratamento com AZ promoveu redução do número de vaso, corroborando estudos prévios que mostraram que o AZ, de forma dose dependente, pode causar citotoxicidade e redução da capacidade migratória de células endoteliais (CASTRO et al., 2019; ZHAO et al., 2018, PABST et al., 2016). Apesar de o estudo de Biver et al. (2010) não ter observado mudança no padrão de vascularização em defeitos de calota em ratos que utilizaram a mesma dosagem de AZ. Entretanto, vale salientar que a formação de novos vasos é uma etapa crucial do reparo ósseo pois além de prover nutrição para o novo tecido, auxilia também na translocação de

células osteoprogenitoras Osterix-positivas que tem papel importante na formação de novo osso (MAES et al., 2010).

Neste contexto de dificuldade de reparo ósseo, o uso de enxertos é um dos procedimentos cirúrgicos mais comumente usados para induzir regeneração do tecido ósseo. Embora enxertos autólogos sejam considerados padrão ouro, eles apresentam limitações de uso associados ao sítio doador. Assim, aloenxertos se destacam como uma segunda opção amplamente utilizada na prática clínica (WANG & YEUNG, 2017). No entanto, muitos substitutos ósseos, como por exemplo o Bio-Oss, atuam apenas como arcabouço para migração de células progenitoras, sem apresentar qualquer propriedade osteoindutora, sendo este um importante ponto negativo destes enxertos especialmente em situações onde o tecido ósseo está mais comprometido. Os resultados deste estudo mostraram o preenchimento dos defeitos com Bio-Oss, apesar da manutenção da espessura da calvária original, não foi capaz de prevenir os efeitos deletérios causado pelo AZ, reforçando assim a importância de se associar um biomaterial osteocondutor com agentes osteoindutores.

Estudos que avaliam a aplicação direta de fatores de crescimento tem sido frequentemente realizados como forma de investigação de uma estratégia terapêutica para defeitos ósseos críticos (FISHER et al., 2013). Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), hormônio da paratireoide (PTH) e mais recentemente a fibrina rica em plaquetas (PRF) estão entre os agentes mais testados (EINHORN & GERSTENFELD, 2015).

O PRF, considerado a segunda geração de concentrados plaquetários, tem ganhado bastante destaque atualmente devido seu baixo custo, método simples de centrifugação, sem adição anticoagulantes, alta biocompatibilidade e atuando como um melhor reservatório de fatores de crescimento quando comparado ao plasma rico em plaquetas (PRP) (KANG et al., 2011; MIRON et al., 2017c). Embora ainda existam muitas questões considerando sua eficácia clínica, os possíveis efeitos positivos na regeneração tecidual nos levaram a investigar o efeito do PRF no reparo ósseo.

Este estudo mostrou que os animais que receberam PRF apresentaram maior quantidade de osteoblastos e osteoclastos, revertendo os achados do grupo AZ. Esta maior quantidade de células ósseas sugere um processo de remodelação mais ativo nestes grupos (HADJIDAKIS & ANDROULAKIS, 2006). Ainda, corroborando nossos achados, Steller et al., (2019) mostraram que a adição de PRF a osteoblastos pré-tratados com AZ induziu aumento da viabilidade celular e adesão intercelular. Na PRF, a matriz de fibrina que contém plaquetas, leucócitos e uma ampla variedade de fatores de crescimento e citocinas incluindo fator de



crescimento transformador-beta1 (TGF- $\beta$ 1), fator de crescimento de plaquetas (PDGF), VEGF, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento insulínico (IGF), interleucinas (IL) -1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 que agem diretamente promovendo a proliferação e diferenciação de osteoblastos (HE et al, 2009; DOHAN et al., 2017).

Ainda, o efeito positivo da PRF sobre osteoblastos tem repercussão direta no aumento da quantidade de colágeno, que foi marcado pelo incremento de colágeno tipo I nos animais dos grupos PRF e BO+PRF. O colágeno, especialmente o do tipo I, é o maior constituinte da matriz óssea, é secretado por osteoblastos e prove a estrutura para maturação e mineralização da matriz óssea (VAN DER REST & GARRONE, 1991). Em conjunto esses achados tendem a estimular a regeneração óssea (CAKIR et al., 2019; WANG et al., 2016; KANG et al., 2011).

Além do efeito pró-osteoblastogênico, este estudo mostrou que a PRF aumentou o número de vasos sanguíneos na região do defeito em animais pré-tratados com AZ, confirmando outros trabalhos (RATAJCZAK et al., 2018; DONG et al., 2012). A vascularização é um requisito essencial para que o processo de regeneração óssea ocorra adequadamente, sendo o VEGF, um dos fatores de crescimento liberados pela PRF, a molécula chave no controle da morfogênese dos vasos sanguíneos, promovendo quimiotaxia, diferenciação de células precursoras endoteliais e proliferação de células endoteliais (ADAMS et al., 2007). Este evento pró-angiogênico da PRF ganha ainda mais destaque neste estudo pois reverteu a redução do número de vasos observados nos animais que receberam AZ. Zoledronato prejudica a angiogênese óssea reduzindo marcadores de células progenitoras endoteliais (SOKI et al., 2013) e bem como os níveis circulantes de VEGF (SANTINI et al., 2003). O efeito negativo dos bisfosfonatos na vasculatura vem sendo investigado como possível fator de risco para osteonecrose (ALLEN & BURR, 2009)

Contudo, apesar dos benefícios anabólicos ósseos da PRF observados neste estudo, seu uso isolado não foi capaz de manter a espessura da calota original, como visto na análise histológica qualitativa. As partículas de Bio-Oss não são completamente reabsorvidas e atuam como um veículo transportador apropriado para fatores de crescimento permitindo assim um reparo rápido de defeitos ósseos de maior extensão quando comparados com cada material utilizado separadamente (DENICOLO et al., 2015). Outros estudos que utilizaram o mesmo modelo experimental também obtiveram efeito superior na regeneração óssea na presença da associação de PRF e BO, tanto na porcentagem de novo osso formado (ENGLER-PINTO et al., 2019; DO LAGO et al., 2019; OLIVEIRA et al. 2015), quanto na quantidade de colágeno (WONG & RABIE, 2010), expressão de VEGF (ENGLER-PINTO et al., 2019; DO LAGO et

al., 2019), potencializando os efeitos da PRF isolada, mesmo na presença de osteoporose (ENGLER-PINTO et al., 2019). Este fato reforça a importância da associação de materiais osteoindutores como o PRF, que estimulam a proliferação celular, com materiais osteocondutores que servem de suporte para células progenitoras (DENICOLO et al., 2015; TORRES et al., 2008; OHBA et al., 2016).

Em suma, podemos concluir que o uso de PRF associado ao Bio-Oss pode auxiliar o processo de reparo ósseo por estimular a remodelação óssea, promover angiogênese, estimular a produção de colágeno e manter a anatomia do tecido, atenuando os efeitos negativos causados pelo ácido zoledrônico, sugerindo que esta associação pode ser uma ferramenta importante no tratamento de defeitos ósseos críticos em pacientes que utilizam bisfosfonatos.

## REFERÊNCIAS

1. Abdullah WA. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *The Saudi dental journal*, v. 28, n. 3, p. 109-117, 2016.
2. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 8, n. 6, p. 464, 2007
3. Ali S, Bakry SA, Abd-elhakam H. Platelet-rich fibrin in maxillary sinus augmentation: a systematic review. *J Oral Implantol.*, v. 41, n. 6, p. 746-753, 2015.
4. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 67, n. 5 Suppl, p. 61-70, 2009.
5. Alves APNN, et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. *Rev Bras Queimaduras*, v. 14, n. 3, p. 203-10, 2015.
6. Anagnostis P, et al. Drug holidays from bisphosphonates and denosumab in postmenopausal osteoporosis: EMAS position statement. *Maturitas*, v. 101, p. 23-30, 2017.
7. Bayram H, Kenar H, Tasar F, Hasirci V. Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, v. 42, p. 140-146, 2013.

8. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*, v. 49, n. 1, p. 50-55, 2011.
9. Biver E, Vieillard MH, Cortet B, Salleron J, Falgayrac G, Penel G. No anti-angiogenic effect of clinical dosing regimens of a single zoledronic acid injection in an experimental bone healing site. *Bone*, v. 46, n. 3, p. 643-648, 2010.
10. Cakir S, et al. Histological Evaluation of the Effects of Growth Factors in a Fibrin Network on Bone Regeneration. *J Craniofacial Surg.*, v. 30, n. 4, p. 1078-1084, 2019.
11. Castro M, Torres P, Solano L, Córdova LA, Torres VA. Histatin-1 counteracts the cytotoxic and antimigratory effects of zoledronic acid in endothelial and osteoblast-like cells. *J Periodontol.*, v. 90, n. 7, p. 766-774, 2019.
12. Castro AB, et al. Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.*, v. 44, n. 1, p. 67-82, 2017a.
13. Castro AB, et al. Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *J Clin Periodontol.*, v. 44, n. 2, p. 225-234, 2017b.
14. D'Souza M, MacDonald NA, Gendreau JL, Duddleston PJ, Feng AY, Ho AL. Graft, Materials and Biologics for Spinal Interbody Fusion. *Biomedicines*, v. 7, n. 4, 2019.
15. DeNicolo PJ, Guyton MK, Cuenin MF, Hokett SD, Sharawy M, Borke J, McPherson JC 3rd. Histologic Evaluation of Osseous Regeneration Following Combination Therapy With Platelet-Rich Plasma and Bio-Oss in a Rat Calvarial Critical-Size Defect Model. *J Oral Implantol.*, v. 41, n. 5, p. 543-549, 2015.
16. do Lago ES, Ferreira S, Garcia IR Jr, Okamoto R, Mariano RC. Improvement of bone repair with I-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig.* 2019.doi:10.1007/s00784-019-03018-4
17. 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 Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod.*, 108, n. 3, p. 341-352, 2009.
18. Dohle E, et al. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. *J Tissue engineering and regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med.*, v. 12, n. 3, p. 598-610, 2018.

19. Dong Z, et al. Platelet-rich plasma promotes angiogenesis of prefabricated vascularized bone graft. *J Oral Maxillofacial Surg.*, v. 70, n. 9, p. 2191-2197, 2012.
20. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* v.11, p. 45–54, 2015.
21. Engler-Pinto A, Siéssere S, Calefi A, Oliveira L, Ervolino E, de Souza S, Furlaneto F, Messoria MR. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. *Clin Oral Implants Res.*, v. 30, n. 10, p. 962-976, 2019.
22. Fisher DM, Wong JM, Crowley C, Khan WS. Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review. *Curr Stem Cell Res Ther.*, v. 8, n. 3, p. 260-268, 2013.
23. Martin V, Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, v. 82, p. 363-371, 2018.
24. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, v. 81, p. 112–121, 2015.
25. Goes P, Dutra C, Lösser L, Hofbauer LC, Rauner M, Thiele S. Loss of Dkk-1 in Osteocytes Mitigates Alveolar Bone Loss in Mice With Periodontitis. *Front Immunol.*, v. 10, n. 10, p. 29242019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02924.
26. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.*, v. 45, n. 1, p. 14-24, 2011
27. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1092, n. 1, p. 385-396, 2006.
28. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts *in vitro*. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod.*, v. 108, p. 707–713, 2009
29. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis.*, v. 14, p. 457–464, 2008.
30. Huang X, Huang S, Guo F, et al. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function *in vitro*. *Mol Med Rep.*, v. 13, p. 613-622, 2016.

31. Kang Y, Jeon SH, Park J, Chung J, Choung Y, Choung H, Kim E, Choung P. Platelet-Rich Fibrin is a Bioscaffold and Reservoir of Growth Factors for Tissue Regeneration. *Tissue engineering: Part A.*, v. 17, n. 3, 2011.
32. Kasten P. Comparison of platelet-rich plasma and VEGF-transfected mesenchymal stem cells on vascularization and bone formation in a critical-size bone defect. *Cells Tissues Organs.*, v. 196, n. 6, p. 523-533, 2012.
33. Kilkenny C, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS biology*, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.
34. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, v. 3, p. a005058, 2011.
35. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell.*, v. 19, p. 329-344, 2010..
36. Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, Ruiz C, Garcia-Martinez O. High doses of bisphosphonates reduce osteoblast-like cell proliferation by arresting the cell cycle and inducing apoptosis. *J Craniomaxillofac Surg.*, v. 43, p. 396-401, 2015.
37. Messori MR, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.*, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2008.
38. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Wang HL, Chandad F, Nacopoulos C, Simonpieri A, Aalam AA, Felice P, Sammartino G, Ghanaati S, Hernandez MA, Choukroun J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.*, v. 21, n. 6, p. 1913-1927, 2017c.
39. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandam U, Zhang Y, Ghanaati G, Choukroun, J. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig.*, v. 21, n. 8, p. 2619-2627, 2017a.
40. Miron RJ, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.*, v. 21, n. 6, p. 1913-1927, 2017b.
41. Ohba S, et al. Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using a hydroxyapatite/collagen composite material with total blood or platelet-rich plasma. *Arch Oral Biol.*, v. 61, p. 23-27, 2016.

42. Olejnik C, Falgayrac G, During A, Cortet B, Penel G. Doses effects of zoledronic acid on mineral apatite and collagen quality of newly-formed bone in the rat's calvaria defect. *Bone*, v. 89, p. 32–39, 2016.
43. Oliveira MR, de Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR Jr, 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.*, v. 44, n. 5, p. 649-655, 2015.
44. Pabst AM, et al. Angiogenesis in the development of medication-related osteonecrosis of the jaws: an overview. *Dent J.*, v. 5, 2016.
45. Ratajczak J, et al. Angiogenic properties of 'leukocyte-and platelet-rich fibrin'. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 14632, 2018.
46. Rosini S, Bertoldi I, Frediani B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, v. 19, n. 17, p. 3309-3317, 2015.
47. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, Gavasci M, Rocci L, Tirindelli MC, Altomare V, Tocchini M, Bonsignori M, Tonini G. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.*, v. 9, p. 2893–2897, 2003.
48. Soki FN, Li X, Berry J, Koh A, Sinder BP, Qian X, Kozloff KM, Taichman RS, McCauley LK. The effects of zoledronic acid in the bone and vasculature support of hematopoietic stem cell niches. *J Cell Biochem.*, v. 114, n. 1, p. 67-78, 2013.
49. Sönmez TT, et al. The protective effect of platelet released growth factors and bone augmentation (Bio-Oss®) on ethanol impaired osteoblasts. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, v. 214, p. 36-42, 2017.
50. Steller D, Herbst N, Pries R, Juhl D, Klinger M, Hakim SG. Impacts of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma on primary osteoblast adhesion onto titanium implants in a bisphosphonate in vitro model. *J Oral Pathol Med.*, v. 48, n. 10, p. 943-950, 2019.
51. Torres J, et al. Effect of Solely Applied Platelet-Rich Plasma on Osseous Regeneration Compared to Bio-Oss®: A Morphometric and Densitometric Study on Rabbit Calvaria. *Clinical implant dentistry and related research*, v. 10, n. 2, p. 106-112, 2008.
52. Vajgel A, et al. A systematic review on the critical size defect model. *Clinical oral implants research*, v. 25, n. 8, p. 879-893, 2014.

53. Van Der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *The FASEB journal*, v. 5, n. 13, p. 2814-2823, 1991.
54. Viateau V, Logeart-Avramoglou D, Guillemain G, Petite H. Animal models for bone tissue engineering purposes. In: Conn P, ed. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa, NJ: Humana Press, 2008
55. Von Knoch F, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, v. 26, n. 34, p. 6941-6949, 2005.
56. Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig.*, v. 14, p. 35-41, 2010.
57. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* v. 2, n. 4, p. 224-247, 2017.
58. Wang Z, et al. Sheet of osteoblastic cells combined with platelet-rich fibrin improves the formation of bone in critical-size calvarial defects in rabbits. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 54, n. 3, p. 316-321, 2016.
59. Zhao Z et al. Zoledronate inhibits fibroblasts' proliferation and activation via targeting TgF- $\beta$  signaling pathway. *Drug design, development and therapy*, v. 12, p. 3021, 2018.

#### IV- CONCLUSÃO GERAL

- 1- A presença de AZ em baixa dosagem promoveu diminuição da quantidade de osteoblastos, osteoclastos, vasos sanguíneos e colágeno total
- 2- O tratamento com BO manteve a altura de tecido ósseo, no entanto não foi capaz de prevenir os efeitos negativos do AZ sobre células ósseas, vasos sanguíneos e colágeno.
- 3- O tratamento com PRF foi capaz de reverter a redução na contagem de osteoblastos, osteoclastos, vasos sanguíneos bem como o percentual de colágeno
- 4- Os animais tratados com BO+PRF apresentaram o benefício adicional manter a espessura da calota original.



## REFERÊNCIAS

1. ABDULLAH, Walid Ahmed. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. **The Saudi dental journal**, v. 28, n. 3, p. 109-117, 2016.
2. ALBILIA, Jonathan B. et al. Liquid platelet-rich fibrin injections as a treatment adjunct for painful temporomandibular joints: preliminary results. **CRANIO®**, p. 1-13, 2018.
3. ALLEN, Matthew R.; BURR, David B. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 5, p. 61-70, 2009.
4. ALI, Sherif; BAKRY, Saleh Ahmed; ABD-ELHAKAM, Hesham. Platelet-rich fibrin in maxillary sinus augmentation: a systematic review. **Journal of Oral Implantology**, v. 41, n. 6, p. 746-753, 2015.
5. ANAGNOSTIS, Panagiotis et al. Drug holidays from bisphosphonates and denosumab in postmenopausal osteoporosis: EMAS position statement. **Maturitas**, v. 101, p. 23-30, 2017.
6. ASAKA, Takuya et al. Platelet-rich fibrin may reduce the risk of delayed recovery in tooth-extracted patients undergoing oral bisphosphonate therapy: a trial study. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 7, p. 2165-2172, 2017.
7. BACCARO, Luiz Francisco et al. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical interventions in aging**, v. 10, p. 583, 2015.
8. BAYRAM, Hilal et al. Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 42, n. 1, p. 140-146, 2013.
9. BELLIDO, Teresita; PLOTKIN, Lilian I. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 50-55, 2011.
10. BIVER, E. et al. No anti-angiogenic effect of clinical dosing regimens of a single zoledronic acid injection in an experimental bone healing site. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 643-648, 2010.

11. CAKIR, Sevki et al. Histological Evaluation of the Effects of Growth Factors in a Fibrin Network on Bone Regeneration. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 30, n. 4, p. 1078-1084, 2019.
12. CASTRO, Ana B. et al. Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. **Journal of clinical periodontology**, v. 44, n. 1, p. 67-82, 2017.
13. CASTRO, Ana B. et al. Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. **Journal of clinical periodontology**, v. 44, n. 2, p. 225-234, 2017.
14. DE-FREITAS, Nayara-Ribeiro et al. Bisphosphonate treatment and dental implants: A systematic review. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 21, n. 5, p. e644, 2016.
15. DEL FABBRO, Massimo; GALLESIO, Giorgia; MOZZATI, Marco. Autologous platelet concentrates for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw treatment and prevention. A systematic review of the literature. **European journal of cancer**, v. 51, n. 1, p. 62-74, 2015.
16. DENICOLO, Philip J. et al. Histologic evaluation of osseous regeneration following combination therapy with platelet-rich plasma and bio-oss in a rat calvarial critical-size defect model. **Journal of Oral Implantology**, v. 41, n. 5, p. 543-549, 2015.
17. DOHAN, David M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. e37-e44, 2006.
18. DOHAN, David M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. e45-e50, 2006.
19. DOHLE, Eva et al. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 12, n. 3, p. 598-610, 2018.

20. DO LAGO, Eliel Scarpioni et al. Improvement of bone repair with 1-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. **Clinical oral investigations**, p. 1-14, 2019.
21. DONG, Zhiwei et al. Platelet-rich plasma promotes angiogenesis of prefabricated vascularized bone graft. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 9, p. 2191-2197, 2012.
22. D'SOUZA, Marissa et al. Materials and Biologics for Spinal Interbody Fusion. **Biomedicines** 2019, 7, 75; doi:10.3390/biomedicines7040075
23. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nat. Rev. Rheumatol.** v.11, p. 45–54, 2015.
24. ELGALI, Ibrahim et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European journal of oral sciences**, v. 125, n. 5, p. 315-337, 2017.
25. ENGLER-PINTO, Ana et al. Effects of leukocyte-and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. **Clinical oral implants research**, v. 30, n. 10, p. 962-976, 2019.
26. ESPOSITO, Marco et al. Effectiveness of sinus lift procedures for dental implant rehabilitation: a Cochrane systematic. **Eur J Oral Implantol**, v. 3, n. 1, p. 7-26, 2010.
27. ESPOSITO, Marco et al. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants-a Cochrane systematic review. **Eur J Oral Implantol**, v. 2, n. 3, p. 167-84, 2009.
28. FEMMINELLA, Beatrice et al. Clinical comparison of platelet-rich fibrin and a gelatin sponge in the management of palatal wounds after epithelialized free gingival graft harvest: A randomized clinical trial. **Journal of periodontology**, v. 87, n. 2, p. 103-113, 2016.
29. FILLINGHAM, Y.; JACOBS, J. Bone grafts and their substitutes. **The bone & joint journal**, v. 98, n. 1\_Supple\_A, p. 6-9, 2016.
30. GARCÍA-GARETA, Elena; COATHUP, Melanie J.; BLUNN, Gordon W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112-121, 2015.

31. GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory animals**, v. 45, n. 1, p. 14-24, 2011.
32. GUIMARÃES, M. B. et al. Does local delivery of bisphosphonates influence the osseointegration of titanium implants? A systematic review. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 46, n. 11, p. 1429-1436, 2017.
33. GRIFFIN, Xavier L.; SMITH, C. M.; COSTA, Matthew L. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. **Injury**, v. 40, n. 2, p. 158-162, 2009.
34. HADJIDAKIS, Dimitrios J.; ANDROULAKIS, Ioannis I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, n. 1, p. 385-396, 2006.
35. HERATH, Thanuja DK et al. Neutrophil-mediated enhancement of angiogenesis and osteogenesis in a novel triple cell co-culture model with endothelial cells and osteoblasts. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 12, n. 2, p. e1221-e1236, 2018.
36. HOAGLIN, Donald R.; LINES, Gary K. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. **International journal of dentistry**, v. 2013, 2013.
37. HONMA, T. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral diseases**, v. 14, n. 5, p. 457-464, 2008.
38. HUANG, Xin et al. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 1, p. 613-622, 2016.
39. IM, Gun-Il et al. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4105-4115, 2004.
40. KANG, Young-Ho et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, n. 3-4, p. 349-359, 2010.
41. KASTEN, Philip et al. Comparison of platelet-rich plasma and VEGF-transfected mesenchymal stem cells on vascularization and bone formation in a critical-size bone defect. **Cells Tissues Organs**, v. 196, n. 6, p. 523-533, 2012.

42. KILKENNY, Carol et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.
43. LIU, J.; KERNS, D.G. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. **Open Dent J**. 2014 May 16;8:56-65. doi: 10.2174/1874210601408010056. eCollection 2014
44. LOPEZ-JORNET, Pia et al. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Is autologous platelet concentrate application effective for prevention and treatment? A systematic review. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 8, p. 1067-1072, 2016.
45. LU, Pengfei et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 12, p. a005058, 2011.
46. MAES, Christa et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. **Developmental cell**, v. 19, n. 2, p. 329-344, 2010.
47. MARTIN, Victor; BETTENCOURT, Ana. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 82, p. 363-371, 2018.
48. MANZANO-MORENO, Francisco Javier et al. High doses of bisphosphonates reduce osteoblast-like cell proliferation by arresting the cell cycle and inducing apoptosis. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 3, p. 396-401, 2015.
49. MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. **Journal of periodontal research**, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2008.
50. MIRON, Richard J. et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 6, p. 1913-1927, 2017.
51. MIRON, Richard J. et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry?. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 8, p. 2619-2627, 2017.
52. OHBA, Seigo et al. Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using a hydroxyapatite/collagen composite material with total blood or platelet-rich plasma. **Archives of oral biology**, v. 61, p. 23-27, 2016.

53. OLEJNIK, Cécile et al. Doses effects of zoledronic acid on mineral apatite and collagen quality of newly-formed bone in the rat's calvaria defect. **Bone**, v. 89, p. 32-39, 2016.
54. OLIVEIRA, M. R. et al. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 5, p. 649-655, 2015.
55. ORRISS, Isabel R. et al. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. **Journal of cellular biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 109-118, 2009.
56. PETER, B. et al. The effect of bisphosphonates and titanium particles on osteoblasts: an in vitro study. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 87, n. 8, p. 1157-1163, 2005.
57. PABST, A. M. et al. Angiogenesis in the development of medication-related osteonecrosis of the jaws: an overview. **Dent J**, v. 5, 2016.
58. PATEL, Gauresh Kumar; GAEKWAD, Shivali S.; GUJJARI, Sheela Kumar. Platelet-rich fibrin in regeneration of intrabony defects: a randomized controlled trial. **Journal of periodontology**, v. 88, n. 11, p. 1192-1199, 2017.
59. PENG, Wang et al. The healing effect of platelet-rich plasma on xenograft in peri-implant bone defects in rabbits. **Maxillofacial plastic and reconstructive surgery**, v. 38, n. 1, p. 16, 2016.
60. POZZI, Samantha et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 18, p. 5829-5839, 2009.
61. RATAJCZAK, Jessica et al. Angiogenic properties of 'leukocyte-and platelet-rich fibrin'. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14632, 2018.
62. ROBERTO, Luana L. et al. Sociodemographic determinants of edentulism in the elderly population: A systematic review and meta-analysis. **Gerodontology**, v. 36, n. 4, p. 325-337, 2019.
63. ROSINI, S.; BERTOLDI, I.; FREDIANI, B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 17, p. 3309-3317, 2015.

64. SANTINI, Daniele et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 8, p. 2893-2897, 2003.
65. SOKI, Fabiana N. et al. The effects of zoledronic acid in the bone and vasculature support of hematopoietic stem cell niches. **Journal of cellular biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 67-78, 2013.
66. STELLER, Daniel et al. Impacts of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma on primary osteoblast adhesion onto titanium implants in a bisphosphonate in-vitro model. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 2019
67. SÖNMEZ, Tolga Taha et al. The protective effect of platelet released growth factors and bone augmentation (Bio-Oss®) on ethanol impaired osteoblasts. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 214, p. 36-42, 2017
68. SUTTAPREYASRI, Srisurang; LEEPONG, Narit. Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 24, n. 4, p. 1088-1094, 2013.
69. TAJIMA, Satoshi et al. Direct and indirect effects of a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 5-6, p. 895-905, 2014.
70. TORRES, Jesús et al. Effect of Solely Applied Platelet-Rich Plasma on Osseous Regeneration Compared to Bio-Oss®: A Morphometric and Densitometric Study on Rabbit Calvaria. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 10, n. 2, p. 106-112, 2008.
71. VAJGEL, André et al. A systematic review on the critical size defect model. **Clinical oral implants research**, v. 25, n. 8, p. 879-893, 2014.
72. VAN DER REST, Michel; GARRONE, Robert. Collagen family of proteins. **The FASEB journal**, v. 5, n. 13, p. 2814-2823, 1991
73. VON KNOCH, Fabian et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6941-6949, 2005.
74. VIATEAU, Véronique et al. Animal models for bone tissue engineering purposes. In: **Sourcebook of models for biomedical research**. Humana press, 2008. p. 725-736.

75. WANG, Zhifa et al. Sheet of osteoblastic cells combined with platelet-rich fibrin improves the formation of bone in critical-size calvarial defects in rabbits. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, n. 3, p. 316-321, 2016.
76. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. **Bioact Mater.** v. 2, n. 4, p. 224-247, 2017.
77. WANG, Xuzhu et al. Fluid platelet-rich fibrin stimulates greater dermal skin fibroblast cell migration, proliferation, and collagen synthesis when compared to platelet-rich plasma. **Journal of cosmetic dermatology**, 2019.
78. WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Effect of Bio-Oss® Collagen and Collagen matrix on bone formation. **The open biomedical engineering journal**, v. 4, p. 71, 2010.
79. WALTER, C. et al. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. **Clinical oral investigations**, v. 14, n. 1, p. 35-41, 2010.
80. YOU, Jae-Seek et al. Effects of Platelet-Derived Material (Platelet-Rich Fibrin) on Bone Regeneration. **Implant dentistry**, v. 28, n. 3, p. 244-255, 2019.
81. ZHAO, Zichang et al. Zoledronate inhibits fibroblasts' proliferation and activation via targeting TgF- $\beta$  signaling pathway. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 3021, 2018.



## ANEXO 1



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E ENXERTO XENÓGENO NA REMODELAÇÃO ÓSSEA DE DEFETOS EM CALVÁRIAS DE RATOS TRATADOS COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO", protocolada sob o CEUA nº 8209060218 (06 9005421), sob a responsabilidade de **Paula Goes Pinheiro Dutra** e equipe; Bárbara Gressy Duarte Souza Carneiro; Delane Viana Gondim - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 27/03/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA (PRP) AND XENOGRAFTS IN BONE REMODELING OF DEFECTS IN CALVARIES OF RATS TREATED WITH ZOLEDRONIC ACID", utilizing 70 Heterogenic rats (70 males), protocol number CEUA 8209060218 (06 9005421), under the responsibility of **Paula Goes Pinheiro Dutra** and team; Bárbara Gressy Duarte Souza Carneiro; Delane Viana Gondim - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/27/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **12/2019** Área: **Departamento de Morfologia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **70**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 250 g**

Local do experimento: **Núcleo de Estudos e Pesquisa em Processamento de Imagem**

Fortaleza, 27 de março de 2018

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará