

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

Walter Arthur Silva Valente

**INFLUÊNCIA DO PRF E ALB-PRF NA BIOESTIMULAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS SOBRE TITÂNIO**

Duque de Caxias

2021

Walter Arthur Silva Valente

**INFLUÊNCIA DO PRF E ALB-PRF NA BIOESTIMULAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS SOBRE TITÂNIO**

Tese apresentada à Universidade do Grande Rio
“Prof. José de Souza Herdy”, como parte dos
requisitos parciais para obtenção do grau de
Doutor em Odontologia Clínica e Experimental.

Orientadores:

Prof. Dr. Plínio Mendes Senna

Profa. Dra. Sara Gemine Piperni

Duque de Caxias

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

V386a Valente, Walter Arthur Silva.

Influência do PRF e Alb-PRF na bioestimulação de Osteoblastos humanos cultivados sobre titânio / Walter Arthur Silva Valente. – Duque de Caxias, 2021.

72 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2021.

“Orientador: Prof. Dr. Plinio Mendes Senna”.

Referências: f. 55-68.

1. Odontologia. 2. Implantodontia. 3. Osseodensificação. 4. Estabilidade primária. 5. Implantes dentários. I. Senna, Plinio Mendes. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

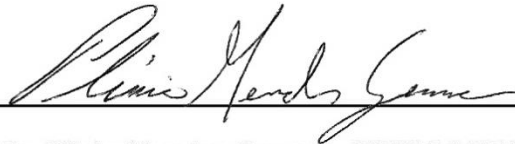
CDD – 617.6

Walter Arthur Silva Valente

INFLUÊNCIA DO PRF E ALB-PRF NA BIOESTIMULAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS SOBRE TITÂNIO

Aprovado em 06 de abril de 2021.

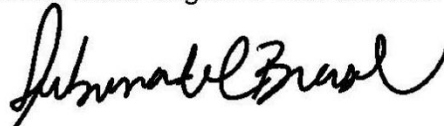
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Plinio Mendes Senna – UNIGRANRIO



Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva – UNIGRANRIO



Prof^a. Dr^a. Sabrina de Castro Brasil – UNIGRANRIO



Prof. Dr. Bruno Salles Sotto Maior – UFJF



Prof. Dr. Carlos Fernando de Almeida Barros Mourão – SAVEETHA

“Aquele que crê em mim, nunca estará sozinho.”

Jesus Cristo

Agradecimentos

A Deus por apoiar e criar recursos de todas as formas para a realização desse grande sonho.

Aos meus pais Letice e Walter Valente, e a minha irmã, Andressa Shoyana, pelo incansável incentivo e apoio, fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal, permitindo, assim, que eu realizasse esse o sonho de ser um Doutor em Odontologia.

Ao Felipe Gustavo Diogo Antônio por todo o apoio, dedicação, amizade, carinho e atenção, importantíssimos para minha jornada no Doutorado.

Ao Professor Dr. Plinio Mendes Senna, meu Orientador, pelo exemplo a ser seguido como Cirurgião-Dentista e Docente, pelo profissionalismo, atenção, paciência, amizade e seriedade com o qual conduziu esses anos de trabalho. Muito obrigado por todo o conhecimento acrescentado em minha vida e por ser um exemplo a ser incorporado.

À Profa. Sara Gemini Piperni, uma inspiração como Docente e Pesquisadora, de excelência, por todo o empenho, dedicação, amizade, respeito e atenção. Obrigado por estimular sempre o meu crescimento profissional.

À Profa. Cláudia Pereira, pela garra, atenção e colaboração com seus conhecimentos, experiência e profissionalismo que foram essenciais para a minha formação e amadurecimento profissional na minha jornada como Cirurgião-Dentista.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Clínica e Experimental (Odontoclinex) pela acolhida, pela paciência, pela

dedicação, por todos os ensinamentos e experiências transmitidos durante o caminhar deste curso.

Às minhas amigas de turma Fernanda Hecksher e Silvia Lira, por tornarem essa jornada especial, sempre fortes e unidos e por compartilharem comigo momentos de alegrias e dificuldades, tornando esse caminhar mais suave e que serão eternamente parte de minha memória.

E por fim, quero agradecer a Universidade Unigranrio, pela Oportunidade de ser aluno da primeira turma do PPGO – Odontoclinex, me concedendo a oportunidade de crescer e me aprimorar profissionalmente, me abrindo um mar de novas possibilidades. Meu agradecimento especial.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o comportamento celular e a expressão gênica de osteoblastos humanos cultivados sobre a superfície rugosa de titânio e expostos as membranas de fibrina rica em plaquetas (PRF) e modificadas com albumina (Alb-PRF). **Métodos:** Osteoblastos humanos foram cultivados sobre discos de titânio grau 4 em meio osteogênico incompleto. Após a adesão por 24 horas, as células foram submetidas à exposição direta de membranas de PRF ou Alb-PRF por até 21 dias. A viabilidade celular foi avaliada após 7 dias pelo teste de MTT, a expressão gênica após 14 dias por meio de reação de PCR em tempo. Os dados foram avaliados por ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). **Resultados:** A exposição ao PRF e Alb-PRF induziu a formação de esferóides a partir de 7 dias e mantendo-se estável esta estrutura até 14 dias. O PCR demonstrou uma expressão gênica semelhante entre os grupos PRF e Alb-PRF, com maior expressão dos genes ALP, Runx-2 e OC que o grupo controle ($P < 0,05$). OPG foi diminuída em todos os grupos expostos as membranas de forma direta e indireta, sendo ainda maior no indireto intensa ($P < 0,01$). **Conclusão:** Foi possível observar que a exposição às membranas de PRF e Alb-PRF estimulou a organização de osteoblastos em esferóides concomitante com uma maior expressão dos genes relacionados à osteogênese. As membranas de PRF e Alb-PRF diminuíram a expressão de OPG em exposição direta e indireta.

Palavras-chave: PRF, ALB-PRF, Osteoblastos, Titânio.

ABSTRACT

Objective: The objective of the study was to evaluate the cellular behavior and gene expression of human osteoblasts cultured on the surface of minimally rough titanium exposed to platelet-rich fibrin membranes (PRF) and their modification with albumin (Alb-PRF). **Methods:** Human osteoblasts were cultured on minimally rough grade 4 titanium discs (12.7mm in diameter x 2mm in height) in incomplete osteogenic medium. After adhesion for 24 hours, the cells were subjected to direct exposure to PRF or Alb-PRF membranes for up to 21 days. Cell viability was assessed after 7 days by the MTT test, expression after 14 days by real-time PCR reaction. The data were evaluated by analysis of variance and Tukey's test at a significance level of 5%. **Results:** It was possible to verify that the exposure to PRF and Alb-PRF induced the formation of spheroids from 7 days and remaining in this structure for up to 14 days. The results of the PCR analysis showed a similar gene expression between the PRF and Alb-PRF, with greater expression of the ALP, Runx-2 and OC genes than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** It was possible to observe that the exposure to the membranes of PRF and Alb-PRF stimulated the organization of osteoblasts in spheroids concomitantly with a greater expression of genes related to osteogenesis.

Key words: titanium; osteoblasts; platelet aggregates.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

° C	Graus Celsius/ Celsius <i>degree</i>
Alb-PRF	Fibrina rica em plaquetas modificada com Albumina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
µL	Microlitro/ <i>microliter</i>
M	Molar
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
mM	Mimolar/ <i>millimolar</i>
mg	Miligrama/ <i>milligram</i>
mL	Mililitro/ <i>milliliter</i>
mm	Milimetro/ <i>millimeter</i>
N	Newton
ng	Nanograma/ <i>nanogram</i>
%	Porcentagem
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> / Lauryl Sulfato de Sódio
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SM	Síndrome metabólica
TE	Tampão tris-EDTA
PRF	Fibrina rica em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TGF- β1	Fator transformador de crescimento β1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação gráfica de eventos microscópicos e moleculares ao longo do modelo de osseointegração oral em camundongos.	Pág. 26
Figura 2	Coágulo PRF.	Pág. 37
Figura 3	Preparo de membranas de Alb-PRF.	Pág. 43
Figura 4	Protocolo de preparação Alb-PRF.	Pág. 44
Figura 5	Membrana de PRF posicionada num molde de 10 mm de diâmetro para padronização do tamanho da membrana.	Pág. 48
Figura 6	Membrana posicionada no suporte tipo <i>transwell</i>	Pág. 49
Figura 7	Imagem representativa da superfície dos discos de titânio.	Pág. 53
Figura 8	Níveis de absorbância no teste de MTT.	Pág. 54
Figura 9	Morfologia das células após 7 dias de cultivo.	Pág. 55
Figura 10	Morfologia das células após 14 dias de cultivo.	Pág. 55
Figura 11	Tamanho dos esferoides formados após a exposição ao PRF (a) e ao Alb-PRF (b).	Pág. 56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Expressão gênica ($\text{ng} \times 10^{-3}$) dos genes relacionados ao fenótipo osteoblástico após 7 dias de cultura sobre os discos de titânio com e sem a cobertura de PLGA (média \pm desvio padrão). Pág. 56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Remodelação e modelação na osseointegração.....	17
2.2 Interface osso x implante.....	27
2.3. Agregados plaquetários.....	35
2.3.1 Fibrina Rica em Plaquetas - PRF.....	35
2.3.2 Alb-PRF.....	40
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	45
4.1 Confeção dos corpos de prova.....	46
4.2 Cultura celular	47
4.3 Preparo das membranas de PRF e Alb-PRF	47
4.4 Exposição dos osteoblastos às membranas de PRF e Alb-PRF	49
4.5 Ensaio de MTT	50
4.6 Análise da expressão gênica	50
4.7 Análise dos dados	51
5 RESULTADOS	52
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO	61
8 REFERÊNCIAS	62
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética.....	69

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários se tornaram a principal opção para a reabilitação bucal devido à possibilidade de repor dentes perdidos sem danificar os elementos adjacentes, além de estimular a manutenção do volume do rebordo alveolar (Albrektsson & Sennerby, 1990). O titânio é o material de escolha para a fabricação destes implantes devido às suas propriedades mecânicas favoráveis, excelente resistência à corrosão e biocompatibilidade, as quais permitem o suporte das cargas mastigatórias sem que se inicie um processo de rejeição pelo tecido ósseo (Branemark *et al.*, 1969).

Apesar de biocompatível, o titânio é considerado um material bioinerte, ou seja, a regeneração óssea no sentido de promover a osseointegração dos implantes dentários depende fundamentalmente da capacidade de resposta do tecido ósseo (van Steenberghe *et al.*, 2002). Isto é um motivo para que implantes instalados em sítios de baixa qualidade óssea, como a região posterior da maxila, ou instalados em pacientes com comprometimento metabólico como o diabetes e a osteoporose apresentem uma menor previsibilidade de sucesso (Zinger *et al.* 2005; Kubo *et al.*, 2009). Assim, a evolução da implantodontia esteve intimamente relacionada com esforços para modificar a superfície do titânio, conferindo aos implantes dentários um potencial também osseointegrador que estimule a regeneração óssea (Yonekura *et al.*, 2011).

A topografia, composição química e a molhabilidade da superfície do titânio mostraram-se importantes fatores que influenciam o processo de osseointegração. Deste modo, consagrou-se nos últimos anos o uso de implantes dentários com a superfície asperizada por processos químicos ou

jateamento abrasivo, criando assim superfícies minimamente ou moderadamente rugosas para interagir com as células do tecido ósseo. A capacidade de adesão e proliferação celular, assim como a capacidade osteogênica das células mesenquimais e osteoblastos são influenciadas pela interação com as superfícies dos implantes tratadas (Chakravorty *et al.*, 2012).

Emboras nas duas últimas décadas a maioria das pesquisas tenha se concentrado na interação da superfície de implantes dentários com o tecido ósseo, a cicatrização do tecido mole peri-implantar tem sido o foco de muita discussão devido ao seu papel fundamental na manutenção da osseointegração a longo prazo. Neste sentido, tem se difundido o uso dos concentrados plaquetários na implantodontia com o objetivo de melhorar a resposta tecidual ao redor dos implantes (Wang *et al.*, 2017).

O concentrado denominado fibrina rica em plaquetas (PRF), desenvolvido na França por Choukroun *et al.* em 2001 (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2018) como uma evolução do plasma rico em plaquetas (PRP). O PRF deriva de uma polimerização natural, lenta e progressiva que ocorre durante a centrifugação, que pode aumentar a incorporação das citocinas circulantes nas malhas de fibrina. O PRF tem demonstrado significativo efeito na cicatrização de feridas de tecidos moles pelo estímulo da angiogênese derivado da presença de fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Masuki *et al.*, 2016). Entretanto, o PRF é rapidamente metabolizado no organismo, em cerca de 14 dias após a implantação *in vivo*, o que limita o tempo de ação no tecido e sua utilização como barreira para a técnica de regeneração tecidual guiada (Cabaro *et al.*, 2018).

Um novo protocolo para a produção de membranas é realizado com um tratamento térmico da camada de plasma mais superficial após a centrifugação para melhorar as propriedades de trabalho do PRF. Enquanto o teor de fator de crescimento encontrado no PRF é normalmente perdido durante os protocolos de aquecimento padrão, métodos recentes para reincorporar o PRF líquido, incluindo células da camada leucocitária, favorecem um conteúdo mais elevado de células e fator de crescimento chamado de Alb-PRF. O Alb-PRF incorporou células vivas com altos níveis de liberação de fator de crescimento por até 10 dias ou mais, sendo uma membrana sólida, mais estável, moldável e opaca que foi proposta para uso como barreira para tecidos moles com um tempo reabsorção de 4 a 6 meses após a implantação *in vivo* (Fujioka-Kobayashi *et al.*, 2021).

Apesar do PRF e Alb-PRF serem biomateriais autógenos promissores para aplicação na cirurgia oral, implantologia e dermatologia (Gheno *et al.*, 2020), ainda não foi avaliado o potencial de estimulação de ambos os materiais tanto para fibroblastos como para osteoblastos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Remodelação e modelação na osseointegração

Na fisiologia óssea normal a formação e a reabsorção estão relacionadas em tempo, grau e espaço, uma vez que neoformação óssea só é iniciada após o estabelecimento da área de absorção. O metabolismo ósseo é influenciado por vários fatores hormonais, locais, comportamentais e ambientais, além de forças mecânicas, elétricas, químicas e magnéticas. Esse mecanismo é relativamente rápido no osso trabecular e mais lento no osso cortical (Manea *et al.*, 2019).

Alterações a níveis citoplasmáticos se iniciam e se estendem profundamente pela matriz óssea recentemente sintetizada via osteoblastos e ficam em contato com processos osteocíticos em seus canalículos. Pode-se encontrar frequentemente os complexos juncionais (junções comunicantes) entre osteoblastos (Gemini-Piperni *et al.*, 2014).

A osteblastogênese é um fenômeno complexo que tem em seu primeiro passo o compromisso das células troncos mesenquimais com um osteo-condro progenitor, impulsionados pelo fator Wnt10b, que inibem, também a diferenciação pré-adipocitária. Esse comprometimento é realizado pela ativação de fatores de transcrição pro-osteogênicos como runx2 (Jue *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que o fator de transcrição Runx2 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do esqueleto, por ser um gene fundamental para a diferenciação de osteoblastos. O envolvimento da linhagem osteoblástica na osteblastogênese é realizado não apenas pela ativação de fatores de transcrição pró-osteogênicos, mas também pela supressão do fator

adipogênico ativador de proteína ligante α (C-EBP α) e o receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ (PPAR γ). Por outro lado, altos níveis de sinalização Wnt, juntamente com a presença de Runx2, promovem ainda mais a osteoblastogênese às custas da diferenciação de condrócitos (Takarada *et al.*, 2016).

Sob os estímulos descritos acima, os precursores de osteoblastos sofrem proliferação e diferenciação em pré-osteoblastos, diferenciando-se após em osteoblastos maduros, alterando a morfologia das células osteoprogenitoras fusiformes para osteoblastos grandes e diferenciados, de forma cúbica, depositados na superfície da matriz óssea. Nos últimos estágios de sua diferenciação, o osteoblasto torna-se uma célula de revestimento plana ou um osteócito (Root *et al.*, 2020).

Durante a biossíntese da matriz extracelular e mineralização da matriz, observa-se uma variação na expressão do marcador de osteoblastos: ALP e receptor de paratireóide tipo 1 (PTH1R) aumentam na primeira fase, diminuem quando a mineralização progride e os osteoblastos se tornam osteócitos, enquanto outros marcadores como a osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea, aparecem e aumentam durante a mineralização (Martin *et al.*, 2020).

Além disso, os osteoblastos desempenham um papel crucial na formação de osteoclastos, produzindo duas citocinas osteoclastogênicas essenciais: fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), um fator de crescimento capaz de estimular a proliferação de precursores de osteoclastos e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), uma citocina transmembrana pertencente à família do TNF expressa por osteoblastos, que interage com seu receptor RANK na superfície de pré-osteoclastos. A RANK localiza-se na

superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros. Seu principal papel é a inibição da apoptose dos osteoclastos e a estimulação da diferenciação e ativação dessas células, desencadeando a osteoclastogênese (Paula-Silva *et al.*, 2020).

Os osteoblastos também secretam osteoprotegerina (OPG), um receptor chamariz para RANKL, que tem um papel osteoprotetor. De fato, a OPG é uma proteína secretada que possui a mesma forma da estrutura do domínio extracelular do RANK, de modo que se liga ao RANKL, e por meio de outros receptores presentes nos osteoclastos, prevenindo a sua interação com o RANK, com uma consequente inibição da osteoclastogênese. Seus efeitos são antagônicos aos da RANKL. Diversas citocinas e compostos, como os estrógenos, influenciam a gênese de osteoclastos por meio da regulação da produção de RANKL/OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos (Paula-Silva *et al.*, 2020).

A osteoprotegerina (OPG), receptor ativador de fator de necrose tumoral (NF- κ B [RANK]), e a citocina RANK ligante (RANKL) têm sido identificadas como os principais fatores envolvidos na gênese de osteoclastos (Paula-Silva *et al.*, 2020).

A Biomineralização é o processo pelo qual a hidroxiapatita é depositada na matriz extracelular. Supõe-se que ocorram os mesmos eventos que os da mineralização da cartilagem. Esses eventos envolvem a liberação de vesículas matriciais, vesículas envoltas por membrana extracelular (50-200nm de diâmetro), que são formadas por brotamento polarizado da membrana superficial dos condrócitos e osteoblastos (Rocha *et al.*, 2012).

A matriz extracelular inicia sua mineralização pela nucleação dos cristais de hidroxiapatita dentro das vesículas da matriz, seguindo com uma propagação da formação de hidroxiapatita da membrana para a matriz extracelular. Logo em seguida, os fosfolípidios de ligação ao cálcio (incluindo a fosfatidilserina), as proteínas de ligação ao cálcio, a sialoproteína óssea e as anexinas formadoras do canal de cálcio fazem com que ocorra um acúmulo de cálcio dentro das vesículas da matriz (Rolin *et al.*, 2018).

Em continuidade ao processo de mineralização os cristais de hidroxiapatita crescem para a matriz extracelular, preenchendo os espaços entre as fibras de colágeno tipo I. Este alongamento dos cristais de hidroxiapatita necessita de concentrações apropriadas de cálcio e fosfato fora das vesículas da matriz (Huesa *et al.*, 2012).

A razão entre o Pi e o pirofosfato inorgânico (PPi) é muito importante nesta fase. O PPi inibe a formação da hidroxiapatita e é formado pela NPP1 (uma isoenzima nucleotídeo pirofosfatase – fosfodiesterase). O PPi também é produzido por ANKH (homólogo da anquilose progressiva) que tem como função, transportar o PPi do interior para o espaço extracelular. A fosfatase alcalina não específica tecidual (TNAP) realiza a hidrólise do PPi para gerar duas moléculas de Pi, promovendo assim a mineralização da matriz. A atividade osteoblástica é finalizada por uma inibição por *feedback* negativo ou mesmo pela indução da apoptose do osteoblasto, realizada pelo TNF liberado pelas células medulares vizinhas (Muller *et al.*, 2019).

O tecido ósseo é dinâmico e está constantemente em processo de remodelação para manter a estabilidade biomecânica e a regulação da homeostase mineral de todo o organismo. O tecido ósseo está em

constantemente remodelação. Após o crescimento e a modelagem do esqueleto terem sido completados, cerca de 20% do osso trabecular está passando por remodelação e cerca de 8 -10% do tecido ósseo é substituído anualmente (Paula Silva *et al.*, 2020).

A remodelação é um processo acentuado que envolve um complexo evento de diferenciação celular. Ela permite a substituição do osso velho e ou danificado por osso novo e mecanicamente competente. Anormalidades desse processo ocorrem em algumas das doenças mais comuns que afetam os seres humanos, como a osteoporose, periodontite, artrite e osteólise induzida por tumor. O remodelamento ósseo é um processo complexo regulado por uma variedade de fatores bioquímicos e mecânicos, envolvendo a primeira reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, que são células gigantes, multinucleados (4 a 20 núcleos), altamente especializadas em remover a matriz óssea antiga, e a formação óssea realizada pelos osteoblastos, colaborando estreitamente nas unidades multicelulares básicas (BMU) (Capariello *et al.*, 2014).

O primeiro passo para o remodelamento ósseo é a fase de reabsorção, seguida pela fase de reversão, fase de formação e a fase de mineralização. Os osteoclastos fazem uma ligação com superfície óssea e iniciam um processo de secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas com a função de digerir a matriz óssea, levando a degradação dos componentes minerais, orgânicos e na liberação de inúmeros fragmentos minerais e colagenosos do tecido ósseo, fenômeno denominado reabsorção óssea. Os osteoclastos reabsorvem então, o tecido ósseo e formam a lacuna de Howship, ocorrendo uma elevada liberação cálcio ou substâncias liberadas pela matriz extracelular (Andia *et al.*, 2013).

Ao final da reabsorção óssea, os osteoclastos passam pelo fenômeno de apoptose, induzida pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β), responsável pela atração dos osteoblastos. Por fim, os osteoblastos passam a ocupar o sítio de reabsorção e iniciam a síntese de matriz extracelular (osteóide) que, após período de amadurecimento (aproximadamente 10 dias), passará pela mineralização. Ao término de cada ciclo de remodelação, a quiescência é restaurada, mantendo assim, a manutenção da integridade óssea (Andia *et al.*, 2013).

Cerca de 5% do osso cortical é remodelado a cada ano, perfurando gradualmente o osso, carregando um grupo de osteoclastos na ponta, cavando um túnel circular (cone de corte) na direção de carregamento dominante, seguido por vários milhares de osteoblastos que preenchem o túnel (cone de fechamento) para produzir um osteon secundário de osso renovado (Alves *et al.*, 2016).

O osso trabecular sofre o processo de remodelação em sua superfície de forma mais ativa (com taxas de remodelação anual até 10 vezes maiores). Logo após, o remodelamento segue para osso cortical, devido a razão superfície-volume muito maior. As primeiras células a chegarem no local da remodelação são os osteoclastos. Eles chegam através da superfície trabecular, cavando uma vala em vez de um túnel, com a profundidade de 40-60mm, seguido pela osteogênese pelos osteoblastos. Os locais de remodelação ativos alcançam áreas de tamanhos variados, desde 50x20mm até 1000x1000mm (Poole *et al.*, 2005).

Existem grandes diferenças entre os dois tipos de cicatrização óssea (ou seja, na ausência ou presença de um implante de titânio), tanto no nível macro

quanto no nível celular e molecular. Um fator crucial para esse processo é o efeito da superfície do implante sobre os diferentes componentes biológicos que entram em contato com sua superfície assim que este é introduzido no defeito ósseo preparado cirurgicamente (Shah *et al.*, 2019).

Após a inserção do implante, o tecido ósseo, que por sua vez é produto de uma longa história de adaptação estrutural e funcional a todos os tipos de efeitos biológicos intrínsecos, é confrontado com um evento físico para o qual não há preparação prévia. Em contraste com as fraturas, em condições eletivas e ideais, o próprio material do implante ocupará rapidamente a maior parte do osso removido cirurgicamente. No entanto, a introdução de uma superfície estranha é um novo elemento para o ambiente ósseo e as propriedades dessa superfície desempenham um papel importante no comportamento das células que entram em contato com ela (Shah *et al.*, 2019).

Com modificações nas escalas de comprimento micrôn, sub-micrôn e nano, a superfície do implante influencia a sequência de adsorção de proteínas, adesão plaquetária e hemostasia, ativação do complemento, inflamação e resposta celular osteogênica. Assim sendo, a superfície do implante é capaz de modular a inflamação, a formação óssea, a remodelação óssea e as consequências funcionais e / ou biomecânicas desses eventos (Shah *et al.*, 2019).

Para que ocorra o fenômeno da osteointegração é necessário um número suficiente de células pré-osteoblásticas (isto é, células-tronco mesenquimais), bem como sua diferenciação subsequente e atividade biossintética. Portanto, a osseointegração requer que as proteínas encontradas pelas células suportem ou promovam ativamente essas atividades, subsequentes à fixação e proliferação.

As proteínas adsorvidas a superfície do implante após a sua instalação apoiam a adesão celular, migração e possivelmente proliferação de células osteoprogenitoras. Os osteoblastos *in vitro* parecem depender principalmente de vitronectina ou fibronectina adsorvida para adesão e proliferação inicial, em materiais incluindo titânio, aço inoxidável e hidroxiapatita. Assim, a capacidade dos materiais de adsorver tais proteínas (em um estado ativo) do soro determina sua capacidade de suportar a adesão e proliferação celular e, portanto, é um aspecto importante de sua biocompatibilidade (Wilson *et al.*, 2005).

Um dos primeiros tipos de células a entrar em contato com os biomateriais de implante são aquelas derivadas da linhagem monócito / macrófago. Estes incluem osteoclastos e células gigantes multinucleadas (MNGCs). Análogo à remodelação óssea normal, os osteoclastos têm sido considerados por muito tempo como desempenhando um papel fundamental na preparação da superfície do implante para a formação óssea pelos osteoblastos imediatamente após a instalação do implante. Em animais e humanos, os genes e marcadores osteogênicos e osteoclásticos são expressos em células aderentes ao implante relativamente cedo (começando na primeira semana) após a implantação (Shah *et al.*, 2019).

A interação entre RANK, expresso por osteoclastos progenitores e osteoclastos, e seu ligante RANKL, expresso por osteoprogenitores e osteoblastos, promove a diferenciação de osteoclastos e remodelação óssea, enquanto OPG, um receptor secretado por osteoblastos bloqueia RANKL, atenua a remodelação óssea. Este acoplamento de osteoblastos e osteoclastos também é importante durante os estágios iniciais após a inserção do implante. A magnitude e a expressão temporal de RANK, RANKL e OPG em células

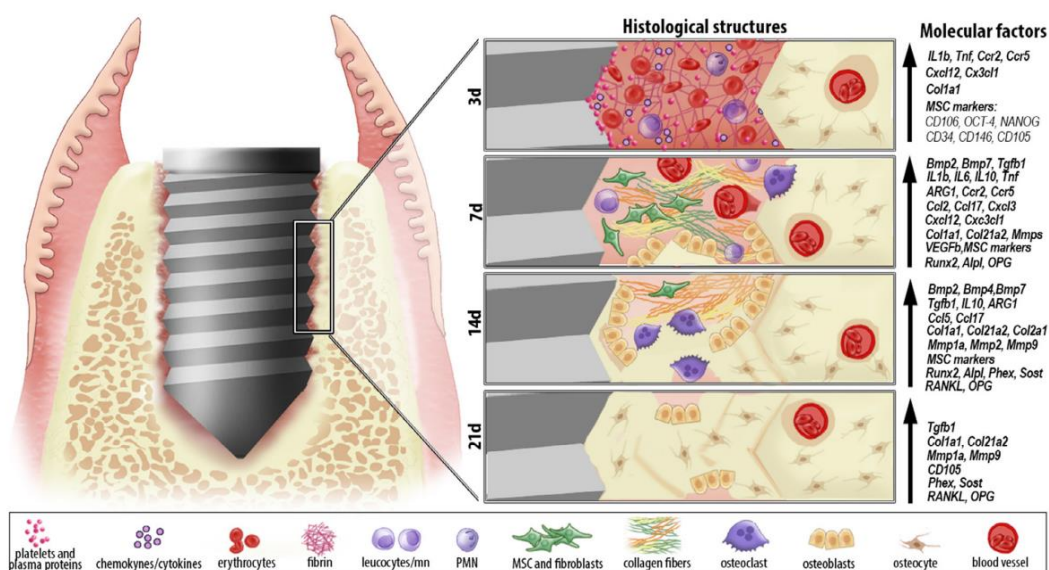
aderentes a implantes difere entre superfícies de titânio usinadas e anodizadas. Durante a cicatrização inicial, uma razão RANKL / OPG aumentada, expressão aumentada de catepsina K e fosfatase ácida resistente, concomitante com expressão aumentada de fosfatase alcalina e osteocalcina, e um alto nível de contato osso-implante em implantes anodizados em comparação com implantes usinados indicam que as propriedades da superfície do implante modulam eventos biológicos críticos no estágio inicial na interface osso-implante (Shah *et al.*, 2019).

Bigueti *et al.* (2018) mostraram que após 3 dias da instalação de implantes de titânio em modelo animal, a interface osso-implante é preenchida principalmente por coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório. O coágulo sanguíneo foi evidenciado por eritrócitos, circundados por uma rede eosinófila e discreta da rede de fibrina, também permeada por infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares. Ao sétimo dia após a implantação, houve uma diminuição significativa do coágulo sanguíneo, enquanto a densidade de área de fibroblastos e vasos sanguíneos aumentou significativamente, como consequência da formação de um tecido de granulação transitório. Células robustas e cubóides alinhadas, com morfologia típica de osteoblastos, também foram observados produzindo nova matriz óssea entre a superfície do implante e o osso pré-existente.

Após 7 dias, lacunas de reabsorção osteoclástica e um pequeno número de osteoclastos foram encontrados ao redor dos restos ósseos e do osso pré-existente. De 14 a 21 dias, os componentes do tecido de granulação diminuíram significativamente em torno dos espaços dos fios de Ti, enquanto a matriz óssea recém-formada aumentou nessas regiões. A matriz óssea recém-produzida foi

depositada imediatamente adjacente aos espaços dos fios ósseos, indicando o contato direto entre a superfície do implante e o osso após 14 e 21 dias. As áreas espalhadas ao redor dos espaços do fio de Ti e osso foram deixadas com tecido mole, incluindo tecido conjuntivo e medula óssea após 21 dias (Biguetti *et al.* 2018).

Figura 1- Representação gráfica de eventos microscópicos e moleculares ao longo do modelo de osseointegração oral em camundongos.



O processo de osseointegração na cavidade oral de C57Bl / 6 exibiu fases de sobreposição ao longo de 3, 7, 14 e 21 dias após a implantação do Ti. O processo de cicatrização ocorre com um coágulo sanguíneo organizado e uma expressão aumentada de fatores de crescimento (TGFb, VEGFb), fatores imunológicos e marcadores MSC. Posteriormente, forma-se um tecido de granulação provisório, com alta expressão de fatores de crescimento e marcadores osteogênicos anteriores (BMPs, ALP e Runx2). Citocinas (TNF, IL6, IL1, IL10), quimiocinas (CXCL3, CCL2, CCL5, CC17, CXCL12 e CXC3CL1) e receptores de quimiocinas (CCR2 e CCR5) regulam a infiltração de células inflamatórias e a resposta imune. ARG1 (um marcador M2) é regulado em locais de implantação, indicando uma predominância de uma resposta do tipo M2 para macrófagos. Em pontos de tempo tardios (14 e 21 dias), a matriz óssea está significativamente aumentada, também seguida pela expressão de Col1a1 e Col21a2. O processo de remodelação / maturação óssea é marcado por um pico de expressão de MMPs, RANKL e OPG aos 14 dias, e um aumento da presença de osteoclastos. Por fim, há um contato íntimo Ti / osso, com expressão dos marcadores finais de diferenciação dos osteoblastos (PHEX, SOST) (Biguetti *et al.*, 2018).

2.2 Interface osso x implante

O tecido ósseo é um material anisotrópico composto, forte e leve, de múltiplas escalas, que apresenta uma hierarquia microestrutural. Temos a nanoescala (a fibra de colágeno mineralizada e o mineral extra-fibrilar), a microescala (a estrutura conforme visível ao microscópio), a mesoescala (particularmente a relação entre osso esponjoso e cortical) e toda a escala óssea. À escala de várias centenas de nanômetros, o osso mineralizado é composto por componentes elementares como a hidroxiapatita, moléculas de colágeno de forma cilíndrica e água. Na escala de 1-10 μm , o tecido ósseo é constituído por uma ultraestrutura composta por fibras colágenas e espaços extrafibrilares (Gao *et al.*, 2019).

Além de sua natureza em multiescala, o tecido ósseo pode adaptar sua estrutura por meio de fenômenos de remodelação, que induzem a alterações em sua estrutura e propriedades mecânicas para acomodar a presença de um implante. A retenção de implantes no osso é determinada por fenômenos que ocorrem em sua interface com o tecido ósseo, tais como o atrito ou o imbricamento mecânico. A rugosidade da superfície influencia a sua estabilidade mecânica. Implantes com tratamentos de superfície rugosas podem estimular a reparação do tecido ósseo (Gao *et al.*, 2019).

O implante de biomateriais no tecido ósseo para restaurar a funcionalidade do órgão tratado tornou-se uma técnica comum em cirurgia ortopédica e odontológica. O titânio é um material amplamente utilizado por apresentar propriedades biocompatíveis exclusivas e importantes para o

processo da osseointegração. Além disso, fornece baixa toxicidade e boa estabilidade mecânica a longo prazo (Sundell *et al.*, 2017).

O titânio é atualmente considerado um biomaterial imunomodulador em vez de um metal inerte, uma vez que a implantação de Ti no osso está associada a um pequeno grau transitório de inflamação, envolvendo uma cascata de eventos biológicos celulares e extracelulares que ocorrem na interface osso-implante até que a superfície do implante esteja coberta por um osso recém-formado levando à osseointegração, um processo biológico que melhora a estabilidade do implante por meio da remodelação óssea (Bigueti *et al.*, 2018).

Após exposição ao ar, uma fina camada (5-10 nm de espessura) de dióxido de titânio (TiO₂) desenvolve-se espontaneamente sobre a superfície do metal de titânio. Esta película de TiO₂ restringe a libertação de espécies iônicas/moleculares de Ti para o meio, conferindo assim um efeito protetor ao ambiente biológico. Portanto, o meio biológico circundante interagirá com esta camada de óxido (Sundell *et al.*, 2017). A composição química do óxido é considerada importante para as propriedades de osseointegração, uma vez que influencia a adsorção de proteínas na superfície exposta imediatamente após sua instalação cirúrgica. As proteínas adsorvidas desencadeiam uma resposta imunológica ao implante, eventualmente levando ao recrutamento de osteoblastos para a região da superfície. A superfície do óxido carrega uma carga negativa em pH fisiológico. Foi sugerido que isso promove a formação de um composto de cálcio amorfo na superfície do implante, que atua como um precursor para subsequente nucleação de apatita. De forma geral, a ligação bioquímica na interface osso-implante aumenta as propriedades de osseointegração. Essa ligação seria fortemente dependente das características

químicas da superfície do implante, já demonstrado experimentalmente em estudos *in vivo* (Sundell *et al.*, 2017).

Existe um alto nível de contato direto entre osso e implante. O tecido ósseo próximo à superfície do implante parece ser denso com um nível relativamente baixo de vasos sanguíneos, que aumenta com o aumento da distância da interface. Não há célula inflamatória em contato imediato com o implante. Análises histomorfométricas revelam um valor médio de BIC (contato osso implante) de 77,6% (Sundell *et al.*, 2017). Albrektsson *et al.* (2008) demonstraram BIC > 50% em média para implantes maxilares em comparação BIC > 75% BIC para implantes mandibulares. Não foi observado BIC 100% em nenhum caso investigado. Uma observação interessante do estudo foi que implantes sem carga apresentavam, em média, um BIC 10% menor do que os implantes com carga.

Após a instalação do implante a resposta do hospedeiro é modificada por suas características, estabilidade da fixação e as lesões por aquecimento intra-operatórias que incluem a morte de osteócitos que se estendem por 100-500 μm no osso hospedeiro (Mavrogenis *et al.*, 2009).

A estabilidade primária é um fenômeno de natureza puramente biomecânica, relacionado principalmente à qualidade óssea no local do implante, tendo como fatores importantes nesse processo o desenho do implante, o protocolo cirúrgico e a congruência entre o osso e o implante. O fenômeno de fricção na interface osso-implante é um dos principais determinantes da estabilidade primária. A estabilização primária do implante no tecido ósseo é uma condição necessária para obter a osseointegração. Uma estabilidade primária insuficiente leva a uma micromovimentação na interface osso-implante

excessiva que pode implicar numa maior incidência de falha no processo da ossointegração (Haiat *et al.*, 2014).

Durante a cicatrização, micromovimentações de baixa amplitude estimulam a remodelação óssea. Porém, nos casos de micromovimentação excessiva na interface após cirurgia, pode se desenvolver uma encapsulação de tecidos fibrosos em vez de uma interface osseointegrada, em particular para implantes dentários. Resultados experimentais mostraram que o micromovimento inferior a 40 - 70 μm permite o crescimento do tecido ósseo. No entanto, um nível excessivo (normalmente acima de 150 μm) resulta na formação de tecido fibroso em vez de uma interface osseointegrada (Bragdon *et al.*, 1996; Bigueti *et al.*, 2018).

A presença dessa cápsula de tecido fibroso na interface afeta a capacidade de suporte de carga do implante e leva a um círculo vicioso, uma vez que as micromovimentações são ainda mais intensificadas nessa situação, sendo assim, responsável pelas falhas do implante (Bragdon *et al.*, 1996).

A estabilidade secundária do implante ocorre após um período de cicatrização e corresponde à estabilidade inicial reforçada pela nova formação e maturação óssea na interface osso-implante. A qualidade e a duração da formação e maturação óssea estão relacionadas a vários fatores, como a superfície do implante e a qualidade do osso no local do implante. A estabilidade secundária é alcançada pela remodelação óssea e subsequente aposição óssea ligando o osso velho e a superfície do implante (Haiat *et al.*, 2014).

As propriedades biomecânicas da interface osso-implante são determinantes para a estabilidade do implante. Uma cicatrização óssea de boa qualidade leva a: (i) contato direto entre o tecido ósseo mineralizado e o implante

e (ii) uma proporção importante da superfície do implante em contato íntimo com o tecido ósseo. O sucesso da cirurgia de implante é determinado pela qualidade biomecânica do tecido ósseo localizado a uma distância inferior a cerca de 100 - 200 μm da superfície do implante (Gao *et al.*, 2019).

A interface entre o osso e os implantes osseointegrados é altamente heterogênea e inclui áreas mineralizadas, parcialmente mineralizadas (osteóide) e não mineralizadas. A matriz extracelular depositada diretamente na superfície do implante é, inicialmente, não mineralizada, sendo subsequentemente mineralizada (Shah *et al.*, 2019).

Imediatamente após a fresagem cirúrgica, que consiste em se preparar uma cavidade ligeiramente menor que o diâmetro do implante, levando assim à estabilidade primária através da compactação do tecido ósseo pelas roscas do implante, a superfície é cercada por sangue (devido ao alargamento da cavidade óssea), e, por tecido ósseo morto e vivo. Detritos ósseos remanescentes do preparo cirúrgico também podem estar presentes ao redor da superfície do implante. Durante a cicatrização do tecido ósseo, que ocorre várias semanas / meses após a cirurgia, um osso recém-formado é produzido para preencher a lacuna entre o tecido ósseo maduro e a superfície do implante. Algumas semanas ou meses após a cirurgia do implante, o tecido ósseo recém-formado é substituído progressivamente por tecido ósseo maduro ao redor da superfície do implante, levando à uma relação BIC final (Gao *et al.*, 2019).

O primeiro componente biológico a entrar em contato com um implante endósseo é o sangue. Células sanguíneas, incluindo glóbulos vermelhos, plaquetas e células inflamatórias, como granulócitos polimorfonucleares e monócitos, emigram de locais pós-capilares e migram para o tecido ao redor do

implante. As células sanguíneas aprisionadas na interface do implante são ativadas e liberam citocinas e outros fatores solúveis de crescimento e diferenciação (Mavrogenis *et al.*, 2009). As interações iniciais das células sanguíneas com o implante influenciam a formação do coágulo. As plaquetas sofrem alterações morfológicas e bioquímicas em resposta à superfície estranha, incluindo adesão, disseminação, agregação e alterações bioquímicas intracelulares, como indução de fosfotirosina, aumento de cálcio intracelular e hidrólise de fosfolipídios. A matriz de fibrina formada atua como um andaime (osteocondução) para a migração das células osteogênicas e eventual diferenciação (osteoindução) dessas células no compartimento de cicatrização. Células osteogênicas formam tecido osteóide e novo osso trabecular que eventualmente se remodelará em osso lamelar em contato direto com a maior parte da superfície do implante (osseointegração) (Mavrogenis *et al.*, 2009).

Após a instalação do implante, uma série de proteínas serão adsorvidas imediatamente do sangue na ferida cirúrgica. A presença de fibrinogênio é uma diferença fundamental entre o sangue e o soro. Embora sua capacidade de apoiar a adesão de osteoblastos pareça limitada, ele tem um papel importante na formação de coágulos sanguíneos e nas interações plaquetárias. A adsorção de fibrinogênio é amplamente estudada no contexto da hemocompatibilidade; uma observação geral é que ele adsorve em maiores quantidades em superfícies hidrofóbicas (Wilson *et al.*, 2005).

Em seguida, o tecido ósseo adapta sua estrutura aos estresses mecânicos que sofre por meio de fenômenos de remodelação, induzindo alterações nas propriedades ósseas para acomodar sua estrutura à presença do implante. A formação óssea depende de vias de sinalização complexas

sensíveis à estimulação biomecânica, que permanecem obscuras, e são obtidas por meio da ossificação intramembranosa e ativação de osteoblastos. A regeneração óssea que ocorre após a instalação do implante dura vários meses. As principais etapas de regeneração óssea são: (i) a deposição de uma matriz extracelular ou tecido osteóide, um tecido rico em colágeno não mineralizado, (ii) mineralização do osteóide por estimulação hormonal de cálcio local e íons de fosfato para formar osso tecido (um tecido mineralizado desordenado) e (iii) remodelação de osso tecido em osso maduro (Bragdon *et al.*, 1996).

Osteoblastos e células mesenquimais parecem migrar e aderir à superfície do implante desde o primeiro dia após a implantação, depositando proteínas relacionadas ao tecido ósseo e criando uma camada de matriz não colágena na superfície do implante que regula a adesão celular e a ligação de minerais. Esta matriz é uma camada afibrilar calcificada formada precocemente na superfície do implante, envolvendo osteóide pouco mineralizado semelhante às linhas de cimento ósseo e lâminas limitantes que formam uma camada de 0,5 mm de espessura rica em cálcio, fósforo, osteopontina e sialoproteína óssea. Forma-se uma camada separada de 20 a 50 μm de células semelhantes a osteoblastos, fibrilas de colágeno calcificadas e mineralização inicial na interface implante-osso (Mavrogenis *et al.*, 2009).

O tecido da medula óssea com sua rica vasculatura suporta as células mesenquimais e fornece precursores de osteoclastos. O tecido ósseo tem baixa resistência mecânica devido à orientação aleatória das fibras de colágeno, mas por volta do décimo dia, o osso trabecular é formado rapidamente com sua arquitetura em forma de ponte fornecendo a fixação biológica ativa precoce do

implante. Isso ocorre de maneira ideal quando a lacuna entre o implante e o osso não excede 500 μm (Lee *et al.*, 2019).

Os osteoclastos conduzem o processo de reabsorção e remodelação do tecido ósseo e sua substituição por osso lamelar com maior grau de mineralização. O titânio induz o hospedeiro a favorecer a remodelação óssea em vez da reabsorção. Os osteoblastos se fixam à matriz de colágeno mineralizado, formando uma zona de selamento, depositando osso diretamente na superfície do implante. O osso lamelar permite adaptação a uma carga maior, com fibras ósseas depositadas em formação paralela e novos *osteons* circulando ao redor do implante com seus longos eixos perpendiculares ao longo eixo dos implantes. Isso fornece fixação secundária ativa do implante por meio de ligação biológica. Aos 3 meses pós-implantação, uma textura mista de tecido ósseo lamelar pode ser encontrada em torno dos implantes de titânio, enquanto o estágio final da osseointegração pode levar um ano ou mais para ser concluído. Durante este tempo, no lado do implante, observa-se a oxidação do titânio (Lee *et al.*, 2019).

Na área de até 1 mm de osso da superfície do implante, há um processo dinâmico e contínuo de remodelação óssea em resposta ao estresse e carga mecânica meses a anos após a implantação. Isso é confirmado pela presença ao longo prazo de espaços medulares contendo osteoclastos, osteoblastos, células mesenquimais e tecido vascular próximo à superfície do implante (Lee *et al.*, 2019).

2.3. Agregados plaquetários

2.3.1 Fibrina Rica em Plaquetas - PRF

Diversos concentrados de sangue podem ser usados para melhorar a regeneração de tecidos moles e duros e a cicatrização de feridas em diferentes campos da medicina. Um desses sistemas é a fibrina rica em plaquetas (PRF), desenvolvida para minimizar o risco de contaminação durante o seu preparo, eliminar anticoagulantes adicionais e usar a capacidade de regeneração autóloga e natural do paciente. A PRF foi desenvolvida para atender às necessidades clínicas, economizando tempo e sendo fácil de usar (El Bagdadi *et al.*, 2019).

A fibrina rica em plaquetas (PRF) foi elaborada como uma segunda geração de concentrados plaquetários autólogos, que não requer nenhum anticoagulante ou trombina bovina ou qualquer outro agente gelificante, frequentemente usada pela cirurgia oral e maxilofacial com intenção de melhorar a cicatrização de tecidos moles e proteção remodelação de tecidos ósseos (Dohan *et al.*, 2010). Ele é composto por um conjunto de citocinas e glicoproteínas estruturais entrelaçadas em uma rede de fibrina polimerizada na qual as plaquetas e outras células sanguíneas estão presas (Kobayashi *et al.*, 2016).

Ela foi descrita pela primeira vez por Choukroun *et al.*, em 2001 e seus efeitos já foram documentados em várias revisões sistemáticas, que demonstram seus efeitos a longo prazo sobre cicatrização de tecidos moles e duros. Duas das principais vantagens documentadas da utilização de PRF

incluem o fato de conter células de defesa do sistema imunológico do hospedeiro (leucócitos) que atuam no controle de infecção (Kobayashi *et al.*, 2016).

A PRF é formada por uma rede tridimensional de fibrina, contendo células vivas, que podem atuar como um andaime nas fases iniciais da cicatrização de feridas. Ela é produzida a partir do sangue humano rico em uma variedade de células sanguíneas - incluindo plaquetas, linfócitos B e T, monócitos, células-tronco e neutrófilos. Os leucócitos (maioria de linfócitos) estão presos dentro desta rede de fibrina, mas ainda estão vivos e prontos para desempenhar suas funções (Dohan *et al.*, 2010). Além uma variedade celular, o PRF pode liberar diversos fatores de crescimento que aumentam a proliferação celular, entre eles, PDGF-AB, TGFB1, VEGF, EGF e IGF-1. Tais fatores são liberados das plaquetas quando ativadas por um estímulo ou agregadas por alguns ativadores (Kobayashi *et al.*, 2016).

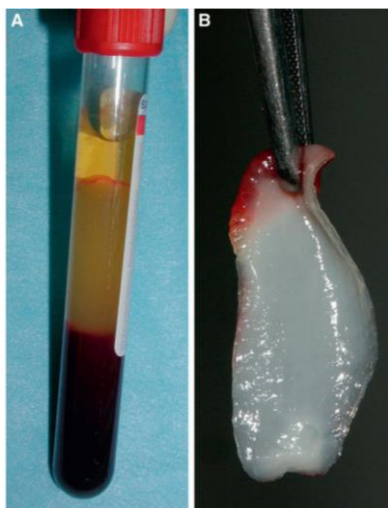
A liberação de fatores de crescimento do coágulo PRF começa 5 a 10 minutos após a coagulação e continua por pelo menos 5 a 7 dias. Durante esta fase, as plaquetas interagem com a matriz de fibrina para formar um tampão hemostático e induzir uma liberação lenta de citocinas para estimular a migração e proliferação celular (Pitzurra, 2020). A composição e as quantidades de fatores de crescimento parecem muito estáveis em cada coágulo PRF devido ao processo mecânico de polimerização durante a centrifugação (Dohan *et al.*, 2019).

Esta rede tridimensional de fibrina é capaz de simular a matriz extracelular em termos de sua estrutura, criando um ambiente para as células funcionarem de forma otimizada, além de não possuírem nenhum potencial citotóxico descrito na literatura. Uma grande vantagem deste método é sua

simplicidade de preparação. O processo de centrifugação ativa o processo de coagulação e, como resultado, é obtido um coágulo de PRF produzido por um processo natural de polimerização, e sua arquitetura de fibrina natural parece responsável por uma liberação lenta de fatores de crescimento e glicoproteínas da matriz durante mais ou menos 7 dias (Dohan *et al.*, 2010). O PRF também é usado na forma de membrana comprimida para a função de membrana de barreira reabsorvível em regeneração tecidual guiada. Essa ideia é baseada principalmente por sua característica química de que o PRF é composto de uma fibra de biopolímero. Após sua implantação *in vivo*, as membranas de PRF são reabsorvidas em torno de 14 dias (Kawase *et al.*, 2015).

O PRF é obtido a partir de 9 mL de sangue coletado do próprio paciente em tubos de vidro seco ou tubos de plástico revestidos de vidro e imediatamente centrifugados a 2700 rpm em 12min, sem o uso de coagulantes. Três camadas são formadas: uma base de glóbulos vermelhos na parte inferior do tubo, um plasma acelular (plasma pobre em plaquetas [PPP]) como um sobrenadante e um coágulo PRF no meio (Pradeep *et al.*, 2012).

Figura 2. Coágulo de PRF.



A) O coágulo PRF foi produzido em tubos de vidro seco ou tubos de plástico revestidos de vidro. B) Os coágulos foram coletados e transformados em membranas. Este biomaterial autólogo que foi construído com fibrina, plaquetas e leucócitos apresentou uma arquitetura específica (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2018).

Este coágulo pode ser utilizado diretamente para preencher uma cavidade ou misturado com um biomaterial ósseo, ou comprimido em forma de membrana ou num cilindro de fibrina utilizando a caixa cirúrgica adequada concebida para o preparar sem danos (Dohan *et al.*, 2018).

As membranas PRF são mais densas que um coágulo sanguíneo ou mesmo um PRP comum. Os efeitos dessa condensação no tempo de reabsorção da fibra e nas propriedades de cicatrização são investigados. Quando as membranas PRF são usadas para o fechamento de feridas em cirurgia oral, o tempo médio de reabsorção dessas membranas é bastante longo, seguindo um lento processo de remodelação da matriz de fibrina em um tecido de cicatrização (Dohan *et al.*, 2010).

Na odontologia regenerativa, as membranas de PRF fornecem uma capacidade limitada de funcionar como uma “barreira para tecidos moles” uma vez que seu uso está associado a um período de reabsorção de 10-14 dias após implantação *in vivo* (Fujioka-Kobayashi *et al.*, 2021).

As membranas de PRF contêm a maioria das plaquetas e metade dos leucócitos presentes na colheita inicial de sangue. As plaquetas são maioritariamente ativadas e servem como cimento para reforçar a matriz de fibrina fortemente polimerizada. As plaquetas são as primeiras células a ocorrer na região de uma lesão. Além de seu papel na hemostasia, as plaquetas têm potencial inflamatório, incluindo o recrutamento de outras células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, e promovem a angiogênese e o reparo do tecido. Elas são capazes de expressar uma série de moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento biologicamente ativos, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator

de crescimento transformador beta (TGF- β). Esses fatores de crescimento são essenciais para a vascularização do tecido e a formação de novos tecidos (El Bagdadi *et al.*, 2019).

As plaquetas apresentam, ainda, uma série de grânulos com citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios que são liberados após a agregação plaquetária para aumentar a hemostasia e ativar e recrutar células para o local da inflamação. Os leucócitos também contribuem para a angiogênese e linfangiogênese, participando de uma interação celular cruzada e expressando várias moléculas de sinalização. A matriz extracelular no leito da ferida suporta a formação de vasos sanguíneos, e a fibrina fornece uma estrutura para as células inflamatórias (El Bagdadi *et al.*, 2019).

In vitro, as membranas PRF têm fortes efeitos sobre os queratinócitos estimulando a proliferação da maioria dos tipos de células (fibroblastos, células-tronco) pré-adipócitos, osteoblastos, osso mesenquimal (Dohan *et al.*, 2009). A utilização dessas membranas é capaz de, posteriormente, melhorar a cicatrização de feridas. O PRF contém plaquetas e leucócitos (incluindo monócitos, linfócitos e granulócitos). É relatado que a interação entre essas células e a matriz de fibrina estimula uma liberação lenta de fatores de crescimento que podem resultar em uma melhor cicatrização da ferida na fase inicial deste processo (Pitzurra, 2020).

Os efeitos benéficos da PRF têm sido estudados em vários procedimentos, como cirurgia plástica facial, em procedimentos de levantamento de seio como um único material de preenchimento osteocondutor, em defeitos ósseos periodontais, em lesões de furca e como um arcabouço adequado para

criação de células periosteais humanas *in vitro*, que podem ser adequadas para aplicações de engenharia de tecido ósseo (Pradeep *et al.*, 2012).

O PRF em fase líquida, conhecido como i-PRF, devido à sua consistência e composição, pode ser utilizado em combinação com vários outros biomateriais, como hidroxiapatita autógena, xenógena ou aloplástica, com a finalidade de aumentar sua bioatividade na regeneração do tecido ósseo e tecido mole e para melhorar a capacidade de cicatrização desses tecidos, ou mesmo em casos de cicatrização de feridas prejudicadas (Kayyik *et al.*, 2021).

2.3.2 Alb-PRF

O uso de albumina sérica na engenharia tecidual é amplamente relatado na literatura. A albumina é a proteína plasmática humana mais abundante, respondendo por mais de 50% da proteína total presente na corrente sanguínea e fácil de isolar a partir da precipitação do plasma sanguíneo com alta pureza e homogeneidade. Ela está envolvida em uma variedade de papéis relacionados à sobrevivência e regeneração celular. A molécula é um polipeptídeo não glicosilado, helicoidal, em forma de coração com um peso molecular de 66.500 Da contendo 585 aminoácidos. Provavelmente, o efeito mais comumente citado da albumina sérica em cultura celular é que ela fornece fatores de crescimento e citocinas provenientes de plaquetas ou leucócitos (Horváthy *et al.*, 2017).

Esses fatores e misturas endógenas como preparações de plasma rico em plaquetas (PRP) são bem investigados em sistemas de cultura celular. Além de fornecer uma estrutura compatível para proliferação celular, os biomateriais enriquecidos com albumina apresentaram pouca redução de suas dimensões ao

longo do tempo (estabilidade dimensional) sugerindo menor degradação (Horváthy *et al.*, 2017).

Biomateriais ósseos revestidos com albumina também são estudados como facilitadores de aderência para vários tipos de células. De acordo com estudos *in vitro*, a albumina sérica provavelmente recruta células-tronco endógenas e, assim, alimenta a regeneração óssea com progenitores potenciais localmente. Superfícies revestidas com albumina não só aumentou a fixação das células-tronco, mas também apoiou sua sobrevivência e proliferação em longo prazo (Horváthy *et al.*, 2017).

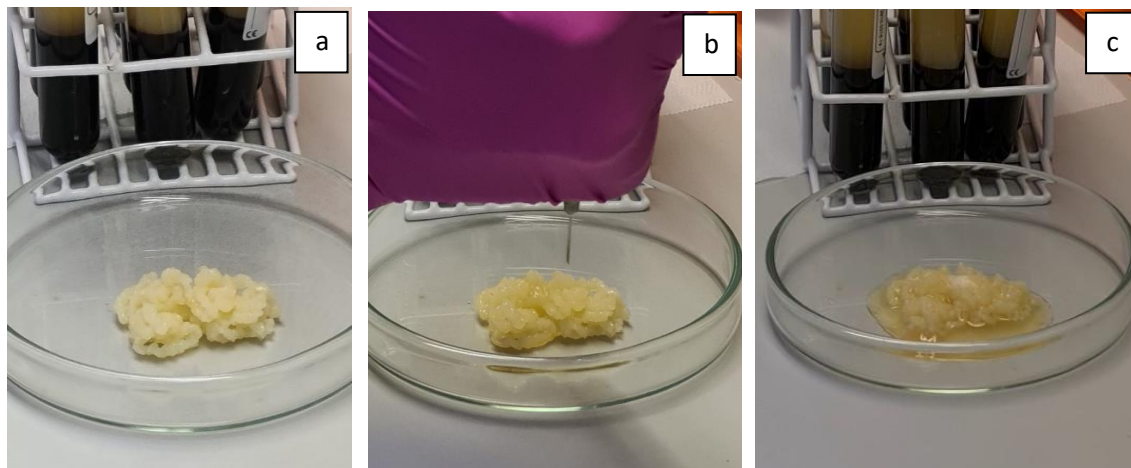
Além disso, a associação com a albumina pode modular a ultraestrutura e a permeabilidade da rede de fibrina, induzindo fibras com espessura aumentada e aparência nodular grosseira. A associação com albumina sérica desnaturada poderia representar uma possível melhora no arcabouço baseado em PRF, que é um material totalmente autólogo, biocompatível e possivelmente mais durável e com maior duração de ação (Mourão *et al.*, 2018).

Para superar a rápida degradação do plasma e manter a estabilização do volume, uma nova técnica foi desenvolvida em que o plasma pobre em plaquetas (PPP) contendo principalmente cerca de 60% de albumina é aquecido a 75 Celsius por 10 minutos para permitir a desnaturação e quebra de muitas das ligações fracas de hidrogênio) dentro de sua molécula de proteína. Seguindo este processo, as proteínas são então reestruturadas em uma estrutura mais densamente organizada com propriedades de reabsorção estendida por até 4 - 6 meses pós-implantação *in vivo* (Fujioka-Kobayashi *et al.*, 2021). Para o preparo da técnica, são coletados dois tubos de 9ml de sangue periférico sem adição de aditivos (Vacutube, Biocon ®, Brasil). Para a produção de cada membrana, os

dois tubos são posicionados no rotor vertical da centrífuga de ângulo fixo (Medifuge ®, Silfradent, Itália), e o protocolo foi aplicado para a obtenção dos fatores de crescimento concentrados (CGF) na fase líquida (LPCGF), conforme descrito pelo fabricante. Após o processamento, observa-se o plasma e o restante material decantado contendo hemácias. Dois mililitros da porção inicial do plasma (plasma pobre em plaquetas [PPP]) são coletados com uma seringa (Injex ®, Brasil), enquanto as demais porções de sangue (camada leucocitária, LPCGF e hemácias) são reservadas à temperatura ambiente (20 ° C). As seringas contendo PPP são inseridas em um dispositivo para gel de albumina de plasma ativado por desnaturação de albumina sérica humana (APAG ®, Silfradent, Itália). Após 10 min em uma temperatura de operação de 75 ° C, as seringas são armazenadas em temperatura ambiente por mais 10 min e protegidas da luz ambiente (conforme recomendação do fabricante). A albumina desnaturada é depositada em um recipiente de vidro, para obter a forma desejada (Fujioka-Kobayashi *et al.*, 2021).

Posteriormente, usando-se uma seringa de 10 ml (Injex ®, Brasil) e uma agulha hipodérmica 18 (Injex ®, Brasil), as porções de LPCGF e porção inflamatória são coletadas em um volume aproximado de 4ml, adicionadas à albumina desnaturada do recipiente de vidro e, a seguir, são misturadas suavemente com pinça. Após aguardar o processo de polimerização da fibrina (aproximadamente 5min), a membrana é formada com o formato previamente estabelecido. A Figura 2 demonstra um esquema da produção das membranas Alb-CGF (Fujioka-Kobayashi *et al.*, 2021).

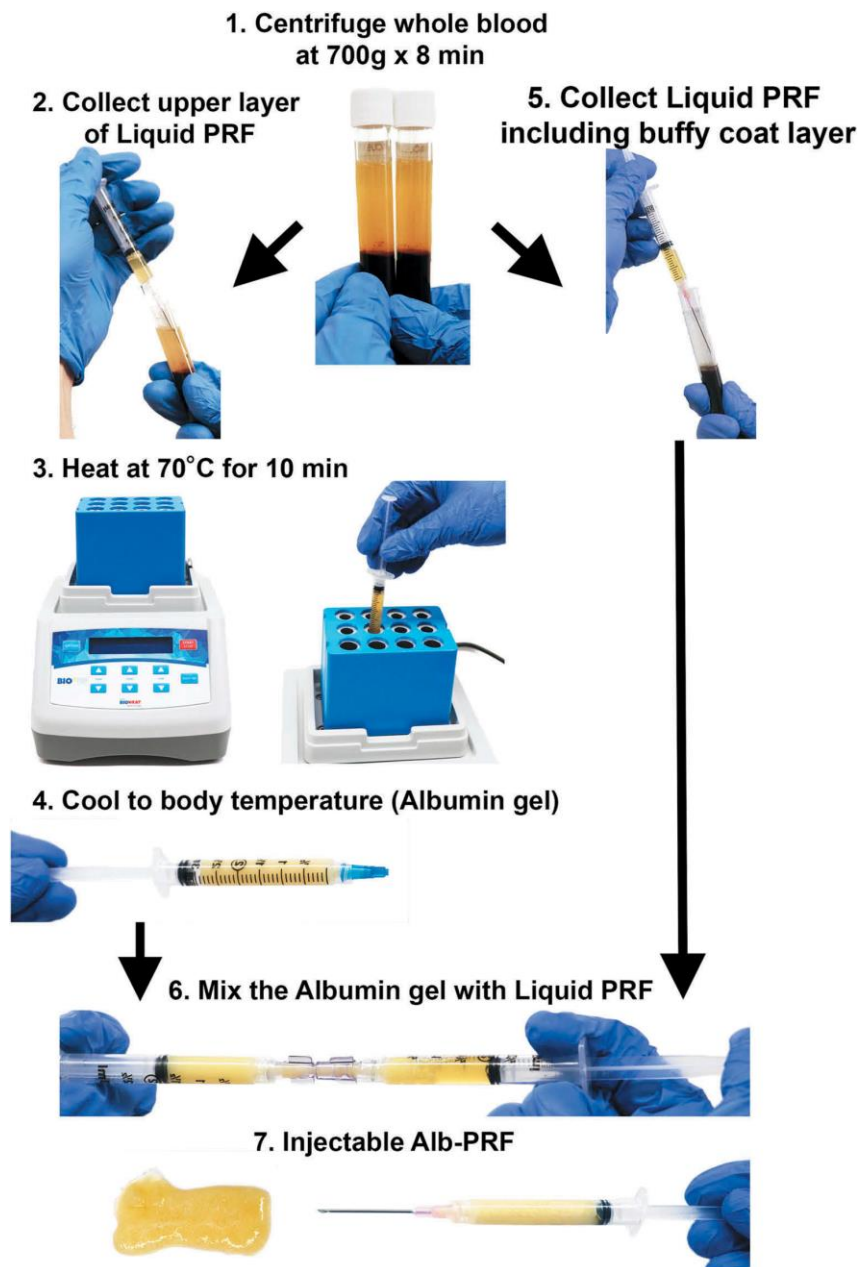
Figura 3. Preparo de membranas de Alb-PRF.



a) Camada mais superior de plasma pobre em plaquetas (PPP) já desnaturada em forma de gel de albumina. b) Camada líquido rica em plaquetas (PRF-líquido), incluindo a camada leucocitária. c) Membrana de Alb-PRF em geleificação.

A associação proposta de LPCGF e albumina desnaturada pela mistura em um recipiente de vidro resulta em uma membrana sólida, opaca e moldável. Ao MEV é possível observar uma superfície muito densa, com deposição muito evidente de uma camada de proteína desnaturada, que é revestida claramente por fibras de fibrina envolvendo as células e plaquetas aprisionadas (Mourão *et al.*, 2018).

Figura 4. Protocolo de preparação Alb-PRF.



1) O sangue total (~9 mL) foi centrifugado a 700 g durante 8 minutos. A camada superior (camada amarela) mostra a camada de plasma líquido. 2) A camada mais superior de plasma pobre em plaquetas (PPP) foi recolhida numa seringa. 3) O PPP recolhido foi aquecido num bloco térmico a 75°C durante 10 minutos e depois 4) arrefecido à temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Um gel de albumina injetável foi então preparado. 5) A camada líquida rica em plaquetas (PRF líquida), incluindo a camada de buffy coat com plaquetas e leucócitos acumulados, foi recolhida em uma seringa separada. 6) O gel de albumina e o PRF líquido nativo foram então completamente misturados utilizando um conector fêmea-fêmea luer lock. 7) Injetável Alb-PRF na forma final pronta (Fujioka-Kobayashi *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse estudo foi avaliar o comportamento celular e a expressão gênica de osteoblastos humanos cultivados sobre a superfície de titânio minimamente rugoso expostos a membranas de PRF e Alb-PRF.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- 1) Caracterizar os osteoblastos expostos a membranas de PRF e Alb-PRF,
- 2) Avaliar o efeito da adição de membranas de PRF e Alb-PRF no metabolismo de osteoblastos cultivados o titânio minimamente rugoso através do teste de redução do MTT,
- 3) Avaliar o efeito da adição de membranas de PRF e Alb-PRF na expressão gênica dos genes relacionados à osteogênese de osteoblastos cultivados sobre o titânio minimamente rugoso,

4 METODOLOGIA

4.1 Confeção dos corpos de prova

Discos de titânio comercialmente puro grau 4 (12,7 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram limpos com acetona e imersos em solução de ácido sulfúrico 98% e peróxido de hidrogênio 30% por 4 h sob agitação em temperatura ambiente para criar uma superfície minimamente rugosa (Nanci *et al.*, 1998; de Oliveira *et al.*, 2007). Em seguida, os discos foram limpos com água destilada, secos em estufa, embalados em papel grau cirúrgico e esterilizados com 25 kGy de radiação gama (He *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2012).

A morfologia final foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e a rugosidade final da superfície foi avaliada com auxílio de um interferômetro (NewView 7300, CT, EUA). O equipamento possui uma resolução lateral de 0,3 μm e uma resolução vertical de 0,05 nm. Cinco áreas (200 \times 260 μm) em cada amostra serão avaliadas (lente objetiva de 50 \times associado a um fator de magnificação de 0,5) utilizando um filtro gaussiano (50 \times 50 mm) para remoção das interferências de forma e ondulação. O parâmetro de amplitude (S_a), que representa a média aritmética do desvio da altura das estruturas da superfície; o parâmetro híbrido (S_{dr}), o qual demonstra o aumento percentual da área de superfície; e o parâmetro espacial (S_{ds}), que é a concentração de picos na superfície foram utilizados. A média aritmética de cada parâmetro foi definida para cada amostra, sendo o valor de S_a entre 0,3 e 1,0 μm determinante para classificação da superfície como minimamente rugosa (Wennerberg e Albrektsson, 2010).

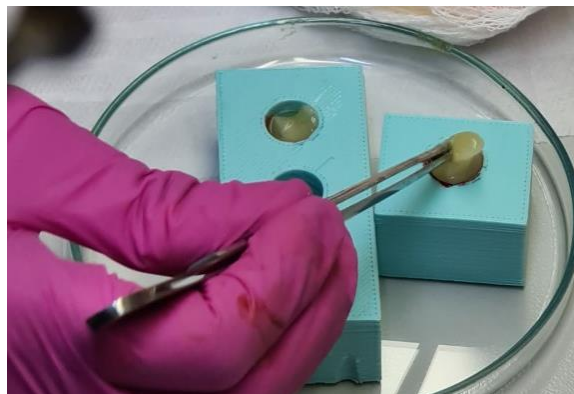
4.2 Cultura celular

Células MG63 (ATCC CRL-1427) foram reativadas e cultivadas em meio *Dulbeccos Modiffid Eagles Medium* (DMEM) com glicose contendo 10% de soro fetal bovino e 1 % de penicilina-estreptomicina. Este meio foi utilizado como controle. Os experimentos celulares com a exposição às membranas de PRF ou Alb-PRF desenvolveram-se utilizando meio de cultivo osteogênico incompleto com a suplementação de ácido ascórbico 50µg/ml e β-glicerofosfato 10mM. As células foram incubadas a 37°C e em atmosfera controlada umidificada contendo 5% de CO₂.

4.3 Preparo das membranas de PRF e Alb-PRF

O PRF foi preparado utilizando-se o sangue periférico de um doador saudável (W.A.S.V.), coletado pelo sistema vacutainer usando tubos de vidro sem quaisquer aditivos. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 2700 rpm por 12 minutos (~700 RCF-máx) (Intraspín Biohorizons, Alabama, EUA). Todas as amostras de PRF neste estudo foram coletadas do mesmo doador, sob jejum de 12 h, para limitar a variabilidade neste estudo. Em seguida, as membranas foram separadas da parte eritrocítica, colocadas em um dispositivo estéril confeccionados em politetrafluoretileno com diâmetro de 10 mm (Figura 3) e prensadas para a remoção de soro e padronização da técnica (Miron *et al.*, 2019).

Figura 5. Membrana de PRF posicionada num molde de 10 mm de diâmetro para padronização do tamanho da membrana.



O Alb-PRF foi preparado utilizando-se amostras de sangue coletados em tubos de plástico PET sem aditivos do mesmo doador (W.A.S.V.) Para a produção de cada membrana, dois tubos foram colocados em uma centrífuga de rotor horizontal (Bio-PRF, Venice, Flórida, EUA) e centrifugadas por 8 min a 700 RCF-máx. Após o processamento, 2 ml da porção inicial do plasma (PPP) foram coletados em seringa com agulha 18 G (Injex®, São Paulo, Brasil), enquanto o restante do sangue (porção rica em células e hemácias) foi preservado em ambiente temperatura (20 ° C).

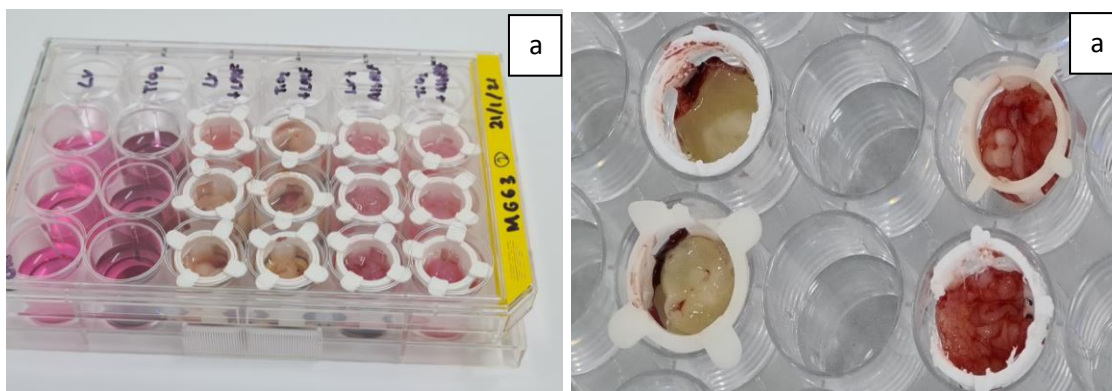
As seringas contendo plasma pobre em plaquetas (PPP) foram inseridas em um dispositivo para desnaturação de proteínas no plasma humano (Bio-Heat, Bio-PRF, Venice, Florida, USA) por 10 min a 75 °C. Em seguida, as seringas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos para permitir o resfriamento. Posteriormente, utilizando uma seringa de 10 ml com agulha 18 G (Injex®, Brasil), os 4 ml da porção rica da camada leucocitária foram coletados do tubo inicial, adicionados à camada de PPP aquecida do recipiente de vidro e

suavemente misturados. Após a conclusão do processo de polimerização da fibrina (aproximadamente 5 min), a membrana foi formada (Gheno *et al.*, 2020).

4.4 Exposição dos osteoblastos às membranas de PRF e Alb-PRF

Para este ensaio, foram utilizadas placas de cultura de 24 poços. Cada disco de titânio foi colocado individualmente no fundo do poço e 5×10^4 células foram colocadas na superfície de cada disco e deixadas aderir *overnight*. Em seguida, as membranas de PRF e Alb-PRF foram posicionadas individualmente em suportes tipos inserts sobre as células (Figura 4). A exposição foi mantida por até 7 dias para análise de MTT, até 14 dias para a análise da expressão gênica e até 21 dias para a análise de mineralização da matriz extracelular. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias de cultivo e as células sempre mantidas em estufa de CO₂.

Figura 6. Membrana posicionada no suporte tipo *transwell* para exposição das células aos fatores de crescimento presentes nas membranas



Discos de titânio dispostos em placa de cultivo de 24 poços (a), sobre os quais membrana de PRF (tom amarelado) e a membrana de Alb-PRF (tom avermelhado) foram posicionadas com auxílio de um suporte tipo *transwell* (b).

4.5 Ensaio de MTT

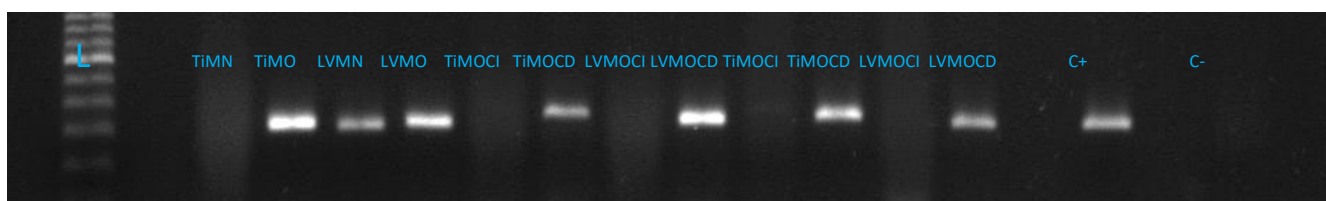
O ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) foi usado para avaliar a viabilidade celular após 1, 3 e 7 dias. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel tetrazólio, transformando-se em um composto de coloração amarelada e um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan (E, Z - 1, 4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan), que são cristais insolúveis em solução aquosa. Assim sendo, a produção de formazan reflete ao estado funcional da cadeia respiratória.

Os cristais de formazan púrpura foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), transferidos para uma placa de 24 poços (150 µL por poço) e a absorbância foi registrada num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 570nm com subtração do branco de 690 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O disco de titânio sem exposição às membranas foi utilizado como controle.

4.6 Análise da expressão gênica

A influência das membranas de PRF e Alb-PRF na osteogênese foi avaliada por meio de PCR em tempo real após 14 dias de cultura. Para isto, o material genético total foi coletado utilizando o 300 µL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Em seguida, 1000 ng de RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen, EUA) e o cDNA foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA utilizando um kit da enzima transcriptase reversa (Superscript IV Invitrogen, Carlsbad,

EUA). A qualidade dos cDNAs foi avaliada pela amplificação do gene da B-actina (353pb) seguido de eletroforese em gel de agarose à 1,5% corada com gelred®. O kit SYBR® Green Applied biosystem (Carlsbad, EUA) foi utilizado para análise quantitativa dos genes ligados ao fenótipo osteoblástico: osteoprotegerina (OPG), osteopontina (OPN), osteocalcina (OC) e receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK-L). Como gene normalizador foi utilizado o gliceraldeído 3-fosfatase desidrogenase (GAPDH). As reações foram feitas em triplicata com a presença de um controle negativo. Cada reação foi composta de 2µL de H₂O deionizada, 5µL de master mix, 1µL de primer forward, 1µL de primer reverso e 1µL de cDNA num total de 10µL. Para o cálculo da expressão relativa foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. As condições para PCR foram: threshold.



Gel agarose a 1,5% com PCR para b-actina para avaliação da qualidade dos cDNAs sintetizados a partir do RNA total extraído das amostras (352 pb).

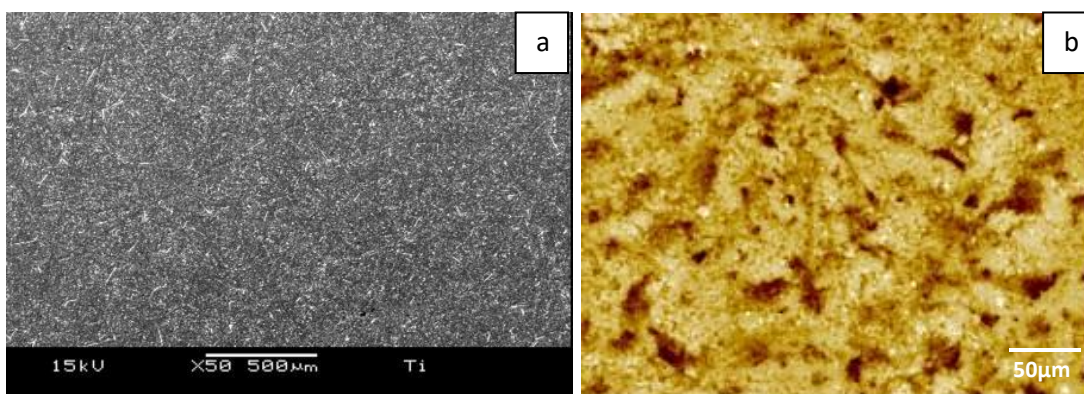
4.7 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados com o teste de Shapiro-Wilks para checar a normalidade e em seguida, os grupos foram comparados com o teste de análise de variância a 1 critério e teste de Tukey (SPSS Statistics 20, IBM Brazil, São Paulo, SP, Brazil). O nível de significância de 5% foi definido para todas as análises.

5 RESULTADOS

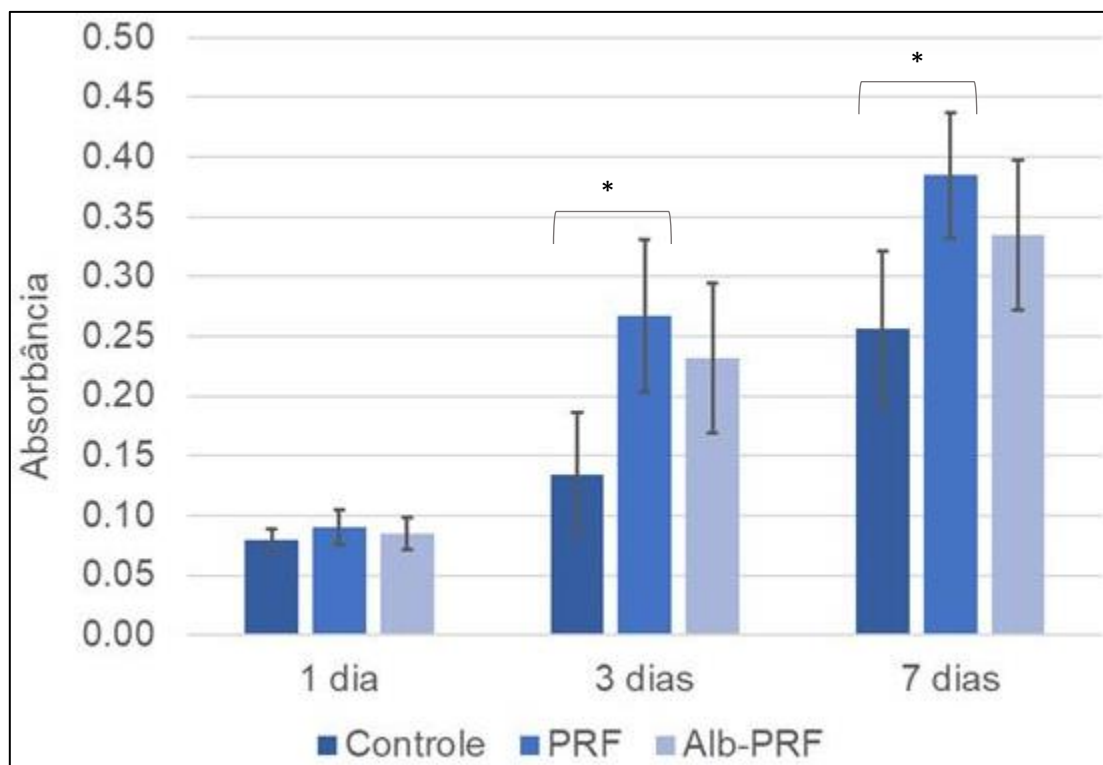
A superfície dos discos de titânio utilizados no estudo pode ser observada na Figura 5. Esta superfície apresenta valores de S_a , S_{dr} e S_{ds} de: $0,52 \pm 0,04 \mu\text{m}$; $14,4 \pm 1,8 \%$ e $0,09 \pm 0,01 1/\mu\text{m}^2$; respectivamente.

Figura 7. Imagem representativa da superfície dos discos de titânio utilizados no estudo na microscopia eletrônica de varredura (a) e na interferometria (b).



O ensaio de MTT demonstrou a manutenção da viabilidade celular após a exposição às membranas de PRF e Alb-PRF (Figura 6). Houve um aumento significativo do metabolismo celular com o tempo para todos os grupos ($P < 0,05$). Na comparação entre os grupos, houve diferença significativa apenas entre o grupo controle e o grupo exposto ao PRF ($P < 0,05$).

Figura 8. Níveis de absorvância no teste de MTT para as células cultivados sobre o titânio sem exposição (controle) e com exposição às membranas de PRF e Alb-PRF.



* indica diferença estatística significativa entre os grupos – Tukey ($P < 0,05$).

A morfologia das células pode ser observada por microscopia óptica no cultivo direto sobre o fundo da placa de cultivo, onde foi possível verificar que a exposição ao PRF e Alb-PRF por 7 dias induziu a formação de esferóides após 7 e 14 dias (Figuras 7 e 8). Na figura 9 é possível verificar o tamanho dos esferóides formados.

Figura 9. Morfologia das células após 7 dias de cultivo aderidas em monocamada quando não expostas às membranas (a) e a presença de células em formação de esferoides tanto quando expostas ao PRF (b) como ao Alb-PRF (c).

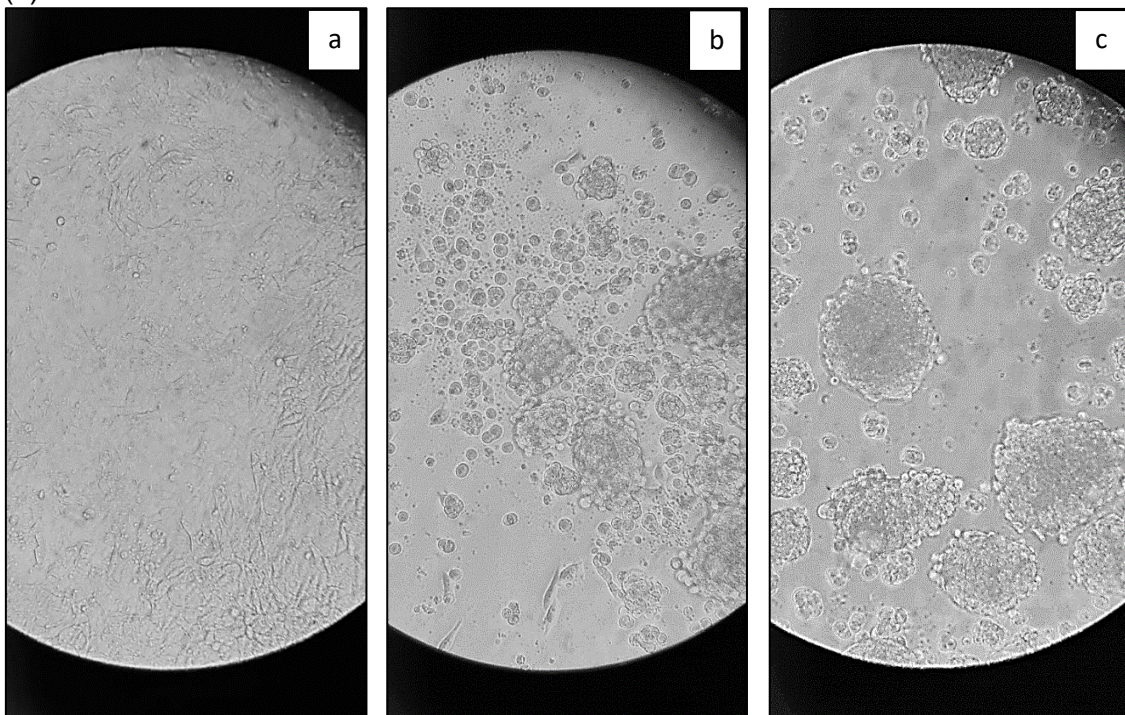


Figura 10. Morfologia das células após 14 dias de cultivo aderidas em monocamada quando não expostas às membranas (a) e a presença de células em formação de esferoides tanto quando expostas ao PRF (b) como ao Alb-PRF (c).

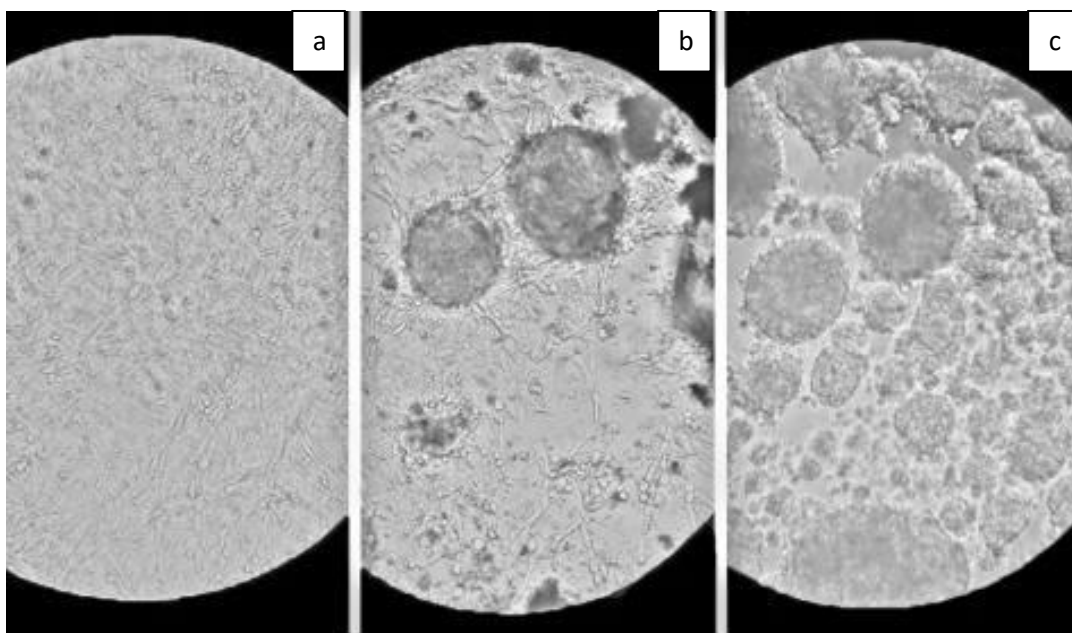
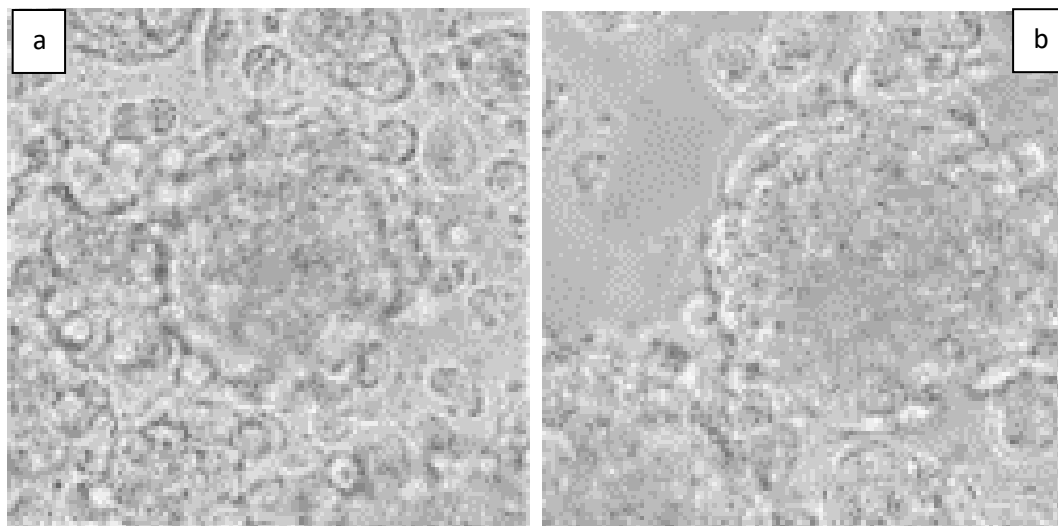


Figura 11. Esferóides visualização em câmara de Neubauer (25 x 25 μm), onde é possível determinar seu tamanho aproximadamente 15 μm de diâmetro quando expostos ao PRF (a) e aproximadamente 20 μm de diâmetro quando expostos ao Alb-PRF (b).



Os resultados da análise de PCR estão expressos na Tabela 1. Após 14 dias de cultivo, foi possível observar uma expressão gênica semelhante entre os grupos PRF e Alb-PRF, com maior expressão dos genes ALP, Runx-2 e OC que o grupo controle ($P < 0,05$).

Tabela 1. Expressão gênica ($\text{ng} \times 10^{-3}$) dos genes relacionados ao fenótipo osteoblástico após 14 dias de cultura sobre os discos de titânio e com exposição às membranas de PRF e Alb-PRF (média \pm desvio padrão).

Gene	Controle	PRF	Alb-PRF
ALP	7,48 \pm 4,38 ^A	13,48 \pm 10,26 ^B	11,22 \pm 4,18 ^B
RUNX-2	20,86 \pm 5,52 ^A	36,09 \pm 8,78 ^B	29,34 \pm 5,90 ^C
OPN	17,12 \pm 6,78 ^A	16,53 \pm 6,90 ^A	19,86 \pm 5,23 ^A
OC	2,09 \pm 1,54 ^A	4,16 \pm 1,32 ^B	4,69 \pm 2,16 ^B
RANK-L	7,45 \pm 2,04 ^A	9,86 \pm 1,25 ^A	7,96 \pm 1,62 ^A
GAPDH	3,22 \pm 0,66 ^A	3,08 \pm 0,74 ^A	3,97 \pm 0,55 ^A

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos – Tukey ($P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Produtos derivados de plaquetas são usados atualmente em aplicações clínicas e cirúrgicas que requerem regeneração de tecidos. Seus potenciais resultados benéficos, incluindo a regeneração de tecidos moles e duros, hemostasia local, aceleração da cicatrização de feridas, fazem com que estes sejam opções terapêuticas em diferentes áreas médicas. A estratégia é coletar e reunir os componentes ativos da amostra de sangue (plaquetas, fibrina e, eventualmente, leucócitos) e prepará-los em uma forma clinicamente utilizável. Durante o reparo normal do tecido vivo, as plaquetas liberam altas concentrações de proteínas biologicamente ativas, como fatores de crescimento (GFs) e outras substâncias. Os principais fatores associados às plaquetas incluem fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador β (TGF- β), que têm estado principalmente envolvidos na proliferação celular, quimiotaxia e produção de matriz extracelular e angiogênese (Cabaro *et al.*, 2018).

Outros GFs liberados das plaquetas são fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) 1 e 2 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que desempenham papéis críticos nas fases de hemostasia, proliferativa e remodelação da cicatrização de feridas. A degranulação plaquetária também leva à liberação de citocinas e quimiocinas, como Ligante de motivo CC 5 (CCL5), interleucina (IL) -1 β , IL-8 e macroproteína inflamatória do fago (MIP) -1 α , que contribuem para o processo de cicatrização. Vários procedimentos técnicos foram desenvolvidos para obter diferentes concentrados plaquetários com amostras variáveis de plaquetas e componentes celulares (Cabaro *et al.*, 2018).

O uso dessas modalidades regenerativas na odontologia tornou-se cada vez mais popular nos últimos anos com o uso de PRF sustentado por uma vasta literatura nos últimos cinco anos. A implantodontia foi recentemente alertada sobre as vantagens da utilização de PRF como membranas durante a regeneração óssea guiada. A utilização de PRF atua como um biomaterial inteiramente autólogo e, portanto, não suscita uma reação de corpo estranho, além do papel das proteínas da matriz extracelular contribuírem positivamente para a regeneração tecidual (Wang *et al.*, 2017).

Recentemente foram realizados grandes progressos na formulação de uma versão líquida de PRF, denominada injetável-PRF, ou i-PRF, com o objetivo de melhorar a mistura de biomateriais com concentrados plaquetários formando uma rede de fibrina logo após a inserção do biomaterial, favorecendo a estabilidade dos biomateriais durante os procedimentos regenerativos (Wang *et al.*, 2017).

Os leucócitos também são uma fonte significativa de citocinas e GFs que podem interagir sinergicamente com aqueles liberados pelas plaquetas junto com muitos tipos de células, incluindo células do sangue, fibroblastos e células endoteliais, os leucócitos participam do processo de cura final e, com uma intrincada diafonia, cada tipo de célula pode afetar especificamente a função dos outros tipos de células (Cabaro *et al.*, 2020).

Esse processo de regeneração ou reparo tecidual requer uma reação harmoniosa de vários tipos de células, incluindo células de resposta imune (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), células epiteliais, fibroblastos e células-tronco. Os Scaffolds de PRF representam uma boa fonte de todos os

componentes necessários para o processo de cicatrização, liberando uma grande variedade de fatores (Cabaro *et al.*, 2018).

O PRF é um concentrado de plaquetas de segunda geração, consiste em um conjunto íntimo de citocinas, cadeias glicânicas e glicoproteínas estruturais enredadas em uma rede de fibrina polimerizada lentamente. Os efeitos benéficos da PRF foram estudados em vários procedimentos, como cirurgia plástica facial, procedimentos de levantamento de seio maxilar como um material de preenchimento osteocondutor como uso indicado em defeitos periodontais intra-ósseos, defeitos de furca etc (Wang *et al.*, 2017). O PRF é capaz de formar uma rede tridimensional de fibrina, contendo células vivas, que podem atuar como um andaime nas fases iniciais da cicatrização de feridas. Durante esta fase, as plaquetas interagem com a matriz para formar um tampão hemostático e induzir uma liberação lenta de citocinas para estimular a migração e proliferação celular. Este processo é capaz de, posteriormente, melhorar a cicatrização de feridas. O PRF contém plaquetas e leucócitos (incluindo monócitos, linfócitos e granulócitos). É relatado que a interação entre essas células e a matriz de fibrina estimula uma liberação lenta de fatores de crescimento que podem resultar em uma melhor cicatrização da ferida na fase inicial deste processo (Pitzurra *et al.*, 2020).

Cabaro *et al.*, (2020) mostraram que a preparação de A-PRF resultou num maior número de plaquetas e leucócitos disseminados na malha de fibrina. A matriz de fibrina gerada no A-PRF mostrou uma estrutura mais porosa, permitindo mais espaço para que plaquetas e células imunes fiquem aderidas e, portanto, uma mantendo uma liberação maior e mais sustentada de fatores de crescimento, em comparação com PRF.

Cabaro *et al.*, (2020) comparou a liberação de citocinas / quimiocinas e GFs por PRF e A-PRF, incubados em meio sem soro por 24 h. Foram liberados uma quantidade semelhante de IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, FN γ MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5, TNF α , PDGF e VEGF por ambos os concentrados de plaquetas. Em contraste, IL-2, IL-10 e bFGF não foram detectados. Além disso, as membranas de A-PRF liberaram uma quantidade maior de IFN γ , embora sem atingir uma significância estatística ($p = 0,057$) (Cabaro *et al.*, 2020).

Em contraste, nenhuma diferença foi observada para as concentrações de IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, MIP-1 α , e MIP-1 β liberado pelos dois derivados de plaqueta. Em seguida, foram analisadas a secreção de PDGF e VEGF, que estavam, respectivamente, 3 e 1,7 vezes aumentadas em A-PRF em comparação com L-PRF (Cabaro *et al.*, 2020).

Em todas as culturas do nosso trabalho os osteoblastos se organizaram em forma de esféroide, tanto em PRF quanto em Alb-PRF. Os esferoides são modelos celulares que mimetizam tecidos, com a formação de gradientes moleculares e uma interação dos complexos célula-célula e das adesões celulares com a matriz extracelular. Na ausência de uma superfície de aderência, as células tendem a um processo de agregação. As células isoladas em suspensão tendem a formar microtecidos 3D chamados de esferoides multicelulares (STEINBERG, 2003).

Foi possível observar uma expressão gênica semelhante entre os grupos PRF e Alb-PRF, com maior expressão dos genes ALP, Runx-2 e OC que o grupo controle. As membranas de PRF e Alb-PRF diminuíram a expressão de OPG tanto em Ti quanto em LV. Este resultado contrasta com Chang *et al.*, (2010), onde a expressão de OPG foi aumentada pela PRF em cultura com U2OS.

Mccarthy *et al.*, (2008) relataram que o PDGF estimula a produção de OPG em duas linhas de células osteoblásticas humanas (MG63 e Saos-2). Chung *et al.*, (1997) mostraram que a expressão elevada de PDGF aumentou a regeneração óssea em defeitos ósseos em calvária.

7 CONCLUSÃO

Foi possível observar que a exposição às membranas de PRF e Alb-PRF: (1) estimulou a organização de osteoblastos em esferoides, (2) apresentou uma maior expressão dos genes relacionados à osteogênese.

8 REFERÊNCIAS

Albrektsson T (2008). Hard tissue implant interface. *Australian dental journal*; 53, S34-S38.

Albrektsson T e Sennerby L (1990). Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont*; 3(1): 30-41.

Andia, D. C., Cerri, P. S., & Spolidorio, L. C. (2013). Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP*, 35(2), 191-198.

Bigueti C C, Cavalla F, Silveira E M, Fonseca A C, Vieira A E, Tabanez A P, Garlet G P (2018). Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *Journal of Applied Oral Science*, 26.

Bragdon C R, Burke D, Lowenstein J D, O'Connor D O, Ramamurti B, Jasty M, & Harris W H (1996). Differences in stiffness of the interface between a cementless porous implant and cancellous bone in vivo in dogs due to varying amounts of implant motion. *The Journal of arthroplasty*; 11(8), 945-951.

Branemark P I, Adell R, Breine U, Hansson B O, Lindstrom J e Ohlsson A (1969). Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*; 3(2): 81-100.

Cabaro, S., D'Esposito, V., Gasparro, R., Borriello, F., Granata, F., Mosca, G., ... & Riccitiello, F. (2018). White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds. *Platelets*, 29(5), 463-467.

Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V., & Teti, A. (2014). The Great Beauty of the osteoclast. *Archives of biochemistry and biophysics*, 558, 70-78.

Chakravorty N, Ivanovski S, Prasadam I, Crawford R, Oloyede A, Xiao Y (2012). The microRNA expression signature on modified titanium implant surfaces influences genetic mechanisms leading to osteogenic differentiation. *Acta Biomaterialia*; 8 3516–352.

de Oliveira P T, Zalzal S F, Beloti M M, Rosa A L e Nanci A (2007). Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A*; 80(3): 554-564.

Dohan Ehrenfest D M, Pinto N R, Pereda A, Jiménez P, Corso M D, Kang B S, Nally M, Lanata N, Wang H L, Quirynen M (2018). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets Mar*;29(2):171-184.

El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, ... & Ghanaati S (2019). Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*.45(3), 467-479.

Fujioka-Kobayashi M, Schaller B, Mourão C F A B, Zhang Y, Sculean A, Miron R J (2021). Biological characterization of an injectable platelet-rich fibrin mixture consisting of autologous albumin gel and liquid platelet-rich fibrin (Alb-PRF). *Platelets Jan* 2;32(1):74-81.

Gao X, Fraulob M, & Haiat G (2019). Biomechanical behaviours of the bone–implant interface: a review. *Journal of the Royal Society Interface*; 16 (156).

Gemini-Piperni, S., Takamori, E. R., Sartoretto, S. C., Paiva, K. B., Granjeiro, J. M., de Oliveira, R. C., & Zambuzzi, W. F. (2014). Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell–biomaterial interface. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, 88-98.

Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, Landes C, Sader R, Kirkpatrick C, Choukroun J (2014) Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 40:679–689.

Gheno E, Mourão C F A B, Mello-Machado R C, Lourenço E S, Miron R J, Catarino K F F, Alves A T, Alves G G, Calasans-Maia M D (2020). In vivo evaluation of the biocompatibility and biodegradation of a new denatured plasma membrane combined with liquid PRF (Alb-PRF), Platelets; 1-13.

Haiat G, Wang H L, & Brunski J (2014). Effects of biomechanical properties of the bone–implant interface on dental implant stability: from in silico approaches to the patient's mouth. *Annual review of biomedical engineering*, 16, 187-213.

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 Radiol Endod*; Nov; 108(5):707-13.

Horváthy D B, Simon M, Schwarz C M, Masteling M, Váczi G, Hornyák I, Lacza Z(2017). Serum albumin as a local therapeutic agent in cell therapy and tissue engineering. *Biofactors*. 2017 May 6;43(3):315-330.

Kawase, T., Kamiya, M., Kobayashi, M., Tanaka, T., Okuda, K., Wolff, L. F., & Yoshie, H. (2015). The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(4), 825-831.

Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ (2016). Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*; Dec;20(9):2353-2360.

Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F, Ueno T, Saruwatari L, Aita H, Chiou W A e Ogawa T (2009). Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials*; 30(29): 5319-5329.

Lee J W Y e Bance M L (2019). Physiology of osseointegration. *Otolaryngologic Clinics of North America*; 52(2), 231-242.

Livak KJ e Schmittgen T D (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*; 25(4): 402-408.

Manea A, Bran S, Dinu C, Rotaru H, Barbur I, Crisan B, Armencea G, Onisor F, Lazar M, Ostas D, Baciut M, Vacaras S, Mitre I, Crisan L, Muresan O, Roman R and Baciut G (2019). Principles of biomechanics in oral implantology. *Med Pharm Rep* 92(Suppl No 3): S14-S9.

Martín-Guerrero, E., Tirado-Cabrera, I., Buendía, I., Alonso, V., Gortázar, A. R., & Ardura, J. A. (2020). Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation. *Journal of cellular physiology*, 235(10), 7356-7369.

Masaki, H., Okudera, T., Watanebe, T., Suzuki, M., Nishiyama, K., Okudera, H., ... & Kawase, T. (2016). Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International journal of implant dentistry*, 2(1), 1-6.

Mavrogenis A F, Dimitriou R, Parvizi J e Babis G C (2009). Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 9(2), 61-71.

Mourão C F A B, Gheno E, Lourenço E S, Barbosa R L, Kurtzman G M Javid K, Mavropoulos E, Benedicenti S, Calasans-Maia M D, Machado R C M, Alves G G (2018). Characterization of a New Membrane from Concentrated Growth Factors Associated with Denaturated Albumin (Alb-Cgf) for Clinical Applications: A Preliminary Stud. *International Journal of Growth Factors and Stem Cells in Dentistry* (1), 2.

Müller W E, Schröder H C, Wang X. (2019). Inorganic polyphosphates as storage for and generator of metabolic energy in the extracellular matrix. *Chemical reviews*, 119(24), 12337-12374.

Nanci A, Wuest J D, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S e McKee M D (1998). Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res*; 40(2): 324-335.

Paula-Silva, F. W. G., Arnez, M. F. M., Petean, I. B. F., Almeida-Junior, L. A., da Silva, R. A. B., da Silva, L. A. B., & Faccioli, L. H. (2020). Effects of 5-lipoxygenase gene disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis. *Archives of oral biology*, 112, 104670.

Pitzurra L, Ineke D C, Jansen I D C, Vries T J (2020). Hoogenkamp M. A., Loos B. G. Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. *J Periodontal Res*; Apr;55(2):287-295.

Pradeep A R, Rao N S, Agarwal E, Bajaj P, Kumari M, & Naik S B. (2012). Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology*, 83(12), 1499-1507.

Poole K E, Van Bezooijen R L, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos S E, Löwik C W, & Reeve J. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *The FASEB journal*, 19(13), 1842-1844.

Rolim A E, Carvalho F A A, Costa R C C, Rosa F P (2018). Chitosan Scaffolds - Physico - Chemical and Biological Properties for Bone Repair. *Revista Virtual de Química*, v. 10. n. 2, p. 211-228.

Root S H, Wee N K, Novak S, Rosen C J, Baron, R., Matthews B G, & Kalajzic I. (2020). Perivascular osteoprogenitors are associated with transcortical channels of long bones. *Stem Cells*, 38(6), 769-781.

Shah F A, Thomsen P e Palmquist A (2019). Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta biomaterialia*, 84, 1-15.

Sundell G, Dahlin C, Andersson, M e Thuvander M (2017). The bone-implant interface of dental implants in humans on the atomic scale. *Acta biomaterialia*; 48, 445-450.

Takarada T, Nakazato R, Tsuchikane A, Fujikawa K, Iezaki T, Yoneda Y, & Hinoi E. (2016). Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Development*, 143(2), 211-218.

Ueno T, Takeuchi M, Hori N, Iwasa F, Minamikawa H, Igarashi Y, Anpo M e Ogawa T (2012). Gamma ray treatment enhances bioactivity and osseointegration capability of titanium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 100(8): 2279-2287.

van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G e Quirynen M(2002). The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clin Oral Implants Res*; 13(6): 617-622.

Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron R J (2017). Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP *Int J Mol Sci*; Feb 4;18(2):331.

Wang Z, Wu G, Feng Z, Bai S, Dong Y, Wu G e Zhao Y(2015). Microarc-oxidized titanium surfaces functionalized with microRNA-21-loaded chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promote the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*; 10: 6675-6687.

Wilson C J, Clegg R E, Leavesley D I e Pearcy M J (2005). Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue engineering*; 1(1-2), 1-18.

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DOS BIOMATERIAIS NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS HUMANAS DE OSSO E PELE

Pesquisador: Sara Gemini Piperni

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16124819.6.0000.5283

Instituição Proponente: ASSOCIACAO FLUMINENSE DE EDUCACAO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.525.362

Apresentação do Projeto:

O presente estudo avaliará a interação de superfícies ou partículas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada em várias temperaturas, dióxido de titânio e L-PRF, com células de pele e osteoblastos em termos de citotoxicidade, diferenciação e produção de matriz extracelular com o intuito de aprimorar o uso destes biomateriais destinados à prática clínica. As células que farão parte do estudo serão obtidas de cultura primária de material de biópsia coletada durante procedimento odontológico de rotina. Amostras de sangue periférico e de tecido ósseo serão obtidas de 20 voluntários que concordarem com o protocolo do estudo e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que explica os objetivos, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo. A seleção dos participantes obedecerá a critérios de inclusão (indivíduos maiores de 18 anos e não fumantes) e de exclusão (portadores de qualquer doença sistêmica ou usuários de medicação de uso controlado). As células isoladas serão empregadas em experimentos in vitro, que incluem: caracterização dos materiais; análise de citotoxicidade; de adesão celular; análise multiplex de produtos secretados; de tráfego intracelular; coloração de TRAcP e ALP; de produção de colágeno da matriz

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.525.362

orgânica e mineralizada; e ensaio de reabsorção. Os resultados dos diferentes experimentos serão analisados comparando-se os efeitos dos diferentes biomateriais sobre as células testadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente estudo visa compreender a citotoxicidade ao expor células humanas de pele ou osso em cultivo, às superfícies ou partículas nanoestruturadas de hidroxiapatita carbonatada, látex, L-PRF ou dióxido de titânio com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Objetivo Secundário:

O presente estudo visa compreender a biocompatibilidade ao expor células humanas de pele ou osso em cultivo, às superfícies ou partículas nanoestruturadas de hidroxiapatita carbonatada, látex, L-PRF ou dióxido de titânio com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para coleta de sangue são mínimos. Não há riscos na coleta dos restos cirúrgicos pois estes serão aproveitados partindo do material de descarte de cirurgia, não apresentando riscos para o paciente.

Benefícios:

As aplicações de biomateriais (superfícies ou materiais nanoestruturados) abrangem uma grande diversidade de áreas tais como a terapia de câncer, cardiovascular, ortopedia e odontologia, doenças infecciosas, gastroenterologia, imunologia, neurologia, além de preenchedor, cosméticos e fotoprotetores (Alizadeh-Osgouei, Li, and Wen 2019). Os resultados deste estudo serão usados com o intuito de aprimorar o uso dos biomateriais testados tanto na prática clínica quanto na medicina estética.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.525.362

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desfecho Primário:

O desfecho primário do presente estudo é a avaliação da citotoxicidade ao expor células humanas de pele ou osso em cultivo, às superfícies ou partículas nanoestruturadas de dióxido de titânio ou hidroxiapatita com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Desfecho Secundário:

Na hipótese de que os materiais testados não provoquem a morte celular, o desfecho secundário do presente estudo será a avaliação do potencial bio-estimulador das superfícies ou partículas nanoestruturadas de dióxido de titânio ou hidroxiapatita para células humanas de pele ou osso em cultivo, com o intuito de aprimorar o uso deste biomaterial na prática clínica e/ou da medicina estética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos estão de acordo.

Recomendações:

Que os resultados da pesquisa sejam publicados e divulgados as instituições de pesquisa do país.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os documentos solicitados foram readequados e apresentados da forma correta. Portanto não existem mais inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO atendendo o previsto na Resolução 466/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto na reunião ocorrida em 04 de julho de 2019. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa será necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.525.362

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Cronograma	cronograma_atualizado_Sara.pdf	14/08/2019 09:41:38	Renato Cerqueira Zambrotti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_atualizado_Sara.pdf	14/08/2019 09:41:14	Renato Cerqueira Zambrotti	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1356212.pdf	12/06/2019 18:17:56		Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	12/06/2019 18:16:29	Sara Gemini Piperni	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_Funadesp_Sar a_Gemini_Piperni.pdf	12/06/2019 18:09:39	Sara Gemini Piperni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_clinica.pdf	11/06/2019 08:53:10	Sara Gemini Piperni	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia.pdf	11/06/2019 08:52:48	Sara Gemini Piperni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	10/06/2019 12:52:18	Sara Gemini Piperni	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	17/05/2019 08:14:17	Sara Gemini Piperni	Aceito
Orçamento	Orcamento_de_Projeto_2019_para_CE P.pdf	14/05/2019 14:41:23	Sara Gemini Piperni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UNIGRANRIO.pdf	14/05/2019 14:31:02	Sara Gemini Piperni	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DUQUE DE CAXIAS, 22 de Agosto de 2019

Assinado por:
Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br