



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE**

CAMILLA PALMEIRA ESTEVES

**CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS E
CELULARES DE MEMBRANAS DE L-PRFs PRODUZIDAS POR
DIFERENTES CENTRÍFUGAS/ PROTOCOLOS DE
CENTRIFUGAÇÃO**

Salvador
2020

CAMILLA PALMEIRA ESTEVES

**CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS E
CELULARES DE MEMBRANAS DE L-PRFs PRODUZIDAS POR
DIFERENTES CENTRÍFUGAS/ PROTOCOLOS DE
CENTRIFUGAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia e Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Maria P. Ramalho. Coorientador: Prof. Dr. André Carlos de Freitas

Salvador
2020

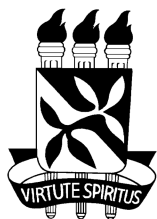
Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

E79 Esteves, Camilla Palmeira
Caracterização de propriedades físicas e celulares de membranas
de L-PRFs produzidas por diferentes centrífugas: protocolos de
centrifugação/Camilla Palmeira Esteves. – Salvador, 2020.
76 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Maria P. Ramalho; Coorientador:
Prof. Dr. André Carlos de Freitas.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade
de Odontologia/Programa de Pós-Graduação Odontologia e Saúde,
2020.
Inclui referências e anexos.

1. Fibrina rica em plaquetas. 2. Plasma rico em plaquetas.
3. Medicina regenerativa. 4. Cicatrização. I. Ramalho, Luciana Maria
P. II. Freitas, André Carlos de. III. Universidades Federal da Bahia.
IV. Título.

CDU 616.314



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE**

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. CAMILLA PALMEIRA ESTEVES

**“CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICAS E CELULARES
DE MEMBRANAS DE L-PRF₅ PRODUZIDAS POR DIFERENTES
CENTRÍFUGAS/ PROTOCOLOS DE CENTRIFUGAÇÃO”**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho (Orientadora)
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. André Carlos de Freitas (Examinador Externo ao Programa)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Jorge Moreira Pinto Filho (Examinador Externo)
Professor da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a duas pessoas que sempre torceram muito para que esse dia chegasse e que agora são os meus anjos que estão lá em cima pertinho do meu padroeiro Santo Antônio intercedendo por mim..

Minha avó Áurea Costa Palmeira, rainha da minha vida, a personificação do amor. Confesso que ainda não consigo imaginar como vou me acostumar a viver fisicamente sem você, mas, tenha certeza que eu vou tentar ser forte como você foi nesses 88 anos, não vou desistir de nenhum sonho, vou botar minha Fé na frente dos meus medos como você sempre fez, vou priorizar minha família, aumentar o seu legado e vou amar, amar e amar cada dia mais como você fez por todo o tempo que esteve aqui.. Ah, nunca se esqueça nenhum segundo, que eu tenho o amor maior do mundo e que ele é todinho seu independentemente de onde você esteja.

Por fim, gostaria de dedicar também essa vitória ao meu sogro Guilherme Osório da Cunha Schleinstein. Você tio, acreditou tanto que eu seria capaz de realizar esse sonho desde o primeiro segundo que eu resolvi sonhar ele, desde o momento que resolvi estudar para a seleção do mestrado você já era só orgulho. Nós sabemos que nossa relação foi construída aos poucos, nosso amor foi se remodelando e se reinventando ao longo desses anos e tenho muito orgulho de tudo que passamos, por isso, de onde você estiver quero que saiba que eu consegui! Exatamente como você disse que aconteceria desde quando tudo isso aqui só era um sonho... Ah, obrigada por acreditar, fez toda diferença... Amo você.

*“Não dá mais pra voltar, o barco está em alto mar.
Não dá mais pra negar o mar é Deus e o barco sou eu
E o vento forte que me leva pra frente é o amor de Deus.”*

Padre Jonas

AGRADECIMENTOS

Meu **Deus**, minha fortaleza, meu guia, minha certeza, minha luz, meu tudo, muito obrigada por me permitir sentir tua presença em cada passo da construção e realização de mais um sonho na minha vida.

Santo Antônio, meu padroeiro, obrigada por interceder junto à Deus por cada pedido e por cada súplica e por entregar diretamente a ele todas as minhas dúvidas, meus medos, incertezas e por ser tão presente na minha vida me permitindo te sentir ao meu lado a todo momento.

À minha mãe **Marcia**, minha Nina, minha vida, meu cais, meu porto seguro, a mulher mais forte e de mais fibra que já conheci. Você é minha inspiração, minha direção, meu norte. Obrigada por acreditar e viver intensamente todos os meus sonhos junto comigo e não soltar da minha mão nem por um segundo. Obrigada por toda uma vida dedicada à felicidade das suas filhas. Você, é a certeza do quanto Deus me ama e de como ele cuida de mim. Ter você como mãe nesta vida dá sentido à minha vida, te amo vida de mamy.

Meu pai **Roberto**, obrigada por sonhar junto comigo todos os meus sonhos e vibrar com todas as minhas conquistas. Obrigada pelo amor incondicional, pelo exemplo de caráter, pelo exemplo de ser humano e por me mostrar o quanto o trabalho e correr atrás dos nossos sonhos nos dignifica. Ter você na vida é certeza de colo, ombro amigo, melhor beijo e abraço da vida, comida com gostinho de lar e a certeza de que nunca estarei só. Você é meu amor, o homem da minha vida, te amo, sua Cam.

Obrigada por todo o apoio, amor, carinho, oração e companheirismo em mais uma jornada minhas metades, melhores amigas, minhas irmãs **Roberta e Marina**. Ter vocês é ter tudo! É ter colo, ombro amigo, amor, companheirismo, verdade, lealdade e eternidade. Obrigada por serem tanto para mim, por serem TUDO que eu tenho de mais lindo desde quando abri os olhos neste mundo pela primeira vez, amo vocês.

Gustavo, meu marido, meu Gu, meu vidoco, meu companheiro, meu cúmplice, minha alma gêmea, meu Bê... Agradecer a você é até meio clichê. Sem você, nada disso estaria acontecendo e essa realização não teria passado de um mero e longínquo sonho impossível de ser realizado. Obrigada pela sua paciência e amor incondicional, obrigada por viver isso intensamente comigo em todos os momentos e por não ter desistido de mim nesses quase 03 anos... Foi bem difícil e só nós sabemos. Obrigada por sonhar comigo, obrigada por me mostrar que seria possível e obrigada por ter me trazido até aqui... Sim, foi você que me trouxe. Esse título é nosso, esse sonho é nosso. Nunca esqueça que você será sempre minha melhor escolha dessa e de todas as outras vidas que virão... De janeiro a janeiro... Te amo.

Guel, obrigada cunha por toda torcida e amor, você faz parte de tudo isso e me inspira demais! Eu te amo!

As minhas amadas **Tia Núbia** e **Tia Zenaide** agradeço por todas as orações, por acreditarem no meu potencial e por tanto amor dedicado à mim, amo vocês.

À **Família Schleinstein** obrigada à todos por toda torcida e apoio, vocês fazem parte dessa conquista. Um agradecimento especial à minha sogra **Tânia** pelo amor, orações e por acreditar que eu seria capaz. A meu cunha **Léo** por todo amor e por sonhar esse sonho junto comigo, a minha amiga **Isa** por toda lealdade e amor e por se fazer presente com sua fé inabalável e a minha sobrinha **Miloca** por cada beijo e abraço e pelo amor dedicado a mim, tia Cam te ama!

As minhas amigas, muito obrigada pela torcida. Posso falhar em citar nomes, mas não poderia deixar de agradecer ao meu trevinho **Grazi** por todo companheirismo, lealdade e amor de toda uma vida compartilhada, é incrível realizar mais um sonho tendo você ao meu lado. À minha **Jabu**, irmã por escolha, obrigada por estar sempre coladinha em mim torcendo, vibrando com minhas conquistas e me amando incondicionalmente. Ao meu “**mimimi**” meu muito obrigada de coração! Vocês como sempre sonharam e realizaram esse sonho junto comigo. **Nanda**, minha dupla da vida, meu presente de Deus, obrigada. **Paulinha Cardoso**, obrigada por tanto amor, cuidado e pela torcida. **Teixa**,

minha sintonia mais que perfeita, parceira, confidente e colega de profissão... Não tenho palavras para te agradecer, quando achei que não conseguiria te ouvir dizer que eu era capaz e isso por muitas vezes foi meu combustível... Te amo.

Não posso deixar de agradecer as minhas meninas que viveram essa jornada tão intensa, louca e incrível comigo... **My love**, você é o presente mais precioso que esse mestrado me trouxe. Obrigada por cada conselho, cada palavra e cada oração. Você me fez entender que eu sou muito mais capaz de realizar sonhos do que um dia eu achei. Te levo pra vida, pra meus amigos, pra minha família, pra sempre... Te amo. **Minha Prin (Jú)**, sou muito grata à Deus pelo nosso reencontro, pelo seu carinho comigo, companheirismo, amor e por sonhar esse sonho coladinha em mim... Gratidão eterna! Te amo.

Viviane Palmeira, Vi, prima, amiga, anjo da guarda, referência a ser seguida, não existem palavras que descrevam a minha gratidão a você. Obrigada por absolutamente tudo que foi dito e posto em prática para que só assim esse sonho pudesse deixar de ser um sonho. Essa vitória é tão minha quanto sua tenha certeza disso. Obrigada, obrigada e obrigada por me ensinar sobre como a docência pode ser vivida com amor e por amor.

Profa. Dra. Luciana Ramalho, obrigada pela oportunidade que você me deu de viver e de realizar esse sonho e de crescer tanto como profissional e como pessoa. Você é uma referência e, ter tido a oportunidade e o prazer de ter caminhado lado a lado com você nessa jornada foi incrível. Você me ensinou a ter asas e me fez enxergar o quanto eu posso alçar voos cada vez mais altos. Obrigada de coração, gratidão eterna!

Prof. Dr. André Carlos de Freitas, muito obrigada pela sua disponibilidade e paciência em transmitir seus conhecimentos e contribuir tanto para a realização deste trabalho.

Prof. Dra. Maria Cristina Cangussu, obrigada de coração pela grande ajuda e paciência. Sua colaboração foi muito importante nesse trabalho.

Aos professores da Pós-graduação em Odontologia e Saúde gostaria de agradecer por todo conhecimento compartilhado e por me inspirarem para que eu siga o caminho da docência.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da UFBA, especialmente **Sr. Edilson Amâncio** pela enorme ajuda com a parte laboratorial e **Srt^a Sueli Paixão** por todo suporte e paciência nesses dois anos.

À **Fapesb** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) que, mesmo em tempos difíceis, concedeu-me a bolsa de Mestrado, investimento em prol da ciência e do meu crescimento profissional.

Por fim, agradeço à **FOUFBA** (Faculdade de Odontologia da UFBA) por me acolher e por ter contribuído tanto para minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 HISTÓRICO DOS CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS	19
2.2 FIBRINA RICA EM LEUCÓCITOS E PLAQUETAS (L-PRF)	22
2.2.1 A-PRF e i-PRF	25
2.2.2 Hemostasia e Coagulação	26
2.2.3 Cicatrização e regeneração tecidual	28
2.2.4. Rede tridimensional de fibrina	30
2.2.5 Principais fatores de crescimento	31
2.3 PRF – EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DO POTENCIAL BIOLÓGICO	33
2.3.1 Implantodontia	34
2.4 A INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE CENTRÍFUGAS NA PRODUÇÃO DOS L-PRFs	36
3 PROPOSIÇÃO	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO	39
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	39
4.4 SELEÇÃO DA AMOSTRA	41
4.5 COLETA	42
4.6 PREPARO DO L-PRF	44
4.7 ANÁLISE MACROSCÓPICA	45
4.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	48
4.9 ANÁLISE DE DADOS	49
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4.11 ARMANEZAMENTO E DESCARTE DO MATERIAL ANATOMOPATOLÓGICO	51
5 RESULTADOS	52
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	52
5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA	53
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1:** Sistema de Classificação do Estado Físico da American Society of Anesthesiologists (ASA).
- Quadro 2:** Variáveis, parâmetros e categorização da avaliação histológica.
- Tabela 1:** Comparação das características macroscópicas entre os grupos 1 e 2.
- Tabela 2:** Quantidade de áreas com células.
- Tabela 3:** Área com maior concentração de células.
- Tabela 4:** Intensidade de células na proximal, central e distal.
- Tabela 5:** Porcentagem (%) de células na proximal, central e distal.
- Tabela 6:** Distribuição de células na proximal, central e distal.
- Tabela 7** Localização das células na proximal, central e distal .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Tubo de L-PRF demonstrando as três camadas produzidas.
- Figura 2:** Três fases da regeneração tecidual.
- Figura 3:** Coleta sanguínea para a confecção do L-PRF
- Figura 4:** Centrífuga Montserrat
- Figura 5:** Centrífuga Intra Spin Intra-Lock Iberia
- Figura 6:** Os tubos de L-PRFs após serem removidos das respectivas centrífugas.
- Figura 7:** Coágulo de L-PRF sendo removido do tubo
- Figura 8:** Coágulos de L-PRF dispostos na caixa cirúrgica
- Figura 9:** Medição do coágulo de L-PRF com régua milimetrada
- Figura 10:** Placa metálica exercendo a compressão nos coágulos de L-PRF
- Figura 11** Membranas de L-PRF
- Figura 12** Medição da membrana de L-PRF
- Figura 13** Sobrenadante após a remoção do coágulo de L-PRF
- Figura 14** Intensidade de células na porção central e distal dos grupos 1 e 2.
- Figura 15** Porcentagem de células na porção central dos grupos 1 e 2.
- Figura 16** Distribuição de células na porção central e distal dos grupos 1 e 2.
- Figura 17** Localização de células na porção central dos grupos 1 e 2.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFBA	Universidade Federal da Bahia
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
L-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
CPs	Concentrados de plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
P-PRP	Plasma Rico em Plaquetas Puro
L-PRP	Plasma Rico em Plaquetas e Leucócitos
P-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas Pura
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformador Beta-1
PDGFs	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IL	Interleucina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
A-PRF	Fibrina Avançada Rica em Plaquetas
i-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas Injetável
FvW	Fator Von Willebrand
MEC	Matriz extracelular
ADP	Adenosina difosfato
APT	Ativador de Plasminogênio Tecidual
MSCs	Células-Tronco Mesenquimais

EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ml	Mililitros
RPM	Rotação por minuto
RCF	Força centrífuga relativa
kg	Quilogramas
g	Gramas
HE	Hematoxilina-eosina

RESUMO

A Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos, do inglês Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) tem sido utilizada como reguladora do processo cicatricial por ser importante fonte de citocinas e fatores de crescimento. O L-PRF é um produto autólogo oriundo da centrifugação de amostras sanguíneas. O sucesso da técnica está intrinsecamente relacionado aos protocolos de processamento do sangue coletado e do tipo de centrífuga utilizada. Este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente macro e microscopicamente pela técnica da hematoxilina/eosina (H/E) a formação da membrana/ coágulo de L-PRF em dois modelos diferentes de centrífugas, a Intra Spin -Intra-Lock e a centrífuga Montserrat. Foram utilizadas 4 amostras de sangue de 8 voluntários saudáveis submetidos à cirurgia de reabilitação com implantes dentários. Dois tipos de centrífuga com diferentes protocolos de centrifugação foram utilizados. No grupo 1 da centrífuga Montserrat foram utilizadas 400g de força centrífuga por 10 minutos, 27°C e 2700 de rpm, já no grupo 2 da centrífuga Intra Spin -Intra-Lock foram utilizadas 400g de força centrífuga por 12 minutos, 27°C e 2700 de rpm. O sangue foi coletado rapidamente e distribuído de forma randomizada nas centrífugas. Ao final foram obtidos 32 L-PRFs coágulos/ membranas. Em seguida, as peças foram registradas e encaminhadas para análise macroscópica, das variáveis de pesos e tamanhos dos coágulos/membranas de L-PRFs e peso do sobrenadante/coágulo de glóbulos vermelhos remanescentes nos tubos. Em seguida, os espécimes foram processados para a técnica histológica de rotina (H/E). Cada lâmina foi dividida em três áreas de tamanho igual: Proximal (Cabeça e Face), Centro (Corpo) e Distal (Cauda) e analisadas semi-quantitativamente para a presença de leucócitos. Os resultados demonstraram que as membranas produzidas na centrífuga Intra Spin - Intra-Lock apresentam presença de leucócitos em pelo menos 2 áreas concomitantemente (62,5%) ($p=0,003$). Em relação a intensidade de leucócitos ($p=0,012$), porcentagem de leucócitos ($p=0,037$), distribuição de leucócitos ($p=0,005$) e localização de leucócitos ($p=0,037$) ambas foram estatisticamente maiores na áreas centrais das membranas de L-PRFs produzidas na centrífuga Intra Spin -Intra-Lock quando comparadas as áreas centrais das produzidas na Montserrat. No que se refere as características macroscópicas, em nenhum dos L-PRFs produzidas pelas duas centrífugas foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes. Sugere-se então que os diferentes protocolos influenciam na presença e distribuição dos leucócitos entre as membranas de L-PRFs. Novos estudos devem ser realizados para ampliar essa caracterização.

Palavras-chave: Fibrina Rica em Plaquetas, Plasma Rico em Plaquetas, Medicina Regenerativa, Cicatrização.

ABSTRACT

Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) has been used as a regulator of the healing process because it is an important source of cytokines and growth factors. L-PRF is an autologous product from the centrifugation of blood samples. The success of the technique is intrinsically related to the blood processing protocols collected and the type of used centrifuge. This study aimed to evaluate, comparatively macro and microscopically using the hematoxylin/eosin (H/E) technique, the formation of the L-PRF membrane/clot in two different models of centrifuges, the Intra-Spin - Intra-Lock and the Montserrat centrifuge. Four blood samples were used from 8 healthy volunteers who underwent rehabilitation surgery with dental implants. Two types of centrifuge with different centrifugation protocols were used. In group 1 of the Montserrat centrifuge, 400gm of centrifugal force at 10 minutes, 27°C and 2700 rpm were used, while in group 2 of the Intra-Spin Intra-Lock centrifuge, 400g of centrifugal force at 12 minutes, 27°C and 2700 rpm were used. The blood was collected quickly and randomly distributed in the centrifuges. At the end, 32 clot/membrane L-PRFs were obtained. Then, the pieces were registered and sent for macroscopic analysis, of the variables of weights and sizes of clots/membranes of L-PRFs and weight of the supernatant/clot of red blood cells remaining in the tubes. Then, the specimens were processed for routine histological technique (H/E). Each slide was divided into three areas of equal size: Proximal (Head and Face), Center (Body) and Distal (Tail), and was analyzed semiquantitatively for the presence of leukocytes. The results demonstrate that the membranes produced in the Intra-Spin - Intra-Lock centrifuge present leukocytes in, at least, 2 areas simultaneously (62.5%) ($p = 0.003$). Regarding leukocyte intensity ($p = 0.012$), leukocyte percentage ($p = 0.037$), leukocyte distribution ($p = 0.005$) and leukocyte location ($p = 0.037$), both were statistically higher in the central areas of the L-PRFs produced in the Intra-Spin - Intra-Lock centrifuge when compared to the central areas of those produced in Montserrat. With regard to macroscopic characteristics, no statistically relevant differences were found in any of the L-PRFs produced by the two centrifuges. It is suggested that the different protocols influence the presence and distribution of leukocytes between the membranes of L-PRFs. New studies must be carried out to expand this characterization.

Key-words: Platelet-Rich Fibrin, Platelet-Rich Plasma, Regenerative Medicine, Healing.

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios nas últimas décadas, tem sido desenvolver protocolos de aditivos cirúrgicos bioativos que possam regular o processo inflamatório e acelerar o reparo tecidual. Nesse contexto, o uso de biomateriais enriquecidos com plaquetas tem proporcionado ótimos resultados, estando em evidência a Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF), que possui três componentes principais em sua composição capazes de favorecer a regeneração tecidual, incluindo células autólogas (leucócitos e plaquetas), um arcabouço tridimensional provisório da matriz extracelular fabricado a partir da fibrina autóloga e uma infinidade de moléculas bioativas (citocinas e fatores de crescimento) (Dohan Ehrenfest et al., 2017).

Apesar do processo de reparo não ser ainda completamente compreendido, sabe-se que as plaquetas desempenham um papel importante tanto na hemostasia como nos processos de reparo tecidual (Dohan Ehrenfest et al., 2017), estas possuem fatores de crescimento responsáveis pela mitose celular, indução de diferenciação celular e aumento na produção de colágeno (Dohan Ehrenfest et al., 2017). Então, depende-se que as estratégias terapêuticas realizadas com a utilização de concentrados plaquetários visam a aceleração dos efeitos desses fatores de crescimento contidos nas plaquetas, as quais já são vistas há muito tempo como uma das principais iniciadoras do processo de reparo tecidual (Dohan Ehrenfest et al., 2017)

Em anos mais recentes, os concentrados de plaquetas (CPs) para uso cirúrgico vem sendo cada vez mais estudados, visando otimizar a sua forma e aplicabilidade cirúrgica. Os CPs correspondem a produtos autógenos preparados através da centrifugação de amostra de sangue do paciente, que permite que os componentes ricos em fatores de crescimento, fibrina e leucócitos sejam coletados e, em seguida, preparados para uma forma passível de uso clínico (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSESON; ALBREKTSSON, 2009).

Descrita inicialmente por Choukroun et al. (2001) na França, a L-PRF (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos) caracterizada como uma verdadeira matriz cicatricial autóloga é considerada uma tecnologia de concentrado

plaquetário de segunda geração por se tratar de uma técnica mais simples e com um custo mais inferior, sendo muito diferente dos inúmeros outros protocolos existente até o momento, como por exemplo o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) (DOHAN et al., 2006a). Nessa técnica desenvolvida por Choukroun et al. (2001), o sangue foi coletado sem adição de anticoagulante em tubos de 10ml e centrifugados imediatamente a 2700 RPM por 12 minutos utilizando uma centrífuga de mesa PC-02 e um kit de coleta da Process (Nice, França), levando a formação de um coágulo de PRF no meio do tubo. Como não houve a adição de agente anticoagulante, o processo de coagulação ocorreu naturalmente logo após o sangue entrar em contato com a parede do tubo coletor (DOHAN et al., 2006a).

Dessa maneira, o sucesso da técnica de preparo da L-PRF depende do rápido e eficiente processamento do sangue coletado. Após a centrifugação ocorre uma separação do sangue em três fases. A primeira fase mais superficial é a do plasma acelular, a segunda fase mais intermediária corresponde ao coágulo de L-PRF e a fase mais profunda seria a da série das células vermelhas (DOHAN et al., 2006a). A PRF é considerado um biomaterial sólido (DEL CORSO; SAMMARTINO; DOHAN EHRENFEST, 2009; DOHAN EHRENFEST et al., 2010a; MAZOR et al., 2009; SIMONPIERI et al., 2011) e um coágulo sanguíneo natural otimizado (DOHAN, 2010; DOHAN EHRENFEST et al., 2010b)

A simplicidade da técnica para obtenção da L-PRF e conseqüentemente a maior acessibilidade do uso deste concentrado em procedimento cirúrgicos de rotina, permite a aquisição de um concentrado plaquetário autólogo sem adição de nenhum tipo de anticoagulante para uso clínico, o que é visto como umas das grandes vantagens deste concentrado em relação a outros concentrados plaquetários (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

Após a evidente evolução dos estudos a respeito da L-PRF, já surgiram na literatura diversas variações sobre os diferentes modelos de centrífugas e conseqüentemente diferentes protocolos que podem ser utilizados para este método. Diante desse contexto, estão surgindo questionamentos no que diz respeito as grandes diferenças que vem sendo encontradas nos materiais de L-

PRFs produzidos por diferentes centrífugas/ protocolos. Como por exemplo, em relação a qualidade, tamanho e peso dos coágulos adquiridos e a sua influência no reparo tecidual (DOHAN, 2010). Até o momento, estudos que caracterizem o efeito de diferentes modelos de centrífugas na confecção dos coágulos/membranas de L-PRFs são escassos na literatura.

Recentemente, alguns estudos foram publicados visando investigar diferentes parâmetros utilizados em diferentes modelos de centrífugas que possam vir a interferir na qualidade dos coágulos/membranas de L-PRFs. Como as vibrações mecânicas que aparecem durante a centrifugação em diferentes modelos de centrífugas de mesa usados para produzir L-PRF e o impacto das características da centrífuga na arquitetura celular e de fibrina de um coágulo/membrana de L-PRF (DOHAN EHRENFEST et al., 2014a, 2014b, 2017; DOHAN EHRENFEST, DAVID M DEL CORSO et al., 2014).

Levando em consideração que diversas características das centrífugas podem interferir de alguma forma no resultado biológico da L-PRF final, este estudo teve como objetivo avaliar as características macroscópicas e microscópicas do coágulo/ membrana de L-PRF em dois modelos de centrífugas, a Intra Spin -Intra-Lock e a centrífuga nacional Montserrat. As hipóteses nulas testadas no presente estudo foram: 1- Há diferenças macroscópicas dos coágulos/membranas de L-PRFs produzidas nos dois modelos de centrífugas; e 2- Há diferenças microscópicas dos coágulos/membranas de L-PRFs produzidas nos dois modelos de centrífugas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DOS CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS

A história dessas tecnologias com os materiais autólogos derivados do sangue começa com os adesivos de fibrina que foram desenvolvidos há mais de 40 anos (MATRAS, 1970). O desenvolvimento das colas de fibrinas ocorreu pela necessidade de adjuvantes cirúrgicos para melhorar a cicatrização e controlar o sangramento difuso. Sendo a primeira matriz de coagulação, a fibrina é um elemento-chave do processo de cicatrização (GIBBLE; NESS, 1990).

Tendo sido comercializada pela primeira vez no final do ano de 1970, a cola de fibrina foi o primeiro aditivo cirúrgico a ser comercializado na Europa (PRAKASH; THAKUR, 2011). Este aditivo cirúrgico que tem como base a fibrina é resultado da polimerização do fibrinogênio com adição de trombina e cálcio. Na cascata de coagulação sua principal característica é mimetizar os seus estágios finais, agindo de forma independente a partir dos mecanismos internos desse processo. Então, mesmo se existir defeitos no processo da coagulação, a hemóstase será alcançada (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b; DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

Essas colas poderiam ser utilizadas em muitos tecidos sem oferecer grandes riscos, além de terem sido projetadas visando melhorar a cicatrização e a neoangiogênese no local lesado (DEL CORSO et al., 2012). Os profissionais da área da cirurgia oral e maxilofacial tem aplicado esses produtos (MATRAS, 1982; PAIROT TAYAPONGSAK, BRIEN; MONTEIRO; ARCEO-DIAZ, 1994) considerados como uma ferramenta polimórfica e adaptativa, um adjuvante cirúrgico perfeito, que auxilia no processo natural de coagulação (DEL CORSO et al., 2012).

O alto custo de preparação desses referidos materiais motivou a evolução das colas de fibrinas para os concentrados plaquetários (CPs), por serem preparações autólogas, onde a presença das plaquetas reforçaria a arquitetura do gel de fibrina. Então, o conceito dos CPs foi descrito inicialmente para tratamento de úlceras cutâneas na cirurgia plástica (KNIGHTON et al., 1988,

1990, 1986) e depois difundido no ramo das cirurgias bucomaxilofaciais (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997).

Neste contexto, em 1997 surgiu como opção na medicina regenerativa, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) introduzido como concentrados de plaquetas para utilização em procedimentos cirúrgicos orais, como uma formulação em gel, derivados da centrifugação do sangue total com utilização de trombina bovina e cloreto de cálcio (CaCl_2) (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997).

A importância dos fatores de crescimento (FC) nesses concentrados já foi descrita, sendo que a sua liberação pode ocorrer pela ativação de algumas substâncias como a trombina, o cloreto de cálcio (CaCl_2), o colágeno ou a adenosina 5c-difosfato (MARX et al., 1998).

O PRP é resultado da modificação de cola de fibrina fruto da centrifugação de sangue do próprio paciente, ou seja, o resultado disso é uma concentração plaquetária superior aos valores basais do sangue periférico. A sua aplicação em feridas proporciona um aumento significativo do número de fatores de crescimento na zona lesada. Dessa forma, uma fonte autóloga de mediadores estimulariam a reparação do tecido, modulando a inflamação, permitindo uma homeostasia eficaz, acelerando o processo de reparo dos tecidos moles e duros (ALBANESE et al., 2013; DESARDA et al., 2013; DOHAN EHRENFEST et al., 2014a; DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009; FIORAVANTI et al., 2016; MARX et al., 1998; RAJA; NAIDU, 2008; SOOD et al., 2012; VAHABI et al., 2015; WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; WU et al., 2012).

No princípio, as pesquisas demonstraram que o PRP era efetivo no que dizia respeito a aceleração do processo de cicatrização e reparo ósseo e tecidual em cirurgias orais. E, isso evidenciou o fato de que vários fatores de crescimento estavam contidos em níveis bastante elevados no PRP (MARX et al., 1998).

No entanto, com o passar do tempo foram evidenciadas diversas limitações como a baixa eficiência de manuseio do sangue, a técnica em si que era demorada e, portanto, exigia o uso adicional de fatores anticoagulantes como trombina bovina ou cloreto de cálcio (CaCl_2), ambos inibidores conhecidos da cicatrização de feridas. E, com isso, a possibilidade de desenvolvimento de anticorpos tanto de anti-trombina como (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b;

MASUKI et al., 2016; PRAKASH; THAKUR, 2011) de anti-fatores V e XI devido à utilização de trombina (geralmente bovina) ficaram evidentes. Além disso, a possibilidade de reação imunológica de corpo estranho devido à presença de fator V na trombina utilizada também se tornou uma realidade com a utilização deste concentrado (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b; MASUKI et al., 2016; PRAKASH; THAKUR, 2011).

Como uma resposta às limitações evidentes do PRP, surgiu na França no ano de 2001 outra família de concentrados plaquetários desenvolvidos por Joseph Choukroun et al., a Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) que pertence a uma nova geração de concentrado imunológico e plaquetário, considerado por muitos como o método mais promissor para muitas aplicações, por conta da simplicidade da sua técnica e por ser um concentrado totalmente autólogo (CHOUKROUN et al., 2001).

Atualmente, essa técnica é considerada a mais simples e com o protocolo menos dispendioso, na qual o sangue é coletado sem nenhum tipo de anticoagulante como o citrato de sódio, não requer aquecimento nem ativador como o cloreto de cálcio ou trombina bovina e é imediatamente centrifugado sem manipulação para criar uma matriz de fibrina. A técnica da PRF produz um coágulo sanguíneo natural otimizado, preparado em uma forma clinicamente utilizável (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b). Este gel de PRF é muito forte e libera durante mais de 7 dias grandes quantidades de importantes moléculas de coagulação e cicatrização e fatores de crescimento (DOHAN EHRENFEST et al., 2012, 2009).

Devido a diversidade de protocolos para a produção de concentrados plaquetários eles foram categorizados em 4 famílias, dependendo do conteúdo de leucócitos e da arquitetura da fibrina: Plasma Rico em Plaquetas Puro (P-PRP), Plasma Rico em Plaquetas e Leucócitos (L-PRP), Fibrina Rica em Plaquetas Pura (P-PRF) e Fibrina Rica em Leucócitos e Plaquetas (L-PRF) (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

O P-PRP e o L-PRP foram classificados como sendo suspensões líquidas de plaquetas, respectivamente sem e com leucócitos. Estas, podem ser usadas como suspensão injetável e após a sua ativação (com trombina, cloreto de cálcio

ou outros agentes), tornando-se géis de fibrina com uma polimerização incompleta do fibrinogênio e uma arquitetura final fraca da fibrina (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009; FERNÁNDEZ-BARBERO et al., 2006).

O P-PRF e o L-PRF foram classificados como biomateriais de fibrina sólidos com e sem a presença de leucócitos. Em ambos, a ativação de plaquetas faz parte do processo de produção destes concentrados e pode ser realizada de maneira natural (L-PRF) ou artificial (P-PRF). No entanto, sempre ocorre durante a centrifugação e demanda uma forte arquitetura final de fibrina (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b; DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

2.2 FIBRINA RICA EM LEUCÓCITOS E PLAQUETAS (L-PRF)

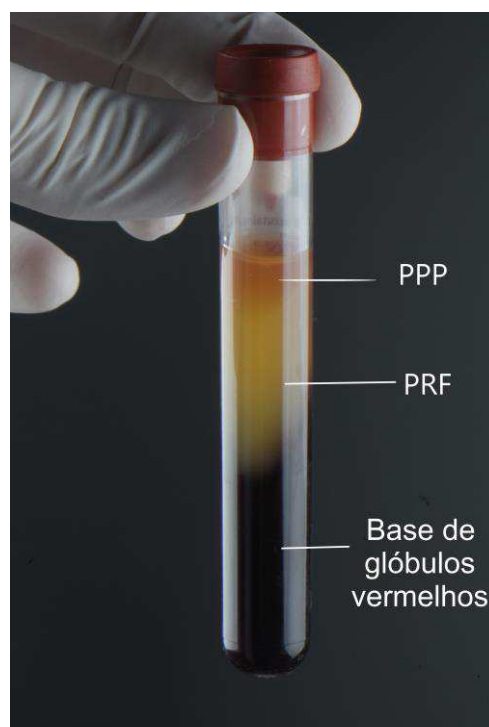
A Fibrina Rica em Leucócitos e Plaquetas (L-PRF) foi descrita inicialmente na França por Joseph Choukroun et al. para uso específico em cirurgia oral e maxilo-facial (CHOUKROUN et al., 2001). A L-PRF também conhecida como PRF de Choukroun é considerada a segunda geração de concentrados plaquetários por se tratar de uma técnica muito diferente dos inúmeros outros protocolos, sendo o mais simples e mais barato em comparação com os demais concentrados existentes até o momento (DOHAN et al., 2006b, 2006c, 2006a; DOHAN; CORSO; CHARRIER, 2007).

Segundo o protocolo estabelecido por Choukroun et. al (2001), o sangue venoso autólogo é coletado e processado sem nenhum tipo de anticoagulante em tubos de 10ml que são imediatamente centrifugados a 2700 rpm (rotações por minuto), 750g (força centrífuga), por 12 min. Esta técnica foi criada em 2000, utilizando uma centrífuga de mesa PC-02 e um kit de coleta da Process (Nice, França) (CHOUKROUN et al., 2001).

Neste protocolo não há adição de agente anticoagulante, trombina ou cloridrato de cálcio, o que implica a ativação em poucos minutos da maioria das plaquetas da amostra de sangue em contato com as paredes do tubo coletor e

a consequente ativação da via intrínseca da cascata de coagulação, o que leva a formação de um coágulo de fibrina natural (DOHAN et al., 2006a). Então, três camadas são formadas no tubo de colheita: uma base de glóbulos vermelhos no fundo, o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) na forma de sobrenadante e um coágulo de PRF no meio do tubo, em que estão contidos a maioria das plaquetas e leucócitos (figura 1) (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b; DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

Figura 1: Tubo de L-PRF demonstrando as três camadas produzidas



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

O coágulo de PRF obtido apresenta uma arquitetura tridimensional complexa, onde concentra mais de 97% das plaquetas e mais de 50% dos leucócitos (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b), o que o torna um biomaterial fundamental na hemóstase (ARUNACHALAM; PULIKKOTIL; SONIA, 2016; FUJIOKA-KOBAYASHI; MIRON, 2017). Esse coágulo pode sofrer uma compressão suave entre duas gazes ou com a utilização de kits específicos, para que se torne uma membrana de L-PRF forte e com alto potencial para a

aplicação clínica (DOHAN et al., 2006a, 2006c), como também em relação a engenharia de tecidos (CHOUKROUN et al., 2007).

Dentro desta membrana/coágulo de PRF pode-se observar três componentes principais que serão vistos como auxiliares no processo da regeneração tecidual, incluindo células autólogas (leucócitos e plaquetas), um arcabouço tridimensional provisório da matriz extracelular fabricado a partir da fibrina autóloga e uma infinidade de moléculas bioativas. Todos estes componentes são de suma importância no processo de cicatrização de feridas (ADAMSON, 2009; CHOUKROUN et al., 2006a; DOHAN et al., 2006c, 2006b, 2006a).

Uma das grandes diferenças à nível celular dos concentrados de PRF e PRP gira em torno dessa incorporação de leucócitos que pode ser vista no PRF. Estas células são fundamentais na regulação imunológica (KAWAZOE; KIM, 2012; PERUT et al., 2013; PIRRACO; REIS; MARQUES, 2012), além de desempenharem um papel muito importante durante a integração do tecido ao biomaterial do hospedeiro (DAVIS et al., 2014a; GHASEMZADEH; HOSSEINI, 2015; MIRON; BOSSHARDT, 2016).

A falta de anticoagulantes, permite a formação da matriz de fibrina diferenciando o PRF do PRP. E, apesar ter sido vista no passado simplesmente como um transportador para fatores de crescimento e células, a matriz de fibrina com o tempo demonstrou ser uma característica principal do PRF. Por ter sua atuação como uma matriz de fibrina polimerizada em uma estrutura tetra molecular na incorporação de plaquetas, leucócitos e citocinas e na presença de células-tronco circulantes, a matriz PRF é um componente chave da cicatrização de feridas teciduais (CHOUKROUN et al., 2006a).

A terceira principal vantagem da PRF é o fato de conter algumas citocinas e fatores naturais de crescimento na sua matriz, como: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Transformador Beta-1 (TGF- β 1), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGFs), Fator de Crescimento de Fibroblastos (bFGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1), Interleucina (IL) -1 β , IL-6, IL-4 e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) (DEL CORSO et al., 2012; HE et al., 2009; KANG et al., 2011). A

presença de bFGF, PDGF e VEGF no coágulo/membrana de L-PRF justifica o seu papel importantíssimo na neoformação tecidual, devido ao grande potencial na angiogênese (CHOUKROUN et al., 2006a).

Deste modo, é possível observar que a combinação da presença de células hospedeiras, da matriz de fibrina tridimensional e de fatores de crescimento no PRF atuam como componentes-chave que auxiliam no processo da regeneração tecidual (ADAMSON, 2009; CHOUKROUN et al., 2006a; DOHAN et al., 2006a, 2006c, 2006b).

2.2.1 A-PRF e i-PRF

Posteriormente, surgiu o A-PRF, do inglês Advanced platelet-rich fibrin, uma versão modificada do PRF que é considerado um coágulo de fibrina mais leve, mais curto e mais estreito do que o PRF original, por possuir um protocolo de centrifugação de baixa velocidade e por ser composto por um número maior de leucócitos (ISOBE et al., 2017; MASUKI et al., 2016).

Estudos mostram que este protocolo do A-PRF (1500 rpm, 100g de força centrífuga, 14min) leva a um melhor aprisionamento de linfócitos B e T e a uma distribuição mais uniforme de plaquetas e neutrófilos. Além disso, há relatos de que no A-PRF o número de plaquetas é superior quando comparado com o L-PRF (DOHAN EHRENFEST et al., 2014b). Clinicamente, isso pode-se traduzir numa maior liberação de fatores de crescimento, contudo, a literatura ainda é limitada em relação a comparação entre os dois protocolos e são necessários que mais estudos sejam feitos para verificar os benefícios e limitações do A-PRF quando comparado ao L-PRF (KOBAYASHI et al., 2016).

Em se tratando da Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF), uma das principais limitações relatadas do PRF tradicional tem sido a sua difícil combinação com os biomateriais ósseos, por conta da sua consistência de arcabouços de fibrina. Por conta disso, o PRF injetável (i-PRF) foi criado, visando suprir esta dificuldade, sem ter a necessidade da utilização de anticoagulantes (WANG et al., 2017).

O i-PRF por ser um concentrado que é produzido com protocolo de centrifugação à velocidade mais lenta (600 rpm, 47 g de força centrífuga, 8 min), pode ser facilmente misturado a biomateriais, formando uma rede de fibrina após ser misturado a eles e auxiliando a estabilidade do biomaterial nos procedimentos de regeneração tecidual (WANG et al., 2017).

2.2.2 Hemostasia e Coagulação

A hemostasia baseia-se na formação do coágulo que ocorre após o bloqueio do sangramento causado pela vasoconstricção. Tendo como objetivo, reduzir ou interromper o fluxo de sangue no lúmen do vaso até que ocorra o reparo da lesão, para que assim o sangue fique contido e se mantenha em estado fluido dentro desse lúmen. O processo hemostático é bastante efetivo e envolve basicamente três elementos principais: endotélio, plaquetas e cascata de coagulação (SILVERTHORN, 2010). Do mesmo modo, pode-se dizer que a hemostasia ocorre em três estágios: hemostasia primária, hemostasia secundária e retração do trombo (GUYTON & HALL, 2006).

Na hemostasia primária, a lesão no vaso sanguíneo vai atuar como um agente causador da vasoconstricção arteriolar transitória, que acarreta a diminuição do fluxo sanguíneo no local da lesão. Isto ocorre por meio de mecanismos neurogênicos reflexos (resposta central) e são potencializados pela produção de endotelinas, potentes vasoconstrictores derivados do endotélio (resposta local). A vasoconstricção diminui a perda de sangue além de viabilizar uma resposta mais eficiente nos processos de coagulação e de agregação plaquetária (SILVERTHORN, 2010).

Ao final desta primeira fase de vasoconstricção, ocorre a formação do tampão plaquetário que define o início da hemostasia secundária. No princípio, ocorre adesão plaquetária, onde as plaquetas se aderem ao colágeno e esta adesão é regulada pelo fator von Willebrand (FvW), proteína sintetizada pelas células do endotélio (GUYTON & HALL, 2006).

O FvW se mantém preso à matriz extracelular (MEC) através de interações com o colágeno e com as plaquetas. Após ativadas, as plaquetas

liberam por exocitose o ADP (adenosina difosfato), tromboxano e outras substâncias químicas. Em seguida, o ADP e o tromboxano induzem a agregação plaquetária adicional pela ligação de receptores ao fibrinogênio. Essa agregação plaquetária preenche o defeito vascular, formando um tampão plaquetário frouxo (GUYTON & HALL, 2006).

O início da cascata de coagulação se dá através da presença de colágeno e de outros fatores nos tecidos, onde as proteínas inativas do plasma sanguíneo são transformadas em fatores de coagulação (enzimas ativas). Desse modo, o tampão plaquetário (coágulo) será reforçado, já que a enzima trombina converterá o fibrinogênio em fibrina. Sendo a fibrina o resultado de um emaranhado de reações enzimáticas que circunda fatores de coagulação, cofatores não enzimáticos, cálcio e fosfolípidos provenientes de membrana, especialmente de plaquetas (SILVERTHORN, 2010).

Sabe-se que no quesito da reparação de feridas, a fibrina ocupa um lugar substancial em relação a hemostasia, no entanto, a fibrina também favorece uma matriz para deslocamento de fibroblastos e de células do endotélio que estão envolvidos no processo da formação de novos vasos (angiogênese) e são responsáveis pela remodelação de novos tecidos (SILVERTHORN, 2010).

A fibrina age potencializando o coágulo plaquetário primário, a força elástica é ampliada pelos polímeros de fibrina, através do fator XIIIa que converte α_2 -antiplasmina em fibrina, além de proteger o coágulo contra fibrinólise. No entanto, sabe-se que a fibrinólise é um requisito básico para o processo da hemostasia. Então, o Ativador de Plasminogênio Tecidual (APT) liberado pelas células do endotélio, transforma plasminogênio em plasmina (uma protease) e ao final da reparação do vaso sanguíneo a plasmina é responsável por dissolver o coágulo retraído (SILVERTHORN, 2010).

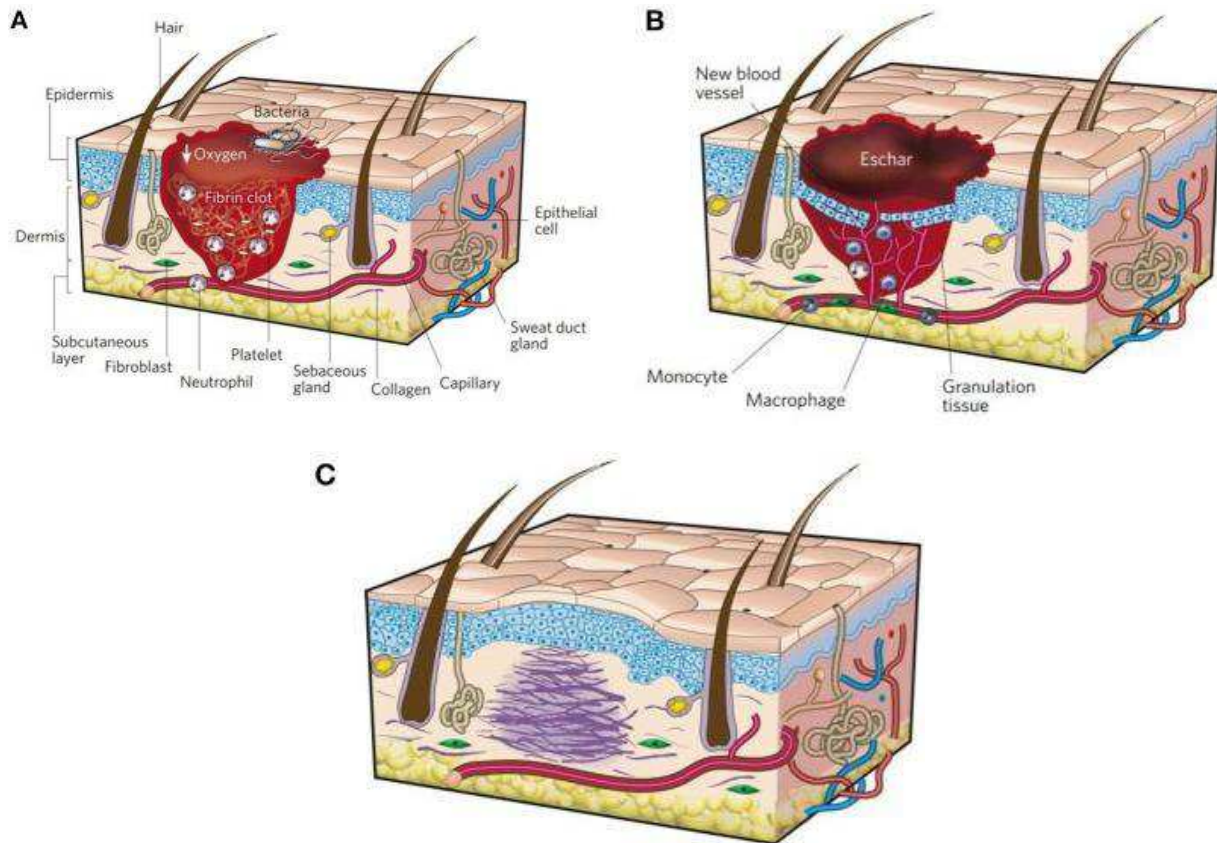
2.2.3 Cicatrização e regeneração tecidual

O processo de cicatrização de feridas pode ser compreendido como uma variedade de eventos celulares, mediados através de proteínas de sinalização e, por se tratar de um processo complexo pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação. A primeira fase se inicia no momento do ferimento e dura entre 24 e 48 horas. Nesse momento, há uma interação dinâmica entre as células endoteliais, as citocinas e a matriz extracelular (MEC), em que a deposição bem controlada de fatores de crescimento visa acelerar o processo de cicatrização de feridas (GUO; DIPIETRO, 2010).

O sangue será responsável por fornecer todas as células, proteínas e moléculas necessárias para viabilizar o sucesso desse processo. Sendo assim, uma vez que a ferida ocorre, o sangue começa a coagular dentro de alguns minutos para conseguir conter o sangramento e uma das principais células envolvidas neste processo são as plaquetas, responsáveis por regular a hemostasia através da formação dos coágulos de fibrina. As plaquetas, além de liberarem citocinas liberam fatores de crescimentos que iniciam e sustentam o processo de cicatrização ao atraírem macrófagos e neutrófilos para o local que precisa ser reparado (GUO; DIPIETRO, 2010; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

No terceiro dia começa a fase proliferativa, onde o coágulo de sangue de dentro da lesão contém uma matriz provisória para a migração celular, enquanto o coágulo do interior do lúmen do vaso contribui para a continuidade da hemostasia (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000). Os fibroblastos começam a produzir colágeno de forma aleatória e, depois disso, ocorre a angiogênese ao mesmo tempo que a lesão começa a se estabilizar. Na fase de maturação de colágeno e contração (fase final de remodelação), ocorre a substituição do colágeno por fibrilas de colágeno organizadas, que proporcionam maior resistência ao local lesado onde ocorre a regeneração tecidual (GURTNER et al., 2008).

Figura 2: Três fases da regeneração tecidual (a) Fase Inflamatória; (b) Fase Proliferativa; (c) Fase de Remodelação.



Fonte: Adaptado de: Gurtner, Werner, Barrandon, Longaker, 2008

Neste processo, são considerados como principais componentes sanguíneos o plasma, glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e as plaquetas, sendo que as plaquetas são as células consideradas como cruciais no processo da cicatrização. Estas, são consideradas como responsáveis pela ativação e liberação de diversos fatores de crescimento, fatores de coagulação, moléculas de adesão, citocinas e também fatores angiogênicos, permitindo dessa forma que ocorra o recrutamento e atividade de fibroblastos e leucócitos, macrófagos e de células-tronco mesenquimais (MSCs). Após a ativação das plaquetas e as subsequentes liberações no coágulo dos fatores de crescimento, de coagulação e das citocinas, isso resultará em reparo tecidual, remodelamento de vasos e regeneração dos tecidos (EMING et al., 2007; GOSAIN; DIPIETRO, 2004; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

Então, as terapias realizadas com concentrados plaquetários foram desenvolvidas, visando acelerar de maneira natural a regeneração das

plaquetas contidas no sangue. Onde, as aplicações clínicas do L-PRF são baseadas em quatro eventos fundamentais do processo de cicatrização: angiogênese, controle imunológico, aproveitamento de células-tronco circulantes e recobrimento da lesão por epitélio (CHOUKROUN et al., 2001). Após a centrifugação, o PRF final consiste em um concentrado natural de glóbulos brancos, plaquetas e fibrina. Estes concentrados de PRF, como dito anteriormente, contêm 97% de plaquetas e mais de 50% de leucócitos em uma rede de fibrina de alta densidade quando comparados a porcentagem de sangue total (DOHAN EHRENFEST et al., 2010b).

2.2.4 Rede tridimensional de fibrina

A fibrina é a forma ativada de uma molécula plasmática chamada fibrinogênio (MOSESSON; SIEBENLIST; MEH, 2001), que é considerado o substrato final de todas as reações de coagulação e por ser uma proteína solúvel é transformado em fibrina insolúvel pela trombina, enquanto o gel de fibrina polimerizada forma a primeira matriz cicatricial da ferida local (CLARK, 2001; HINSBERGH; COLLEN; KOOLWIJK, 2006).

No PRF encontra-se um conjunto de propriedades incluindo células e fatores de crescimento presos em uma matriz de fibrina tridimensional, que agem de maneira simultânea, acarretando um aumento rápido da reparação tecidual. Esta molécula fibrilar solúvel está massivamente presente tanto no plasma como nas plaquetas e desempenha um papel determinante na agregação plaquetária durante a hemóstase, sendo capaz de fortalecer o agrupamento inicial de plaquetas, formando, assim, uma barreira de proteção ao longo de violações vasculares durante o processo de coagulação (CLARK, 2001). A rede de fibrina apresenta uma organização especialmente homogênea, tridimensional e ainda mais coerente do que os coágulos de fibrina naturais (DOHAN et al., 2006c).

Pode-se considerar que o coágulo/membrana de PRF contém inúmeras vantagens adicionais, afinal baseia-se em um conjunto de citocinas, cadeias glicanas e glicoproteínas estruturais envolvidas dentro de uma rede de fibrina

lentamente polimerizada. Os fatores de crescimento que estão presos a esta rede de fibrina influenciam a matriz extracelular (MEC), permitindo assim a migração, divisão e alteração fenotípica das células do endotélio, levando à formação de novos vasos (angiogênese) (BURNOUF et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2016).

Na estrutura do PRF as plaquetas ficam aprisionadas de maneira condensada dentro da rede de fibrina e os fatores de crescimento permanecem dentro dessa malha tridimensional. Posteriormente, ocorrerá uma liberação lenta e gradual desses fatores de crescimento (DOHAN et al., 2006c). Também pode-se observar que no coágulo de PRF, a fibrina irá agir junto com a fibronectina (glicoproteína de elevado peso molecular) como uma matriz provisória, visando recrutar células como monócitos, fibroblastos e células endoteliais para o local que foi lesado (HINSBERGH; COLLEN; KOOLWIJK, 2006).

2.2.5 Principais fatores de crescimento

O sangue deve ser visto como principal local de armazenamento para diversos fatores de crescimento responsáveis por ocasionar a angiogênese e a regeneração de tecidos envolvidos no processo de cicatrização de feridas. Estes fatores de crescimento existem como precursores parcialmente ativos ou inativos que precisam sofrer ativação proteolítica e/ou serem ligados a moléculas da matriz para assim realizarem sua atividade ou para serem devidamente estabilizados (CLARK, 2001).

Sabe-se que os concentrados de plaquetas fornecem muitos fatores de crescimento autólogos simultaneamente. Durante o processamento da PRF por centrifugação as plaquetas são ativadas e após sofrerem degranulação maciça, ocorre uma liberação significativa de citocinas. Dessa forma, o PRF, diferentemente dos outros concentrados plaquetários, é capaz de liberar de maneira progressiva citocinas no decorrer da remodelação de fibrina, e isto

justifica as propriedades de regeneração tecidual que podem ser observadas na membrana/coágulo de PRF (DOHAN et al., 2006c).

As plaquetas e macrófagos liberam uma abundância de fatores, dentre os principais, estão: o Fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) que é a principal isoforma produzida pelo TGF beta, sendo o melhor indutor de cicatrização fibrosa entre todas as citocinas. O TGF- β 1 estimula a quimiotaxia de fibroblastos, assim como a produção de colágeno e de fibronectina, enquanto inibe a degradação de colágeno por diminuição das proteases e aumenta os inibidores das proteases, tudo isto favorecendo, assim, a fibrogênese. Também é um fator que irá inibir a formação dos osteoclastos e a reabsorção óssea, o que favorece a formação óssea sobre a reabsorção (CLARK, 2001).

Os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) são os primeiros fatores de crescimento presentes em uma ferida, iniciando a cicatrização do tecido conjuntivo, incluindo a regeneração e reparação do osso. Sendo considerados reguladores cruciais para a migração, proliferação e sobrevivência das células mesenquimais além de promoverem a produção de colágeno para remodelamento da MEC durante a cicatrização (LUCARELLI et al., 2003; ROSENKRANZ; KAZLAUSKAS, 1999). As plaquetas são consideradas as principais fontes de PDGFs e estes são acumulados em quantidades grandes na matriz de PRF sendo considerados umas das importantes moléculas que serão liberadas ao longo do tempo do PRF de maneira lenta e gradual, por possuírem uma meia-vida extremamente curta. As principais atividades do PDGFs incluem mitogênese (aumento da população de células de cicatrização), a angiogênese (mitoses endoteliais em capilares funcionais) e ativação de macrófagos (desbridamento do local da ferida) (ADAMSON, 2009; DAVIS et al., 2014a, 2014b; GHASEMZADEH; HOSSEINI, 2015; TSIROGIANNI; MOUTSOPOULOS; MOUTSOPOULOS, 2006).

O VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) está relacionado ao PDGF e foi descrito como o fator de crescimento mais importante no que se refere a angiogênese dos tecidos, acarretando a formação de novos vasos sanguíneos e, conseqüentemente um aumento do fluxo de sangue e de nutrientes no local lesionado (KATO et al., 2005; LOZITO et al., 2009). O VEGF tem resultados importantes em relação ao remodelamento de tecidos e a

incorporação desse fator de crescimento humano recombinante em biomateriais ósseos tem indicado um aumento na neoformação óssea, salientando os efeitos rápidos e importantes do VEGF (SHAMLOO; XU; HEILSHORN, 2012).

Já o Fator de crescimento epidérmico (EGF) corresponde a uma família responsável por aumentar a formação de epitélio e diminuir exacerbadamente o processo cicatricial global quando utilizado, além de ser responsável por induzir a formação de novos vasos, a quimiotaxia de células do endotélio e a mitose de células mesenquimais. Sendo que a maioria dos tipos de células humanas, inclusive aquelas que desempenham um papel bastante importante durante a cicatrização, como queratinócitos, células do endotélio e fibroblastos expressam o receptor de EGF (BABENSEE; MCINTIRE; MIKOS, 2000).

Por fim, os Fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) são reguladores positivos da proliferação e diferenciação da maioria das células, incluindo as células tumorais. Estes, são liberados pelas plaquetas durante sua ativação e degranulação e estimulam a diferenciação e a mitogênese das células mesenquimais. Apesar de os IGFs serem mediadores proliferativos de células, formam o maior eixo da regulação da morte celular programada (apoptose), através da indução de sinais de sobrevivência que protege as células de vários estímulos apoptóticos matriciais (GIANNOBILE et al., 1996).

2.3 PRF – EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DO POTENCIAL BIOLÓGICO

O PRF é um biomaterial autólogo que tem ganhado cada vez mais visibilidade desde a última década. É muito utilizado em diversas áreas, apresentando inúmeras aplicabilidades em odontologia, cirurgia plástica e no ramo da otorrinolaringologia (MIRON et al., 2017; VINAYA KUMAR; SHUBHASHINI, 2013).

Choukroun e os seus colaboradores, foram os primeiros a descrever o L-PRF como sendo uma membrana/coágulo com capacidade de promover a regeneração óssea relacionada a colocação de implantes dentários (CHOUKROUN et al., 2006b). Tal abordagem foi estendida para o ramo de

cirurgias periodontais estéticas, enxertos de alvéolos no pós-operatório, endodontia regenerativa, dentre outras. As aplicações clínicas do L-PRF têm um caráter amplo, no entanto torna-se necessário um conhecimento cada vez mais preciso a respeito deste concentrado, para entender a sua eficácia e seus limites e assim otimizar o uso deste na prática clínica odontológica (MARCO DEL CORSO; MICHAEL TOFFLER; DAVID M. DOHAN EHRENFEST, 2010).

Alguns estudos demonstram que na odontologia, a membrana de L-PRF pode prover efeitos clínicos muito positivos no tratamento de defeitos nos tecidos periodontais de suporte (AJWANI et al., 2015; CHANDRADAS et al., 2016), estimular a cicatrização de tecidos moles e duros (KOTSAKIS et al., 2016; MARENZI et al., 2015), auxiliar na diminuição dos casos de alveólites pós-exodontias (KUMAR et al., 2015), interferir positivamente no ganho de tecido ósseo em cirurgias pré-protéticas e na osseointegração de implantes dentários (CASTRO et al., 2017; ÖNCÜ; ERBEYOĞLU, 2019).

2.3.1 Implantodontia

Na área da implantodontia, o uso de modalidades de caráter regenerativo têm se tornado algo cada vez mais rotineiro e uma lista ampla de biomateriais vêm sendo usada constantemente, dentre eles estão as membranas de barreira, os diferentes materiais de enxertos ósseos e fatores de crescimento bioativos que agem como facilitadores no processo de regeneração tecidular. Entre a variedades de procedimentos de regeneração utilizados destaca-se o PRF que, é um indutor da velocidade de regeneração de tecidos por possuir uma quantidade supra-fisiológica de fatores de crescimentos autólogos (MIRON et al., 2017).

Grandes dificuldades encontradas na cirurgia para colocação de implantes dentários estão relacionadas a proximidade com estruturas anatômicas importantes, como canal mandibular e seio maxilar e a quantidade de osso no local para a correta instalação do mesmo. Diante disso, visando sanar essas dificuldades, existem determinados procedimentos cirúrgicos que podem

ser realizados previamente ou mesmo durante à instalação de implantes, como enxertos de seio e a regeneração óssea guiada (AROCA et al., 2009; RAJA; NAIDU, 2008).

Neste sentido, é importante ressaltar que as características positivas da L-PRF quando associadas a enxertos ósseos e a biomateriais no que se refere aos processos de regeneração tecidual, podem ser ainda mais significativas (CHOUKROUN et al., 2006b). A adição de PRF aos enxertos é vista como uma oportunidade de desenvolver um tratamento que melhore a integração desses substitutos ósseos com os enxertos utilizados nos tratamentos de reabilitação com implantes dentários.

A fibrina rica em leucócitos e plaquetas possui um grande potencial angiogênico, retêm as células-tronco circulantes e dá proteção a ferida por cobertura epitelial. Os diversos fatores de crescimento que se encontram neste concentrado têm como potencial estimular o reparo ósseo e propiciar que fibroblastos se proliferem. Ressalta-se ainda a melhor vascularização dos tecidos, formação de colágeno e mitose de osteoblastos, células endoteliais e mesenquimais proporcionado pelo L-PRF. (MARRELLI; TATULLO, 2013; SUÁREZ-LÓPEZ DEL AMO et al., 2015).

Na literatura recente encontra-se cada vez mais estudos que tem demonstrado uma relação positiva existente entre a combinação do uso do PRF com aloenxertos durante cirurgia para colocação de implantes dentários e cirurgia de levantamento de seio maxilar, promovendo assim uma regeneração óssea de melhor qualidade, mais rápida e segura (DRAGONAS et al., 2019; SIMONPIERI et al., 2012).

Desde modo, é cabível dizer que a utilização do PRF como um coadjuvante na cirurgia de colocação de implantes dentários deve ser visto como algo que pode trazer bastante benefícios, pois auxilia na preservação dos contornos dos tecidos periodontais e na neoformação óssea ao redor dos implantes colocados, além de ajudar na cicatrização, no controle da inflamação e ser um auxiliador na formação do periodonto de suporte (MARRELLI; TATULLO, 2013).

2.4 A INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE CENTRÍFUGAS NA PRODUÇÃO DOS L-PRFs

Como já foi visto, o L-PRF é um concentrado de plaquetas e leucócitos que pode ser facilmente preparado e utilizado diariamente na prática clínica médica e odontológica (DOHAN et al., 2006a). No protocolo de Choukroun foi utilizado uma centrífuga de mesa e um kit de coleta da Process (Nice, França), onde, as amostras sanguíneas foram colhidas em tubos de 10ml sem anticoagulantes, que foram imediatamente centrifugados a 2700 rpm (aproximadamente 750g de força centrífuga relativa (RCF)) por 12 minutos. Após isso, os coágulos de L-PRFs obtidos foram removidos do tubo coletor e utilizados conforme necessário (DOHAN et al., 2006a).

Apesar do protocolo de Choukroun ter sido bem delineado, muitas publicações relatam algumas discrepâncias na produção de diferentes coágulos/membranas de L-PRFs e isso se justifica pelo fato dos métodos prescritos não terem sido seguidos. Uma das grandes diferenças relatadas refere-se a falha no uso da centrífuga específica, mas principalmente em ter sido utilizado uma força centrífuga específica (750g) mesmo no caso da utilização de um outro tipo de centrífuga (AGARWAL et al., 2013; ANILKUMAR et al., 2009; SINGH; BHARTI, 2013).

Pode-se observar também que em muitas publicações, a RCF nem sequer é citada e, ao invés disso, apenas o tempo e a velocidade da centrífuga são relatados. Ocorre assim, um desvio muito grande do protocolo original, já que a RCF é completamente subestimada (AGARWAL et al., 2013; ANILKUMAR et al., 2009; SINGH; BHARTI, 2013).

As centrífugas são equipamentos que aplicam a força centrífuga relativa para separar as partículas de uma solução. O funcionamento das centrífugas baseia-se em colocar amostras em rotação em torno de um eixo fixo (OSWALD, 2009). A força centrífuga relativa (RCF) ou força gravitacional (Força G) pode ser definida como a quantidade de força de aceleração que será aplicada em uma amostra durante a centrifugação. A unidade de medida da RCF é g que equivale

à aceleração da gravidade na superfície da terra. A RCF difere da RPM (rotações por minuto) que é definida como a velocidade de rotação da centrífuga, ou seja, a quantidade de rotações por minuto em torno do eixo fixo da centrífuga (OSWALD, 2009).

A RCF será baseada em duas variáveis específicas, a largura do rotor e a rapidez em que ele se move. Desde modo, o raio da centrífuga ou rotor é tão importante para a produção da RCF como é para a contagem das RPM. Dessa forma, se a velocidade de centrifugação estiver descrita somente em RPM, ela só poderá ser utilizada em um outro modelo de centrífuga se as centrífugas em questão tiverem o mesmo tamanho de raio e o mesmo ângulo de inclinação do rotor e assim consequentemente terão RCF constante. E, no caso de centrífugas de raio e/ou ângulo de rotor diferentes a RCF será alterada e deve ser então calculada para que não haja alteração na produção dos coágulos/membranas de L-PRFs (OSWALD, 2009).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente macro e microscopicamente pela técnica da hematoxilina/eosina a formação da membrana/ coágulo de L-PRF em dois modelos diferentes de centrífugas a Intra Spin -Intra-Lock e a centrífuga Montserrat.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os pesos e os tamanhos dos coágulos/membranas de L-PRFs em diferentes tempos do seu processo de formação produzidas nas centrífugas Intra Spin -Intra-Lock e Montserrat.

- Comparar a presença e a distribuição de leucócitos nas regiões proximal, central e distal das membranas de L-PRFs produzidas nas centrífugas Intra Spin -Intra-Lock e Montserrat.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi elaborado considerando a Resolução do Conselho Nacional de Saúde n° 466/12. Sendo iniciado somente após a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFBA (CAAE: 17443719.0.0000.5024) (Anexo A) e a devida assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B), pelos voluntários que estavam envolvidos na pesquisa.

4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO

As amostras foram coletadas no ambulatório do curso de Especialização em Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA) (Anexo C). As análises laboratoriais à nível celular foram realizadas no laboratório de Anatomia Patológica (Anexo D) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para definição dos critérios de inclusão e exclusão, foi levado em consideração o Sistema de Classificação do Estado Físico da American Society of Anesthesiologists (ASA) que é utilizado como uma ferramenta importante para avaliar e comunicar as co-morbidades médicas pré-anestésicas de um paciente (quadro 1).

Quadro 1: Sistema de Classificação do Estado Físico da American Society of Anesthesiologists (ASA)

CLASSIFICAÇÃO ASA	DEFINIÇÃO	EXEMPLOS PARA ADULTOS, INCLUINDO, MAS NÃO SE LIMITANDO A:
ASA I	Paciente normal e saudável	Saudável, não fumante, nenhum ou uso mínimo de álcool
ASA II	Paciente com doença sistêmica leve	Doenças leves sem limitações funcionais substantivas. Os exemplos incluem (mas não se limitam a): fumante atual, bebedor social de álcool, gravidez, obesidade ($30 < \text{IMC} < 40$), DM / hipertensão bem controlada, doença pulmonar leve
ASA III	Paciente com doença sistêmica grave	Limitações funcionais substantivas; Uma ou mais doenças moderadas a graves. Os exemplos incluem (mas não se limitam a): DM ou hipertensão mal controlada, DPOC, obesidade mórbida ($\text{IMC} \geq 40$), hepatite ativa, dependência ou abuso de álcool, marca-passo implantado, redução moderada da fração de ejeção, ESRD submetido a diálise regularmente programada, bebê prematuro PCA <60 semanas, história (> 3 meses) de MI, AVE, TIA ou CAD / stents.
ASA IV	Paciente com doença sistêmica grave que é uma ameaça constante à vida	Os exemplos incluem (mas não se limitam a): IM, CVA, TIA ou CAD / stents recentes (<3 meses), isquemia cardíaca contínua ou disfunção valvar grave, redução grave da fração de ejeção, sepse, DIC, ARD ou ESRD não submetidos regularmente a diálise programada
ASA V	Paciente moribundo de quem não se espera que sobreviva sem a operação	Os exemplos incluem (mas não se limitam a): ruptura de aneurisma abdominal / torácico, trauma maciço, sangramento intracraniano com efeito de massa, intestino isquêmico em face de patologia cardíaca significativa ou disfunção de múltiplos órgãos / sistemas
ASA VI	Paciente declarado com morte cerebral cujos órgãos estão sendo removidos para fins de doador	

Fonte: Adaptado da American Society of Anesthesiologists, 2019

Dessa forma, foram incluídos no estudo pacientes do curso de especialização em Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), que fossem ASA I ou II, sem história de uso de aspirina ou qualquer medicação correlacionada com o processo de coagulação e que aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para poder então, fazer parte da pesquisa.

Os critérios de exclusão, pacientes que não fossem ASA I ou II, que apresentassem histórico de uso de aspirina ou qualquer medicação correlacionada com o processo de coagulação ou que não aceitasse assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.4 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Neste ensaio clínico foram utilizadas amostras de sangue de 8 voluntários saudáveis com base no artigo de Dohan Ehrenfest et al., 2017, que foram submetidos à cirurgia de reabilitação com implantes dentários na especialização em Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

Este estudo teve como variáveis dependentes as centrífugas IntraSpin™, Intra-Lock Iberia e a Montserrat, modelo 80-2B 15mL e como variáveis independentes as variáveis macroscópicas incluindo volume do tubo contendo o coágulo de L-PRF, tamanho do coágulo e da membrana de L-PRF e peso da membrana de L-PRF e também do sobrenadante e dos coágulos de glóbulos vermelhos remanescentes no tubo e as variáveis microscópicas incluindo uma única variável numérica discreta (quantidade de áreas com células) e as seguintes variáveis categóricas entre os grupos: área com maior concentração de células, intensidade de células na proximal, central e distal, score em porcentagem da presença de células na proximal, central e distal, distribuição de células na proximal, central e distal e localização das células na região proximal, central e distal.

4.5 COLETA

A coleta foi realizada no ambulatório da especialização de Implantodontia FOUFBA, previamente a cirurgia de colocação de implantes dentários, onde foram coletados 4 tubos de sangue de cada voluntário para imediata produção de coágulos e membranas L-PRFs (1 para utilização como amostra de cada centrífuga e 1 para reserva). O sangue foi coletado por um profissional habilitado.

O material foi armazenado em tubos de plástico, sem anticoagulantes (BD Vacutainer Serum de 10,0 ml, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e o procedimento de coleta foi realizado conforme Andriolo et. al (2010) de acordo com os padrões preconizados pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso, descritas abaixo (figura 3):

- 1) Verificar os padrões de limpeza e abastecimento da sala da coleta antes de iniciar as coletas.
- 2) Solicitar ao paciente que diga seu nome completo para confirmação dos dados do paciente e etiquetas.
- 3) Conferir e ordenar todo o material a ser usado no paciente, de acordo com o pedido médico (tubo, gaze, torniquete etc.). Essa identificação dos tubos deve ser feita na frente do paciente.
- 4) Informar ao paciente como será o procedimento.
- 5) Higienizar as mãos.
- 6) Calçar as luvas.
- 7) Posicionar o braço do paciente, inclinándolo para baixo na altura do ombro.
- 8) Se o torniquete for usado para seleção preliminar da veia, pedir para que o paciente abra e feche a mão; em seguida, afrouxar o instrumento e esperar 2 minutos para utilizá-lo novamente.
- 9) Fazer a antisepsia.
- 10) Garrotear o braço do paciente.
- 11) Abrir o lacre do scalp de coleta múltipla de sangue a vácuo em frente ao paciente.

- 12) Retirar a proteção que recobre a agulha do scalp de coleta múltipla de sangue a vácuo.
- 13) Fazer a punção numa angulação oblíqua de 30°, com o bisel da agulha voltado para cima. Se necessário, para melhor visualizar a veia, esticar a pele com a outra mão (longe do local onde foi feita a antissepsia).
- 14) Encaixar o tubo para coleta no adaptador do sistema a vácuo.
- 15) Quando o sangue começar a fluir para dentro do tubo, desgarrotar o braço do paciente e pedir para que abra a mão.
- 16) Realizar a troca dos tubos sucessivamente.
- 17) Homogeneizar imediatamente após a retirada de cada tubo, invertendo-o suavemente de 5 a 10 vezes.
- 18) Após a retirada do último tubo, remover o scalp e fazer a compressão no local da punção, com algodão ou gaze secos.
- 19) Exercer pressão no local, em geral, de 1 a 2 minutos, evitando-se, assim, a formação de hematomas e sangramentos. Se o paciente estiver em condições de fazê-lo, orientá-lo adequadamente para que faça a pressão até que o orifício da punção pare de sangrar.
- 20) Descartar o scalp imediatamente após sua remoção do braço do paciente, em recipiente para materiais perfurocortantes.
- 21) Fazer curativo oclusivo no local da punção.
- 22) Orientar o paciente a não dobrar o braço, não carregar peso ou bolsa a tiracolo no mesmo lado da punção por, no mínimo, 1 hora, e não manter a manga dobrada, pois pode funcionar como torniquete.
- 23) Verificar se há alguma pendência, fornecendo orientações adicionais ao paciente, se for necessário.
- 24) Certificar-se das condições gerais do paciente, perguntando se está em condições de se locomover sozinho e, em caso afirmativo, entregar o comprovante de retirada do resultado ao paciente para, em seguida, liberá-lo.
- 25) Colocar as amostras em local adequado ou encaminhá-las imediatamente ao processamento. Deve-se respeitar sempre o procedimento operacional do laboratório; por exemplo, nos casos recomendados, manter em gelo os materiais necessários.

Figura 3: Coleta sanguínea para a confecção do L-PRF



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Após ser realizada a coleta, os scalpns utilizados foram descartados em caixa de material perfurocortante, que foram posteriormente coletadas pela empresa responsável pelo recolhimento de material biológico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

4.6 PREPARO DO L-PRF

Para o preparo do L-PRF, dois tipos de centrífuga foram utilizados (IntraSpin™, Intra-Lock Iberia e a Montserrat, modelo 80-2B 15mL). Previamente a coleta sanguínea, as centrífugas foram programadas com os protocolos indicados pelo fabricante, os quais são: 400g de força centrífuga, 12 minutos, 27°C, 2700 rpm para a centrífuga a Intra Spin -Intra-Lock e 400g de força centrífuga, 10 minutos, 27°C, 2700 rpm para a centrífuga Montserrat. O sangue foi coletado rapidamente (máximo de 2 min para colocação dos tubos nas centrífugas), distribuído de forma randomizada nos aparelhos e centrifugado imediatamente (antes de 2 minutos). Após o final da centrifugação, os tubos permaneceram dentro das respectivas centrífugas por 10 minutos (figura 4 e figura 5).

Figura 4: Centrífuga Montserrat

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 5: Centrífuga Intra Spin Intra-Lock Iberia

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Foram obtidos quatro coágulos/membranas por voluntário, sendo que duas foram oriundas da centrífuga IntraSpin -Intra-Lock e duas da centrífuga Montserrat, totalizando 32 L-PRF coágulos/ membranas. Todas as peças foram devidamente registradas no caderno de pesquisa e encaminhadas para análise macroscópica, processamento histológico e posterior coloração em hematoxilina e eosina.

4.7 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após a centrifugação, os tubos contendo os coágulos de fibrina L-PRF foram pesados (balança de precisão 3kg resolução 0,01g com calibração interna, Didática Sp) (figura 6) e em seguida, o coágulo de fibrina L-PRF foi removido do tubo com pinças estéreis e uma espátula lisa para liberar cuidadosamente o coágulo de glóbulos vermelhos no interior do tubo (figura 7). Os coágulos de L-PRFs obtidos foram acomodados em uma caixa cirúrgica, apropriada para preparação de membranas de L-PRFs (figura 8), para medição dos tamanhos destes coágulos (Régua milimetrada -01 régua de aço inox AISI 420, Golgran) (figura 9).

Figura 6: Os tubos de L-PRFs após serem removidos das respectivas centrífugas.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 7: Coágulo de L-PRF sendo removido do tubo



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 8: Coágulos de L-PRF dispostos na caixa cirúrgica



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

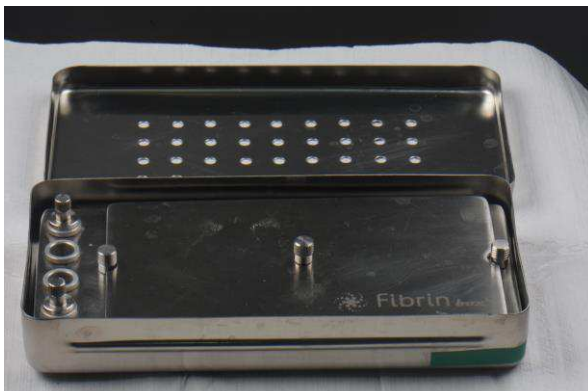
Figura 9: Medição do coágulo de L-PRF com régua milimetrada



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Essa caixa cirúrgica possui uma placa metálica e apenas com a ajuda da gravidade foi realizada uma compressão suave nestes coágulos, após essa compressão (45 segundos) (figura 10), estes coágulos foram então caracterizados como membranas de L-PRFs (figura 11).

Figura 10: Placa metálica exercendo a compressão nos coágulos de L-PRF



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 11: Membranas de L-PRF



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A partir desse método, as membranas de L-PRFs também foram colocadas em uma bandeja individual para medições de peso (balança de precisão 3kg resolução 0,01g com calibração interna, Didática Sp) e tamanho (Régua milimetrada -01 régua de aço inox AISI 420, Golgran) (figura 12). O sobrenadante e o coágulo de glóbulos vermelhos remanescentes no tubo também foram pesados (balança de precisão 3kg resolução 0,01g com calibração interna, Didática Sp) para se obter a proporção de coágulo de fibrina L-PRF / sangue total por tubo (figura 13). Posteriormente a análise macroscópica, as membranas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas.

Figura 12: Medição da membrana de L-PRF



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 13: Sobrenadante após a remoção do coágulo de L-PRF



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Após as medições de peso/tamanho das membranas de L-PRFs, e do sobrenadante e o coágulo de glóbulos vermelhos remanescentes no tubo terem sido pesados, o sangue remanescente e os tubos utilizados foram descartados. Segundo o item 5.4.6 do Capítulo IV da RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004: “As sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, podem ser descartadas diretamente no sistema de coleta de esgotos, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes”. Dessa forma, os resíduos de sangue foram descartados conforme estas recomendações e os tubos utilizados para acondicionar o sangue nas centrífugas foram higienizados e posteriormente descartados conforme resíduos classificados como A4: “Recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, que não contenha sangue ou líquidos corpóreos na forma livre”. Foram, então, acondicionados em saco branco leitoso e recolhidos pela empresa responsável pela coleta de material biológico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

4.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a fixação, as membranas foram distendidas em papel filtro (papel filtro quantitativo c41 (faixa preta) 125 mm, Unifil) e processados seguindo o protocolo do laboratório de Patologia Cirúrgica da FOUFBA, na seguinte sequência: 30' formol, 10' água, 1h álcool etílico 90°, 1h álcool etílico 90°, 1h álcool etílico 90°, 1h álcool etílico 90°, 1h30' álcool etílico 90°, 1h30' xilol, 1h30' xilol, 1h30' xilol, 2h parafina, 2h parafina.

Após o processamento, as peças foram incluídas em parafina líquida a 60°C até haver a solidificação das mesmas. Foram feitos 2 cortes nos blocos de parafina através de um micrótomo (micrótomo manual Leica RM2125 RTS) na espessura de 3µm. Os cortes foram distendidos em água destilada a 40°C e coletados em lâminas histológicas não silanizadas para colorações histoquímicas.

Foi realizada a coloração com Hematoxilina-eosina conforme protocolo do Laboratório de Patologia da FOUFBA. Após coradas, as lâminas foram montadas utilizando Entellan®. Depois de secas, foram avaliadas em microscópio óptico (Axiostarplus® / ZEISS, Germany 2008) no aumento de 40X. Cada lâmina foi dividida em três áreas de tamanho igual: Proximal (Cabeça e Face) correspondendo a área que está em contato com as hemácias onde encontra-se maior população celular, Centro (Corpo) e Distal (Cauda) que corresponde a área oposta ao concentrado de hemácias. Em seguida, foi realizada a avaliação das lâminas coradas em HE em um estudo cego, por um patologista experiente, de forma semi-quantitativa, para análise da presença de leucócitos.

4.9 ANÁLISE DE DADOS

Em relação as características macroscópicas dos coágulos/membranas de L-PRFs foram realizadas avaliações entre os grupos com variáveis numéricas contínuas sobre o volume do tubo contendo o coágulo de L-PRF produzido, o tamanho do coágulo e da membrana de L-PRF, o peso da membrana de L-PRF e também do sobrenadante e dos coágulos de glóbulos vermelhos remanescentes no tubo.

Em relação as características microscópicas, foi utilizada uma variável numérica discreta no que diz respeito a quantidade de áreas com presença de leucócitos e foram executadas também avaliações descritivas e categóricas dos dados obtidos entre os grupos. Para os testes estatísticos, os achados foram categorizados como se apresenta no quadro abaixo (Quadro 2).

Para todas as análises realizadas entre grupos, testes estatísticos foram aplicados, para uma probabilidade de erro de 5% ($p < 0,05$).

Quadro 2 - Variáveis, parâmetros e categorização da avaliação histológica

Variável	Parâmetro Histológico	Categorização (score)
Área com > concentração de células	Proximal	1
	Central	2
	Distal	3
Intensidade de células nas áreas proximal, central e distal	Ausente	0
	Pouca	1
	Moderada	2
	Intensa	3
Porcentagem (%) de células nas áreas proximal, central e distal	<5%	0
	6-25%	1
	26-50%	2
	>50%	3
Distribuição de células nas áreas proximal, central e distal	Ausente	0
	Difusa	1
	Focal	2
Localização das células nas áreas proximal, central e distal	Ausente	0
	Bordas	1
	Centro	2
	Borda e Centro	3

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas e numérica discreta foram expressas em frequências absolutas e relativas (percentuais). O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparação dessas variáveis, avaliando o quão provável é que qualquer diferença observada aconteça ao acaso.

Para as variáveis numéricas contínuas suas frequências absolutas e relativas (percentuais) também foram relatadas, com a utilização neste caso do teste t de Student. Todos os dados obtidos foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel e analisados estatisticamente com auxílio do programa Minitab®, considerando uma significância de 5% tanto para a comparação intergrupos.

4.11 ARMAZENAMENTO E DESCARTE DO MATERIAL ANATOMOPATOLÓGICO

Na Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011 considera-se: “Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais”.

As amostras dos exames anatomopatológicos serão armazenadas em biorrepositório até a análise final e publicação do artigo da pesquisa e posteriormente descartadas de acordo com as normas da RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004 para resíduos classificados como A4, a qual preconiza que estas sejam acondicionadas em saco branco leitoso e sejam posteriormente recolhidas pela empresa responsável pela coleta de material biológico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

5 RESULTADOS

Foi realizada inicialmente uma avaliação macroscópica da quantidade do volume do tubo contendo o coágulo de L-PRF, do tamanho do coágulo e da membrana de L-PRF, do peso da membrana de L-PRF e também do sobrenadante e dos coágulos de glóbulos vermelhos remanescentes no tubo, comparando os grupos em cada um dos tempos, não tendo sido encontrada em nenhuma dessas variáveis diferença entre os grupos, os quais são: Centrífuga Montserrat (1); Centrífuga Intra Spin -Intra-Lock (2) (Tabela 1).

Posteriormente, para as análises microscópicas semi-quantitativas, visando comparar a presença e a distribuição de leucócitos nas regiões proximal, central e distal entre os grupos, foi utilizada uma única variável numérica discreta (quantidade de áreas com células) (Tabela 2) e as seguintes variáveis categóricas entre os grupos: área com maior concentração de células (Tabela 3), intensidade de células na proximal, central e distal (Tabela 4), score em porcentagem da presença de células na proximal, central e distal (Tabela 5), distribuição de células na proximal, central e distal (Tabela 6) e localização das células na região proximal, central e distal (Tabela 7).

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Tabela 1- Comparação das características macroscópicas entre os grupos 1 e 2.

Variável	Grupo	Média	DP	p-valor
Volume do tubo (g)	1	18,670	0,788	0,734
	2	18,814	0,814	
Peso da membrana de L-PRF (g)	1	0,541	0,152	0,843
	2	0,521	0,233	
Tamanho do coágulo L-PRF	1	33,88	4,22	0,893
	2	34,25	6,45	

Tamanho da membrana L-PRF	1	31,13	5,22	0,341
	2	33,63	4,90	
Sobrenadante do tubo (g)	1	16,35	1,23	0,466
	2	16,82	1,31	

DP= desvio padrão

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A tabela 1 apresenta todas as características macroscópicas entre os grupos, onde observa-se que não foram encontradas nenhuma variável quantitativa com diferença estatisticamente relevante. Assim, pode-se dizer que na utilização das centrífugas de ambos os grupos: Centrífuga Montserrat (1); Centrífuga Intra Spin -Intra-Lock (2) não houve diferença na quantidade do volume dos tubos contendo os coágulos de L-PRFs ($p=0,734$), no tamanho dos coágulos ($p= 0,893$) e também no tamanho das membranas de L-PRFs produzidas pelas centrífugas ($p= 0,341$), no peso das membranas de L-PRFs ($p= 0,843$), e nos sobrenadantes e coágulos de glóbulos vermelhos remanescentes nos tubos ($p= 0,466$).

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Quantidade de áreas com células

Entre os grupos, a tabela 2 demonstra significância estatística em relação a quantidade de área com presença de células nas membranas de L-PRFs que foram produzidas em ambos os grupos ($p=0,003$).

Tabela 2- Quantidade de áreas com células.

Nº de áreas	Grupos	
	1 (n=8)	2 (n=8)

1	62,5%	0%
2	37,5%	62,5%
3	0%	37,5%
p-valor	0,003	

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Observou-se que no grupo 1, 62,5% das membranas de L-PRFs produzidas apresentaram presença de células em apenas 1 área e em nenhuma das membranas produzidas nesse grupo, houve presença de células nas 3 áreas concomitantemente. Já no grupo 2, a maioria das membranas de L-PRFs produzidas (62,5%) apresentaram presença de células em pelo menos 2 áreas ao mesmo tempo e neste grupo, nenhuma das membranas de L-PRFs apresentaram presença de células em apenas 1 área (Tabela 2).

Área com maior concentração de células

Na análise dessa variável categórica, não foi encontrada relação estatisticamente relevante entre as áreas com maior concentração de células nas membranas de L-PRFs e o grupo em que estas membranas foram produzidas ($p=0,89$) (Tabela 3).

Tabela 3- Área com maior concentração de células

Variável	Grupos		P (valor)
	1 (n=8)	2 (n=8)	
Área com > concentração de células			
1 = Proximal	100%	87,5%	0,89
2 = Central	0%	12,5%	
3 = Distal	0%	0%	

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Na Tabela 3 observa-se uma certa homogeneidade, onde no grupo 1, todas as membranas de L-PRFs produzidas tiveram a área proximal como sendo

a de maior concentração celular e do mesmo modo, no grupo 2, observa-se que cerca de 87,5% das amostras também tiveram a área proximal como a área de maior concentração celular.

Intensidade de células na proximal, central e distal

Em relação a intensidade de células, na área proximal não foi possível encontrar uma diferença estatisticamente relevante nas membranas de L-PRFs produzidas nos 2 grupos ($p=0,763$), observando-se que as membranas produzidas nos grupos podem ter apresentado uma certa homogeneidade em relação a intensidade de células na proximal. No entanto, na análise entre grupos, foi encontrada significância estatística nas áreas central ($p= 0,012$) e distal ($p=0,028$) das amostras (Tabela 4).

Tabela 4- Intensidade de células na proximal, central e distal

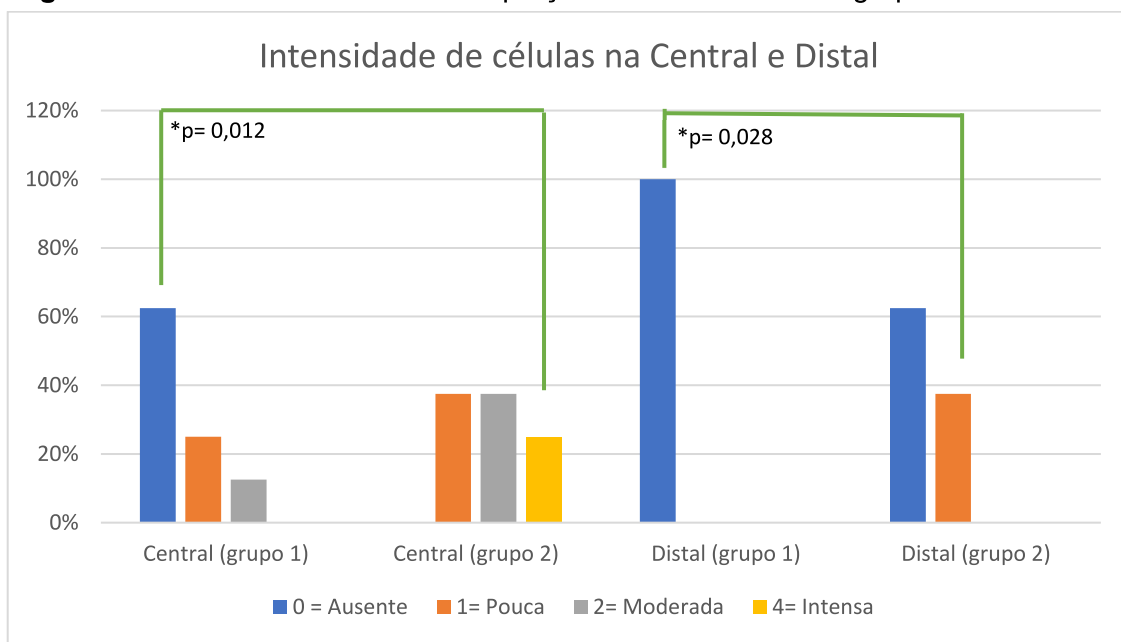
Variável	Grupos		P (valor)
	1 (n=8)	2 (n=8)	
Intensidade de Células (Proximal)			
0 = ausente	0%	0%	0,763
1 = pouca	12,5%	25%	
2 = moderada	50%	50%	
3 = intensa	37,5%	25%	
Intensidade de Células (Central)			
0 = ausente	62,5%	0%	0,012
1 = pouca	25%	37,5%	
2 = moderada	12,5%	37,5%	
3 = intensa	0%	25%	
Intensidade de Células (Distal)			
0 = ausente	100%	62,5%	0,028

1 = pouca	0%	37,5%%
2 = moderada	0%	0%
3 = intensa	0%	0%

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A análise entre grupos demonstrou relevância estatística na intensidade de células na porção central das membranas de L-PRFs ($p=0,012$). Onde, a maioria das amostras do grupo 1 (62,5%) não possuíam nenhuma célula na porção central, enquanto no grupo 2 nenhuma amostra obteve intensidade 0 na porção central. Além disso, observou-se que enquanto no grupo 1 nenhuma membrana produzida obteve intensa quantidade de células, no grupo 2, 25% das amostras obtiveram intensa quantidade celular na porção central (Figura 14).

Figura 14: Intensidade de células na porção central e distal dos grupos 1 e 2



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Na porção distal (0,028) também foi encontrada uma relevância estatística de intensidade celular. No grupo 1, 100% das membranas produzidas não apresentaram nenhuma intensidade de célula na sua porção distal. Enquanto no grupo 2, 37,5% da amostra apresentaram pouca intensidade celular nesta porção (Figura 14).

Porcentagem (%) de células na proximal, central e distal

Na Tabela 5, observa-se que 87,5% das membranas produzidas em ambos os grupos obtiveram um score de células > 50% nas suas porções proximais ($p= 0,91$), indicando uma homogeneidade de resultados. O mesmo ocorreu na distal ($p= 0,89$), onde 93,75% das amostras totais dos grupos obtiveram um score de < 5% de células. Dessa forma não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos tanto na proximal como na distal.

Tabela 5- Porcentagem (%) de células na proximal, central e distal

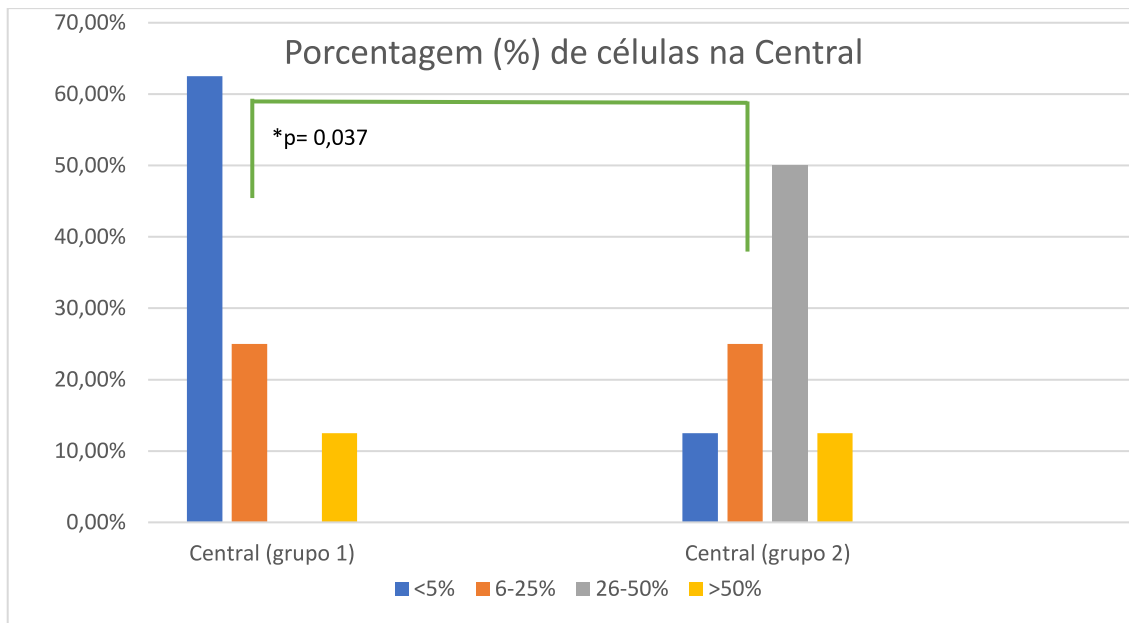
Variável	Grupos		P (valor)
	1 (n=8)	2 (n=8)	
% de células (Proximal)			
score 0 = < 5%	0%	0%	0,91
score 1 = 6-25%	0%	12,5%	
score 2 = 26-50%	12,5%	0%	
score 3 = >50%	87,5%	87,5%	
% de células (Central)			
score 0 = < 5%	62,5%	12,5%	0,037
score 1 = 6-25%	25%	25%	
score 2 = 26-50%	0%	50%	
score 3 = >50%	12,5%	12,5%	
% de células (Distal)			
score 0 = < 5%	100%	87,5%	0,89
score 1 = 6-25%	0%	12,5%	
score 2 = 26-50%	0%	0%	
score 3 = >50%	0%	0%	

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Em relação a porcentagem de células na porção central ($p=0,037$), encontrou-se uma relação estatisticamente relevante entre os grupos. Observando-se que no grupo 1, 62,5% das membranas de L-PRFs

apresentaram < 5% de células na sua porção central e apenas 12,5% apresentou > 50% de células nessa porção. Enquanto isso no grupo 2, 50% das membranas produzidas apresentam entre 26-50% de células na sua porção central e apenas 12,5% apresentou > 50% de células nessa porção. (Figura 15)

Figura 15: Porcentagem de células na porção central dos grupos 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Distribuição de células na proximal, central e distal

Ao realizar a análise entre os grupos, notou-se que na região proximal ($p=0,89$) não houve diferença significativa entre as variáveis estudadas. Já na região central ($p=0,005$) e distal ($p=0,028$) encontrou-se uma relação estatisticamente relevante na distribuição celular entre os grupos (Tabela 6).

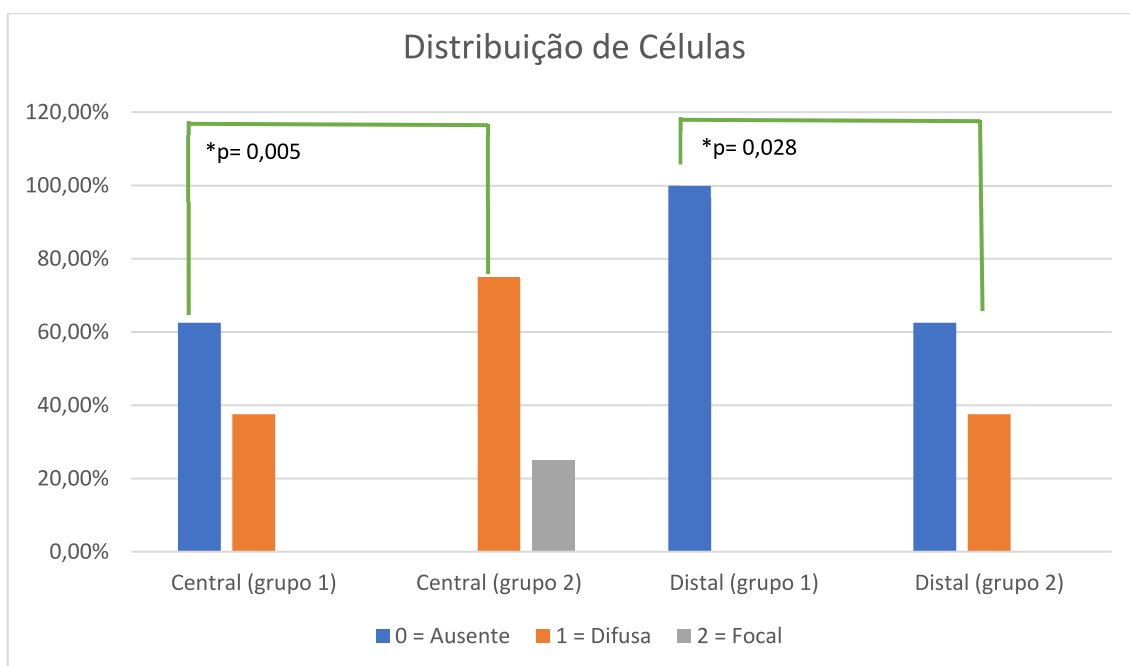
Tabela 6 - Distribuição de células na proximal, central e distal

Variável	Grupos		P (valor)
	1 (n=8)	2 (n=8)	
Distribuição de células (Proximal)			
0 = ausente	0%	0%	0,89
1 = difusa	100%	87,5%	

2 = focal	0%	12,5%	
Distribuição de células (Central)			
0 = ausente	62,5%	0%	0,005
1 = difusa	37,5%	75%	
2 = focal	0%	25%	
Distribuição de células (Distal)			
0 = ausente	100%	62,5%	0,028
1 = difusa	0%	37,5%	
2 = focal	0%	0%	

Na Figura 16 pode-se observar que na região central ($p=0,005$) no grupo 1, 62,5% das membranas produzidas não tiveram distribuição de células e 37,5% obtiveram uma distribuição celular difusa nesta região. Já no grupo 2, observa-se que de maneira distinta do outro grupo, 75% da amostra teve uma distribuição difusa na região central e no restante (25%) da amostra, observou-se uma distribuição focal de células na região.

Figura 16: Distribuição de células na porção central e distal dos grupos 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Na Figura 16 nota-se também que tratando-se da distribuição de células na porção distal ($p=0,028$), 100% das membranas produzidas no grupo 1 não tiveram nenhuma distribuição celular nesta região e em relação ao grupo 2 percebeu-se que 37,5% das membranas apresentaram uma distribuição difusa de células.

Localização de células na proximal, central e distal

Na tabela 7, ao realizar a análise entre os grupos, na região proximal ($p=0,240$) e distal ($p= 0,32$) não foi possível encontrar uma relação estatística relevante. Já na região central ($p=0,037$) foi possível observar que após a análise entre os grupos, houve uma diferença significativa entre as variáveis (Tabela 7).

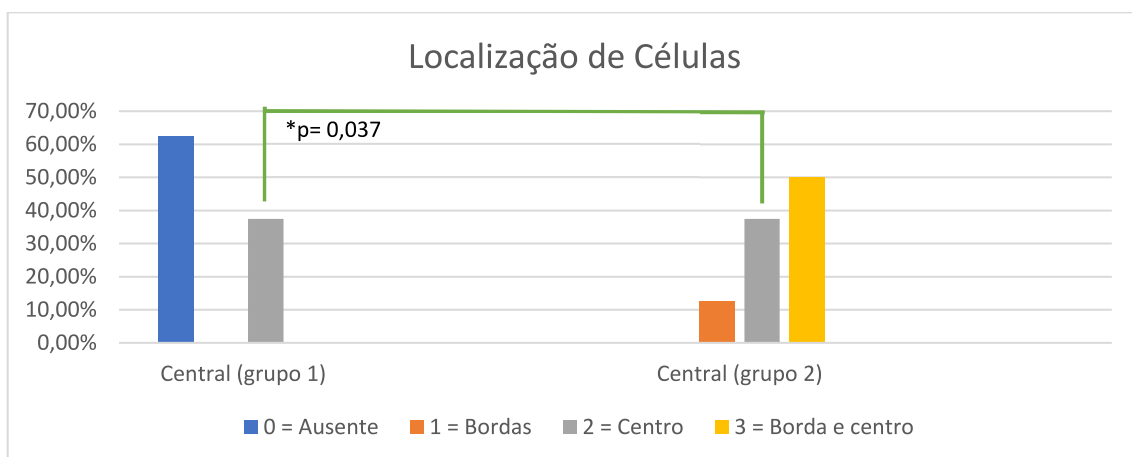
Tabela 7 - Localização das células na proximal, central e distal

Variável	Grupos		P (valor)
	1 (n=8)	2 (n=8)	
Localização das células (Proximal)			
0 = ausente	0%	0%	0,240
1 = bordas	37,5%	12,5%	
2 = centro	0%	0%	
3 = borda e centro	62,5%	87,5%	
Localização das células (Central)			
0 = ausente	62,5%	0%	0,037
1 = bordas	0%	12,5%	
2 = centro	37,5%	37,5%	
3 = borda e centro	0%	50%	
Localização das células (Distal)			
0 = ausente	100%	62,5%	0,32
1 = bordas	0%	0%	
2 = centro	0%	25%	
3 = borda e centro	0%	12,5%	

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Na porção central ($p=0,037$), 62,5% das membranas de L-PRFs produzidas no grupo 1 não tiveram presença de células em nenhum local e o restante das membranas (37,7%) apresentaram-se com células no centro dessa região. Já no grupo 2, 50% das membranas de L-PRFs produzidas tiveram as células localizadas nas bordas e no centro, 37,5% tiveram essas células localizadas apenas no centro e 12,5% dessas membranas tiveram presença de células apenas nas bordas dessa região (Figura 17).

Figura 17: Localização de células na porção central dos grupos 1 e 2.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível observar que em relação as análises microscópicas de grande parte das membranas de L-PRFs, as produzidas na centrífuga Montserrat apresentaram presença de leucócitos em apenas uma área e as oriundas da centrífuga Intra Spin -Intra-Lock apresentaram essas células em pelo menos duas áreas concomitantemente. Notou-se também que em algumas das variáveis categóricas estudadas, incluindo: intensidade de células, porcentagem de células, distribuição de células e localização de células, a presença de leucócitos foi estatisticamente maior na área central das membranas de L-PRFs produzidas na Intra Spin -Intra-Lock, do que as produzidas na centrífuga Montserrat e não foi encontrada diferença estatística na quantidade de leucócitos na área proximal em nenhuma dessas variáveis nas membranas de L-PRFs produzidas em nenhum dos modelos de centrífugas. No que se refere as características macroscópicas estudadas, em nenhum dos L-PRFs produzidos pelos dois modelos de centrífugas, foi possível encontrar diferenças estatisticamente relevantes.

Deste modo, a primeira hipótese nula do presente estudo foi negada já que não foram encontradas diferenças macroscópicas nos coágulos/membranas de L-PRFs produzidos nos dois modelos de centrífugas, enquanto a segunda hipótese nula deste estudo foi aceita já que em contrapartida, foram encontradas diferenças microscópicas dos coágulos/membranas de L-PRFs produzidas nos dois diferentes modelos de centrífugas.

Nas primeiras fases de desenvolvimento da tecnologia envolvendo L-PRFs, observou-se que a escolha do tipo de centrífuga e do protocolo de centrifugação interferia no produto final do coágulo/membrana de L-PRF (DOHAN EHRENFEST et al., 2012, 2010). No entanto, apenas recentemente estudos publicados começaram a investigar alguns efeitos sobre diferentes parâmetros que possam vir a interferir na qualidade das membranas de L-PRFs (DOHAN EHRENFEST et al., 2014a, 2014b; DOHAN EHRENFEST, DAVID M DEL CORSO et al., 2014). Foram testadas quatro diferentes tipos de centrífugas de L-PRFs disponíveis no mercado, a centrífuga Intra Spin -Intra-Lock e outras três centrífugas de mesa, utilizando a mesma força centrífuga (400g) e o mesmo

tipo de coleta do L-PRF, tendo como objetivo avaliar as vibrações mecânicas que aparecem durante a centrifugação nos quatro modelos de centrífugas de mesa usadas para produzir L-PRF e o impacto das características da centrífuga na arquitetura celular e de fibrina de um coágulo L-PRF e membrana. (DOHAN EHRENFEST et al., 2014a, 2014b, 2017; DOHAN EHRENFEST, DAVID M DEL CORSO et al., 2014).

À nível celular pode-se dizer que o resultado do presente estudo é de certa forma compatível com DOHAN EHRENFEST et al., 2017, já que após realizarem a microscopia fotônica e a microscopia eletrônica de varredura (SEM) dos L-PRFs produzidos na centrífuga Intra Spin -Intra-Lock e em mais três outras centrífugas de laboratório e apesar de na microscopia de luz terem obtido resultados semelhantes em todas as quatro centrífugas, com concentração de corpos celulares na proximal e no centro, em relação aos resultados da SEM, foram encontradas diferenças consideráveis entre os L-PRFs produzidos nessas quatro diferentes centrífugas.

Segundo DOHAN EHRENFEST et al., 2017, enquanto a membrana de L-PRF da Intra Spin -Intra-Lock se mostrou com uma matriz de fibrina espessa fortemente polimerizada e com todas as células vivas e com sua forma normal, incluindo o aspecto dos linfócitos ativados, as membranas de L-PRFs das outras três centrífugas apresentaram um gel de fibrina fino levemente polimerizado e a maioria dos corpos celulares visíveis apareceu destruída, demonstrando uma diferença significativa à nível celular na qualidade dos L-PRFs produzidos nas diferentes centrífugas.

Em comparação com a análise microscópica obtida neste estudo, foi possível observar que a presença de leucócitos também foi estatisticamente diferente entre os grupos, as membranas de L-PRFs produzidas na centrífuga Intra Spin -Intra-Lock, em sua maioria, tiveram presença de leucócitos em pelo menos 2 áreas da membrana ao mesmo tempo. Além disso, as variáveis utilizadas para avaliação microscópica de leucócitos nas membranas de L-PRFs produzidas nas duas diferentes centrífugas demonstraram que a intensidade, porcentagem, distribuição e localização de leucócitos dessas membranas oriundas da centrífuga Intra Spin -Intra-Lock ocorreram de maneira mais intensa e mais homogênea, envolvendo na maioria das vezes as áreas proximal, central

e distal. Nas membranas oriundas da centrífuga Montserrat, só foi possível detectar a presença de leucócitos com a utilização dessas mesmas variáveis nas áreas proximal e na central em grande parte das membranas de L-PRFs produzidas e não foram encontrados leucócitos na distal dessas membranas.

Entretanto, em relação aos resultados deste estudo sobre as características macroscópicas dos coágulos/membranas de L-PRFs produzidos nas centrífugas Montserrat e na Intra Spin -Intra-Lock, estes diferem do que foi encontrado por DOHAN EHRENFEST et al., 2017 na sua mais recente publicação sobre essa temática. Já que neste estudo, ao comparar as duas centrífugas, não foi possível encontrar nenhuma diferença macroscópica nas características dos coágulos/membranas de L-PRFs que foram produzidas, no que se refere ao volume do tubo, peso da membrana, tamanho do coágulo/membrana e sobrenadante nos tubos.

DOHAN EHRENFEST et al., 2017, de maneira distinta, encontraram uma diferença macroscópica significativa nos L-PRFs produzidos pelas 4 diferentes centrífugas testadas, onde as características do coágulo/membrana de L-PRF produzido na centrífuga Intra Spin -Intra-Lock foram considerados significativamente superior em relação ao peso, tamanho e também comprimento dos que foram produzidos nas demais centrífugas. Isto pode ser justificado por não terem sido testadas as mesmas centrífugas em ambos os estudos. Dessa forma torna-se necessário que mais estudos sejam feitos visando estudar as diferenças macroscópicas dos coágulos/membranas de L-PRFs produzidos na centrífuga Intra Spin -Intra-Lock em comparação com outros modelos de centrífugas, para que essa diferença possa ser melhor avaliada.

De maneira geral, o resultado deste presente estudo torna-se bastante promissor, já que na literatura encontra-se que a maior densidade de leucócitos e plaquetas é vista no primeiro milímetro do coágulo amarelo do PRF (região proximal- cabeça e face), logo após o coágulo vermelho e que, a distribuição de plaquetas e leucócitos torna-se cada vez mais escassa a partir do momento que aproxima-se do final do coágulo (região distal- cauda), não sendo encontrada mais células além da primeira metade do coágulo amarelo (DOHAN EHRENFEST et al., 2010). Então, este estudo poderá ter um forte impacto clínico, já que as membranas de L-PRFs produzidas nas centrífugas Intra Spin -

Intra-Lock demonstraram uma superioridade em relação a presença de leucócitos nas áreas central e distal do que as membranas produzidas na Montserrat. Neste sentido, a quantidade de leucócitos implantados dentro de cada membrana deve ser considerável, já que pequenos linfócitos são considerados como particularmente eficientes na regulação de reações inflamatórias (DOHAN EHRENFEST et al., 2010). Além disso, a composição celular do PRF implica que esse biomaterial é um tecido vivo derivado do sangue e deve ser manuseado com cuidado para manter seu conteúdo celular vivo e estável (DEL CORSO; SAMMARTINO; DOHAN EHRENFEST, 2009).

Diante da escassez de estudos publicados que investiguem essa temática dos diferentes parâmetros que possam vir a influenciar na qualidade dos coágulos/membranas de L-PRFs confeccionados em diferentes modelos de centrífugas disponíveis no mercado atualmente, torna-se importante que fatores que já vem sendo estudados como a utilização da mesma força centrífuga, que deve ser calculada e ajustada para cada modelo de centrífuga, a utilização do mesmo tipo de coleta do sangue do paciente e a vibração da centrífuga, sejam parâmetros que devam ser levados em consideração como possíveis influenciadores na qualidade dos coágulos e membranas de L-PRFs produzidos em diferentes modelos de centrífugas (DOHAN EHRENFEST et al., 2014a, 2014b, 2017; DOHAN EHRENFEST, DAVID M DEL CORSO et al., 2014).

Logo, este estudo sugere que há diferença microscópicas de leucócitos entre as membranas de L-PRFs confeccionadas nas centrífugas Intra Spin -Intra-Lock e nas membranas confeccionadas na centrífuga Montserrat. E, apesar de não ter sido encontrada diferença significativamente relevante nas áreas proximais dessas membranas, nas áreas centrais e distais a presença de leucócitos foram relativamente maiores nas membranas produzidas na centrífuga Intra Spin -Intra-Lock o que não foi encontrado na Montserrat. No entanto, por se tratar de um número reduzido de artigos sobre a temática, torna-se necessário que mais estudos sejam feitos, envolvendo mais parâmetros e investigando cada vez mais centrífugas para que estes resultados possam ser replicados.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, observou-se não existir diferença entre o peso, tamanho e sobrenadante dos coágulos/membranas de L-PRFs produzidas nas diferentes centrífugas utilizadas.

O percentual, distribuição e localização de leucócitos das membranas de L-PRFs confeccionadas na centrífuga Intra Spin-Intra-Lock foram estatisticamente superiores nas áreas central quando comparados com as produzidas na centrífuga Montserrat. Essa diferença de caracterização celular pode contribuir para as propriedades biológicas das membranas de L-PRFs produzidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, 2006.
2. DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158–167, 2009.
3. GHANAATI, S. et al. Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell-Based tissue engineering by means of inflammatory cells. **Journal of Oral Implantology**, v. 40, n. 6, p. 679–689, 2014.
4. HE, L. et al. 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 Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 108, n. 5, p. 707–713, 2009.
5. SIMONPIERI, A. et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 7, 2012.
6. BORIE, E. et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: A literature review. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 5, p. 7922–7929, 2015.
7. ROSS, R.; RAINES, E. W.; BOWEN-POPE, D. The biology of platelet derived growth factor. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 155–169, 1986.
8. MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 6, 1998.
9. CHOUKROUN, J. et al. Une opportunité en paroiimplantologie: Le PRF. **Implantodontie**, v. 42, p. 55–62, 2001.
10. DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, 2006.

11. DEL CORSO, M.; SAMMARTINO, G.; DOHAN EHRENFEST, D. M. Re: "Clinical Evaluation of a Modified Coronally Advanced Flap Alone or in Combination With a Platelet-Rich Fibrin Membrane for the Treatment of Adjacent Multiple Gingival Recessions: A 6-Month Study". **J. Periodontol**, v. 80, n. 11, p. 1694–1697, 2009.
12. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): Rabbit tricks and traps. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 4, p. 413–416, 2010.
13. MAZOR, Z. et al. Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A Radiologic and Histologic Study at 6 Months. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 12, p. 2056–2064, 2009.
14. SIMONPIERI, A. et al. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: A six-year experience. **Implant Dentistry**, v. 20, n. 1, p. 2–12, 2011.
15. DOHAN, D. M. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 3, p. 275–278, 2010.
16. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 4, p. 546–555, 2010.
17. MATRAS, H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. **Osterr Z Stomatol**, v. 67, n. 9, p. 338–359, 1970.
18. GIBBLE, J. W.; NESS, P. M. Fibrin glue: the perfect operative sealant? **Transfusion**, v. 30, n. 8, p. 741–747, 1990.
19. PRAKASH, S.; THAKUR, A. Platelet Concentrates: Past, Present and Future. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 10, n. 1, p. 45–49, 2011.
20. DEL CORSO, M.; SAMMARTINO, G.; DOHAN EHRENFEST, D. M. Re: "Clinical Evaluation of a Modified Coronally Advanced Flap Alone or in Combination With a Platelet-Rich Fibrin Membrane for the Treatment of Adjacent Multiple Gingival Recessions: A 6-Month Study". **J. Periodontol**, v. 80, n. 11, p. 1694–1697, 2009.

21. MATRAS, H. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 10, p. 617–622, 1982.
22. PAIROT TAYAPONGSAK, BRIEN, D. A. O.; MONTEIRO, B.; ARCEO-DIAZ, L. Y. N. Y. Reconstruction With Particulate Cancellous Bone and Marrow. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 52, p. 161–165, 1994.
23. KNIGHTON, D. et al. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 170, n. 1, p. 56–60, 1990.
24. KNIGHTON, D. R. et al. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds: Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). **Annals of Surgery**, 1986.
25. KNIGHTON, D. et al. The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. **Prog Clin Biol Res**, v. 266, p. 319–329, 1988.
26. WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 11, p. 1294–1299, 1997.
27. ALBANESE, A. et al. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: From the wound healing to bone regeneration. **Immunity and Ageing**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2013.
28. DESARDA, H. M. et al. Platelet rich fibrin: A new hope for regeneration in aggressive periodontitis patients: Report of two cases. **Indian Journal of Dental Research**, v. 24, n. 5, p. 627–630, 2013.
29. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 1, p. 3–9, 2014.
30. FIORAVANTI, C. et al. Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. **ORAL and Implantology**, v. 8, n. 4, p. 96–113, 2016.
31. RAJA, V. S.; NAIDU, E. M. Platelet-rich fibrin : Evolution of a second-generation platelet concentrate Platelet Concentrates : Evolution Platelet-Rich Plasma : Preparation Potential Risks of Using PRP. **Indian Journal of Dental Research**, v. 19, n. 1, p. 42–46, 2008.

32. SOOD, V. et al. Platelet Concentrates – Part I. **Indian J. Dent. Sci.**, v. 4, p. 123–126, 2012.
33. VAHABI, S. et al. Effects of Plasma Rich in Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin on Proliferation and Viability of Human Gingival Fibroblasts. **Journal of dentistry (Tehran, Iran)**, v. 12, n. 7, p. 504–12, 2015.
34. WU, C. L. et al. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. **Australian Dental Journal**, v. 57, n. 2, p. 207–212, 2012.
35. MASUKI, H. et al. 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**, v. 2, n. 1, 2016.
36. MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. **American Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 11, p. 1774–1778, 2006.
37. DOHAN EHRENFEST, D. et al. Do the Fibrin Architecture and Leukocyte Content Influence the Growth Factor Release of Platelet Concentrates? An Evidence-based Answer Comparing a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) Gel and a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF). **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 1145–1152, 2012.
38. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): A gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. **Growth Factors**, v. 27, n. 1, p. 63–69, 2009.
39. FERNÁNDEZ-BARBERO, J. E. et al. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 6, p. 687–693, 2006.
40. DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, 2006.
41. DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, 2006.
42. DOHAN, D. M.; CORSO, M. DEL; CHARRIER, J.-B. Cytotoxicity analyses of Choukroun's PRF (Platelet Rich Fibrin) on a wide range of human cells

the answer to a commercial controversy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 103, n. 5, p. 587, 2007.

43. ARUNACHALAM, M.; PULIKKOTIL, S. J.; SONIA, N. Platelet Rich Fibrin in Periodontal Regeneration. p. 174–181, 2016.
44. FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; MIRON, R. Biological Components of Platelet Rich Fibrin: Growth Factor Release and Cellular Activity. In: **Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications**. [s.l: s.n.]. p. 15–31.
45. CHOUKROUN, J. et al. Influence of platelet rich fibrin (PRF) on proliferation of human preadipocytes and tympanic keratinocytes: A new opportunity in facial lipostructure (Coleman's technique) and tympanoplasty? **Laryngol Otol Rhinol**, p. 27–32, 2007.
46. ADAMSON, R. Role of macrophages in normal wound healing: an overview. **Journal of wound care**, v. 18, n. 8, p. 349–351, 2009.
47. KAWAZOE, T.; KIM, H. H. Tissue augmentation by white blood cell-containing platelet-rich plasma. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 2–3, p. 601–607, 2012.
48. PERUT, F. et al. Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, n. 7, p. 830–839, 2013.
49. PIRRACO, R.; REIS, R.; MARQUES, A. Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. **Tissue Eng Regen Med**, v. 7, n. 5, p. 392–400, 2012.
50. DAVIS, V. L. et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: Workable options for every size practice. **Journal of Oral Implantology**, v. 40, n. 4, p. 500–510, 2014.
51. GHASEMZADEH, M.; HOSSEINI, E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: Directing leukocytes to sites of vascular injury. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 113, n. 6, p. 1224–1235, 2015.
52. MIRON, R. J.; BOSSHARDT, D. D. OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. **Biomaterials**, v. 82, n. March 2018, p. 1–19, 2016.
53. DEL CORSO, M. et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 1: Periodontal and Dentoalveolar Surgery.

Current Pharmaceutical Biotechnology, v. 13, n. 7, p. 1207–1230, 2012.

54. KANG, Y. H. et al. Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. **Tissue Engineering - Part A**, v. 17, n. 3–4, p. 349–359, 2011.
55. ISOBE, K. et al. Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). **International Journal of Implant Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 4–9, 2017.
56. DOHAN EHRENFEST, DAVID M DEL CORSO, M. et al. 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. Part 3: comparison of the growth factors content and slow re. **Poseido**, v. 2, n. 2, p. 155–166, 2014.
57. KOBAYASHI, E. et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 9, p. 2353–2360, 2016.
58. WANG, X. et al. Behavior of gingival fibroblasts on titanium implant surfaces in combination with either injectable-PRF or PRP. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 2017.
59. SILVERTHORN DU. *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. Sangue. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2010.
60. GUYTON AC, HALL JE. *Tratado de Fisiologia Médica. Física do sangue, fluxo sanguíneo e pressão*. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
61. GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.
62. TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 40–46, 2000.
63. GURTNER, G. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, p. 314–321, 2008.
64. GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and Wound Healing. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 321–326, 2004.

65. EMING, S. A. et al. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 115–170, 2007.
66. MOSESSON, M.; SIEBENLIST, K.; MEH, D. The structure and biological feature so fibrinogen and fibrin. **Ann N Y Acad Sci**, v. 936, p. 11–30, 2001.
67. CLARK, R. Fibrin and wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, n. 1, p. 355–367, 2001.
68. HINSBERGH, V. W. M.; COLLEN, A.; KOOLWIJK, P. Role of Fibrin Matrix in Angiogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, n. 1, p. 426–437, 2006.
69. BURNOUF, T. et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. **Blood Reviews**, v. 27, n. 2, p. 77–89, 2013.
70. ROSENKRANZ, S.; KAZLAUSKAS, A. Evidence for Distinct Signaling Properties and Biological Responses Induced by the PDGF Receptor α and β Subtypes. **Growth Factors**, v. 16, p. 201–216, 1999.
71. LUCARELLI, E. et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials**, v. 24, n. 18, p. 3095–3100, 2003.
72. TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: Immunological aspects. **Injury**, v. 37, n. 1, 2006.
73. DAVIS, V. L. et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part II: Platelet activation and enrichment, leukocyte inclusion, and other selection criteria. **Journal of Oral Implantology**, v. 40, n. 4, p. 511–521, 2014.
74. LOZITO, T. P. et al. Mesenchymal stem cell modification of endothelial matrix regulates their vascular differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 706–713, 2009.
75. KATO, J. et al. Adrenomedullin: A protective factor for blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 12, p. 2480–2487, 2005.
76. SHAMLOO, A.; XU, H.; HEILSHORN, S. Mechanisms of vascular endothelial growth factor-induced pathfinding by endothelial sprouts in biomaterials. **Tissue Engineering - Part A**, v. 18, n. 3–4, p. 320–330, 2012.
77. BABENSEE, J.; MCINTIRE, L.; MIKOS, A. Growth factor delivery for tissue engineering. **Pharmaceutical research.**, p. 497–504, 2000.

78. GIANNOBILE, W. et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. **J Periodontal Res**, v. 31, n. 5, p. 301–312, 1996.
79. MIRON, R. J. et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 8, p. 2619–2627, 2017.
80. VINAYA KUMAR, R.; SHUBHASHINI, N. Platelet rich fibrin: A new paradigm in periodontal regeneration. **Cell and Tissue Banking**, v. 14, n. 3, p. 453–463, 2013.
81. CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. 299–303, 2006.
82. AROCA, S. et al. Clinical Evaluation of a Modified Coronally Advanced Flap Alone or in Combination With a Platelet-Rich Fibrin Membrane for the Treatment of Adjacent Multiple Gingival Recessions: A 6-Month Study. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 2, p. 244–252, 2009.
83. MARRELLI, M.; TATULLO, M. Influence of PRF in the healing of bone and gingival tissues. Clinical and histological evaluations. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 14, p. 1958–1962, 2013.
84. SUÁREZ-LÓPEZ DEL AMO, F. et al. Biologic Agents for Periodontal Regeneration and Implant Site Development. **BioMed research international**, v. 2015, p. 957518, 2015.
85. DRAGONAS, P. et al. Effects of leukocyte–platelet-rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 2, p. 250–262, 2019.
86. SINGH, J.; BHARTI, V. Laterally positioned flap-revised technique along with platelet rich fibrin in the management of Miller class II gingival recession. **Dental Research Journal**, v. 10, n. 2, p. 268, 2013.
87. ANILKUMAR, K. et al. Platelet-rich-fibrin: A novel root coverage approach. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 13, n. 1, p. 50, 2009.

88. AGARWAL, K. et al. Lateral sliding bridge flap technique along with platelet rich fibrin and guided tissue regeneration for root coverage. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 6, p. 801–805, 2013.
89. OSWALD, N. **RPM Does Not Equal RCF**.
90. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. 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**, v. 29, n. 2, p. 171–184, 2017.
91. DEL CORSO, M.; SAMMARTINO, G.; DOHAN EHRENFEST, D. M. Choukroun's platelet-rich fibrin membranes in periodontal surgery: Understanding the biomaterial or believing in the magic of growth factors? **J Periodontol**, v. 80, p. 1697–1699, 2009.
92. DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. 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. Part 1: evaluation of the vibration shocks of 4 models of tab. **Poseido Journal**, v. 2, n. 2, p. 129–39, 2014.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFBA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFBA, no dia 24 de março de 2020, através do Parecer Consubstanciado nº 3.932.605, resolveram aprovar Ad Referendum o projeto de pesquisa "**O ESTUDO DO IMPACTO NA FORMAÇÃO DA MEMBRANA DE L-PRF UTILIZANDO DIFERENTES CENTRÍFUGAS/ PROTOCOLOS DE CENTRIFUGAÇÃO: UM ESTUDO À NÍVEL CELULAR**", da pesquisadora Luciana Maria Pedreira Ramalho, Área 4, registro no CONEP: 17443719.0.0000.5024.

Fabiola Bastos de Carvalho
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa em Humanas
FCURBA

Salvador, 26 de junho de 2020.

Fabiola Bastos de Carvalho

Fabiola Bastos de Carvalho
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa em Humanas
FOUFBA

Profa. Dra. Fabiola Bastos de Carvalho
Coordenadora do CEP FOUFBA

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido você para participar do trabalho “O ESTUDO DO IMPACTO NA FORMAÇÃO DA MEMBRANA DE L-PRF UTILIZANDO DIFERENTES CENTRÍFUGAS/ PROTOCOLOS DE CENTRIFUGAÇÃO: UM ESTUDO À NÍVEL CELULAR.” que é coordenado pela Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho, professora da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia. Esse trabalho tem como objetivo fazer uma comparação em relação a quantidade e qualidade de células que podem ter em uma membrana produzida a partir de um coágulo de sangue em dois aparelhos diferentes. Esta membrana acelera a cicatrização e a formação de osso e tecido no local em que será feito a cirurgia de implantes dentários. Assim, esse trabalho pretende estudar as características das células presentes no sangue que será coletado do participante da pesquisa para poder ajudar ainda mais através destas amostras de sangue na recuperação de cirurgias de implantes que serão feitas no próprio participante da pesquisa que vai doar a amostra de sangue. Caso você decida aceitar o convite para participar desta pesquisa, você irá passar por uma coleta de sangue que será feita por um profissional devidamente treinado na clínica de Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Av. Araújo Pinho nº 62-Canela, 10º andar, onde serão coletados 04(quatro) tubos de sangue venoso de você, cada tubo com cerca de 10 ml, então, no total serão coletados cerca de 40 ml de amostra de sangue de cada participante da pesquisa, e esta quantidade corresponde a cerca de 3 colheres de sopa cheias e, após esta coleta, as análises dessas amostras de sangue que serão utilizadas nesta pesquisa serão realizadas nos laboratórios de Anatomia Patológica e Imunohistoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, localizados na Av. Araújo Pinho nº 62 - Canela, 9º andar. Sendo necessário então, que você nos autorize através deste termo a fazer a coleta do material biológico (sangue venoso), o seu devido armazenamento e utilização nesta pesquisa. O material biológico restante será devidamente armazenado pelo pesquisador e pelo aluno envolvido na pesquisa até o final das análises e publicação do artigo de pesquisa. Após esse período as amostras serão devidamente descartadas. Sendo então de total responsabilidade do pesquisador e do aluno o correto armazenamento e descarte deste

material. Além disso, como é protocolo da equipe de implantodontia, e isto já é considerado como algo necessário para o procedimento de instalação de implantes dentários, você também precisa ter exames de sangue de rotina atuais (menos de 3 meses), e caso você não tenha estes exames, nós iremos te encaminhar para que você possa fazer os exames de sangue de rotina no DNA Laboratório e Genética Médica, localizado na Rua Cláudio Manoel Costa, nº 42 – Canela, e isto será oferecido de forma completamente gratuita aos participantes desta pesquisa. Terão acesso aos seus dados, apenas o pesquisador e aluno envolvido no trabalho. É importante dizer também que todos os participantes da pesquisa terão acompanhamento clínico durante todo o período que a pesquisa durar e se durante a pesquisa for encontrado quaisquer problema de saúde que não tenha sido identificado antes, os participantes terão encaminhamento e acompanhamento clínico para resolver estas possíveis alterações que possam ser encontradas. Estes dados serão divulgados em um trabalho científico que será publicado em uma revista lida por estudantes e profissionais da Odontologia. Todas as informações obtidas serão sigilosas, para evitar qualquer risco de constrangimento, e seu nome não será identificado em nenhum momento. Estando então assegurada a confidencialidade dos dados pessoais de todos os participantes de pesquisa, isto é, os dados e documentos serão anonimizados antes de serem encaminhados pela equipe médica responsável pelos cuidados do participante do estudo para qualquer outra instância. Ou seja, os dados do trabalho serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar você. No entanto, os resultados encontrados com a coleta do seu sangue estarão disponíveis para que você tenha livre acesso a eles em sua totalidade e a qualquer momento. Existe o risco de algum possível erro na coleta de sangue e este será evitado pelo cuidado, organização e responsabilidade dos profissionais que irão coletar este sangue e que já fazem isso rotineiramente. Este trabalho terá como benefícios diretos para você participante: a possibilidade de que o cirurgião utilize as membranas que serão confeccionadas com o sangue que será coletado de você no procedimento cirúrgico de colocação de implantes que você irá fazer e a utilização dessas membranas irá acelerar a formação de tecido onde você colocará um implante e também irá ajudar muito na sua cicatrização. Além disso, este estudo tem como benefício para sociedade em geral: proporcionar aos pesquisadores um maior conhecimento sobre a quantidade de células presente nestas amostras de sangue e também sobre a presença de células-tronco nestas amostras, possibilitando assim o desenvolvimento de novos tratamentos no futuro. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação no trabalho, você será ressarcido pelo pesquisador. Você receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita (pelo pesquisador), pelo tempo que for necessário em caso de danos

decorrentes do trabalho, além de ter o direito à indenização. É importante dizer que sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, em qualquer fase da pesquisa, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum tipo de prejuízo ou penalidade alguma. E que, a retirada do consentimento de armazenamento das amostras biológicas humanas do participante da pesquisa armazenadas em biorrepositório deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo ser feita em qualquer momento, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão do participante. Este estudo também poderá ser interrompido mediante aprovação prévia do CEP (Comitê de ética em pesquisa) ou, quando for necessário, para que seja preservada a segurança do participante desta pesquisa. Neste caso, o CEP deverá ser comunicado logo na primeira oportunidade. Por fim, você ficará com uma via deste Termo e qualquer dúvida que você tiver a respeito deste trabalho, poderá perguntar diretamente para Profa. Dra Luciana Maria Pedreira Ramalho, no Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da UFBA, no endereço Av. Araújo Pinho, nº 62, Vale do Canela, Salvador – BA, ou pelo telefone (71) 3283-8966 ou a pesquisadora Cirurgiã-dentista Camilla Palmeira Esteves no Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da UFBA, no endereço Av. Araújo Pinho, nº 62, Vale do Canela, Salvador – BA, ou pelo telefone (71) 991833999. Dúvidas a respeito da ética desse trabalho poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFBA, localizado na Faculdade de Odontologia da UFBA, ou pelo telefone (71) 3283-8962.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do trabalho ao qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Eu concordo voluntariamente em participar deste trabalho.

Salvador, ____ de _____ de _____

Participante

Pesquisador

ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA DO CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM IMPLANTODONTIA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

[Digite aqui]



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Carta de Anuência

DECLARAÇÃO

Eu **André Carlos de Freitas**, na qualidade de responsável pelo Curso de especialização em Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, localizado na Av. Araújo Pinho nº 62 – Canela, Salvador – BA., autorizo a realização da pesquisa intitulada: "O ESTUDO DO IMPACTO NA FORMAÇÃO DA MEMBRANA DE L-PRF UTILIZANDO DIFERENTES CENTRÍFUGAS/ PROCOCOLOS DE CENTRIFUGAÇÃO: UM ESTUDO À NÍVEL CELULAR", a ser conduzida sob a responsabilidade do pesquisador Luciana Maria Pedreira Ramalho/ Camilla Palmeira Esteves; e DECLARO que esta instituição apresenta infraestrutura necessária à realização da referida pesquisa. Esta declaração é válida apenas no caso de haver parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia para a referida pesquisa.

Salvador, 26 de JUNHO de 2019


ASSINATURA DO RESPONSÁVEL PELO CURSO
Dr. André Carlos de Freitas
Cirurgia e Traumatologia
Bucocomaxilofacial
CRO-BA 6182

(carimbo da Instituição)

**ANEXO D – CARTA DE ANUÊNCIA DO LABORATÓRIO DE
ANATOMIA PATOLÓGICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Carta de Anuência

DECLARAÇÃO

Eu **Jean Nunes dos Santos**, na qualidade de responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, localizado na Av. Araújo Pinho nº 62 – Canela, Salvador – BA., autorizo a realização da pesquisa intitulada: "O ESTUDO DO IMPACTO NA FORMAÇÃO DA MEMBRANA DE L-PRF UTILIZANDO DIFERENTES CENTRÍFUGAS/ PROCOCOS DE CENTRIFUGAÇÃO: UM ESTUDO À NÍVEL CELULAR", a ser conduzida sob a responsabilidade do pesquisador Luciana Maria Pedreira Ramalho/ Camilla Palmeira Esteves; e DECLARO que esta instituição apresenta infraestrutura necessária à realização da referida pesquisa. Esta declaração é válida apenas no caso de haver parecer favorável do Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde da para a referida pesquisa.

Salvador, 02 de setembro de 2019

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL PELA INSTITUIÇÃO

[carimbo da Instituição]