

Estado da publicação: Não informado pelo autor submissor

CICATRIZAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS EM CALVÁRIA UTILIZANDO FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS: ESTUDO EM COELHOS

Evans Soares de Oliveira, Jurandir Marcondes Ribas Filho, Marcos Sigwalt, Elora Sampaio Lourenço, Fernanda Piraja Figueiredo, Nicolau Gregori Czezko

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4224>

Submetido em: 2022-06-03

Postado em: 2022-06-06 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

CICATRIZAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS EM CALVÁRIA UTILIZANDO FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS: ESTUDO EM COELHOS

BONE HEALING OF DEFECTS IN CALVARIA USING RICH FIBRIN IN PLATELETS AND LEUKOCYTES: STUDY IN RABBITS

Evans Soares de **OLIVEIRA**¹, Jurandir Marcondes **RIBAS-FILHO**¹, Marcos **SIGWALT**¹, Elora Sampaio **LOURENÇO**¹, Fernanda Piraja **FIGUEIREDO**¹ Nicolau Gregori **CZECZKO**¹

Trabalho realizado na ¹Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

ORCID

Evans Soares de Oliveira - 0000-0002-2074-3659

Jurandir Marcondes Ribas-Filho - 0000-0002-5251-7672

Marcos Sigwalt - 0000-0002-9899-5493

Elora Sampaio Lourenço - 0000-0002-3281-0433

Fernanda Piraja Figueiredo - 0000-0001-5982-7668

Nicolau Gregori Czczko - 0000-0002-5926-150x

Correspondência:

Evans Soares de Oliveira

Email: evansoliveira@gmail.com

Conflito de interesse: Nenhum

Financiamento: Nenhum

Imagem



A) Separação sanguínea após 10 min de centrifugação a 1800 rpm; B) L-PRF de 3,5 cm após ser removido e separado do coágulo

Mensagem Central

O L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos) é concentrado de plaquetas e leucócitos em uma rede de fibrina, obtido pela centrifugação autóloga coletada no momento da operação. Oferece como vantagens o baixo custo, fácil preparo, de simples obtenção e com capacidade de acelerar a cicatrização de tecidos moles e duros.

Perspectiva

As pesquisas atuais têm demonstrado que o uso do L-PRF contribui para melhor cicatrização tanto dos tecidos moles quanto duros, principalmente por fornecer os fatores de crescimento por mais tempo. Os materiais aloplásticos e xenógenos têm ampla indicação em procedimentos de enxertia óssea. No entanto, apesar de serem bons osteocondutores, não possuem a propriedade de serem osteogênicos nem osteoindutores. A associação do L-PRF a estes materiais pode potencializar as chances de sucesso, e melhorar a cicatrização da enxertia óssea na odontologia e medicina.

Contribuição dos autores

Análise formal: Jurandir Marcondes Ribas-Filho

Investigação: Evans Soares de Oliveira

Supervisão: Elora Sampaio Lourenço

Supervisão: Fernanda Piraja Figueiredo

Visualização: Marcos Sigwalt

Redação (esboço original): Marcos Sigwalt

Redação (revisão e edição): Nicolau Gregori Czczko

RESUMO - Introdução: O L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos) é concentrado de plaquetas e leucócitos em uma rede de fibrina, obtido pela centrifugação autóloga coletada no momento da operação. Oferece como vantagens o baixo custo, fácil preparo, de simples obtenção e com capacidade de acelerar a cicatrização de tecidos moles e duros. **Objetivo:** Avaliar o reparo ósseo de defeitos não críticos em calvária de coelhos utilizando o L-PRF isoladamente e em associação com osso autógeno particulado. **Método:** Foram utilizados 15 coelhos com sangue coletado e imediatamente centrifugado. Foram realizados 4 defeitos não críticos de 8 mm de diâmetro e tratados com preenchimento por: 1) osso autógeno particulado; 2) osso autógeno particulado + L-PRF; 3) somente L-PRF; e 4) sem enxerto. Foram sacrificados após 2, 4 e 6 semanas com as amostras analisadas histologicamente e histomorfometricamente comparando as áreas regenerada. **Resultados:** Com 2 semanas houve diferença estatística entre os grupos 1 e 3; com 4 semanas entre os grupos 2 e 4; e com 6 semanas entre os grupos 1 e 4 e entre 3 e 4. Houve ganho ósseo e proporcional significativo entre 2 e 6 semanas para o grupo de L-PRF. **Conclusão:** O L-PRF isoladamente teve efeito positivo e proporcional na formação óssea no decorrer das semanas.

DESCRITORES - L-PRF. Cicatrização óssea. Defeitos em calvária. Coelhos.

ABSTRACT - Introduction: L-PRF (platelet and leukocyte-rich fibrin) is a concentrate of platelets and leukocytes in a fibrin network, obtained by autologous centrifugation collected at the time of the operation. It offers the advantages of low cost, easy preparation, simple acquisition and ability to accelerate the healing of soft and hard tissues. **Objective:** To evaluate the bone repair of non-critical defects in rabbit calvaria using L-PRF alone and in association with particulate autogenous bone. **Method:** Fifteen rabbits were used with blood collected and immediately centrifuged. Four non-critical defects measuring 8 mm in diameter were performed and filled with: 1) particulate autogenous bone; 2) particulate autogenous bone + L-PRF; 3) L-PRF only; and 4) without graft. They were sacrificed after 2, 4 and 6 weeks with the samples analyzed histologically and histomorphometrically comparing the regenerated areas. **Results:** At 2 weeks there was a statistical difference between groups 1 and 3; at 4 weeks there was between groups 2 and 4; and at 6 weeks between groups 1 and 4 and between 3 and 4. There was significant bone and proportional gain between 2 and 6 weeks for the L-PRF group. **Conclusion:** L-PRF alone had a positive and proportional effect on bone formation over the weeks.

KEYWORDS - L-PRF. Bone healing. Defects in calvaria. Rabbit.

INTRODUÇÃO

A reconstrução de tecidos vivos é uma constante busca na bioengenharia tecidual, tanto para a reposição de tecidos moles quanto de tecidos duros. Os mais diversos profissionais da saúde, e em especial os cirurgiões orais e maxilofaciais, constantemente buscam materiais e tecnologias que ofereçam a reconstrução de partes ósseas perdidas, quer seja por extrações dentárias, tumores, cistos, traumas, entre outros. O material de enxerto "ideal" deveria congrega as seguintes habilidades: a) ter fornecimento ilimitado sem comprometer a área doadora; b) promover a osteogênese; c) não apresentar resposta imunológica do hospedeiro; d) revascularizar rapidamente; e) estimular a osteoindução; f) promover a osteocondução; e g) ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro. O L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos) é um concentrado de plaquetas e leucócitos, obtido pela centrifugação de sangue venoso autólogo coletado no momento da operação. Foi desenvolvido na França em 2001, por Choukroun et al., fazendo parte de uma segunda geração de concentrados plaquetários.

O L-PRF oferece diversas vantagens dentre as quais o baixo custo (sangue autólogo), a facilidade no preparo (não há necessidade de anticoagulantes ou ativadores da coagulação), a facilidade na obtenção e alta capacidade de acelerar a cicatrização dos tecidos moles e duros. Ele incorpora em uma matriz de fibrina a maioria das plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento coletados das simples amostras de sangue. Diferentemente do PRP (plasma rico em plaquetas), no L-PRF não há necessidade do uso

de anticoagulantes nem de ativadores da coagulação, tornando o procedimento menos sensível, mais fácil, barato e simples de se obter. Diversos estudos têm sido realizados para avaliar a sua eficácia, pois apesar de ser geração promissora de concentrados plaquetários, há a desconfiança de ocorrer mesmo com ele que, após os resultados obtidos com os estudos do PRP em um primeiro momento parecia extremamente promissor, mas depois teve sua eficácia contestada.

As pesquisas atuais têm demonstrado que o uso do L-PRF contribui para melhor cicatrização tanto dos tecidos moles quanto duros, principalmente por fornecer os fatores de crescimento por mais tempo - 7 a 11 dias -, diferentemente do PRP em que esses fatores eram liberados em aproximadamente 8 h.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o reparo ósseo de defeitos não críticos em calvária de coelhos utilizando o L-PRF isoladamente e em associação com osso autógeno particulado.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil sob CAAE no. 1896/2017, utilizando-se a Nomina Anatômica Veterinária (1983), e foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA).

Amostra

Utilizou-se 16 coelhos fêmeas brancos, adultos, sem doenças prévias, com peso médio de 3118 g sendo que o de menor peso tinha 2450 g e o de maior 3500g; tinham entre 4 e 5 meses de idade quando se iniciou a pesquisa.

Pré-operatório e anestesia

Os animais foram mantidos em biotério e em gaiolas individuais. Após identificação e pesagem eram mantidos em temperatura ambiente, alimentados com ração própria para a espécie e água *ad libitum*, em ciclo dia/noite habitual, e jejum de 12 h prévias às anestésias. Antibioticoprofilaxia foi realizada com 2 ml de cefazolina antes do procedimento.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina a 5% via intramuscular na proporção de 60 mg/kg associada a xilazina na proporção de 10 mg/kg. A anestesia era considerada efetiva quando o animal apresentava-se imóvel ao manuseio.

Técnica para obtenção de sangue venoso

Após tricotomia do pescoço amostra de sangue foi coletada pela veia jugular externa. Retirando-se 8 ml que foram imediatamente levados para a centrífuga (Monteserrat® modelo 80-2B). Não foi utilizado nenhum tipo de aditivo nos tubos a vácuo. A centrifugação contendo o sangue para a obtenção do L-PRF foi realizado simultaneamente aos procedimentos cirúrgicos. De acordo com a recomendação do fabricante, os tubos eram centrifugados a 1800 rpm durante 10 min. Após a centrifugação podia-se distinguir nitidamente o L-PRF propriamente dito do coágulo (Figura 1A); a partir daí o coágulo era destacado e removido, ficando apenas o L-PRF com cerca de 3,5 cm (Figura 1B).



FIGURA 1 – A) Separação sanguínea após 10 min de centrifugação a 1800 rpm; B) L-PRF de 3,5 cm após ser removido do tubo de vidro e separado do coágulo

Procedimento cirúrgico

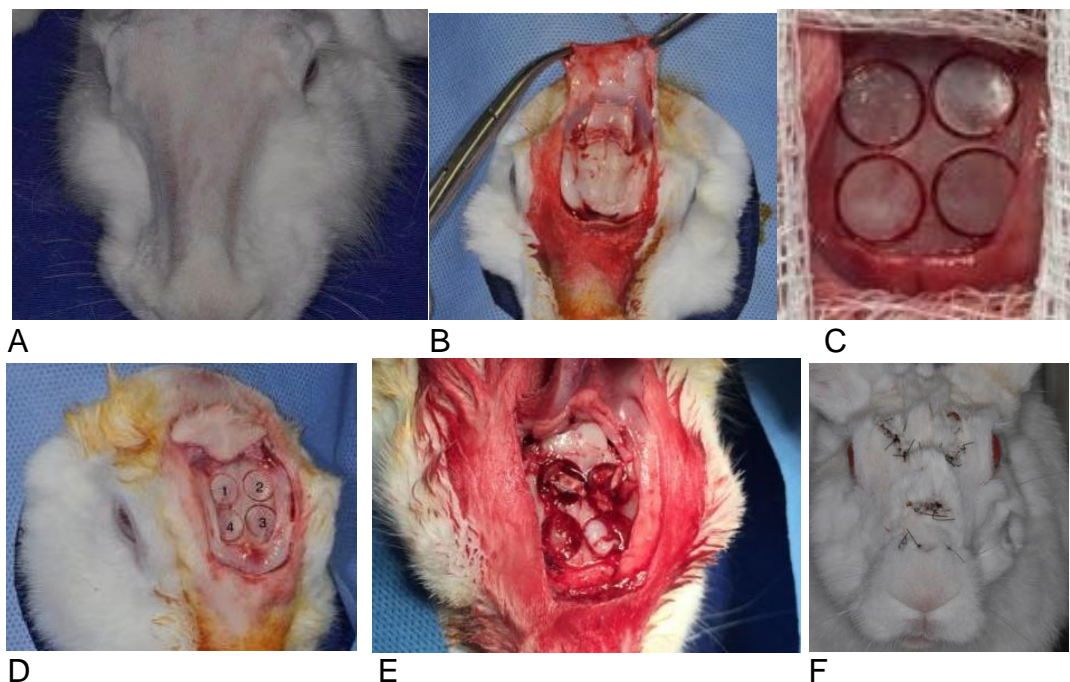


FIGURA 2 – A) Tricotomia da área a ser operada; B) descolamento do tecido mole e periosteio, deixando o tecido ósseo da calvária exposto; C) demarcação da osteotomia com broca trefina de 8 mm; D) definição de cada um dos grupos da osteotomia; E) preenchimento dos gaps ósseos com os devidos materiais em cada gap; F) controle pós-operatório.

Após tricotomia da área a ser manipulada (Figura 2A) era realizada escovação da região com PVPI sabão, lavagem com soro fisiológico 0,9%, antissepsia com PVPI tintura e colocação de campos estéreis. Seguiu-se infiltração anestésica com lidocaína a 2% associada à adrenalina 1:100.000. Três incisões de 4 cm eram efetuadas com lâmina de bisturi no. 11, seguidas por descolamento subperiosteal até a exposição de toda a região craniana, incluindo seu limite posterior (Figura 2B). Em seguida confeccionava-se 4 defeitos de 8 mm com broca trefina (Neodent® - Implante osteointegrável, Curitiba, Brasil) sob copiosa irrigação com soro fisiológico, e com todo o cuidado para não atravessar o crânio. Esta broca era colocada em contra-ângulo tipo 1:1, montado em motor elétrico (Beltec – Brasil). Também foi utilizada uma broca esférica no. 1 para auxiliar na remoção dos fragmentos ósseos e regularização das bases ósseas. O osso removido era particulado para ser utilizado nos defeitos. As osteotomias eram numeradas no sentido horário (Figuras 2C e D). O osso removido das osteotomias através da broca eram particulados e utilizados nas amostras em que se preenchia os defeitos com osso autógeno. Os defeitos eram preenchidos (Figura 2E) da seguinte maneira: 1) com osso autógeno proveniente do particulado ósseo; 2) com osso autógeno particulado associado ao L-PRF; 3) somente com L-PRF; 4) como controle (nenhum material enxertado). A ferida era fechada utilizando-se fio mononáilon 4.0. Após, era realizada nova desinfecção da região com PVPI e os animais transferidos para as mesmas condições do pré-operatório. Antibioticoprofilaxia foi mantida por 3 dias, tal como a analgesia (Dimorf 0,1 ml, Figura 2F).

Obtenção das peças anatômicas

Os coelhos foram mortos através da administração de pentobarbital 100 mg/kg via intravenosa após 2, 4 e 6 semanas (5 animais em cada grupo). O crânio era removido com a utilização de serra sagital montada em motor elétrico com imersão em solução de formol a 10%, após identificação.

Os espécimes cirúrgicos foram desmineralizados em solução de ácido fórmico a 20% (20 ml de ácido fórmico PA, 60 ml de água destilada e 20 ml de formol 36%) por 1 semana. Após a descalcificação cada peça era devidamente recortada com motor piezelétrico com ponta cirúrgica ultrassônica modelo H-SG1 na programação S (surgery) em potência de 150% e com irrigação, onde inicialmente se delimitava a área de cada um dos grupos (Figura

2). O objetivo da utilização do ultrassom piezelétrico era o de obter corte ósseo muito fino e preciso, mantendo-se toda a arquitetura celular intacta.

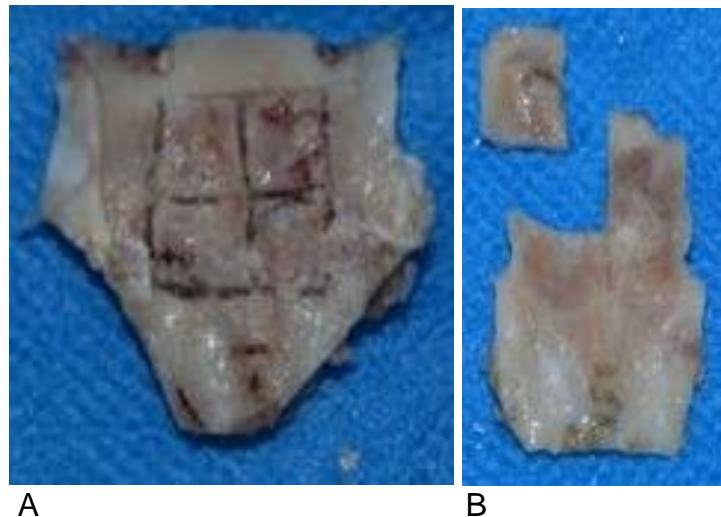


FIGURA 2 - A) Delimitação das áreas do corte ósseo ; B) remoção de um dos gaps ósseos através de motor piezelétrico, mostrando a precisão da separação óssea

Após a separação (Figura 2B), as amostras eram colocadas em um pote identificando cada um dos grupos e encaminhadas para a inclusão e emblocamento em parafina e a obtenção das lâminas para digitalização e escaneamento das imagens (Axio Scan Scanner Z1, Carl Zeiss, Germany).

Um dos coelhos não teve formação do LPR-F da mesma maneira que os outros, apesar de todo o protocolo ter sido realizado exatamente da mesma forma. Assim, ele não fez da análise estatística. Para evitar que houvesse qualquer tendência de privilegiar algum grupo, as 64 lâminas foram aleatoriamente numeradas.

As lâminas eram então abertas no programa Adobe Photoshop CS6 (USA) e criava-se um círculo de 6027 micrômetros de diâmetro (elipse de 4913x4913) onde encontrava-se o local para estudo. Com o auxílio da varinha mágica do programa do photoshop, tudo que não era osso, como vasos sanguíneos e tecido cartilaginoso, era removido da foto digitalizada (Figura 3). Desta forma, ficava apenas o tecido ósseo dentro da esfera. Todas as lâminas receberam o mesmo tratamento pelo mesmo operador. Após a finalização de cada lâmina, todas eram salvas no formato "jpeg".

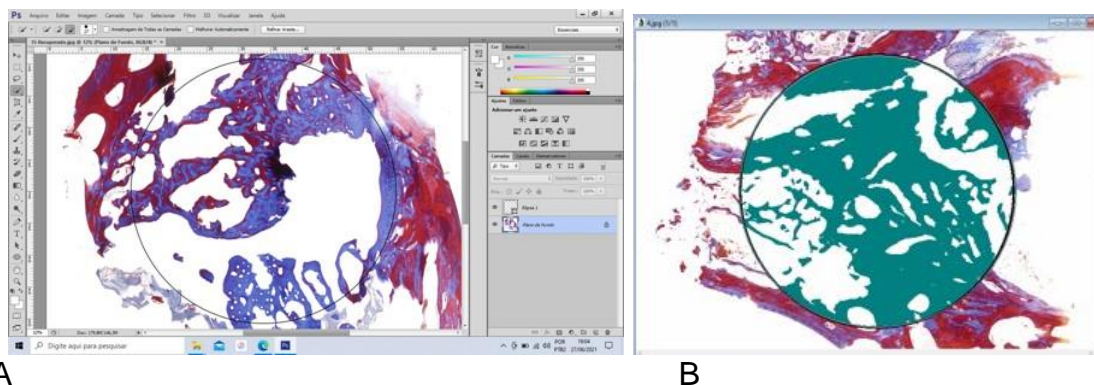


FIGURA 3 – A) Lâmina óssea dentro do programa photoshop, onde foi removido todo tecido que não era osso; B) mensuração da área óssea do círculo no programa Image Pro Plus

Em seguida, as fotografias das lâminas foram exportadas para o software Image Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, USA) a fim de obter a área óssea do total da elipse e, desta maneira, obter a porcentagem de formação óssea em cada lâmina.

No programa "Image Pro Plus" era feita a calibração nas medições, iniciando com 0 e finalizando com 1.000.000.000 (10^9). Nele fazia-se novamente uma elipse, exatamente do mesmo tamanho daquela do photoshop, circunscrevendo-se a área de interesse. Em

seguida, fazia-se a mensuração interna do círculo no programa "Image Pro Plus", configurado para exportar um bloco de notas com todas as informações pertinentes da contagem óssea no interior da elipse.

Análise estatística

Os dados foram inseridos em planilha Excel exportados do Image Pro Plus através do bloco de notas, e inserido em cada uma das lâminas, onde já era calculado no Excel a porcentagem de osso em cada uma das lâminas dos 4 grupos de estudo. Após ter a porcentagem óssea em cada uma das 64 lâminas, era correlacionado o número da lâmina com o respectivo grupo de coelhos. Os dados tiveram análise histomorfométrica utilizando o teste t de student.

RESULTADOS

Avaliação histomorfométrica

A média proporcional e respectivo desvio-padrão de ganho de osso nas avaliações de 2 a 4 semanas para dos 4 grupos estão na Tabela 2.

TABELA 2 - Comparação da porcentagem de ganho ósseo em 2 a 6 semanas dos grupos avaliados

		Média (DP)	p*
2 Semanas	Osso	44,08 (±2,78)	0,0053
	L-PRF	29,75 (±1,80)	
4 Semanas	Osso	38,56 (±5,27)	0,0268
	L-PRF	25,57 (±14,05)	
6 Semanas	Osso	42,58 (±7,65)	0,0227
	L-PRF	41,98 (±10,90)	
Controle		33,20 (±8,31)	0,0067

Ao comparar os resultados, segundo o período de avaliação, não houve diferenças significativas entre 2 e 4 semanas para os grupos avaliados), enquanto ganho ósseo proporcional e significativo foi observado entre 2 e 6 semanas para o grupo de L-PRF (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças significativas para ganho ósseo nos grupos entre os períodos de 4 e 6 semanas (Tabela 3).

TABELA 3 - Avaliação do ganho ósseo entre 2 e 4 semanas

	Grupos	Média (DP)	Média (DP)	p*
2 e 4 Semanas	1	44,08 (DP±6,22)	43,61 (DP±8,52)	0,451
	2	36,99 (DP±10,52)	38,56 (DP±5,27)	0,395
	3	29,75 (DP±4,02)	36,66 (DP±9,16)	0,065
	4	30,25 (DP±21,12)	26,57 (DP±14,05)	0,298
2 e 6 Semanas	1	44,08 (DP±6,22)	42,58 (DP±7,65)	0,4
	2	36,99 (DP±10,52)	34,82 (DP±9,52)	0,362
	3	29,75 (DP±4,02)	41,98 (DP±10,90)	0,017
	4	30,25 (DP±21,12)	33,20 (DP±8,31)	0,376
4 a 6 Semanas	1	43,61 (DP±8,52)	42,58 (DP±7,65)	0,4348
	2	38,56 (DP±5,27)	34,82 (DP±9,52)	0,2372
	3	36,66 (DP±9,16)	41,98 (DP±10,90)	0,0735
	4	26,57 (DP±14,05)	33,20 (DP±8,31)	0,0936

DISCUSSÃO

Os fatores de crescimento derivados do sangue estão sendo usados na medicina por algumas décadas. No entanto, é importante ressaltar que com a descoberta do PRF, o uso dos concentrados plaquetários tem crescido exponencialmente.

O uso medicinal do PRP na odontologia iniciou-se na década de 90, com o objetivo de fornecer ao leito cirúrgico a maior quantidade de plaquetas para favorecer os fatores de crescimento, a fim de se obter melhor cicatrização tecidual. No entanto, o PRP tinha uma série de particularidades e dificuldades de obtenção, incluindo a necessidade de uso de anticoagulante e principalmente a necessidade da trombina bovina para a polimerização. A rápida polimerização do PRP dificultava a incorporação de citocinas na matriz de fibrina

devido à alta taxa de trombina bovina que era necessária para a polimerização da fibrina, e como efeito polimerizava de forma rígida. Em consequência, a liberação dos fatores de crescimento no sítio cirúrgico ocorria de forma rápida, ao invés de lentamente. As pesquisas com o PRP foram demonstrando que os resultados obtidos não eram tão promissores como acreditou-se em um primeiro momento (DOHAN et al., 2006; EHRENFEST, RASMUSSEN & ALBREKTSSON, 2009; LAURITANO et al., 2013; BORIE et al., 2015; MIRON & CHOUKROUN, 2017).

Com os experimentos, constatou-se que o PRP aumentava a resposta fisiológica ao trauma e superava a deposição normal dos fatores de crescimento; porém, apesar do PRP liberar grandes quantidades de fatores de crescimento, tais fatores só se sustentavam no estágio inicial após o preparo, por aproximadamente 8 h, ou seja, período muito curto de tempo (ZHAO, DING & SI, 2013).

Em 2001, Choukroun et al. desenvolveram um novo protocolo para concentrar plaquetas e fibrinas em um simples passo sem modificação do sangue: o L-PRF. Nessa técnica não há necessidade de heparina (anticoagulante) nem tampouco de trombina bovina (coagulação) e, segundo os autores, este método apresenta uma série de vantagens em relação ao PRP.

O L-PRF pertence à segunda geração de concentrados plaquetários, onde a rede de fibrina é muito mais semelhante do que a natural. Esta característica leva à migração celular mais eficiente e maior proliferação celular, culminando em melhor cicatrização. Além disto, o L-PRF é capaz de liberar os fatores de crescimento de forma lenta e progressiva no processo de remodelação de matriz de fibrina, uma vez que na técnica de Choukroun a polimerização da fibrina ocorre de maneira lenta e controlada dentro da centrífuga. Ela produz matriz de fibrina de arquitetura tridimensional estável, capaz de incorporar praticamente todas as plaquetas e a maioria dos leucócitos circulantes e mantendo a liberação dos fatores de crescimento no sítio cirúrgico por 7 a 11 dias. Este fato traz muitos benefícios na cicatrização tecidual (DOHAN et al., 2006; EHRENFEST et al., 2009; LAURITANO et al., 2013; MALLMANN, LAGO & BONA, 2013; ZHAO & DING, 2013).

O L-PRF ainda tem como vantagens: a) facilidade técnica de obtenção; b) ser obtido de sangue autólogo; c) exigindo mínima manipulação sanguínea; d) não exigindo nenhum tipo de aditivo (como trombina bovina, cloreto de cálcio ou heparina); e e) ser mais eficaz, mais eficiente e menos controverso do que o PRP (BORIE et al., 2015; BLINSTEIN & BOJARKAS, 2018; BLATT et al., 2020).

A gama de utilização do L-PRF na odontologia é muito vasta e citada para inúmeras aplicações, como melhorar a preservação alveolar, a cicatrização dos tecidos moles, a cicatrização óssea, a regeneração de tecidos ósseos periodontais no tratamento de defeitos intraósseos e de furca dentre tantas outras. Na medicina pode auxiliar técnicas de rejuvenescimento facial preenchendo cavidades ou misturadas com enxerto adiposo em cirurgias plásticas; como forma de membrana em operações otológicas; e na proteção de nervos (DOHAN et al., 2006; ESHGHPOUR et al., 2014; BORIE et al., 2015; ARENZI et al., 2015; KUMAR et al., 2016; CANELLAS, RITTO & MEDEIROS, 2017; MIRON & CHOUKROUN, 2017; BLINSTEIN & BOJARKAS, 2018; DIANA et al., 2018; STÄHLI et al., 2018; STÄHLI et al., 2018; ZHOU et al., 2018; CANELLAS et al., 2019; DRAGONAS et al., 2019; LIU et al., 2019; MOURÃO et al., 2019; OLIVEIRA & ALMEIDA, 2019; ALKOFABI et al., 2020; ATCHUTA et al., 2020; AWADEEN et al., 2020; CANELLAS et al., 2020; ORTEGA et al., 2020; RODAS et al., 2020; STRAUSS et al., 2020).

Apesar de possuir técnica simples, alguns passos são fundamentais para a obtenção de correto L-PRF, sendo os principais o cuidado na coleta sanguínea e tempo entre a coleta e o início da centrifugação, que precisa ser imediata (OLIVEIRA & ALMEIDA, 2019).

Outro fator muito importante é em relação ao adequado posicionamento dos tubos sanguíneos na centrífuga, a fim de obter estabilidade. Recomenda-se colocar sempre um tubo contra o outro, evitando instabilidade e vibração. Diversos autores ressaltam que baixos níveis de vibração e de variação térmica são fundamentais para adequada obtenção do PRF (EHRENFEST et al., 2014; PINTO et al., 2015; EHRENFEST et al., 2018; OLIVEIRA & ALMEIDA, 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

Há também que se tomar cuidado com a maneira de formar as membranas e de

comprimir o L-PRF. A caixa específica para a produção dessas membranas permite a produção em espessura constante e hidratadas, além de permitir recolher o soro, que é rico em proteínas como a fibroconectina e vitronectina. Este exsudato coletado do fundo pode ser utilizado para hidratar materiais de enxerto, lavar o sítio cirúrgico ou armazenar enxerto autólogo, melhorando os resultados obtidos. Deve-se evitar ao máximo o uso de gaze para comprimir as membranas, uma vez que este procedimento pode acabar tirando também os fatores de crescimento, como o PDGF (EHRENFEST et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2012; EHRENFEST et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018; OLIVEIRA & ALMEIDA, 2019).

Os protocolos de produção do L-PRF variam de acordo com o tempo de centrifugação, número de rotações, tipo de tubo de ensaio e até a quantidade de sangue para a obtenção das membranas. O tempo de centrifugação e o número de rotações dependem da centrífuga, do tamanho do raio, da angulação dos tubetes na centrífuga, entre outros. Assim sendo, a maior parte dos fabricantes de centrífugas já entregam a velocidade e o tempo para a confecção de cada um dos agregados plaquetários desejados, incluindo o L-PRF (EHRENFEST et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018; OLIVEIRA & ALMEIDA, 2019; OLIVEIRA et al., 2020)

Há uma linha de pesquisadores que afirmam que a centrífuga ideal para a confecção do L-PRF seria a Intra-Spin (Intra-Lock International, Boca- Raton, FL, USA). Há trabalhos que mostram que ela é a mais estável; tem nível de vibração entre 4,5 e 6 vezes menor que das outras centrífugas; tem temperatura dos tubetes menor que das outras marcas; produz coágulo e exsudato mais pesados; tem matriz de fibrina espessa fortemente polimerizada; e apresenta células vivas normais. As outras, podem apresentar gel de fibrina fino ligeiramente polimerizado e a maioria dos corpos celulares destruída. Segundo diversos autores as características da centrífuga e os protocolos de centrifugação impactam de maneira significativa nas células, nos fatores de crescimento e na arquitetura de fibrina do L-PRF. (EHRENFEST et al., 2014; PINTO et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018). Há, no entanto, uma linha de pesquisadores que afirmam que não é obrigatório o uso de marcas comerciais específicas, mas que se tenha uma centrífuga que respeite os requisitos básicos necessários para a confecção do L-PRF. Para utilizar outras centrífugas é necessário realizar os cálculos para determinar a força G da centrífuga e adequar a velocidade e tempo. Oliveira et al., 2020, realizaram pesquisa com a centrífuga Fibrin Fuge 25 (Montserrat, Brasil) e concluíram que as plaquetas estavam intactas e aderidas à rede de fibrina, emitindo pseudópodes, degranulação, e aumento de VEGF até 7 dias para todas as forças (200 g, 400 g e 800 g por 10 min). No entanto, as concentrações foram maiores quando usou-se 200 g. Desta maneira há muitos pesquisadores que questionam até que ponto estas centrífugas fazem realmente a grande diferença na obtenção do L-PRF e se isto acaba sendo um apelo comercial para a venda de centrífugas de valor muito mais elevado. Defendem que não se deve ficar reféns de marcas comerciais, e que o mais importante é calcular a força G da centrífuga que será utilizada, bem como o tempo de centrifugação. No mercado há centrífugas dos mais variados preços, e a Intra Spin chega a custar até 10 vezes mais do que outras. Esta pesquisa utilizou uma centrífuga de valor expressivamente menor que as marcas de referência, e ainda assim os resultados mostraram que houve crescimento ósseo progressivo e estatisticamente significativo no decorrer das semanas, ou seja, que em princípio também são eficazes na confecção do L-PRF. Após a centrifugação fica visível a divisão do conteúdo dos tubos em 3 partes: a camada do topo composta por plasma acelular; a intermediária, que contém o L-PRF propriamente dito; e a da base do tubo que contém as células vermelhas do sangue. Vale aqui ressaltar que a camada do L-PRF que mais contém células viáveis é a mais próxima das células vermelhas, e assim sendo, deve-se tomar cuidado na remoção dessa camada evitando-se remover também a parte do L-PRF que contém a maior parte destas células viáveis.

Os materiais aloplásticos e xenógenos têm ampla indicação em procedimentos de enxertia óssea. No entanto, apesar de serem bons osteocondutores, não possuem a propriedade de serem osteogênicos nem osteoindutores. A associação do L-PRF e do i-PRF a estes materiais aloplásticos e xenógenos pode potencializar as chances de sucesso, pois contém diversos fatores de crescimento (PANDA, 2014; ACAR, 2015; ORTEGA et al., 2020; BLATT et al., 2021). Desta maneira tanto o ganho ósseo pode ser maior, como o

tempo de cicatrização e qualidade do osso lamelar também pode ser melhorado (MALLMANN, LAGO & BONA, 2013; OLIVEIRA et al., 2015; ABDULLAH, 2015). O L-PRF atua em 4 fases fundamentais do processo de cicatrização: 1) angiogênese; 2) controle imunológico; 3) liberação de fatores de crescimento; e 4) recrutamento das células indiferenciadas. Também auxilia na cobertura com migração de células epiteliais.

A importância de avaliar o L-PRF na formação óssea é que há muitos casos em que não se tem disponibilidade óssea autógena suficiente para completar todo o leito receptor. Há casos em que não há sequer a possibilidade de se obter osso autógeno para colocar no leito receptor. Nestes casos há grande importância de se pesquisar alternativas para complementar o enxerto autógeno e/ou xenógeno, procurando as que isoladamente propiciem melhor cicatrização óssea e que potencializem o reparo tecidual, diminuindo a necessidade de área doadora.

Os resultados desta pesquisa mostraram que houve ganho ósseo proporcional e significativo entre 2 e 6 semanas para o grupo onde foi colocado L-PRF exclusivamente. Este resultado é especialmente importante para a prática clínica diária pois há inúmeras situações onde não é indicado a utilização de qualquer tipo de enxerto ósseo (independentemente de ser seja autógeno, xenógeno ou alógeno) e poderia se utilizar o L-PRF isoladamente para se evitar infecção e maximizar toda a resposta tecidual. Um destes exemplos seria a remoção de cistos e/ou tumores. Geralmente quando se realizam operações de cistos ou tumores, há remoção desse tecidos com ou sem margem de segurança, e não é indicado a utilização de enxertos em um primeiro momento, deixando para depois o enxerto ósseo. Nestes casos pode ser muito interessante utilizar o L-PRF, pois além de evitar hemorragias e sangramentos, evitaria infecções e iria melhorar toda resposta tecidual, incluindo a angiogênese e a neoformação óssea, facilitando uma segunda etapa cirúrgica de reconstrução tecidual, ou até mesmo evitando a necessidade dela.

Os resultados encontrados nesta pesquisa corroboram com os encontrados por diversos autores em relação ao L-PRF, e também vem de encontro à sensação clínica que os cirurgiões têm na prática clínica diária. Na revisão de literatura realizada, muitos autores também verificaram que defeitos foram reparados com sucesso com aplicação exclusivamente de L-PRF (LEE et al., 2012; MALLMANN et al., 2013; PRIPATNANONT et al., 2013; ABDULAHH et al., 2015; ACAR et al., 2015; DURMUSLAR, 2016; KUMAR et al., 2016; LIU et al., 2019; CANELLAS et al., 2020).

Nem todas as pesquisas são unânimes em relação às vantagens do L-PRF, trazendo ainda alguns questionamentos sobre sua estabilidade na osteogênese. Diana 2018 realizou estudo do PRF com implantes e não verificou nenhum efeito significativo. Desta maneira há pesquisadores que sugerem que mais pesquisas são necessárias sobre as evidências dos benefícios clínicos do L-PRF, uma vez que ainda consideram as evidências moderadas (STÄLI, STRAUSS & GRUBER, 2018; DRAGONAS et al., 2019; ORTEGA, 2020).

Nesta pesquisa a união do osso autógeno com o L-PRF teve um resultado promissor na segunda e na quarta semanas, mas não na sexta. Uma das possibilidades deste resultado seria o tipo de centrifuga utilizado, uma vez que há autores que acreditam que apenas a centrifuga Intra-Spin possa ser capaz de realizar L-PRF com todas as propriedades para a melhor cicatrização. De qualquer forma, mais pesquisas precisam ser realizadas para comprovar realmente se isto é verdade, uma vez que para muitos não se deve ficar reféns de marcas comerciais, desde que sejam observados o tempo e a força G em cada centrifuga utilizada.

67

CONCLUSÃO

Houve aumento progressivo e proporcional estatisticamente significativo na utilização do L-PRF em defeitos não críticos em coelhos entre 2 e 6 semanas.

REFERÊNCIAS

1. ABDULLAH W. A. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *Saudi Dent J*, v. 28, n. 3, p. 109-117, 2016.
2. ACAR A. H. et al. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on

- bone regeneration in the rabbit calvarium. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 4, p. 606-614, 2015.
- 3 ALKOFARI, H et al.; Application of platelet-rich fibrin as regeneration assistant in immediate autotransplantation of third molar with unformed roots: case report and review of literature. **Case Rep Dent**, v. 21, 2020.
 - 4 ATCHUTA, A; et al. Clinical and radiographic evaluation of platelet-rich fibrin as an adjunct to bone grafting demineralized freeze-dried bone allograft in intrabony defects. **J Indian Soc Periodontol**, v. 24, n. 1, p. 60-66, 2020.
 - 5 AWADEEN M. A. et al.; Early therapeutic effect of platelet-rich fibrin combined with allogeneic bone marrow-derived stem cells on rats' critical sized mandibular defects. **World J Stem Cells**, v. 12, n. 1, p. 55-69, 2020.
 - 6 BLATT S. et al. Does platelet-rich fibrin enhance the early angiogenic potential of different bone substitute materials? An in vitro and in vivo analysis. **Biomedicines**, v. 9, n. 1, 2021
 - 7 BLATT S. et al. Possible implications for improved osteogenesis? The combination of platelet-rich fibrin with different bone substitute materials. **Front Bioeng Biotechnol**, v.16, n. 9, 2021.
 - 8 BLINSTEIN, B.; BOJARSKAS, S. Efficacy of autologous platelet rich fibrin in bone augmentation and bone regeneration at extraction socket. **Stomatologija**, v. 20, n. 4, p. 111-118, 2018
 - 9 BORIE E et al.; Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 5, p. 7922-7929, 2015.
 - 10 CANELLAS J. V. S. et al.; Platelet-rich fibrin in oral surgical procedures: a systematic review and meta-analysis. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 48, n. 3, p. 395-414, 2019.
 - 11 CANELLAS J. V. S., RITTO F. G., MEDEIROS P. J. D.; Evaluation of postoperative complications after mandibular third molar surgery with the use of platelet-rich fibrin: a systematic review and meta-analysis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 46, n. 9, p. 1138-1146, 2017.
 - 12 CANELLAS J. V. S.; et al. Tomographic and histomorphometric evaluation of socket healing after tooth extraction using leukocyte- and platelet- rich fibrin: A randomized, single blind, controlled clinical trial. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 48, n. 1, p. 24-32, 2020.
 - 13 DIANA C. et al., Does platelet-rich fibrin have a role in osseointegration of immediate implants? A randomized, single-blind, controlled clinical trial. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 9, p. 1178-1188, 2018.
 - 14 DOHAN M. D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 45-50, 2006.
 - 15 DOHAN M. D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 37-44, 2006.
 - 16 DOHAN M. D. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3., p. 51-55, 2006.
 - 17 DRAGONAS P. et al. Effects of leukocyte-platelet-rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 48, n. 2, p. 250-262, 2019.
 - 18 DURMUSLAR M. C.; Evaluation of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in diabetic rabbits. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 44, n. 2, p. 126-133, 2016.
 - 19 EHRENFEST D. M. D. 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, 2018.
 - 20 EHRENFEST D. M. D. 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 table centrifuges for L-PRF. **Poseido**, v. 2, n. 2, p. 129-139, 2014.
 - 21 EHRENFEST D. M. D., RASMUSSEN L., ALBREKTSSON T.; Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.
 - 22 ESHGHPOUR M. et al.; Effect of platelet-rich fibrin on frequency of alveolar osteitis following mandibular third molar surgery: a double-blinded randomized clinical trial. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 8, p. 1463-1467, 2014.
 - 23 KOBAYASHI M. et al.; A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. **Biologicals**, v. 40, n. 5, p. 323-329, 2012.
 - 24 KUMAR Y. R. et al.; Platelet-rich fibrin: the benefits. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 54, n. 1, p. 57-61, 2016.
 - 25 LAURITANO D. et al.; **Is platelet-rich fibrin really useful in oral and maxillofacial surgery? Lights and shadows of this new technique.** *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 1, n. 3, p. 1-5, 2013.
 - 26 LEE J. W. et al.; Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 4, p. 459-463, 2012.
 - 27 LIU, Y. et al.; Platelet-rich fibrin as a bone graft material in oral and maxillofacial bone regeneration: classification and summary for better application. **Biomed Research International**, v. 2019, p. 1-16, 2019
 - 28 MALLMANN F., LAGO, P. E. W., BONA, A. D. Uso de fibrina rica em plaquetas (PRF) no tratamento de perfurações da membrana sinusal. **Full Dent Sci**, v. 5, n. 17, p. 59-66, 2013.
 - 29 MARENZI G. et al.; Influence of leukocyte- and platelet- rich fibrin (L-PRF) in the healing of simple postextraction sockets: a split-mouth study. **Biomed Res Int**, p. 1-6, 2015.
 - 30 MIRON R. J., CHOUKROUN J. Platelet rich fibrin in regenerative dentistry: biological background and clinical indications. John Wiley & Sons, Ltd. 2017.
 - 31 MOURÃO C. F. A. B. et al.; Usefulness of platelet-rich fibrin as a hemostatic agent after dental extractions in patients receiving anticoagulant therapy with factor Xa inhibitors: a case series. **Oral and Maxillofac Surg**, v. 23, n. 3, p. 381-386, 2019.
 - 32 NELSON E. A. et al.; A jugular bleeding technique in rabbits. **Lab Animal**, v. 39, n. 1, p. 17-22, 2010.
 - 33 OLIVEIRA L. A. et al.; Methodological variations affect the release of VEGF *in vitro* and fibrinolysis' time from platelet concentrates. **PloS ONE**, v. 15, n.10, 2020.
 - 34 OLIVEIRA L. A., ALMEIDA, F. L. D. Liberação de VEGF, TGF β e FGF β da matriz de fibrina rica em plaquetas e leucócitos obtida pelo protocolo fibrin de centrifugação. Benefícios como adjuvante cirúrgico em elevações do seio maxilar. **Rev. Catarinense de Implantodont**, n. 19, p. 29-37, 2019.
 - 35 OLIVEIRA M. R., et al.; Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 5, p. 649-655, 2015.
 - 36 ORTEGA M. H. Platelet-rich plasma in maxillary sinus augmentation: systematic review, **Materials**, v. 13, n. 3, p. 1-23, 2020

37. PANDA et al. Platelet rich fibrin and alloplast in treatment of intrabony defect. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 6, n. 2, p. 127-131, 2014.
38. PINTO N. R. et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of aleukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and scanning electron microscopy analysis of 4 kinds of L-PRF clots and membranes. **Poseido**, v. 2, n. 2, p. 141-154.
39. PRIPATNANONT P. et al. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 41, n. 8, 2013.
40. RODAS M. A. R. et al.; Platelet-rich fibrin in coverage of gingival recession: a systematic review and meta-analysis, **Eur J Dent**, v.14, n. 2, 2020.
41. STÄHLI A., STRAUSS F. J., GRUBER R. The use of platelet-rich fibrin to enhance the outcomes of implant therapy: a systematic review, **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 18, p. 6-19, 2018.
42. STRAUSS F. J. et al.; Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies, **Clin Oral Investig**, v. 24, n. 2, p. 569-584, 2020.
43. STRAUSS, F. J.; et al. Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies. **Clin Oral Investig**, v. 24, n. 2, p. 569-584, 2020.
44. ZHAO Q. M., DING Y. J., SI T. Platelet-rich fibrin in plastic surgery. **OA Evidence-Based Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2013
45. ZHOU T. et al.; Effect of Choukroun platelet-rich fibrin combined with autologous micro-morselized bone on the repair of mandibular defects in rabbits. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 76, n. 1, p. 221-228, 2018.

Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.