



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



LUANA CRISTINA FERREIRA

**FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO E
CARACTERÍSTICAS DO CONCENTRADO
SANGUÍNEO – PRF (Fibrina Rica em Plaquetas)**

UBERLÂNDIA

2023

LUANA CRISTINA FERREIRA

**FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO E
CARACTERÍSTICAS DO CONCENTRADO
SANGUÍNEO – PRF (Fibrina Rica em Plaquetas)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
a Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos necessários para a conclusão do
curso

Orientadora Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi Barbar

UBERLÂNDIA

2023

Monografia intitulada “Fatores que interferem na produção e características do concentrado sanguíneo Fibrina rica em plaquetas (PRF)” de autoria de Luana Cristina Ferreira

Aprovada em 02 /06/2023 pela banca constituída pelos seguintes professores:

Prof.^a. Dr^a Paula Caetano Araújo

Prof. Dr^o Jonas Dantas Batista

Ms. João Lucas Carvalho Paz

UBERLÂNDIA

2023

Dedico este trabalho à minha família. Pais, irmãos, avós, tios e tias pelo apoio incondicional sem o qual a conclusão desse curso jamais seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e encorajamento nos momentos de maior dificuldade, e por ter me presenteado com pessoas maravilhosas e encantadoras durante toda essa jornada.

Sou extremamente grata a minha orientadora Paula, pela ajuda, paciência e pelos ensinamentos. Profissional excepcional e um grande exemplo de força e dedicação para mim.

Ao estimado professor Marcelo Dias meus agradecimentos pela contribuição ao presente trabalho.

Agradeço aos meus pais amados, Luzia e Cristiano, por todo o esforço e apoio incondicional, sem o qual não seria possível a finalização dessa jornada.

Agradeço aos meus irmãos, Daiana e Fábio, por todo incentivo e encorajamento, contribuindo para que essa etapa fosse concluída de forma mais leve.

Aos meus amigos e colegas da turma 87, agradeço pelos bons momentos, pelo companheirismo, pela diversão e pelas boas risadas compartilhadas.

Aos professores, funcionários e técnicos da FOUFU, minha eterna gratidão e admiração pela solicitude, dedicação, empenho e por ofertarem sempre o melhor aos graduandos do curso de odontologia e na minha formação como cirurgiã-dentista.

RESUMO

Os concentrados sanguíneos representados, principalmente, pelo plasma rico em plaquetas (PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF), vêm sendo empregados em diversas áreas médicas e odontológicas devido aos bons resultados alcançados, baixo custo, fácil preparação e manuseio. Os resultados clínicos devem-se à capacidade desses concentrados melhorarem o reparo de tecidos moles e duros, visto que fornecem fatores de crescimento e citocinas, responsáveis pela homeostase do organismo. O PRP, considerado a primeira geração de concentrados sanguíneos apresenta efeito limitado no reparo tecidual. Já o PRF, considerado a segunda geração de concentrados sanguíneos que, além de apresentar vantagens como ausência de aditivos pró e anticoagulantes e por ser obtido com apenas um ciclo de centrifugação, tem apresentado melhores resultados no reparo tecidual que o PRP. A malha tridimensional de fibrina formada após a obtenção do PRF concentra quantidade significativa de plaquetas e leucócitos que, em conjunto com os fatores de crescimento, atuam potencializando o processo de reparo tecidual. Atualmente, reconhece-se que vários fatores podem interferir na qualidade do PRF produzido. Assim, considerando a importância de conhecer os parâmetros relacionados à eficiência do PRF, o objetivo da presente monografia foi abordar fatores que interferem nas características físicas e propriedades biológicas do concentrado Fibrina Rica em Plaquetas. Na revisão de literatura, foram consultados artigos e livros, nas bases dados Pubmed, Embase, Web of science e Scopus, no período de 2018 a 2023. As palavras chaves utilizadas foram: Platelets rich fibrin, PRF protocol, tubes, relative centrifugal force. Também foram incluídos artigos específicos obtidos a partir das referências citadas nos artigos do período consultado. A literatura mostrou que vários fatores podem interferir nas características do PRF produzido. Entre eles, destacam-se a Força Relativa de Centrifugação (RCF), tempo de centrifugação e material do tubo de coleta de sangue, além das características sistêmicas do paciente. Esses fatores constituem variáveis que interferem, diretamente, nas propriedades físicas e biológicas do PRF, sendo importante que os profissionais conheçam as características de cada protocolo PRF e padronizem sua utilização de acordo com a necessidade clínica.

Palavras-chave: plaquetas; fibrina rica; protocolo PRF; tubos; força relativa de centrifugação

ABSTRACT

The blood concentrates, represented mainly by platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF), have been used in several medical and dental areas due to the good clinical outcomes achieved, low cost, ease of preparation and handling. The good clinical outcomes observed occurred due to the ability of these concentrates to improve the repair of soft and hard tissues, due to the action of the growth factors and cytokines inside these concentrates that are responsible for the body's homeostasis. The PRP is considered the first generation of blood concentrates and has been shown a limited effect on tissue repair. On the other hand, The PRF is considered a second generation of blood concentrates, has been shown advantages such as the absence of necessity of the use of pro- and anti-coagulation additives, and the obtention of this concentrate can be done with only one centrifugation cycle, which is not possible with the PRP. The three-dimensional fibrin mesh formed after obtaining the PRF concentrates presents a significant amount of platelets and leukocytes that in conjunction with the growth factors act to enhance the tissue repair. Currently, it is recognized that several factors can interfere with the quality of the PRF production. Thus, considering the importance of knowing the parameters related to the efficiency of PRF, the aim of this monograph was to address factors that interfere with the physical characteristics and biological properties of the PRF concentrate. In this literature review, articles and books were consulted in the Pubmed, Embase, Web of science and Scopus databases, from 2018 to 2023. The keywords used were: Platelets rich fibrin, PRF protocol, tubes, and relative centrifugal force. Specific papers obtained from the references cited in the articles that encompassed the period of evaluation proposed were also included. It was shown that several factors can interfere with the characteristics of the PRF. Among them, the Relative Force of Centrifugation (RCF), centrifugation time and material of the blood collection tube, in addition to the systemic characteristics of the patient deserves highlight. These factors are variables that directly interfere with the physical and biological properties of PRF, and it is important for professionals to know the characteristics of each PRF protocol and standardize its use according to clinical needs.

Key Words: Platelets; rich fibrin; PRF protocol; tubes; relative centrifugal force.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
2. Metodologia.....	12
3. Revisão de literatura	13
3.1 Concentrados plaquetários	13
3.2 Plaquetas, processo hemostático e coagulação sanguínea	13
3.3 Plasma rico em plaquetas (PRP).....	14
3.4 Fibrina rica em plaquetas (PRF).....	16
3.5 Tubos de coleta de sangue para produção de PRF	22
3.5.1 Tubos de vidro	22
3.5.2 Tubos de plástico revestidos com sílica	24
3.5.3 Tubos de plástico sem aditivos	27
3.5.4 Tubos de titânio	29
3.6 Coleta de sangue, centrífuga e perfil do paciente	30
4. Considerações finais	33
5. Conclusão.....	35
6. Referências.....	36

1. Introdução

O reparo tecidual é um processo complexo, especialmente em situações adversas, representando um desafio para as áreas médica e odontológica. Diante dessa realidade, uma variedade de terapias tem sido desenvolvidas no sentido de favorecer o reparo de tecidos danificados ou perdidos (COURY, 2016; ROUWKEMA; KHADEMHOSEINI, 2016). A utilização de produtos derivados do sangue para estimular a reparação de feridas começou com o uso de colas de fibrina, preparadas com altas concentrações de trombina e fibrinogênio, descritas pela primeira vez há 40 anos (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009; FEIGIN; SHOPE, 2019)

Os concentrados sanguíneos ricos em plaquetas, vem sendo empregados na engenharia tecidual com objetivo de fornecer um arcabouço com fatores de crescimento e citocinas que auxiliarão no processo de reparo tecidual (CHOUKROUN; GHANAATI, 2018; FEIGIN; SHOPE, 2019). Assim, esses concentrados buscam a partir de suas propriedades biológicas, a homeostase do organismo, a coagulação da fibrina e, conseqüentemente, a regeneração dos tecidos moles e duros. Isso ocorre devido aos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) presentes nesses concentrados (CARUANA et al., 2019).

O conceito original que deu origem aos concentrados de plaquetas baseou-se na ideia de que plaquetas concentradas, juntamente com fatores de crescimento autólogos, poderiam ser coletados em soluções de plasma. Esses, poderiam ser empregados em sítios cirúrgicos específicos para estimular a reparo local (FIJNHEER et al., 1990; MIHAYLOVA et al., 2017). Os concentrados de plaquetas são suspensões concentradas de fatores de crescimento e outras células. São produtos biológicos, autólogos, derivados da centrifugação gravitacional de uma amostra de sangue. Eles são constituídos principalmente por plaquetas, leucócitos, fibrina e fatores crescimento. Atuam como aditivos cirúrgicos bioativos com a finalidade de induzir o reparo de feridas (CHOUKROUN; MIRON, 2017; FEIGIN; SHOPE, 2019))

O conceito de obtenção de doses supra-fisiológicas de fatores de crescimento plaquetário para induzir e acelerar o processo de reparação de feridas após

procedimentos cirúrgicos foi introduzido na odontologia em meados da década de 90 (KOBAYASHI et al., 2016; LUCARELLI et al., 2010). Com isso, a terapia autóloga com plaquetas ganhou popularidade, impulsionada pelo desenvolvimento e utilização do plasma rico em plaquetas (PRP). Então, o PRP foi amplamente adotado e explorado em diversas aplicações médicas e odontológicas, representando um avanço significativo no campo da medicina regenerativa (KARIMI; ROCKWELL, 2019). Apesar da evolução, o PRP apresenta desvantagens como liberação precoce dos fatores de crescimento, utilização de fatores anti e pró coagulantes, demora na sua produção, devido á dupla centrifugação, e formação de um coágulo sem resistência (DOHAN et al., 2006a).

Em 2001, Choukroun propôs o concentrado sanguíneo de fibrina rica em plaquetas (PRF), obtido por meio de uma técnica, relativamente, simples e de baixo custo. Na produção do PRF utiliza-se tubos de coleta de sangue sem aditivos, que são submetidos a forças centrífugas relativas (RCF – *Relative centrifugal force*) específicas. O produto final consiste de uma matriz de fibrina com estrutura tridimensional entremeada, principalmente, por leucócitos e plaquetas, que promovem liberação gradual de fatores de crescimento e citocinas. Esse concentrado PRF é considerado a segunda geração de concentrados sanguíneos.

Indicações para o uso do PRF têm sido propostas em vários campos, como na neurocirurgia (VASILIKOS et al., 2020), dermatologia (SHASHANK; BHUSHAN, 2021), otorrinolaringologia (HUANG et al., 2022), estética (NACOPOULOS, 2017) e em diversas especialidades da odontologia (LYRIS et al., 2021; MIRON et al., 2017; NARENDRAN et al., 2022) com objetivo de aumentar a previsibilidade do reparo de tecidos, incluindo tecidos doentes, lesados ou envelhecidos (DAI et al., 2016; KAWASE; MUBARAK; MOURÃO, 2020; ROUWKEMA; KHADEMHOSEINI, 2016). Esse efeito do PRF é esperado devido à presença de leucócitos, plaquetas, citocinas e fatores de crescimento, que têm a capacidade de estimular a angiogênese, a proliferação celular no sítio cirúrgico, além de controlar a resposta imunológica, acelerando o reparo tecidual (CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN et al., 2006b).

O PRF é um biomaterial autólogo, versátil, que pode ser utilizado substituindo enxertos ósseos ou membrana de barreira, sem a preocupação de causar reação de corpo estranho, acelerando o processo natural de reparo (MIRON et al., 2017). Nesse contexto, também vem sendo utilizado no gerenciamento dos alvéolos de extração (GIRISH RAO et al., 2013; HAUSER et al., 2013). Estudos demonstraram ainda que

o uso da membrana de PRF foi capaz de reduzir as infecções por osteomielite, isso ocorre devido à presença de células imunológicas em especial os leucócitos (HOAGLIN; LINES, 2013).

Em procedimentos de levantamento de seios maxilares, o PRF atua como material de enxertia ou em conjunto com outro material de enxerto buscando aumentar o volume e reduzir o tempo de reparo (MIRON et al., 2017; PICHOTANO et al., 2019). Estudos mostram resultados importantes ao utilizar o PRF para regeneração periodontal de defeitos intraósseos, regeneração de tecidos moles ao redor de implantes, regeneração óssea guiada e outros aspectos odontológicos e da medicina (MIRON et al., 2017). Além disso, estudos estão utilizando PRF em cirurgias periodontais com defeitos mucogengivais; como manejo da exposição radicular. Os resultados têm demonstrado melhora significativa na vascularização e no reparo dos tecidos moles, já que o PRF tem maior contribuição na formação de tecidos moles (TUNALI et al., 2015)

Um desafio enfrentado pelo cirurgião dentista é o selamento de feridas após procedimentos de exodontia e a instalação de implantes em rebordos alveolares atróficos, visto que o fechamento por primeira intenção promove a perda de volume dos tecidos tanto em espessura quanto em altura (CHAPPUIS; ARAÚJO; BUSER, 2017). Assim sendo, a técnica da ferida aberta (Open Wound Technique™) vem sendo empregada tanto em procedimentos pós-exodontia, em especial de molares, quanto após a instalação e reabertura de implantes com a finalidade de garantir a manutenção do tecido ósseo e mucosa queratinizada (SABOIA-DANTAS et al., 2021). Nessa técnica, o espaço presente após a exodontia, instalação ou exposição do implante, é preenchido por membranas e plugs de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), que atuam como curativo provisório imunologicamente ativo (CHOUKROUN et al., 2006). Além disso, essas membranas ao recobrirem o sítio cirúrgico permitem o fechamento passivo evitando o processo isquêmico que prejudica o aporte sanguíneo aos tecidos influenciando de forma negativa o reparo tecidual.

Atualmente, reconhece-se o PRF como uma terapia adjuvante importante que favorece e otimiza o processo de reparo tecidual. Entretanto, ainda há controvérsias na literatura relativas aos resultados clínicos obtidos com a utilização do PRF. Vários fatores, desde a coleta do sangue até aplicação no sítio cirúrgico, estão envolvidos na produção de um PRF de qualidade. Entre eles, destacam-se a Força Relativa de

Centrifugação (RCF), tempo de centrifugação e material do tubo de coleta de sangue, além das características sistêmicas do paciente. Esses fatores constituem variáveis que interferem diretamente nas características físicas e propriedades biológicas do PRF. Assim, considerando a importância desses parâmetros para a eficiência do PRF, o objetivo da presente monografia foi abordar fatores que interferem nas características físicas e propriedades biológicas do concentrado Fibrina Rica em Plaquetas.

2. Metodologia

Esse estudo trata-se de uma revisão da literatura cujo objetivo foi executar uma ampla busca nas bases de dados para verificar quais as evidências científicas haviam sobre a temática. No que se refere a critérios de exclusão todos os estudos que abordaram a discussão sobre os fatores que interferem na produção e características do PRF foram incluídos.

Quanto ao ano de publicação foram selecionados os estudos entre 2018 e 2023 outrossim é válido ressaltar que não houve restrição de idioma. Os critérios de exclusão foram estudos que não estavam em conformidade com o tema, cartas ao editor/editorial, opiniões pessoais, material didático, relatórios e anais de congresso. A pesquisa utilizou as bases de dados Pubmed, Embase, Web of science e Scopus. Para a seleção das palavras chaves foi utilizado o programa de descritores em ciência da saúde DeCS, sendo essas:” Platelets rich fibrina, PRF protocol, tubes, relative centrifugal force”.

Para complementar a busca todas as referências dos artigos elegíveis foram criteriosamente analisados sendo inseridas novas evidências sobre o tema (Cross Reference). Essa revisão realizou a seleção dos estudos por etapas sendo a primeira a leitura dos títulos para verificar se estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão posteriormente, os resumos dos artigos com os títulos dos elegíveis foram lidos para checar a elegibilidade do mesmo

Em uma etapa mais avançada, os artigos elegíveis finais foram lidos na íntegra na tentativa de verificar se os mesmos estavam adequados diante da proposta desta revisão. Ademais houve a coleta de dados dos artigos elegíveis bem como a organização das evidências disponíveis que serviram de base para redação desta revisão.

3. Revisão de literatura

Na presente revisão de literatura, inicialmente, serão abordados conceitos e breve histórico relativos aos concentrados sanguíneos. Em seguida, serão abordados fatores que interferem na qualidade do concentrado fibrina rica em plaquetas.

3.1 Concentrados plaquetários

O concentrado sanguíneo de plaquetas foi observado, inicialmente, em 1970 por Hematologistas, ao analisarem amostras de sangue processado. Esses profissionais observaram um aumento na quantidade de plaquetas, devido à separação de alguns componentes do sangue, o que originou o concentrado de plaquetas (KAWASE; MUBARAK; MOURÃO, 2020). A partir disso, os concentrados de plaquetas foram utilizados na medicina de transfusão, com a finalidade de tratar e prevenir hemorragias provocadas por trombopenia grave em cirurgias de longa duração (FEIGIN; SHOPE, 2019).

Os concentrados de plaquetas são suspensões concentradas de fatores de crescimento e outras células. São produtos biológicos, autólogos, derivados da centrifugação gravitacional de uma amostra de sangue. Eles são constituídos principalmente por plaquetas, leucócitos, fibrina e fatores crescimento. Atuam como aditivos cirúrgicos bioativos com a finalidade de induzir o reparo de feridas (FEIGIN; SHOPE, 2019; MIRON; CHOUKROUN; GHANAATI, 2018).

3.2 Plaquetas, processo hemostático e coagulação sanguínea

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, células presentes na medula óssea. Além da função hemostática, as plaquetas liberam grandes quantidades de moléculas responsáveis pelo processo de mitose, aumento da produção de colágeno e crescimento de vasos sanguíneos, bem como, pelo recrutamento de células primordiais ao processo de reparo tecidual. Dessa forma, as plaquetas possuem grande potencial regenerativo devido à presença desses diversos fatores de crescimento (FEIGIN; SHOPE, 2019).

O processo de coagulação sanguínea tem início com a lesão tecidual. Dessa forma, o fibrinogênio, encontrado em grande quantidade no plasma sanguíneo, é convertido em sua forma ativa, a fibrina, por meio da trombina. A fibrina forma uma

rede que aprisiona plaquetas e células sanguíneas, formando uma barreira protetora e selando a região lesionada. Em seguida, a ativação das plaquetas, no processo homeostático, é responsável por liberar citocinas, proteínas moduladoras que possuem capacidade de estimular a migração e a proliferação celular, sendo essa a primeira fase do reparo tecidual (HOLINSTAT, 2017; LITVINOV et al., 2021).

Os três estágios que fazem parte do processo de reparação de feridas são: fase inflamatória, proliferativa e fase de remodelação. Após a ocorrência de uma lesão tecidual tem-se início a fase inflamatória, na qual as plaquetas são ativadas para dar início ao processo de coagulação. As plaquetas liberam citocinas e fatores de crescimento exercendo deslocamento quimiotático de macrófagos e neutrófilos. Assim, tecidos necróticos, bactérias e detritos são fagocitados. Após o terceiro dia da lesão inicia a fase proliferativa onde uma matriz de fibrina possibilita a migração celular, os fibroblastos produzem colágeno e ocorre a formação de novos vasos. Já na fase final de remodelação, o colágeno forma fibrilas, dispostas de forma a proporcionar resistência ao tecido. Assim, progressivamente, ocorre a reparação do tecido (GUO; DIPIETRO, 2010; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

Considerando o fato de que as plaquetas representam reservatórios de fatores de crescimento, foram desenvolvidos concentrados sanguíneos, no intuito de concentrar maior quantidade de plaquetas e leucócitos, em um pequeno volume. O objetivo desses concentrados foi isolar os componentes do sangue que atuam diretamente no processo de reparo tecidual. Assim, os concentrados de forma geral produzem um coágulo rico em plaquetas e leucócitos, com poucos eritrócitos.

3.3 Plasma rico em plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi o primeiro amplamente utilizado nas áreas médico-odontológicas, sendo considerado a primeira geração de concentrados sanguíneos. Ele é obtido a partir do sangue periférico do paciente, no momento do tratamento, sendo uma fonte autógena e, consideravelmente, barata de fatores de crescimento. O produto obtido é um concentrado de elementos, sendo sua principal composição leucócitos e plaquetas (ALVES; GRIMALT, 2018; LYNCH; BASHIR, 2016).

O principal objetivo na produção do PRP era isolar a maior quantidade de plaquetas para obtenção de fatores de crescimento (PDGF, TGF- β e IGF-1) (DOHAN

EHRENFEST et al., 2010; EMING et al., 2007). Esse concentrado seria utilizado em procedimentos cirúrgicos, enriquecendo o coágulo de sangue, formado na região operada, acelerando o processo de regeneração tecidual (ALVES; GRIMALT, 2018; LYNCH; BASHIR, 2016).

No processo de reparo tecidual as plaquetas atuam como o componente significativo, liberando numerosos mediadores inflamatórios (THOMAS; STOREY, 2015). Porém, existem outros componentes que fazem parte do PRP, como os leucócitos, que atuam na resistência natural contra processos infecciosos (CHOUKROUN; MIRON, 2017). Além disso, as plaquetas formam agregados com os leucócitos, formando pontes entre os leucócitos e o endotélio. Por meio de suas interações com monócitos, neutrófilos, linfócitos e endotélio, as plaquetas são, portanto, importantes coordenadoras da inflamação (THOMAS; STOREY, 2015).

A produção do PRP ocorre por meio de um processo simples no qual o sangue do paciente é coletado, em tubos de plástico com anticoagulantes, antes de se iniciar o procedimento cirúrgico. Em seguida, a amostra passa por um processo de centrifugação, sob condições controladas. O sangue é então separado em três camadas, uma camada inferior formada por hemácias, uma superior constituída por plasma acelular composta, principalmente, por fibrinogênio e plasma pobre em plaquetas (PPP), e uma camada intermediária constituída pelo PRP, sendo essa apenas de 5% do conteúdo coletado (ALVES; GRIMALT, 2018; FEIGIN; SHOPE, 2019; LYNCH; BASHIR, 2016).

A camada superior (PPP) e a camada intermediária (PRP) do tubo são aspiradas com seringa e transferida para outro tubo, para uma segunda centrifugação. Após a centrifugação, forma-se novamente três camadas distintas. Uma camada inferior contendo alguns glóbulos vermelhos, uma camada intermediária de PRP e uma camada superior de PPP. A camada superior é coletada sendo descartada. O PRP é removido e a esse acrescenta-se trombina bovina ou cloreto de cálcio, obtendo-se assim um gel de matriz de fibrina, com propriedades adesivas e homeostáticas (DOHAN et al., 2006a). Um coágulo sanguíneo natural é composto por cerca de 5% de plaquetas enquanto o PRP pode conter até 95% de plaquetas (FEIGIN; SHOPE, 2019).

Entretanto, o PRP possui algumas desvantagens, devido à necessidade de anticoagulantes, como EDTA e citrato de sódio, e pro-coagulantes, como a trombina bovina ou CaCl₂. Essas substâncias são inibidoras do reparo de feridas (MIRON;

CHOUKROUN, 2018). Além disso, outra desvantagem do PRP é sua malha de fibrina, que por ser pouco densa, com fibras de pequeno diâmetro, retém as plaquetas por pouco tempo, dissolvendo-se como cola. Assim, seu potencial quimiotático e de formação de novos vasos é baixo (CARUANA et al., 2019). O PRP pode também ocasionar reações alérgicas já que a trombina bovina usada como substância promotora da coagulação recruta anticorpos V e XI e a formação de trombos.

3.4 Fibrina rica em plaquetas (PRF)

O concentrado sanguíneo fibrina rica em plaquetas (PRF), foi desenvolvido por Choukroun et al (2001), com objetivo de produzir um concentrado de plaquetas, sem a utilização de anticoagulantes e pro-coagulantes. O PRF é considerado a segunda geração de concentrados sanguíneos, sendo obtido sem utilização de aditivos e por apenas uma centrifugação (CHOUKROUN et al., 2001; CHOUKROUN; MIRON, 2017).

No protocolo original para produção do L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos), uma amostra de sangue é coletada em um tubo de vidro de 10 mL, sem aditivos, posteriormente ocorre a centrifugação a 700g/12min. Assim, forma-se no tubo três camadas, uma inferior contendo glóbulos vermelhos, uma camada intermediária de PRF e uma camada sobrenadante, contendo plasma pobre em plaquetas (PPP) (MOURÃO et al., 2015) (Figura 01).

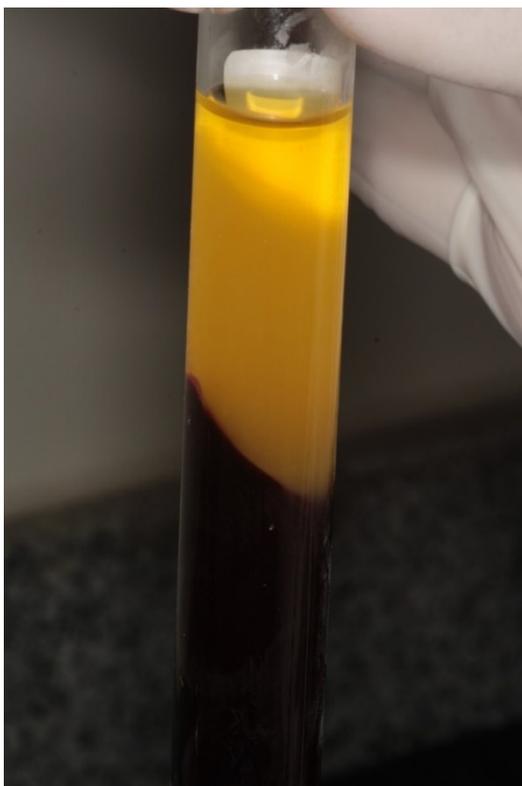


Figura 1: Imagem de tubo de vidro com amostra de sangue, após a centrifugação no protocolo L-PRF, evidenciando a separação em 3 camadas: coágulo de hemácias no fundo do tubo (vermelho), camada intermediária o PRF (amarelo fosco) e camada superior o PPP (amarelo translúcido).

Fonte: Acervo pessoal

Com a ausência do anticoagulante, o sangue coletado ao entrar em contato com a parede do tubo de vidro, leva apenas alguns minutos para iniciar seu processo de coagulação natural. Assim sendo, é importante que o tempo decorrido entre a coleta da amostra de sangue e o início da centrifugação seja rápido e preciso. Caso o tempo de manuseio ocorra de forma lenta, a fibrina será polimerizada difusamente dentro tubo, tendo como consequência a formação de um coágulo reduzido e sem consistência (MOURÃO et al., 2015).

Após a centrifugação forma-se uma malha de fibrina com células e plaquetas aprisionadas. Com a ativação das plaquetas ocorre liberação de citocinas e fatores de crescimento, nessa membrana de PRF. O fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-A e B) são liberados em maior quantidade. Esses

fatores de crescimento são responsáveis por melhorar a reparação de tecidos moles e duros (FEIGIN; SHOPE, 2019). Nesse contexto, a membrana de fibrina é, portanto, um biomaterial natural autólogo rico em glicoproteínas e em fatores de crescimento, de fácil preparação e de baixo custo. Por ser autólogo, não existe risco de infecção ou do desencadeamento de processos autoimunes (DOHAN et al., 2006a).

Pelo fato das concentrações de trombina que atuam no fibrinogênio autólogo concentrado serem quase fisiológicas, o processo de polimerização da fibrina ocorre de forma lenta durante a centrifugação. Essa característica é responsável pela formação de uma rede de fibrina tridimensional (Figura 02), com grande elasticidade capaz de reter citocinas e permitir a migração de células (MOURÃO et al., 2015)

A matriz de fibrina tridimensional do PRF é composta por um número significativo de plaquetas e leucócitos, células importantes no processo de reparo tecidual e defesa contra organismos patógenos, além de importante e na regulação do sistema imunológico. A combinação de uma matriz tridimensional da membrana de PRF com leucócitos e fatores de crescimento atuam em conjunto na cicatrização e regeneração de feridas dos tecidos de forma mais rápida e potente (CHOUKROUN; GHANAATI, 2018; MIRON et al., 2017)

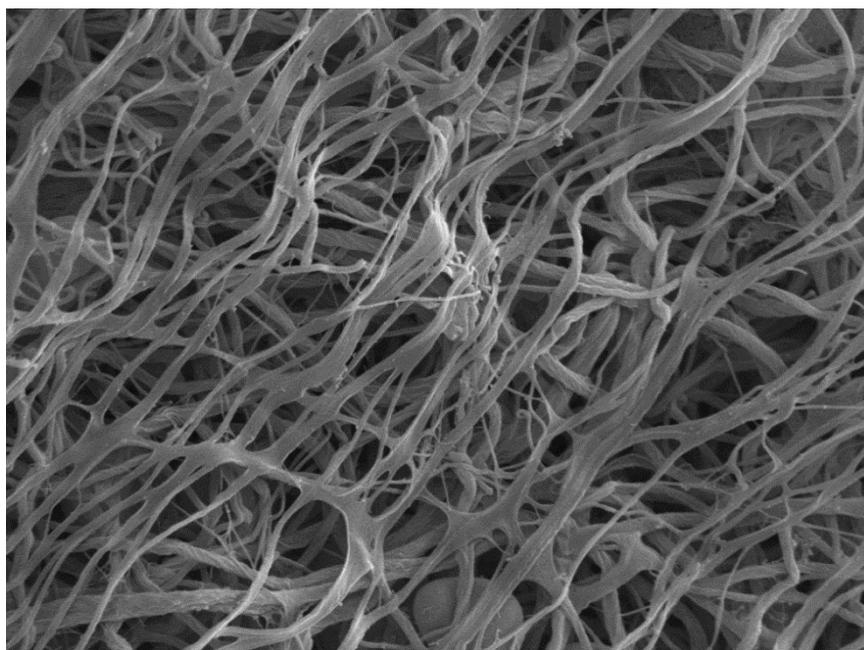


Figura 2: Imagem da malha tridimensional de fibrina (PRF), após centrifugação de amostra de sangue, observada ao microscópio eletrônico de varredura.

Fonte: Acervo pessoal.

3.4.1 Protocolos PRF

O Protocolo originalmente proposto por Choukroun, et al. (2001) o L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos) era produzido em tubos de vidro, sem aditivos, e centrifugados 700g por 12 minutos. Após a centrifugação, a partir de cada tubo de vidro, obtém-se um coágulo (Figura 3A), que é prensado em caixa de inox (PRFBOX) para formação da membrana (Figura 3B)

O Conceito de centrifugação a baixa velocidade mostrou que variações de RCF e tempo de centrifugação produzem PRF com características e possibilidades biológicas diferentes. A redução da RCF e tempo de centrifugação produzem matrizes PRF com rede de fibrina menos densa e mais celularizadas (CHOUKROUN et al., 2001; CHOUKROUN; GHANAATI, 2018) e, provavelmente, com aumento de capacidade de regeneração (MIRON et al., 2017). A estrutura e composição de membranas produzidas em alta RCF (770g) reduzem a reposta in vivo, provavelmente por dificultar a migração celular (KUBESCH et al., 2019)

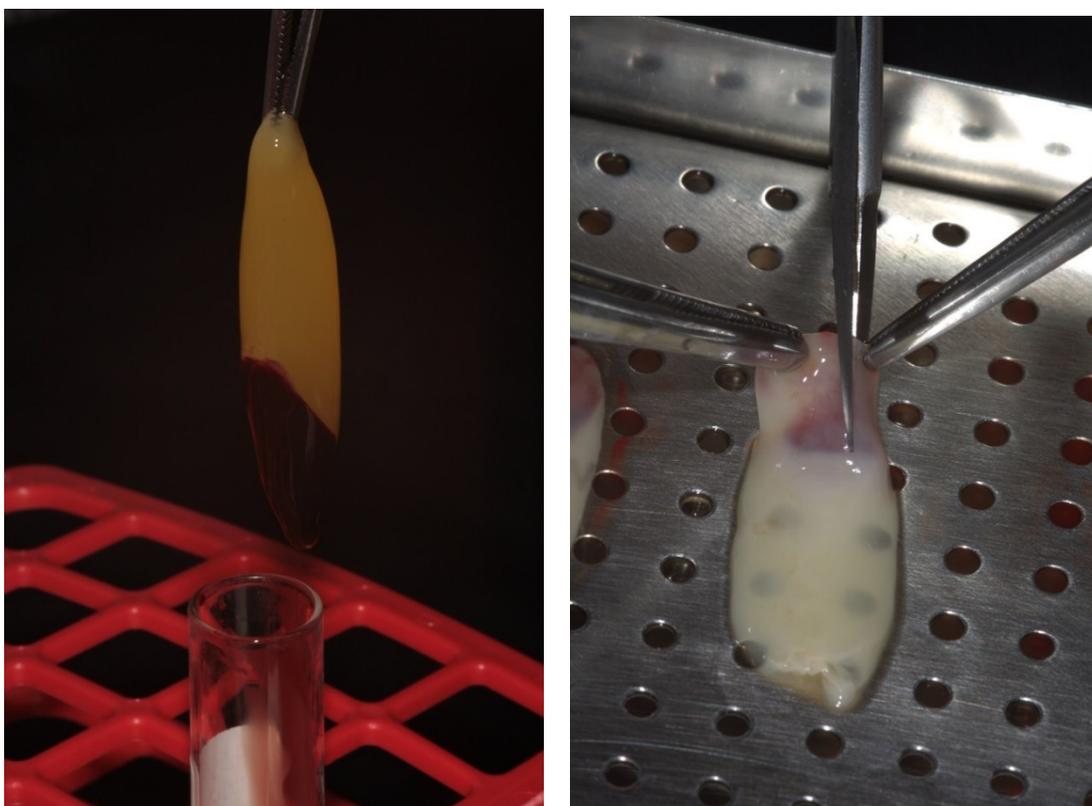


Figura 3: Imagem mostrando coágulo obtido após centrifugação (A) e membrana PRF após prensagem na caixa de inox (B)

Fonte: Acervo pessoal.

Com a modificação do protocolo de produção do PRF, reduzindo a força de centrifugação relativa (RCF) para 208 g, foi observado a formação de um coágulo com estrutura mais porosa e maior espaço entre as fibras. Dessa forma, surgiu então o PFR sólido avançado (A-PRF) (CHOUKROUN; GHANAATI, 2017). Na membrana do A-PRF as plaquetas e leucócitos são distribuídas de forma mais homogênea. Além disso, ocorre aumento na quantidade de leucócitos e plaquetas nessa membrana. Ao analisar histologicamente a sua estrutura observa-se aumento significativo de granulócitos neutrófilos em comparação com a membrana de L-PRF (MIRON et al., 2017).

A redução da RCF no conceito de centrifugação a baixa velocidade mostrou melhoras na estrutura e composição da membrana de PRF possibilitando avanços significativos. Entretanto, investigações *in vitro* mostraram uma liberação lenta e contínua do fator de crescimento acumulado como PDGF, TGF e VEDF (KOBAYASHI et al., 2016). Nesse contexto, uma modificação no tempo de centrifugação foi realizada a fim de melhorar a liberação dos fatores de crescimento, mas mantendo a estrutura porosa e estável da membrana de A-PRF. Assim, uma redução no tempo de centrifugação, mantendo a força de centrifugação relativa (208g), teve como resultado final a formação de um coágulo ainda melhor, o *Advanced PRF plus* (A-PRF+) (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017).

Em relação a estrutura da membrana do A-PRF+ a rede de fibrina apresentou-se com porosidade semelhante ao A-PRF, e células plaquetárias distribuídas uniformemente. Também, houve aumento significativo na capacidade de liberação dos fatores de crescimento, em especial, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em comparação ao L-PRF e A-PRF. Ao comparar membranas L-PRF, A-PRF e A-PRF+ observa-se aumento de leucócitos apenas na membrana de A-PRF+. Esse fato sugere que a maior quantidade de leucócitos poderia ser um fator para melhorar a liberação de fatores de crescimento (DOS SANTOS; ARAÚJO PERES; QUEIROZ, 2023; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017).

Na tentativa de desenvolver um concentrado sanguíneo fluido, foi proposto um protocolo com uma força relativa de centrifugação de 60g. Para tal finalidade, foi necessário utilizar tubo de plástico, sem aditivos, específicos para a coleta de sangue. O plástico, diferente do vidro, retarda a ativação da cascata de coagulação durante a centrifugação. Logo, redução adicional na RCF e o uso do tubo de plástico permitiram a produção de um concentrado fluido denominado PRF injetável (i-PRF) (MOURÃO

et al., 2015). No i-PRF, após a centrifugação, obtém-se uma camada inferior de células vermelhas e uma camada superior (laranja) contendo o i-PRF. Esse, então, é separado da amostra aspirando por meio de seringa e agulha. O PRF injetável permanece líquido cerca de 10 a 15 minutos após a centrifugação. Esse concentrado sanguíneo líquido apresenta maior número de plaquetas e leucócitos em relação aos outros PRFs, possuindo um potencial maior de regeneração (CHOUKROUN; MIRON, 2017), apesar de menor resistência.

Até recentemente, havia consenso que para produção de PRF de matrizes sólidas (membranas), seja de L-PRF, A-PRF ou A-PRF+ deveriam ser utilizados tubos de coleta de vidro e, para produção do PRF injetável (iPRF) deveria ser utilizado tubos de plásticos, sem aditivos. Em 2020, foi proposto o A-PRF líquido (NACOPOULOS, 2017) que possibilita obter-se um PRF injetável, que forma uma malha mais densa que o iPRF, após a polimerização. Nesse protocolo, o PRF é produzido em tubos de vidro, centrifugado a 200g por 5 minutos. Imediatamente após a centrifugação o PRF ainda fluido é aspirado com seringa e agulha. Dessa forma, o PRF líquido de vários tubos pode ser colocado em um recipiente de vidro ou inox para formar uma membrana maior do que as obtidas nos protocolos de L-PRF e A-PRF. Entretanto, a obtenção do PRF líquido é de difícil execução, uma vez que a centrifugação tem que ser iniciada no máximo 2 minutos, após a coleta e, frequentemente, ocorre formação do coágulo dentro dos tubos, impedindo a aspiração do PRF.

Saboia-Dantas et al (2023) propuseram o PRF obtido por centrifugação progressiva em tubos de plástico, sem aditivos, para obtenção de grandes membranas PRF. Nesse protocolo em um tempo total de centrifugação de 15min ocorre aumento progressivo de RCF, iniciando em 60g/5min, seguido de 200g/5min e finalizando com 700g/5min. Finalizada a o tempo de centrifugação, é possível aspirar o conteúdo de vários tubos, dispensando o PRF em cubas de plástico ou inox a fim de acelerar a coagulação. Dessa forma, obtém-se membranas PRF de dimensão e resistência superiores a todos os outros protocolos, além de uma distribuição celular adequada. Esse protocolo progressivo permite a produção de membranas PRF com tamanho e espessura de acordo com a necessidade clínica (SABOIA-DANTAS et al., 2023). (Figura 4)

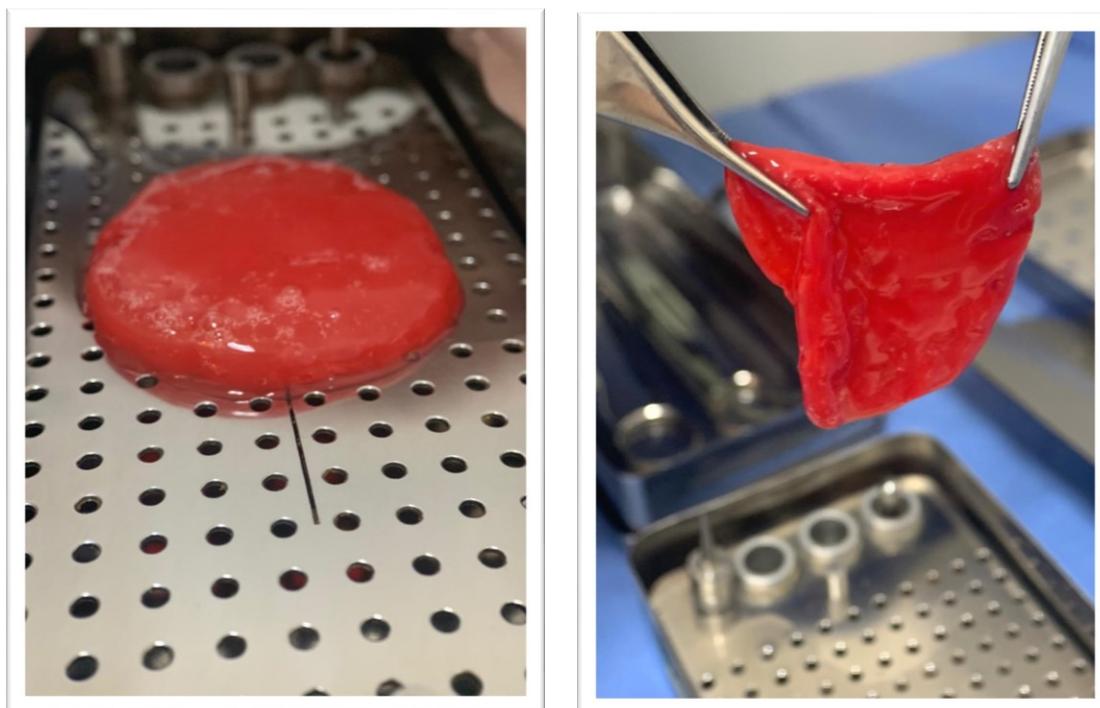


Figura 4: Imagem mostrada coágulo de PRF, após polimerização, obtido por centrifugação em protocolo progressivo (A) e membrana PRF após prensagem em caixa inox (B).

Fonte: Acervo pessoal.

3.5 Tubos de coleta de sangue para produção de PRF

3.5.1 Tubos de vidro

Os protocolos de preparação de membranas de L-PRF, A-PRF e A-PRF+ requerem tubos de vidro simples com a finalidade de ativar a via de coagulação intrínseca formando o coágulo de fibrina, sem o auxílio de qualquer fator de coagulação, durante ou após a coleta do sangue (CHOUKROUN; MIRON, 2017). Ao entrar em contato com a superfície do tubo de vidro, o fator de coagulação XII no plasma pode ser ativado para, conseqüentemente, produzir um coágulo de fibrina por meio da ativação da cascata de coagulação intrínseca. Os grupos silanol carregados negativamente na superfície do vidro são responsáveis pela ativação do fator de coagulação XII (MARGOLIS, 1956).

Em um estudo avaliando os diferentes tipos de força g (200, 400 e 800g) e diferentes tipos de tubos (tubo de vidro puro e tubo de poliestireno com ativador de coágulo SiO₂) na liberação do fator de crescimento endotelial (VEGF) da fibrina rica em plaquetas (PRF) em função do tempo, observou-se que o tubo de vidro

proporcionou maiores concentrações de VEGF liberados em todos os tipos de força empregados, em relação às quantidades obtidas nos tubos de plástico (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Bonazza et al, 2016 ao comparar o efeito de tubos de vidro e plástico na matriz PRF concluiu que os tubos de vidro permitem obter concentrados mais longos e densos, provavelmente devido ao recrutamento de fibrina, o que permite formar uma rede mais extensa aprisionando maior quantidade de plaquetas e leucócitos (BONAZZA et al., 2016).

Um outro estudo, no qual foi utilizado a técnica de imagem *high transmittance of near-infrared* (NIR), observou diferença na distribuição de plaquetas das membranas produzidas em tubos de vidro e plástico com sílica. Enquanto que as plaquetas foram distribuídas homoganeamente nas matrizes de fibrina preparadas com tubo de plástico revestido com sílica, as matrizes de concentrados de fatores de crescimento (CGF) preparadas a partir dos tubos de vidro foram mais concentradas na parte distal do tubo (YAMAGUCHI et al., 2020).

Outro estudo, ao comparar tubos de vidro com tubos revestidos com sílica observou que a centrifugação em alta velocidade concentrou plaquetas na superfície distal dos tubos de vidro. Esse fato deve-se ao fato das células sanguíneas e proteínas presentes no plasma serem deslocadas para a parede distal do tubo durante a centrifugação, sendo a cascata de coagulação ativada. Assim, as fibras de fibrina formadas ao final da cascata são responsáveis pela agregação das plaquetas que se concentram na parede distal do tubo. Já nos tubos de plástico revestidos com sílica, as micropartículas de sílica por serem facilmente destacadas das paredes dos tubos, ficam dispersas na amostra de sangue o que permite a ativação da cascata de coagulação formando fibras de fibrina de forma homogênea na matriz do concentrado (TSUJINO et al., 2019b).

Recentemente, foram produzidos no mercado tubos de vidro revestidos com silicone. Esses tubos de vidro com silicone produzem membranas significativamente menores comparadas às produzidas em vidro sem aditivos e, eventualmente, a coagulação não ocorre (MIRON et al., 2021). O silicone reduz o contato e aderência dos glóbulos vermelhos na parede do tubo, comprometendo o processo de coagulação

3.5.2 Tubos de plástico revestidos com sílica

A descontinuidade na fabricação de tubos de vidro e a oferta limitada motivou a utilização de tubos de plástico revestidos com sílica (Figura 5) para produção da PRF. Essa possibilidade deve-se às propriedades vítreas da sílica, que mimetiza a ação do vidro, o que levou ao emprego comercial desses tubos para o preparo da membrana de PRF. As micropartículas de sílica destacam-se com facilidade da superfície do tubo e podem atuar na ativação da cascata de coagulação de forma mais eficiente que o vidro (TSUJINO et al., 2019b).



Figura 5: Imagem de tubo de plástico revestido com sílica

Fonte: Acervo pessoal.

Embora o uso dos tubos de plástico revestidos com sílica tenha seus benefícios, esses tubos foram criados apenas para teste laboratorial, aprovados por autoridades reguladoras de cada país. Ainda assim, alguns estudos vêm comprovando efeitos negativos desses dispositivos empregados para a preparação dos coágulos de PRF (MIRON et al., 2021; TSUJINO et al., 2019a).

Estudos recentes demonstram que as condições de centrifugação influenciam a composição do PRF e que as partículas de sílica presentes nos tubos de coleta de

plástico revestidos com sílica podem penetrar a matriz de PRF. É possível que essas micropartículas de sílica incorporadas às membranas de PRF possam atuar modificando a distribuição das plaquetas na matriz de PRF, além de serem potencialmente citotóxicas (MASUKI et al., 2020; MIRON et al., 2021; TSUJINO et al., 2019a).

Outro estudo, usando tubos de vidro e tubos de plástico revestidos com sílica, no qual foram empregados centrifugação a baixa e alta velocidade, foram analisadas a distribuição das plaquetas na matriz PRF. Na centrifugação a baixa velocidade as plaquetas se distribuíram homogêaneamente, em ambos os tubos (vidro e plástico). Entretanto, na centrifugação a alta velocidade, as plaquetas distribuíram-se de forma heterogênea concentrando-se mais na superfície da matriz PRF, em tubos de vidro, enquanto nos tubos revestidos com sílica essa distribuição ocorreu de forma menos concentrada. Essa diferença provavelmente ocorre devido a liberação homogênea das micropartículas de sílica responsável pela ativação plaquetária e coagulação difusa dentro do tubo de plástico (TSUJINO et al., 2019b).

De acordo com Masuki et al (2020), as micropartículas de sílica usadas para revestir os tubos de plástico possuem efeitos citotóxicos em células periosteais humanas. Um estudo com micropartículas extraídas dos tubos de plásticos e posteriormente adicionadas a culturas celulares demonstraram que elas foram adsorvidas com elevada afinidade na superfície celular induzindo apoptose das células e reduzindo consideravelmente a proliferação e viabilidade dessas células (MASUKI et al., 2020).

Foi observado que as nanopartículas de sílica (SiNPs) induzem citotoxicidade e respostas inflamatórias em células epiteliais, endoteliais pulmonares e células do hipocampo. As interações entre SiNPs e a superfície celular geram espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, acredita-se que tais efeitos citotóxicos são dependentes do tipo de micropartícula (amorfa ou cristalina), tamanho da partícula, concentração e carga superficial da sílica. Assim, é difícil avaliar como essas partículas influenciarão os tecidos e as células nas regiões de implantação da membrana PRF (CHEN et al., 2018; TSUJINO et al., 2019b).

No sistema imunológico inato ocorre a primeira linha de defesa contra corpos estranhos e materiais particulados, por meio de células efetoras e fatores humorais. Nanopartículas de sílica ao interagirem com células imunocompetentes podem induzir

imunotoxicidade, tendo resultados diferentes a depender de suas características, podendo causar dano celular direto, como apoptose e necrose (CHEN et al., 2018).

As SiNPs são amplamente empregadas em aplicações biomédicas, devido à suas propriedades, e podem interagir com o sistema imunológico de diferentes formas. Essas partículas são facilmente sintetizadas, possuem uma superfície modificável, propriedades químicas resistentes e sua composição química relativamente estática. Existem duas formas básicas de sílica, cristalina e amorfa, as quais diferenciam-se apenas em seus arranjos estruturais. Enquanto a sílica cristalina possui uma estrutura regular, a rede de sílica amorfa é disposta de forma irregular. A sílica cristalina possui várias formas, sendo aquelas com diâmetro entre 2 e 100 nm (mesoporosos) ideais para a liberação controlada de fármacos, devido as suas propriedades que inclui área de superfície elevada, grandes quantidades de poros com tamanhos reguláveis e boa estabilidade química e térmica. Já a sílica amorfa devido à sua biocompatibilidade e estabilidade regulável tem sido amplamente utilizada na odontologia em implantes e preenchimentos dentários (CHEN et al., 2018).

Estudos mostram que a exposição a sílica cristalina induz silicose, estando relacionado também a outras doenças pulmonares (câncer de pulmão, enfisema pulmonar e tuberculose). Além disso, análises sobre a sílica amorfa demonstram que ela tem potencial citotóxico semelhante a sílica cristalina causando efeitos citotóxicos em estudos in vivo e in vitro (CHEN et al., 2018).

Os macrófagos são sensíveis as partículas de sílica amorfa e cristalina após a fagocitose, e uma pequena quantidade de partículas absorvidas são capazes matar essas células (CHEN et al., 2018). A disfunção da autofagia é considerada um potencial mecanismo tóxico dos nanomateriais. Concentrações baixas de SiNPs desencadeiam autofagia que é percebida por marcadores morfológicos e bioquímicos, estes atuam protegendo as células da citotoxicidade. Além disso, estudos mostram que a sílica ao entrar em contato com macrófagos provoca morte celular por ativação da via apoptótica intrínseca (CHEN et al., 2018).

As respostas tóxicas induzidas por partículas de sílica amorfas são específicas das células, essas respostas aumentam de acordo com a concentração de partículas e o tempo de exposição. Sendo o tamanho da SiNPs um parâmetro determinante da sua capacidade de induzir resposta celular. O aumento na quantidade das partículas

de sílica amorfa aumentam a resposta citotóxica induzida e a morte celular (CHEN et al., 2018).

Até o momento, não houve complicações graves em relação ao uso das membranas de PRF produzidas em tubos de plástico revestidos com sílica. Acredita-se que isso se deve à eliminação das partículas de sílica pelo organismo/sistema imune. Porém, o uso desses tubos não se mostra vantajoso, uma vez que, o tamanho do coágulo é reduzido em duas vezes quando comparado ao tamanho dos coágulos produzidos com tubos de vidro puro.

3.5.3 Tubos de plástico sem aditivos

Dois tipos de plástico são geralmente utilizados para fabricar tubos de coleta de sangue, são eles, polipropileno e PET. O PET tem características de ser praticamente inquebrável, já o polipropileno mantém uma melhor barreira líquida. O líquido nos tubos de plástico PET tendem a evaporar (KRATZ; STANGANELLI; VAN COTT, 2006).

Um estudo comparativo utilizando tubos de citrato de vidro (BD Vacutainer de 4,5 mL) e tubos de citrato de plástico (BD Vacutainer Plus de 2,7 mL) não mostraram diferenças significativas entre o vidro e o plástico nos resultados da coagulação. Os tubos de plástico BD Vacutainer Plus são formados por uma camada externa feita de plástico tereftalato de etileno (PET), que é resistente a estilhaços, e uma camada interna constituída de plástico polipropileno. Sendo que a camada interna contém citrato como anticoagulante (KRATZ; STANGANELLI; VAN COTT, 2006).

Os tubos PET por serem constituídos de um material hidrofóbico, retarda a adsorção das proteínas nas superfícies da parede dos tubos, onde inicia-se o processo de coagulação, favorecendo a formação de PRF líquido. Quanto mais hidrofóbico for o material do qual o tubo é formado, maior o tempo de trabalho do líquido (KRATZ; STANGANELLI; VAN COTT, 2006).

Após a centrifugação de amostra de sangue, em um mesmo protocolo, o PRF produzido em tubos de vidro, macroscopicamente, apresenta maior densidade do que o produzido em tubo de plástico sem aditivos (Figura 6). O coágulo de PRF obtido em tubo de vidro é removido com auxílio de pinça, com posterior remoção do coágulo de hemácias. Já o coágulo de PRF obtido em tubo de plástico sem aditivos tem que ser aspirado, com auxílio de seringa e agulha, e dispensado em recipiente de vidro ou inox, para ocorrer a polimerização ideal (Figura 7)

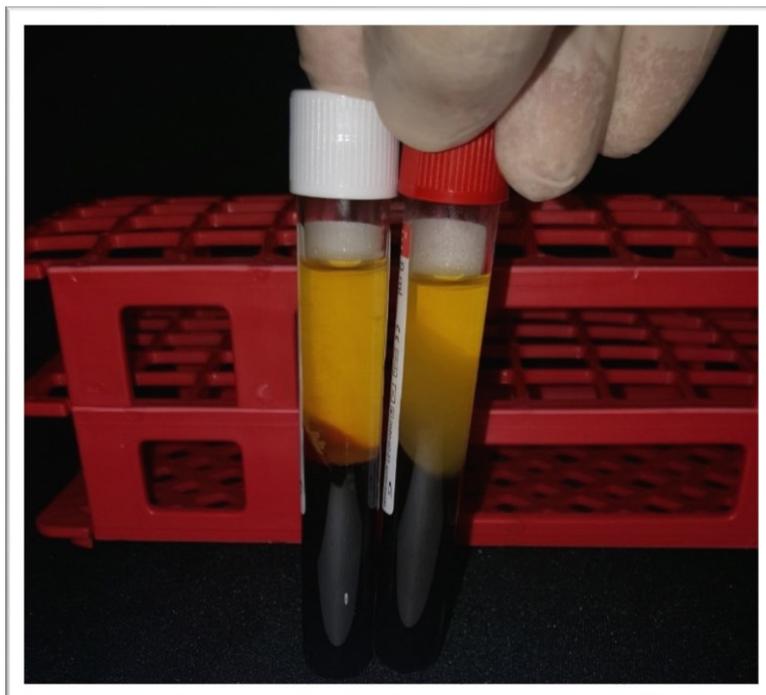


Figura 6: Imagem do aspecto imediato, após a centrifugação em um mesmo protocolo, em um tubo de plástico sem aditivo (tampa branca) e um tubo de vidro (tampa vermelha).

Fonte: Acervo pessoal.

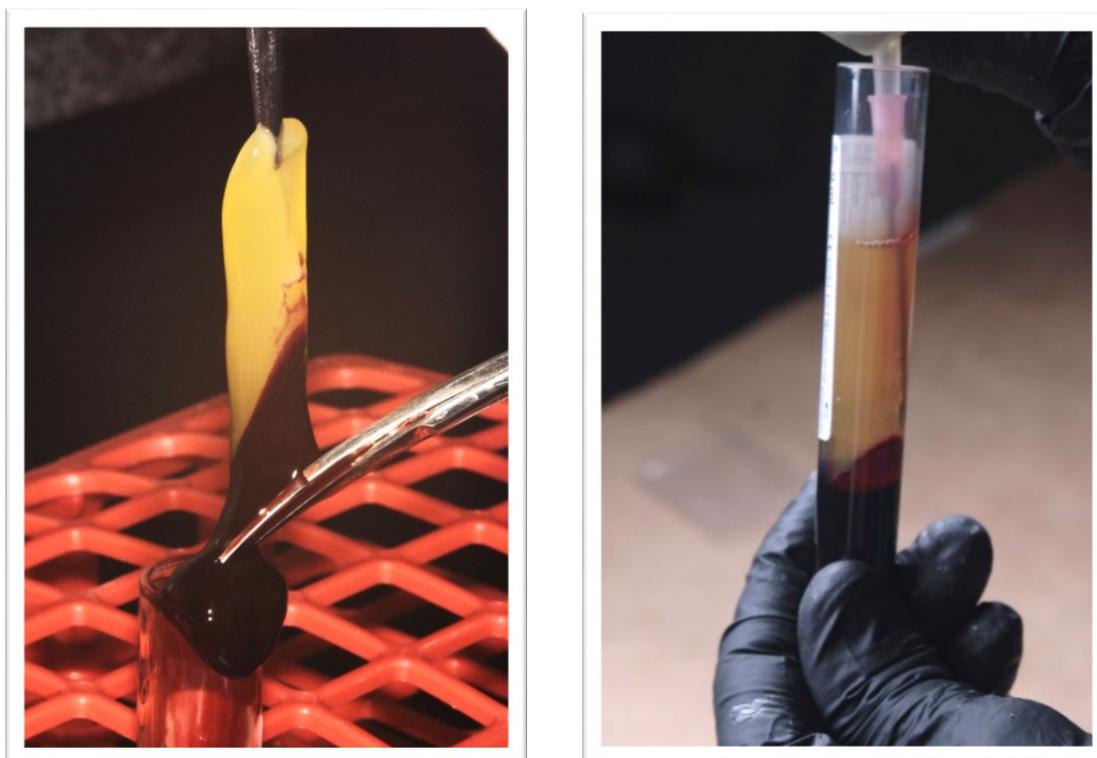


Figura 7: Imagem de coágulo de PRF obtido em tubo de vidro (A) e PRF fluido sendo aspirado, com auxílio de seringa e agulha (B).

Fonte: Acervo pessoal.

3.5.4 Tubos de titânio

A utilização de tubos de titânio para produção de PRF foi proposta como alternativa aos tubos de vidro e plástico revestido com sílica, considerando principalmente a biocompatibilidade do titânio. Nesse estudo, foi observado que a agregação das plaquetas, induzidas pelo titânio, e a formação do coágulo foi semelhante às aquelas observadas em tubos de vidro. As amostras do coágulo obtidas no estudo mostraram uma rede de fibrina bem organizada contínua e integrada sendo observada uma rede de fibrina semelhante com componentes celulares distinguíveis tanto no L-PRF quanto no T-PRF (TUNALI et al., 2014). O método T-PRF baseia-se no fato de que pode ser mais benéfico a obtenção de uma matriz de fibrina utilizando tubos de titânio pelo fato desse material ter boa biocompatibilidade e não ser corrosivo. A membrana gerada em tubos de T-PRF apresenta fibrina rica em plaquetas semelhante ao L-PRF (TUNALI et al., 2014).

Em relação à distribuição celular, membranas produzidas em tubos de titânio, aparentemente, apresentam distribuição celular melhor para linfócitos T, linfócitos B,

plaquetas, neutrófilos, em comparação que L-PRF (BHATTACHARYA et al., 2020). No entanto, o custo da utilização de tubos de titânio, em comparação com tubos de vidro, é uma limitação para a ampla utilização desse método.

3.6 Coleta de sangue, centrífuga e perfil do paciente

Profissionais que utilizam membranas PRF em procedimentos cirúrgicos, frequentemente, observam ampla variação em termos de comprimento, espessura e resistência dessas membranas. Nesse cenário, além do tipo de tubos, emergem dúvidas sobre o impacto da centrifugação, idade e gênero do paciente, entre outros fatores.

O surgimento do PRF motivou fabricantes a desenvolverem centrífugas com diferentes estruturas, entendendo ser esse um fator importante para melhorar a qualidade das membranas de PRF. Atualmente, existem vários tipos de centrífugas para PRF, com variação de tamanho do rotor e angulação (rotor de ângulo fixo ou basculante) (MIRON et al., 2019, 2020b) (Figura 8). Na centrifugação com ângulo variável (basculante), observou-se uma distribuição mais homogênea das células comparada à centrifugação em ângulo reto (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2021). Entretanto, alguns estudos não têm observado alteração nas características das membranas PRF, produzidas em diferentes centrífugas (AL-MAAWI et al., 2022; MIRON et al., 2020a; SATO et al., 2022).



Figura 8: Desenho esquemático comparando centrífuga de ângulo fixo (à esquerda) e basculante (à direita); raio em relação à região média do tubo (r); raio em relação ao fundo do tubo (r_{max}); comprimento do tubo (h).

Fonte: sarstedt.com

Fatores como tamanho de raio e tipos ou tamanhos de caçamba variam de acordo com o tipo de centrífuga (PINTO; QUIRYNEN, 2019), o que pode interferir na separação dos componentes do sangue. As centrífugas apresentam um aumento de vibração durante a progressão da centrifugação, a qual depende da velocidade de rotação. Essa vibração varia de acordo com as características da centrífuga e estabilidade do suporte onde essa está instalada. Assim, centrífuga de mesa pequena e leve apresentará mais vibração e ressonância. O tamanho e largura do coágulo PRF também variam de acordo com a centrífuga, bem como a distribuição celular na membrana (DOHAN EHRENFEST et al., 2018). Também, o tempo de preparo do PRF tem impacto significativo na membrana produzida (CASTRO et al., 2021).

Outro fator a ser considerado na produção de membranas PRF é o tempo aguardado após a centrifugação e prensagem. Estudo de Wei et al (2022) sugeriu que as propriedades físicas das membranas PRF melhoraram quando é aguardado o período de 3 minutos, após a centrifugação, para solidificação completa do coágulo PRF, seguido de compressão por 120 segundos (WEI et al., 2022). Estudo recente demonstrou que o aumento desse intervalo de 60 a 120 segundos reduz significativamente o tamanho das membranas PRF (MIRON et al., 2019a).

A idade e gênero do paciente também interferem na membrana de PRF produzido. Mulheres produzem membranas maiores que homens, independente do intervalo entre coleta e centrifugação. Em relação à idade, os resultados sugeriram que pessoas mais velhas produzem membranas maiores comparadas a pessoas mais jovens (MIRON et al., 2019a).

A manutenção do tubo, com a amostra de sangue, em refrigeração retarda a coagulação, o que é interessante para aumentar o tempo de trabalho na utilização do PRF líquido (MIRON et al., 2022). Preferencialmente, as membranas produzidas devem ser utilizadas logo após seu preparo, para evitar a desintegração das plaquetas e prejuízo na liberação de fatores de crescimento (SNEHA et al., 2022) (Figura 9).



Figura 9: Imagem de sequência para obtenção de membrana PRF. A - coágulos PRF na caixa de inox; B – caixa de inox, durante a prensagem do coágulo; C – membranas produzidas.

Fonte: Acervo pessoal.

Outro fator importante na qualidade do PRF produzido, mas de difícil controle clínico é a condição sistêmica, bem como hábitos do paciente. A formação do coágulo depende do desencadeamento da cascata de coagulação. Assim, a formação do PRF pode ser comprometida em indivíduos com distúrbios de coagulação ou que fazem uso de anticoagulantes. Aparentemente, o PRF em fumantes também pode ser comprometido, pois o tabagismo afeta a ativação plaquetária (SRIRANGARAJAN et al., 2021).

4. Considerações finais

A ampla utilização de concentrados sanguíneos, especialmente o PRF, com objetivo de favorecer o reparo tecidual conduziu a vários estudos, muitas vezes conflitantes em relação à eficácia desses concentrados. Nesse cenário, emergiram questões sobre os fatores que podem interferir, negativamente ou positivamente, na produção de membranas de PRF. Assim, no presente estudo, foram analisados os fatores que interferem nas propriedades físicas e biológicas do PRF. Na literatura consultada, foi observado que essas propriedades variam, principalmente, de acordo com a Força relativa de centrifugação (*RCF-Relative Centrifugal Force*), tempo de centrifugação e o material do tubo utilizado na coleta de sangue, além das características do paciente.

Em relação ao tempo e a força relativa de centrifugação, observou-se que a redução em ambos possibilita a formação de matrizes de fibrina com maior quantidade de leucócitos, plaquetas e fatores de crescimento (VEGF e TGF- γ 1). Esse fato é devido à formação de um coágulo com estrutura mais porosa, com maior espaço entre as fibras de fibrina (CHOUKROUN; GHANAATI, 2017). Esse fato contribui para o aumento da capacidade de reparo tecidual.

Já em relação aos tipos de tubos empregados para a produção das membranas de PRF, os tubos de vidro utilizados nos protocolos de preparação de membranas de L-PRF, A-PRF e A-PRF+ (CHOUKROUN; MIRON, 2017) mostraram possibilitar maior liberação do fator de crescimento VEGF da fibrina rica em plaquetas (PRF) em comparação com os tubos de plástico. Ainda assim, os tubos de vidro permitem a obtenção de concentrados mais longos e densos na matriz PRF, possivelmente, devido ao recrutamento de fibrinas, formando um arcabouço mais extenso, capaz de aprisionar maior quantidade de plaquetas e leucócitos (BONAZZA et al., 2016).

Os tubos de plástico revestido com sílica são capazes de formar fibras de fibrina mais homogêneas na matriz do concentrado, em relação aos tubos de vidro. Isso se deve a maior facilidade das micropartículas de sílica se destacarem da parede do tubo ficando distribuídas de forma dispersa na amostra de sangue (TSUJINO et al., 2019b). Em contrapartida, as partículas de sílica afetam negativamente a sobrevivência e proliferação das células devido ao seu efeito de citotoxicidade (MASUKI et al., 2020; MIRON et al., 2021; TSUJINO et al., 2019a, 2019b).

No que se refere aos tubos de vidro revestidos com silicone, recentemente introduzidos no mercado, produzem membranas significativamente menores quando comparadas àquelas produzidas em tubos de vidro sem aditivos (MIRON et al., 2021). Além disso, o silicone compromete a aderência dos glóbulos vermelhos na parede do tubo, o que compromete a coagulação.

Quanto aos tubos de titânio, os estudos mostram que estes induzem agregação plaquetária semelhante àquelas provocadas pelos tubos de vidro, formando uma rede de fibrina bem estruturada contínua e íntegra (TUNALI et al., 2014). A obtenção da membrana PRF por meio do tubo de titânio (T-PRF) pode ser mais benéfica visto que o titânio possui boa biocompatibilidade além de não ser corrosivo (BHATTACHARYA et al., 2020).

Por fim, no que diz respeito as condições sistêmicas do paciente, a formação do PRF pode ser comprometida em indivíduos com distúrbios de coagulação ou que fazem uso de anticoagulantes, assim como o uso do sangue de pacientes fumantes visto que o tabagismo afeta a ativação plaquetária (SRIRANGARAJAN et al., 2021).

5. Conclusão

A utilização de concentrados sanguíneos PRF representa uma terapia adjuvante importante para melhorar o processo de reparo tecidual. Além de suas propriedades biológicas, essa terapia é de baixo custo e fácil execução, o que a torna muito acessível aos clínicos em geral. Vários fatores interferem na produção de PRF de qualidade, sendo importante que os profissionais conheçam as características de cada protocolo PRF e padronizem sua utilização de acordo com a necessidade clínica.

6. Referências

ALVES, R.; GRIMALT, R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. **Skin Appendage Disorders**, v. 4, n. 1, p. 18–24, jan. 2018.

BHATTACHARYA, H. S. et al. Novel method of determining the periodontal regenerative capacity of T- PRF and L- PRF: An immunohistochemical study. **Dental and Medical Problems**, v. 57, n. 2, p. 137–144, 2020.

BONAZZA, V. et al. How the different material and shape of the blood collection tube influences the Concentrated Growth Factors production. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 12, p. 1173–1178, dez. 2016.

CARUANA, A. et al. From Platelet-Rich Plasma to Advanced Platelet-Rich Fibrin: Biological Achievements and Clinical Advances in Modern Surgery. **European Journal of Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 280–286, maio 2019.

CASTRO, A. B. et al. Impact of g force and timing on the characteristics of platelet-rich fibrin matrices. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6038, 16 mar. 2021.

CHAPPUIS, V.; ARAÚJO, M. G.; BUSER, D. Clinical relevance of dimensional bone and soft tissue alterations post-extraction in esthetic sites. **Periodontology 2000**, v. 73, n. 1, p. 73–83, fev. 2017.

CHEN, L. et al. The toxicity of silica nanoparticles to the immune system. **Nanomedicine (London, England)**, v. 13, n. 15, p. 1939–1962, 1 ago. 2018.

CHOUKROUN, J. et al. Une opprtumnité en paroiimplantologie: Le. **Implantodontie**, v. 42, p. 55–62, 2001.

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 Endodontics**, v. 101, n. 3, p. e56-60, mar. 2006.

CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Introducing the Low-Speed Centrifugation Concept. Em: **Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 33–46.

CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery: Official Publication of the European Trauma Society**, v. 44, n. 1, p. 87–95, fev. 2018.

CHOUKROUN, J.; MIRON, R. J. (EDS.). **Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications**. 1ª edição ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2017.

COURY, A. J. Expediting the transition from replacement medicine to tissue engineering. **Regenerative Biomaterials**, v. 3, n. 2, p. 111–113, jun. 2016.

DAI, R. et al. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 6737345, 2016.

DE 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, p. e0240134, 2020.

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 Endodontics**, v. 101, n. 3, p. e37-44, mar. 2006a.

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 Endodontics**, v. 101, n. 3, p. e45-50, mar. 2006b.

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, abr. 2010.

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, mar. 2018.

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, mar. 2009.

DOS SANTOS, R. F.; ARAÚJO PERES, J. A.; QUEIROZ, M. S. Advances in separation methods for the use of platelet-rich fibrin in tissue repair: an integrative review. **General Dentistry**, v. 71, n. 2, p. 65–69, 2023.

EMING, S. A. et al. [Chronic wounds. Novel approaches in research and therapy]. **Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete**, v. 58, n. 11, p. 939–944, nov. 2007.

FEIGIN, K.; SHOPE, B. Use of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Dentistry and Oral Surgery: Introduction and Review of the Literature. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 109–123, jun. 2019.

FIJNHEER, R. et al. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. **Transfusion**, v. 30, n. 7, p. 634–638, set. 1990.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M. et al. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. **Journal of Periodontology**, v. 88, n. 1, p. 112–121, 2017.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M. et al. Histological comparison of Platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation. **Platelets**, v. 32, n. 3, p. 413–419, 3 abr. 2021.

GIRISH RAO, S. et al. Bone Regeneration in Extraction Sockets with Autologous Platelet Rich Fibrin Gel. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 12, n. 1, p. 11–16, 1 mar. 2013.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, mar. 2010.

HAUSER, F. et al. Clinical and histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study. **Implant Dentistry**, v. 22, n. 3, p. 295–303, jun. 2013.

HOAGLIN, D. R.; LINES, G. K. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, p. 875380, 2013.

HOLINSTAT, M. Normal platelet function. **Cancer metastasis reviews**, v. 36, n. 2, p. 195–198, jun. 2017.

HUANG, J. et al. Tympanic membrane regeneration using platelet-rich fibrin: a systematic review and meta-analysis. **European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery**, v. 279, n. 2, p. 557–565, fev. 2022.

KARIMI, K.; ROCKWELL, H. The Benefits of Platelet-Rich Fibrin. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 331–340, ago. 2019.

KAWASE, T.; MUBARAK, S.; MOURÃO, C. F. The Platelet Concentrates Therapy: From the Biased Past to the Anticipated Future. **Bioengineering (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 3, p. E82, 30 jul. 2020.

KOBAYASHI, E. et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, p. 1–8, 25 jan. 2016.

KRATZ, A.; STANGANELLI, N.; VAN COTT, E. M. A comparison of glass and plastic blood collection tubes for routine and specialized coagulation assays: a comprehensive study. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 130, n. 1, p. 39–44, jan. 2006.

KUBESCH, A. et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. **Platelets**, v. 30, n. 3, p. 329–340, 2019.

LITVINOV, R. I. et al. Fibrinogen and Fibrin. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 96, p. 471–501, 2021.

LUCARELLI, E. et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. **European Cells & Materials**, v. 20, p. 13–23, 1 jul. 2010.

LYNCH, M. D.; BASHIR, S. Applications of platelet-rich plasma in dermatology: A critical appraisal of the literature. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 3, p. 285–289, 2016.

LYRIS, V. et al. Effect of leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) on stability of dental implants. A systematic review and meta-analysis. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, p. S0266- 4356(21)00015–2, 19 jan. 2021.

MARGOLIS, J. Glass surface and blood coagulation. **Nature**, v. 178, n. 4537, p. 805–806, 13 out. 1956.

MASUKI, H. et al. Acute cytotoxic effects of silica microparticles used for coating of plastic blood-collection tubes on human periosteal cells. **Odontology**, v. 108, n. 4, p. 545–552, out. 2020.

MIHAYLOVA, Z. et al. Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 75, n. 1, p. 1–11, jan. 2017.

MIRON, R.; CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Controversies related to scientific report describing g-forces from studies on platelet-rich fibrin: Necessity for standardization of relative centrifugal force values. **International Journal of Growth Factors and Stem Cells in Dentistry**, v. 1, n. 3, p. 80, 9 jan. 2018.

MIRON, R. J. et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 6, p. 1913–1927, 1 jul. 2017.

MIRON, R. J. et al. The effect of age, gender, and time between blood draw and start of centrifugation on the size outcomes of platelet-rich fibrin (PRF) membranes. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 5, p. 2179–2185, maio 2019a.

MIRON, R. J. et al. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 107, n. 10, p. 2257–2271, out. 2019b.

MIRON, R. J. et al. Evaluation of 24 protocols for the production of platelet-rich fibrin. **BMC oral health**, v. 20, n. 1, p. 310, 7 nov. 2020.

MIRON, R. J. et al. A technical note on contamination from PRF tubes containing silica and silicone. **BMC oral health**, v. 21, n. 1, p. 135, 19 mar. 2021.

MIRON, R. J. et al. Extending the working properties of liquid platelet-rich fibrin using chemically modified PET tubes and the Bio-Cool device. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, n. 3, p. 2873–2878, mar. 2022.

MOURÃO, C. F. DE A. B. et al. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. **Revista Do Colegio Brasileiro De Cirurgioes**, v. 42, n. 6, p. 421–423, dez. 2015.

NACOPOULOS, C. Use of Platelet Rich Fibrin in Facial Aesthetics and Rejuvenation. Em: **Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 215–235.

NARENDRAN, N. et al. Autologous platelet-rich fibrin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy-A follow up clinical pilot study. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 30, n. 1, p. 140–145, jan. 2022.

PICHOTANO, E. C. et al. Evaluation of L-PRF combined with deproteinized bovine bone mineral for early implant placement after maxillary sinus augmentation: A randomized clinical trial. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 21, n. 2, p. 253–262, abr. 2019.

PINTO, N.; QUIRYNEN, M. Letter to the editor: RE: Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: Growth factor release, biocompatibility, and cellular response. **Journal of Periodontology**, v. 90, n. 2, p. 119–121, fev. 2019.

ROUWKEMA, J.; KHADEMHOSEINI, A. Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 733–745, set. 2016.

SABOIA-DANTAS, C. J. et al. Utilização dos concentrados sanguíneos de segunda geração para preservação alveolar e aumento de mucosa queratinizada em sítios de exodontia e peri-implantares: a técnica da ferida aberta (open wound technique). In: MAINIERI HENKIN, Vivian Chiada (org.). *Odontologia: da ciência da saúde às ciências humanas e sociais*. Ponta Grossa - PR: Atena, 2021. p. 102-11

SABOIA-DANTAS, C. J. et al. Platelet-Rich Fibrin Progressive Protocol: Third Generation of Blood Concentrates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 81, n. 1, p. 80–87, jan. 2023.

SHASHANK, B.; BHUSHAN, M. Injectable Platelet-Rich Fibrin (PRF): The newest biomaterial and its use in various dermatological conditions in our practice: A case series. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 1421–1426, maio 2021.

SNEHA, K. et al. The G-Force Conundrum in Platelet-Rich Fibrin Generation: Management of a Problem Hidden in Plain Sight. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 150–155, 2022.

SRIRANGARAJAN, S. et al. Does Cigarette Smoking Induce Changes in Biologic and Mechanical Properties of Platelet-Rich Fibrin Membranes? **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 41, n. 6, p. e213–e221, 2021.

THOMAS, M. R.; STOREY, R. F. The role of platelets in inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 114, n. 3, p. 449–458, 31 ago. 2015.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. Angiogenesis in wound healing. **The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 40–46, dez. 2000.

TSUJINO, T. et al. Evidence for Contamination of Silica Microparticles in Advanced Platelet-Rich Fibrin Matrices Prepared Using Silica-Coated Plastic Tubes. **Biomedicines**, v. 7, n. 2, p. 45, 19 jun. 2019a.

TSUJINO, T. et al. Striking Differences in Platelet Distribution between Advanced-Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factors: Effects of Silica-Containing Plastic Tubes. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 10, n. 3, p. E43, 17 set. 2019b.

TUNALI, M. et al. A novel platelet concentrate: titanium-prepared platelet-rich fibrin. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 209548, 2014.

TUNALI, M. et al. Clinical evaluation of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of multiple adjacent gingival recession defects: a 12-month study. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 35, n. 1, p. 105–114, 2015.

VASILIKOS, I. et al. Integrity of dural closure after autologous platelet rich fibrin augmentation: an in vitro study. **Acta Neurochirurgica**, v. 162, n. 4, p. 737–743, abr. 2020.

WEI, Y. et al. The effect of resting and compression time post-centrifugation on the characteristics of platelet rich fibrin (PRF) membranes. **Clinical Oral Investigations**, 22 abr. 2022.

YAMAGUCHI, S. et al. Concentrated Growth Factor Matrices Prepared Using Silica-Coated Plastic Tubes Are Distinguishable From Those Prepared Using Glass Tubes in Platelet Distribution: Application of a Novel Near-Infrared Imaging-Based, Quantitative Technique. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 600, 2020.