



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



LARISSA SANTIAGO COTRIM

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE CONCENTRADO SANGUÍNEO
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA
SINTÉTICA: ESTUDO PILOTO**

UBERLÂNDIA

2023

LARISSA SANTIAGO COTRIM

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE CONCENTRADO SANGUÍNEO
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA
SINTÉTICA: ESTUDO PILOTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Odontologia.

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

Co-orientadora: M^a. Maria Adelia Faleiro Santana Silva

UBERLÂNDIA

2023

LARISSA SANTIAGO COTRIM

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE CONCENTRADO SANGUÍNEO FIBRINÁRICA EM PLAQUETAS (PRF) ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA SINTÉTICA:
ESTUDO PILOTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Odontologia.

Uberlândia, Junho

Banca Examinadora:

Jonas Dantas Batista – Doutorado (FO/UFU)

Paula Caetano Araújo – Doutorado (FO/UFU)

João Lucas Carvalho Paz – Mestre (FO/UFU)

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C845 2023	<p>Cotrim, Larissa Santiago, 1997- AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE CONCENTRADO SANGUÍNEO FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA SINTÉTICA: ESTUDO PILOTO [recurso eletrônico] / Larissa Santiago Cotrim. - 2023.</p> <p>Orientadora: Paula Dechichi Barbar. Coorientadora: Maria Adelia Faleiro Santana Silva. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Odontologia. I. Barbar, Paula Dechichi, 1965-, (Orient.). II. Silva, Maria Adelia Faleiro Santana, 1996- , (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.314</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus por todas as oportunidades concedidas e por sempre orientar meus passos ao longo desta jornada. Além disso, sou grata por ter encontrado tantas pessoas incríveis ao longo do caminho, que têm sido fundamentais para o meu crescimento.

Agradeço de coração aos meus pais e minha família, que tornaram possível a realização desse sonho, mesmo diante de todas as dificuldades.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Paula, que sempre me guiou com dedicação e carinho. Saiba que serei eternamente grata por todas as oportunidades e apoio que me proporcionou. Levarei você como exemplo na minha vida, tanto como profissional quanto como mulher.

Agradeço imensamente à minha coorientadora, Maria Adélia, por toda a paciência, apoio e dedicação. Saiba que você foi essencial para esta jornada e que todo o trabalho realizado despertou em mim uma imensa admiração tanto como pesquisadora quanto como pessoa. Serei sempre grata a você.

À minha banca por ter aceitado prontamente o convite e por ser tão atenciosa.

Agradeço ao meu namorado por todo o apoio durante esta jornada e pelo companheirismo, proporcionando-me momentos de amor, felicidade e tranquilidade.

Aos meus amigos, expresso minha gratidão por todo companheirismo, o material emprestado e pelos momentos que compartilhamos ao longo dessa jornada. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento e para superar as dificuldades. Sou eternamente grata à odontologia por ter me proporcionado a presença de vocês em minha vida.

Agradeço a todos os professores, técnicos e profissionais da Faculdade de Odontologia de Uberlândia, que contribuíram imensamente para o meu aprendizado, de forma humanizada. Tenho uma gratidão eterna por vocês pela profissional que serei.

RESUMO: O concentrado sanguíneo Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) é uma matriz de fibrina autóloga que atua como reservatório de células e fatores de crescimento, relevante na terapia regenerativa tecidual. A biofuncionalização de hidroxiapatita (HA) com PRF, oferece a vantagem de transformar o material sintético, originalmente osteocondutor, em um material histogênico. Entretanto, poucos estudos têm avaliado a relação de proporção entre HA e PRF. O presente estudo teve como objetivo avaliar o padrão de distribuição de partículas de HA associadas a diferentes protocolos de PRF, assim como a relação de proporção PRF/HA. Participaram do estudo 4 indivíduos, que foram submetidos a 3 venopunções em momentos diferentes. Em cada venopunção foram coletados cerca de 48ml de sangue em 6 tubos de plástico sem aditivos, separados em três grupos, de acordo com o protocolo de centrifugação: 700g/12min (L-PRF), 350g/15min (GM350) e centrifugação progressiva de 60g a 700g/15min total (PROPRF). A porção acima das hemácias, nos tubos de mesmo protocolo, foi aspirada e dispensada em recipientes de vidro (5ml) contendo 0,25g de HA. Após a polimerização, os coágulos foram prensados no PRF-box e as membranas foram analisadas por microtomografia computadorizada (micro-CT) quanto à densidade das partículas de HA. Em seguida, as membranas foram incluídas em metacrilato e analisadas ao microscópio de luz (ML) para análise histomorfométrica. Não houve diferença significativa na densidade ($P = 0,579$) e relação de proporção ($P = 0,132$) de HA, entre os grupos. Considerando a metodologia utilizada e os protocolos avaliados, o padrão de distribuição de partículas de HA na biofuncionalização com PRF foi semelhante para os diferentes protocolos. Estudos adicionais são necessários para examinar o grau de ligação e contato na área de superfície da hidroxiapatita.

Palavras-chave: Biomateriais; Plaquetas sanguíneas; Centrifugação; Fibrina Rica em Plaquetas; Medicina regenerativa

ABSTRACT: Platelet-Rich Fibrin (PRF) is an autologous fibrin matrix that acts as a reservoir for cells and growth factors, which is relevant in tissue regenerative therapy. The biofunctionalization of hydroxyapatite (HA) with PRF offers the advantage of transforming the originally osteoconductive synthetic material into a histogenic material. However, few studies have evaluated the ratio relationship between HA and PRF. The present study aimed to evaluate the pattern of distribution of HA particles associated with different PRF protocols, as well as the PRF/HA ratio. Four individuals participated in the study, undergoing 3 venipunctures at different time points. Approximately 48ml of blood were collected in 6 plastic tubes without additives during each venipuncture, separated into three groups according to the centrifugation protocol: 700g/12min (L-PRF), 350g/15min (GM350), and progressive centrifugation from 60g to 700g/15min (PROPRF). The portion above the red blood cells in tubes of the same protocol was aspirated and dispensed into glass containers (5ml) containing 0.25g of HA. After polymerization, the clots were compressed in the PRF-box, and the membranes were analyzed by micro-computed tomography (micro-CT) for the density of HA particles. Subsequently, the membranes were embedded in methacrylate and analyzed under a light microscope (LM) for histomorphometric analysis. There was no significant difference in density ($P = 0.579$) and ratio ($P = 0.132$) of HA among the groups. Considering the methodology used and the evaluated protocols, the pattern of distribution of HA particles in the biofunctionalization with PRF was similar for the different protocols. Additional studies are needed to examine the degree of binding and contact in the surface area of hydroxyapatite.

Keywords: Biomaterials; Blood platelets; Centrifugation; Platelet-Rich Fibrin; Regenerative medicine

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PRF Fibrina Rica em Plaquetas (Platelet-Rich Fibrin)

HA Hidroxiapatita Sintética (Synthetic Hydroxyapatite)

Micro-CT Microtomografia computadorizada (Computed Microtomography)

ML Microscopia de luz (Light Microscopy)

PRP Plasma Rico em Plaquetas (Platelet-Rich Plasma)

TGF- β 1 Fator de Crescimento de Transformação Beta 1 (Transforming Growth Factor Beta 1)

PDGF Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (Platelet-derived Growth Factor)

VEGF Fator de Crescimento Vascular Endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor)

RCF Força de Centrifugação Relativa (Relative Centrifugation Force)

LSCC Conceito de Centrifugação de Baixa Velocidade (Low-Speed Centrifugation Concept)

CEP-UFU Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
METODOLOGIA	15
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

A busca por estratégias de reparo tecidual, que ofereçam resultados satisfatórios quanto a morfologia e função de tecidos lesionados, tem sido um tema recorrente no meio científico. Com o avanço da medicina regenerativa, técnicas, materiais e tecnologias inovadoras estão sendo desenvolvidos e aperfeiçoados para potencializar o reparo de tecidos moles e duros (DUTTA *et al.*, 2016). Especialmente em relação ao tecido ósseo, enxertos autógenos, alógenos, xenógenos, aloplásticos (ZHAO *et al.*, 2021) e fatores de crescimento (DANTAS *et al.*, 2011) são alternativas de escolha frequente. Entre as características preconizadas em substitutos ósseos destacam-se: biocompatibilidade, suprimento ilimitado sem prejuízo ao sítio doador e estímulo à osteogênese, osteocondução e osteoindução. Contudo, na literatura científica ainda não foi estabelecido um material que reúna todos os atributos desejados, sendo o osso autógeno o mais próximo desse ideal (CHENCHEV *et al.*, 2017).

O enxerto autógeno, padrão ouro na terapia regenerativa, une características essenciais de biocompatibilidade e propriedades osteogênicas (CHENCHEV *et al.*, 2017). Enquanto estimula o recrutamento e a diferenciação de células-tronco hospedeiras em osteoblastos, o enxerto autógeno também atua como suporte e permite que as células ósseas proliferem. Entretanto, a disponibilidade limitada de tecido ósseo a ser ofertado, o potencial risco de infecção e complicações operatórias (ESPOSITO *et al.*, 2010), como danos aos nervos e estruturas locais (RAGHOEBAR *et al.*, 2007), são fatores limitantes como produto ideal de enxertia.

Os enxertos alógenos, provenientes de indivíduos da mesma espécie, possibilitam o fornecimento de grandes volumes de tecido sem o comprometimento da área doadora, reduzindo a morbidade cirúrgica e o tempo de trabalho (PEREIRA, 2010).

Apesar de exibir propriedades osteocondutoras, o potencial risco de transmissão de doenças, como hepatite e HIV (SPIN-NETO *et al.*, 2013), e resposta imunogênica (ZHAO *et al.*, 2021), são desvantagens que influenciam na escolha do material. Em contrapartida, os xenoenxertos são derivados de espécies diferentes, geralmente de origem bovina, com propriedades osteocondutoras (ZHAO *et al.*, 2021) e biocompatíveis com o hospedeiro. Entretanto, a possibilidade de rejeição tecidual, transmissão de doenças (PRECHEUR., 2007) e infecções no sítio cirúrgico (PINTO *et al.*, 2007) são limitações a serem consideradas.

Os materiais sintéticos ou aloplásticos foram desenvolvidos com o intuito de reduzir a incompatibilidade imunológica e a morbidade dos demais materiais de enxertia. Além disso, apresentam propriedades osteocondutoras (ZHAO *et al.*, 2021), são de fácil manipulação e de dimensões personalizáveis, o que possibilita a redução do tempo cirúrgico. No entanto, o risco de contaminação e infecção da área enxertada pode levar à necessidade de novas intervenções cirúrgicas (PINTO *et al.*, 2007).

A hidroxiapatita (HA), em sua forma natural ou sintética, é amplamente utilizada no âmbito odontológico, dentre os materiais aloplásticos disponíveis. A apatita osteocondutora promove a neoformação óssea através da infiltração de células osteoprogenitoras (GASSLING *et al.*, 2010), sem induzir reações alérgicas no hospedeiro, devido à ausência de componentes orgânicos em sua composição (SHIVASHANKAR *et al.*, 2013). Além disso, a HA pode ser combinada com diversos biomateriais, como os concentrados sanguíneos, com o propósito de potencializar o efeito regenerativo. Entre os concentrados sanguíneos utilizados na medicina regenerativa, destacam-se o plasma rico em plaquetas (PRP) e o fibrina rica em plaquetas (PRF).

O PRP, concentrado sanguíneo de primeira geração, é obtido por meio de dupla centrifugação do sangue, com adição de anticoagulantes e ativadores da coagulação (ALBANESE *et al.*, 2013). No entanto, a possibilidade de resposta imunológica devido a associação de aditivos como trombina bovina e cloreto de cálcio no processo de gelificação do concentrado (DOHAN *et al.*, 2006) e o processamento em várias etapas, levou ao desenvolvimento de uma tecnologia de segunda geração livre de agentes exógenos e de confecção simplificada.

O PRF, proposto por Choukroun em 2001, como a segunda geração de concentrados sanguíneos, é uma matriz autóloga de fibrina com propriedades regenerativas aplicada em diversas áreas, como implantodontia, cirurgia maxilofacial, periodontia, endodontia, entre outras.

O PRF é composto por uma matriz autóloga de fibrina que retém quantidade significativa de plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento, incluindo: fator de crescimento de transformação beta 1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2009). A centrifugação resulta na formação de uma rede tridimensional de fibrina mais flexível e elástica que promove o recrutamento de citocinas endógenas e a migração de células-tronco circulantes (DOHAN *et al.*, 2006). O método de produção é baseado na centrifugação simples do sangue em tubos de vidro, cuja superfície de contato estimula a ativação da cascata de coagulação. Após a centrifugação, o conteúdo acelular plasmático rico em fibrinogênio permanece disperso na porção superior do tubo, enquanto o coágulo de fibrina estruturado permanece na porção intermediária e, por fim, os glóbulos vermelhos permanecem no segmento inferior do tubo de coleta (DOHAN *et al.*, 2006).

Ao longo dos anos, a redução da força de centrifugação relativa (RCF) e variações do tempo de centrifugação levaram à otimização biológica e físico-química do protocolo clássico, Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (LPRF; 700g/12min) (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2009). O conceito de centrifugação de baixa velocidade (LSCC) (CHOUKROUN *et al.*, 2018). impulsionou a execução de protocolos com densidade reduzida da rede de fibrina e, conseqüentemente, maior quantidade de células retidas e liberação de fatores de crescimento aperfeiçoada, como o PRF Avançado (A-PRF; 200g/14min) e o PRF Avançado+ (A-PRF+; 200g/8min) (GAHNAATI *et al.*, 2014; FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2016). Foi desenvolvida ainda uma formulação fluida, o PRF injetável (i-PRF; 60g/5min), produzido em tubos de plástico (MIRON *et al.*, 2017).

Recentemente, foi introduzida a terceira geração de concentrados sanguíneos, baseada em um protocolo progressivo de centrifugação. O PRF Progressivo (PROPRF; 60g/5min, 200g/5 min e 700g/5min) (SABOIA-DANTAS *et al.*, 2022), é preparado em tubos de plástico sem aditivos e inicialmente obtido em forma fluida. Após a polimerização por contato em uma superfície vítrea, o coágulo é prensado para que membranas sejam obtidas. Além de resistência à tração superior e possibilidade de controle dimensional da membrana, biomateriais podem ser facilmente incorporados (SABOIA-DANTAS *et al.*, 2022).

A utilização de produtos biológicos autólogos para a biofuncionalização de materiais sintéticos desperta grande interesse clínico, uma vez que essa abordagem oferece a possibilidade de aumentar o efeito regenerativo local (AL-MAAWI *et al.* 2019; ALL-MAAWI; BLATT *et al.*, 2021). A associação entre HA e Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) apresenta resultados clínicos satisfatórios, com melhora do quadro pós

operatório, ausência de infecções e reparo adequado de tecidos moles (SILVA *et al.*, 2020). A incorporação do PRF a um enxerto aloplástico oferece a vantagem de transformar o material sintético, originalmente osteocondutor, em um material histogênico (TIWARI *et al.*, 2020). Entretanto, poucos estudos têm avaliado a relação de proporção entre HA e PRF. Portanto, o presente estudo tem como objetivo analisar o padrão de distribuição de partículas de HA associadas a diferentes protocolos de PRF e a relação de proporção PRF/HA, por meio de microscopia de luz (ML) e microtomografia computadorizada (micro-CT).

2. METODOLOGIA

2.1. Delineamento experimental

Participaram do estudo 4 indivíduos saudáveis, conforme os critérios de inclusão e exclusão definidos para coleta de sangue. Considerou-se critérios de inclusão: não ter feito uso de anti-inflamatórios, medicação anticoagulante ou antibióticos nos 3 meses anteriores ao estudo, não estar em período de gestação ou lactação, não apresentar história de doença periodontal ou qualquer infecção sistêmica ativa e não ser fumante. Os critérios de exclusão envolvem o uso de anti-inflamatórios, medicação anticoagulante ou antibióticos nos 3 meses anteriores ao estudo, gestação ou lactação, história de doença periodontal ou infecções sistêmicas ativa e fumantes.

Após aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFU) e mediante leitura e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram realizadas coletas de sangue em cada voluntário (CAAE: 51136121.0.0000.5152). Em cada venopunção, foram coletados 48ml de sangue, distribuídos em 6 tubos de plástico sem aditivos, sendo 2 centrifugados a 700g/12min (LPRF), 2 centrifugados a 350g/15min (GM350) e 2 em centrifugação progressiva (60g/5min, 200g/5min e

700g5min - PROPRF). O início da centrifugação (Spinlab®/ Spin 5000-8) ocorreu no período máximo 3 minutos após o início da coleta.

2.2. Obtenção e preparo dos concentrados sanguíneos

Após a centrifugação, a porção acima das hemácias, nos tubos de mesmo protocolo, foi aspirada com auxílio de agulha e seringa (~4ml) e dispensada em recipientes de vidro contendo 0,25g de HA (Alobone poros, Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil) (PRF-Block - Figura 1). Aguardou-se o período de 30 minutos para completa polimerização. Em seguida, os coágulos foram prensados no dispositivo PRF-box e as membranas produzidas foram processadas para análise ao microscópio de luz.

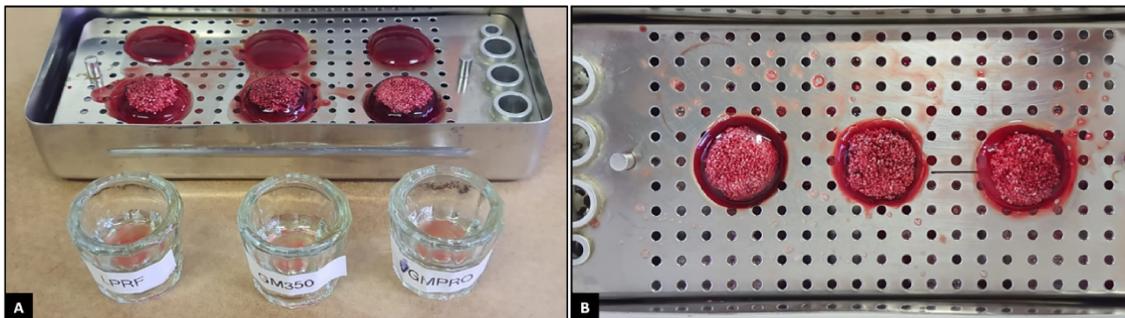


Figura 1. Preparo dos concentrados sanguíneos: 5ml da porção acima das hemácias de cada protocolo (LPRF, GM350 e PROPRF) foram dispensados em recipientes de vidro e combinados a hidroxiapatita sintética (A). PRF-Block obtido após polimerização (B).

2.3. Análise por microtomografia computadorizada

As membranas foram posicionadas em um dispositivo padrão e escaneadas em sua totalidade no Scanner Micro-CT de alta resolução SkyScan 1272 (Bruker, Kontich, Bélgica). Utilizou-se energia de 70kV com resolução de 16 μ m e filtro de alumínio (0,5mm). O cálculo da porcentagem de partículas do volume total (densidade) foi realizado no software CT Analyzer (Bruker, Kontich, Bélgica).

2.4. Análise histomorfométrica

Para análise histomorfométrica da relação de proporção PRF x HA, as membranas foram fixadas em Karnovsky modificado (formaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1M e glutaraldeído a 0,1%) durante 24h. Em seguida, as amostras foram processadas para inclusão em metacrilato e cortes com cerca de 100 μ m de espessura foram obtidos em cortadeira de alta precisão ISOMET 1000 (Buehler, São Paulo, São Paulo, Brasil). Os cortes foram corados em azul de toluidina e avaliados ao ML, considerando a área (porcentagem - %) ocupada pelo concentrado sanguíneo e pelas partículas de HA. As imagens histológicas foram visualizadas utilizando o programa Aperio ImageScope (Copyright © Aperio Technologiches, Inc.2003-2014. All Rights Reserved) e convertidas para formato TIFF, de forma a possibilitar a análise pelo software ImageJ (versão 1.52a) (Figura 2).



Figura 2. Análise histomorfométrica: região extraída de corte histológico longitudinal de membrana de PRF, após binarização (A), execução do threshold (B) e análise da porcentagem de hidroxiapatita (C).

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade, apresentando distribuição paramétrica, e submetidos ao teste One Way Analysis of Variance. A diferença estatística foi considerada significativa quando $\alpha < 0,05$.

3. RESULTADOS

Na análise por micro-CT não foram observadas diferenças estatísticas em relação à densidade de HA entre os protocolos LPRF ($37,95 \pm 0,40$), GM350 ($39,13 \pm 2,29$) e PROPRF ($34,62 \pm 4,05$; $p=0,132$) (Figura 3).

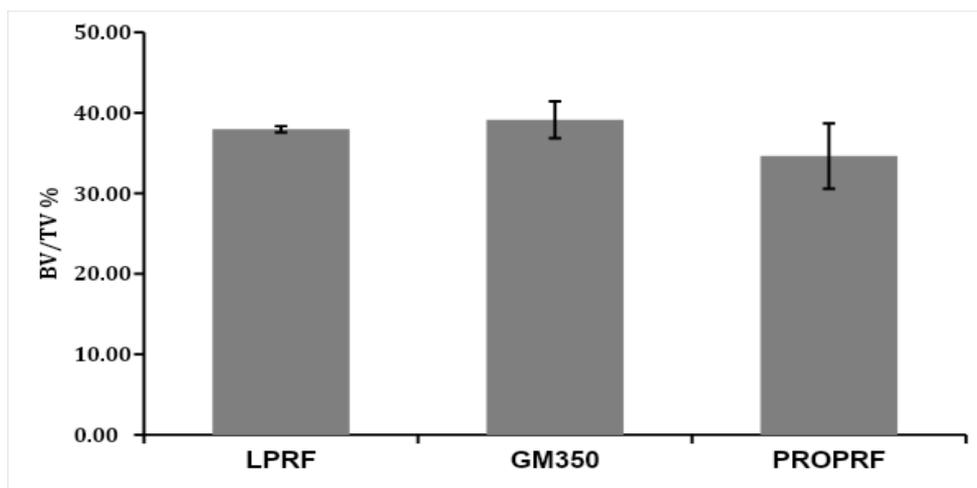


Figura 3. Densidade de hidroxiapatita sintética em relação ao volume total do PRF-Block, para diferentes protocolos: Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (LPRF), Grande Membrana (GM350) e PRF Progressivo (PROPRF).

Na análise histomorfométrica não foram observadas diferenças estatísticas em relação à porcentagem de HA entre os protocolos LPRF ($37,31 \pm 4,08$), GM350 ($40,58 \pm 8,00$) e PROPRF ($40,30 \pm 5,83$; $p=0,579$) (Figura 4).

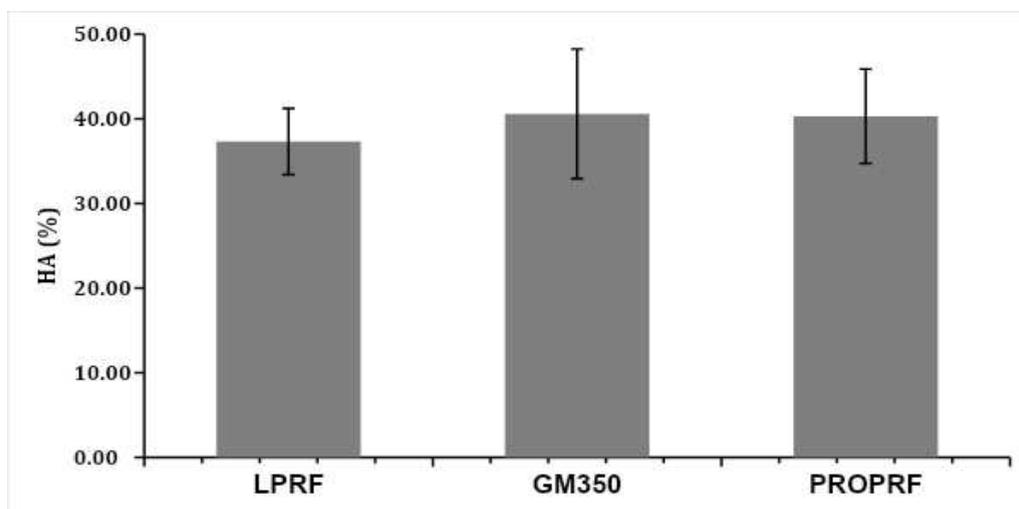


Figura 4. Porcentagem de hidroxiapatita sintética no PRF-Block, para diferentes protocolos: Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (LPRF), Grande Membrana (GM350) e PRF Progressivo (PROPRF).

4. DISCUSSÃO

Abordagens com o intuito de alcançar resultados morfológicos e funcionais satisfatórios no reparo tecidual tem impulsionado a busca por biomateriais com potencial histogênico adicional, especialmente quando associados a enxertos sintéticos. A adição de PRF a HA confere ao enxerto aloplástico, primariamente osteocondutor (GASSLING *et al.*, 2010), potencial histogênico e indutor, amplificando o efeito regenerador (AHMED *et al.*, 2008).

Entretanto, a literatura é conflitante quanto à biofuncionalização de diferentes materiais sintéticos com PRF. Estudos relatam o efeito positivo da associação entre PRF e HA, com aumento considerável da contagem de osteoblastos e redução da atividade osteoclástica (IHASYIMI *et al.*, 2018), neoformação óssea aumentada e acelerada (NACOPOULOS, ACAR *et al.*, 2014; DEENADAYALAN *et al.*, 2015; PRADEEP *et al.*, 2017; AL-AHMADY *et al.*, 2018). Benefícios foram observados em tratamentos complexos de defeitos periodontais (RASTOGI *et al.*, 2011), lesões periapicais (HIREMATH *et al.*, 2014) e defeitos intraósseos de lesões de furca (SALARIA *et al.*, 2018). No entanto, a combinação com enxertos aloplásticos pode não apresentar efeito significativo na regeneração óssea (YOON *et al.*, 2014), sendo escasso em literatura dados pré-clínicos e clínicos (KYYAK *et al.*, 2020).

O protocolo de terceira geração para produção de PRF incorpora o conceito de centrifugação progressiva, o qual possibilita a polimerização lenta e gradual das

moléculas de fibrina, com aumento significativo na quantidade de interações químicas (SABOIA-DANTAS *et al.*, 2022), o que pode impulsionar a infiltração e retenção de materiais sintéticos, como a HA.

No presente estudo, a relação de proporção de partículas de HA na biofuncionalização com PRF foi semelhante para os diferentes protocolos. Este resultado é devido, provavelmente, aos critérios de padronização utilizados na metodologia do estudo, em relação à quantidade de biomaterial empregada. Contudo, é importante ressaltar que investigações adicionais são necessárias para avaliar a qualidade da ligação de contato entre PRF e HA, no que diz respeito à sua durabilidade e potencial influência no processo de regeneração tecidual a longo prazo.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os protocolos avaliados e a metodologia adotada no presente estudo, a biofuncionalização de partículas de HA com PRF ocorre em proporções semelhantes. Entretanto, investigações complementares são necessárias para avaliar o grau de ligação e contato na área de superfície da HA.

6. REFERÊNCIAS

Acar AH, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem NF, Altundag Kahraman S. **Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium.** Arch Oral Biol. 2015;60(4):606-614. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.09.017

Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. **Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications.** Tissue Eng Part B Rev. 2008;14(2):199-215. doi:10.1089/ten.teb.2007.0435

Al-Ahmady HH, Abd Elazeem AF, Bellah Ahmed NE, et al. **Combining autologous bone marrow mononuclear cells seeded on collagen sponge with Nano Hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin: Reporting a novel strategy for alveolar cleft bone regeneration.** J Craniomaxillofac Surg. 2018;46(9):1593-1600. doi:10.1016/j.jcms.2018.05.049

Al-Maawi S, Dohle E, Lim J, et al. **Biologization of Pcl-Mesh Using Platelet Rich Fibrin (Prf) Enhances Its Regenerative Potential In Vitro.** Int J Mol Sci. 2021;22(4):2159. Published 2021 Feb 22. doi:10.3390/ijms22042159

Al-Maawi S, Herrera-Vizcaíno C, Orłowska A, et al. **Biologization of Collagen-Based Biomaterials Using Liquid-Platelet-Rich Fibrin: New Insights into Clinically Applicable Tissue Engineering.** Materials (Basel). 2019;12(23):3993. Published 2019 Dec 2. doi:10.3390/ma12233993

Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. **Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration.** Immun Ageing. 2013;10(1):23. Published 2013 Jun 13. doi:10.1186/1742-4933-10-23

Alhasyimi AA, Pudyani PP, Asmara W, Ana ID. **Enhancement of post-orthodontic tooth stability by carbonated hydroxyapatite-incorporated advanced platelet-rich fibrin in rabbits.** *Orthod Craniofac Res.* 2018;21(2):112-118. doi:10.1111/ocr.12224

Blatt S, Thiem DGE, Kyyak S, Pabst A, Al-Nawas B, Kämmerer PW. **Possible Implications for Improved Osteogenesis? The Combination of Platelet-Rich Fibrin With Different Bone Substitute Materials.** *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:640053. Published 2021 Mar 16. doi:10.3389/fbioe.2021.640053

Chenchev IL, Ivanova VV, Neychev DZ, Cholakova RB. **Application of Platelet-Rich Fibrin and Injectable Platelet-Rich Fibrin in Combination of Bone Substitute Material for Alveolar Ridge Augmentation - a Case Report.** *Folia Med (Plovdiv).* 2017;59(3):362-366. doi:10.1515/folmed-2017-0044

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.** *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(1):87-95. doi:10.1007/s00068-017-0767-9

Dantas T, Lelis E, Naves L, Neto A, Magalhães D. **Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia.** *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.*

Deenadayalan E , Kumar A, Tewari RK, Mishra SK, Iftekhar H. **Management of large preiapical lesion with the combination of second generation platelet extract and hydroxyapatite bone graft: a report of three cases.** *J Clin Diagn Res.* 2015;9(1):ZD24-ZD27. doi:10.7860/JCDR/2015/10885.5482

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, 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. 2006;101(3):e37-e44. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008

Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. **Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies.** Growth Factors. 2009;27(1):63-69. doi:10.1080/08977190802636713

Dutta SR, Passi D, Singh P, Sharma S, Singh M, Srivastava D. **A randomized comparative prospective study of platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and hydroxyapatite as a graft material for mandibular third molar extraction socket healing.** Natl J Maxillofac Surg. 2016;7(1):45-51. doi:10.4103/0975-5950.196124

Esposito M, Grusovin MG, Rees J, et al. **Effectiveness of sinus lift procedures for dental implant rehabilitation: a Cochrane systematic review.** Eur J Oral Implantol. 2010;3(1):7-26.

Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. **Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response.** J Periodontol. 2017;88(1):112-121. doi:10.1902/jop.2016.160443.

Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Açil Y, Wiltfang J, Becker ST. **Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering.** Clin Oral Implants Res. 2010;21(5):543-549. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01900.x

Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, et al. **Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells.** J Oral Implantol. 2014;40(6):679-689. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00138

Hiremath H, Motiwala T, Jain P, Kulkarni S. **Use of second-generation platelet concentrate (platelet-rich fibrin) and hydroxyapatite in the management of large periapical inflammatory lesion: a computed tomography scan analysis.** Indian J Dent Res. 2014;25(4):517-520. doi:10.4103/0970-9290.142556

Kyyak S, Blatt S, Pabst A, Thiem D, Al-Nawas B, Kämmerer PW. **Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin - A comparative in vitro study.** J Biomater Appl. 2020;35(1):83-96. doi:10.1177/0885328220914407

Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. **Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry?.** Clin Oral Investig. 2017;21(8):2619-2627. doi:10.1007/s00784-017-2063-9

Nacopoulos C, Dontas I, Lelovas P, et al. **Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft.** J Craniofac Surg. 2014;25(6):2164-2168. doi:10.1097/SCS.0000000000001172

Pereira, D.M. **Utilização de enxerto alógeno na elevação do seio maxilar: Revisão narrativa.** Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde, 2017

Pinto JGS, Ciprandi MTO, Aguiar RC, Lima PVP, Hernandez PAG, Silva Júnior AN. **Autogenous bone graft x biomaterials in the treatment of facial fractures and deformities – a review of current concepts.** RFO UPF. 2007; 12(3):79-84 doi: 10.5335/rfo.v12i3.1053.

Pradeep AR, Bajaj P, Rao NS, Agarwal E, Naik SB. **Platelet-Rich Fibrin Combined With a Porous Hydroxyapatite Graft for the Treatment of 3-Wall Intrabony Defects in Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial.** J

Periodontol. 2017;88(12):1288-1296. doi:10.1902/jop.2012.110722

Precheur HV. **Bone graft materials.** Dent Clin North Am. 2007;51(3):729-viii. doi:10.1016/j.cden.2007.03.004

Raghoobar GM, Meijndert L, Kalk WW, Vissink A. **Morbidity of mandibular bone harvesting: a comparative study.** Int J Oral Maxillofac Implants. 2007;22(3):359-365.

Rastogi P, Saini H, Singhal R, Dixit J. **Periodontal regeneration in deep intrabony periodontal defect using hydroxyapatite particles with platelet rich fibrin membrane-a case report.** J Oral Biol Craniofac Res. 2011;1(1):41-43. doi:10.1016/S2212-4268(11)60010-9

Saboia-Dantas CJ, Limirio PHJO, Costa MDMA, et al. **Platelet-Rich Fibrin Progressive Protocol: Third Generation of Blood Concentrates.** J Oral Maxillofac Surg. 2023;81(1):80-87. doi:10.1016/j.joms.2022.09.002

Salaria SK, Ghuman SK, Kumar S, Sharma G. **Management of localized advance loss of periodontal support associated Grade II furcation and intrabony defect in chronic periodontitis patient through amalgamation of platelet-rich fibrin and hydroxyapatite bioactive glass composite granules.** Contemp Clin Dent. 2016;7(3):405-408. doi:10.4103/0976-237X.188580

Shivashankar VY, Johns DA, Vidyanath S, Sam G. **Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large**

inflammatory periapical lesion. J Conserv Dent. 2013;16(3):261-264.
doi:10.4103/0972-0707.111329

Silva, J. M. A., de Carvalho, M. M. M., dos Santos, M. O. S., Júnior, B. C., & Souza, A. S. (2020). **L-PRF AND I-PRF associated with hydroxiapatite as grafting material in the reconstruction of alveolar bone in anterior region of the maxilla: case report.** Brazilian Journal of Health Review, 3(1), 605-612. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n1-048>

Spin-Neto R, Stavropoulos A, Dias Pereira LA, Marcantonio E Jr, Wenzel A. **Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation.** A CBCT-based analysis. Clin Oral Implants Res. 2013;24(2):167-173.
doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02324.x

Tiwari UO, Chandra R, Tripathi S, Jain J, Jaiswal S, Tiwari RK. **Comparative analysis of platelet-rich fibrin, platelet-rich fibrin with hydroxyapatite and platelet-rich fibrin with alendronate in bone regeneration: A cone-beam computed tomography analysis.** J Conserv Dent. 2020;23(4):348-353. doi:10.4103/JCD.JCD_228_20

Yoon JS, Lee SH, Yoon HJ. **The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects.** J Craniomaxillofac Surg. 2014;42(7):1071-1077.
doi:10.1016/j.jcms.2014.01.034

Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. **Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments.** Molecules. 2021;26(10):3007. Published 2021 May 18.
doi:10.3390/molecules26103007