

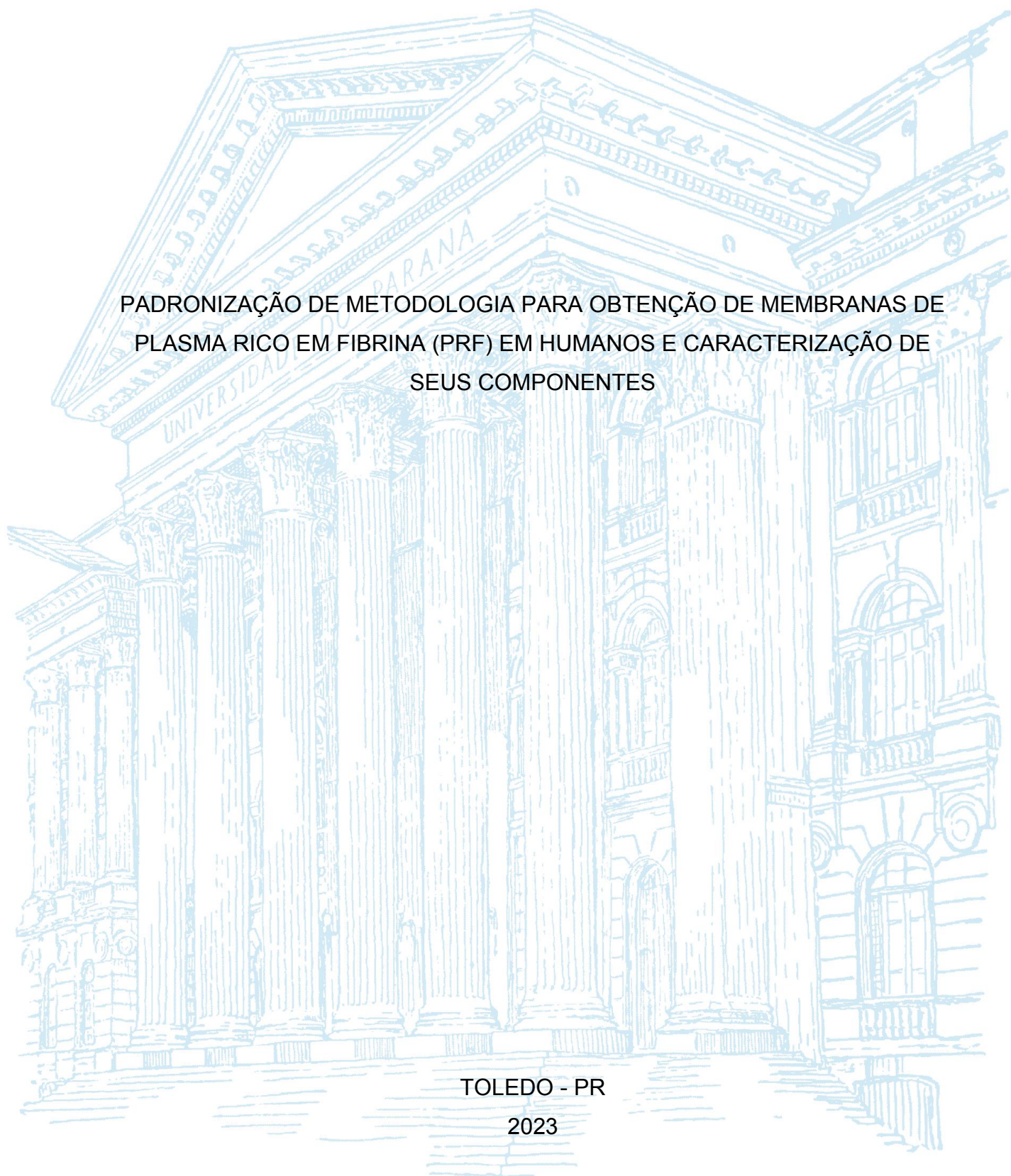
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA ISABELA BACARIN

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE
PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF) EM HUMANOS E CARACTERIZAÇÃO DE
SEUS COMPONENTES

TOLEDO - PR

2023



LUANA ISABELA BACARIN

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE
PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF) EM HUMANOS E CARACTERIZAÇÃO DE
SEUS COMPONENTES

Trabalho de Curso apresentado ao curso de
Medicina, Campus Toledo da Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carla Zarpelon
Schutz

Coorientadora: Profa. Dra. Kádima Nayara
Teixeira

TOLEDO - PR

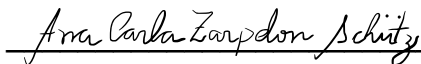
2023

TERMO DE APROVAÇÃO

LUANA ISABELA BACARIN

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF) EM HUMANOS E CARACTERIZAÇÃO DE SEUS COMPONENTES

TRABALHO DE CURSO APRESENTADO AO CURSO DE MEDICINA, CAMPUS TOLEDO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHAREL EM MEDICINA.



Prof(a). Dr(a). Ana Carla Zarpelon Schutz

Orientador(a) – Departamento Medicina, UFPR

Prof(a). Dr(a). Heloísa Deola Confortim

Departamento Medicina, UFPR

Prof(a). Vitória Ceni Silva

Departamento Medicina, UFPR

Toledo PR, 16 de maio de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas professoras, Ana Carla e Kádima, por terem me dado a oportunidade de participar de uma Iniciação Científica e por terem aceitado me orientar nesse Trabalho de Curso, com toda a confiança, ajuda, tempo e disponibilidade que foram doadas.

Agradeço à Manu, à Natani e à Suziani, pela companhia, persistência e todo o trabalho das sextas e sábados.

Agradeço também à minha família, especialmente meu pai e minha mãe, por permitirem que uma das minhas poucas preocupações seja a faculdade.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, me ajudaram, mesmo que sem saber.

"There are two objects of medical education:
To heal the sick, and to advance the science."
(CHARLES HORACE MAYO, 1926.)

RESUMO

Introdução: O PRF (plasma rico em fibrina) é um tipo de concentrado plaquetário, produzido a partir da centrifugação de sangue autólogo, rico em plaquetas e fibrina e bastante utilizado em diversas áreas da saúde. Hoje, no entanto, existem diversos protocolos para o seu preparo, que levam a composições variadas ou mesmo desconhecidas. **Objetivo:** Analisar a morfologia e composição de cada PRF produzido por quatro metodologias diferentes, buscando padronizar um único protocolo. **Metodologia:** Estudo experimental qualitativo, para o qual foram selecionados quatro protocolos de PRF para os testes. De março a abril de 2023, na UFPR, foram realizadas as testagens, com a participação de dois voluntários saudáveis maiores de 18 anos. Através de contagem manual em microscopia óptica com câmara de Neubauer, as células do sangue e do PRF foram quantificadas e os agregados foram pesados e medidos. Os dados coletados foram tabulados, dispostos em gráficos e analisados de forma comparativa, tanto entre metodologias quanto entre pessoas. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa por meio do parecer consubstanciado de número 5.612.418, em 30 de agosto de 2022, CAAE número 58489322.5.0000.0102, em acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. **Resultados e Discussão:** As contagens de células, peso e área do PRF foram os dados com maior variabilidade em relação a todos os resultados tabulados. No entanto, o fator que mais parece interferir na composição e morfologia do produto final são as características próprias de cada indivíduo. Além disso, os resultados obtidos não apontaram para a superioridade absoluta de nenhuma dessas metodologias, mas a maioria desses fatores age em desvantagem do protocolo 3. **Considerações finais:** É necessário que o estudo prossiga com maior número de participantes, para que os resultados sejam mais significativos estatisticamente. Também se pretende analisar os dados epidemiológicos dos doadores, a fim de melhor esclarecer as interferências próprias de cada indivíduo na morfologia e composição dos concentrados de plaquetas.

Palavras-chave: PRF. Caracterização. Protocolo.

ABSTRACT

Introduction: PRF (Platelet-Rich Fibrin) is a type of platelet concentrate, produced from the centrifugation of autologous blood, rich in platelets and fibrin, and widely used in various areas of healthcare. However, currently, there are several protocols for its preparation, which lead to varied or even unknown compositions. **Objective:** Analyze the morphology and composition of each PRF produced by four different methodologies, seeking to standardize a single protocol. **Methodology:** Qualitative experimental study, for which four PRF protocols were selected for testing. From March to April 2023, at UFPR, tests were carried out, with the participation of two healthy volunteers over 18 years old. Through manual counting in optical microscopy with a Neubauer chamber, whole blood and PRF cells were quantified and the aggregates were weighed and measured. The collected data were tabulated, arranged in graphs and analyzed comparatively, both between methodologies and between people. This research was approved by the Research Ethics Committee through substantiated opinion number 5,612,418, on August 30, 2022, CAAE number 58489322.5.0000.0102, in accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council. **Results and Discussion:** Cell counts, PRF weight and area were the data with the greatest variability in relation to all tabulated results. However, the factor that most seems to interfere in the composition and morphology of the final product are the characteristics of each individual. In addition, the results obtained did not point to the absolute superiority of any of these methodologies, but protocol 3 is the least advantageous. **Final considerations:** It is necessary that the study continue with a larger number of participants, so that the results are more statistically significant. It is also intended to analyze the epidemiological data of donors, in order to better clarify the interferences of each individual in the morphology and composition of platelet concentrates.

Keywords: PRF. Description. Protocol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CONCENTRAÇÃO DE HEMÁCIAS/MICROLITRO NO SANGUE TOTAL E NO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B, EM CADA UM DOS PROTOCOLOS.....	25
FIGURA 2 - CONCENTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS/MICROLITRO NO SANGUE TOTAL E NO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B, EM CADA UM DOS PROTOCOLOS.....	26
FIGURA 3 - CONCENTRAÇÃO DE PLAQUETAS/MICROLITRO NO SANGUE TOTAL E NO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B, EM CADA UM DOS PROTOCOLOS.....	27
FIGURA 4 - COMPARAÇÃO DE PESO E ÁREA DO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B EM CADA UM DOS PROTOCOLOS	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO DE PRF SELECIONADOS	18
Tabela 2 - TABULAÇÃO DOS DADOS COLETADOS NOS EXPERIMENTOS COM OS QUATRO PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO DO PRF PARA OS INDIVÍDUOS A E B	23

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
IGF-I	- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1
L-PRF	- Plasma Rico em Fibrina e Leucócitos
PDGF-BB	- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-BB
PRF	- Plasma Rico em Fibrina
PRP	- Plasma Rico em plaquetas
RCF	- Força Centrífuga Relativa
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF beta-1	- Fator de Crescimento Transformante Beta Tipo 1

LISTA DE SÍMBOLOS

< - Menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 METODOLOGIA	17
3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	22
4 DISCUSSÃO	28
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
6 REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

Os agregados sanguíneos são produtos com potencial regenerativo, formados a partir da centrifugação de sangue autólogo (DOHAN *et al.*, 2013). Um de seus precursores foi o selante de fibrina, um tipo de coágulo de fibrina derivado do plasma humano. A partir dele, outros produtos passaram a ser desenvolvidos a fim de combinar as propriedades da fibrina com os efeitos dos fatores de crescimento plaquetários. Hoje, os principais representantes dos concentrados de plaquetas são o PRP (plasma rico em plaquetas) e o PRF (plasma rico em fibrina), que compõem, respectivamente, a primeira e a segunda geração desses concentrados (PRAKASH; THAKUR, 2011).

O PRF é produzido sem a adição de anticoagulantes e em apenas um ciclo de centrifugação. É um material rico em plaquetas, que possuem papel importante na cicatrização de feridas, especialmente devido às citocinas e fatores de crescimento que elas contêm (GASSLING *et al.*, 2009). Além disso, forma uma rede de fibrina, que auxilia na coagulação do sangue e na cicatrização de feridas (MATRAS, 1985). Alguns agregados também contêm leucócitos, que podem favorecer os tratamentos clínicos, visto que têm ação imunológica (EVERTS *et al.*, 2020) e aumentam os níveis de fatores de crescimento e citocinas (KRAEUTLER *et al.*, 2016).

O PRF é bastante utilizado na área de cirurgias orais e maxilofaciais, incluindo implantes, enxertos ósseos, exodontia e osteonecrose mandibular (FAN; PEREZ; DYM, 2020) e na ortopedia, no tratamento de injúrias musculares crônicas, lesões cartilaginosas (GRECU *et al.*, 2019), ligamentares (DEAL *et al.*, 2017), de menisco (BLANKE *et al.*, 2015) e tendinopatias (ROWAN; DROUIN, 2013). Além disso, pode ser útil no tratamento de úlceras e feridas crônicas (STEENVOORDE *et al.*, 2008) alopecia, de cicatrizes e cirurgias plásticas (KARIMI; ROCKWELL, 2019).

Porém, desde que os concentrados de plaquetas se difundiram pelo mundo, surgiram muitas variações das técnicas de preparo originais, por conta da aplicação de novos protocolos ou uso de centrífugas mais modernas, por exemplo (DOHAN *et al.*, 2018). É possível que sejam alterados diversos parâmetros na centrifugação, como a força centrífuga relativa (RCF) e o tempo de duração do ciclo, e, dependendo do protocolo escolhido, podem variar fatores, como a contagem de

plaquetas e leucócitos ou a arquitetura da fibrina (DOHAN *et al.*, 2018; AGRAWAL, 2017).

Além disso, passou a ser comum confusões de nomenclatura, visto que grande parte desses produtos passaram por modificações na sua composição, mas não na designação (DOHAN; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009). Ainda, em muitos dos artigos, os derivados de plaquetas não são acompanhados de uma descrição detalhada de sua composição, visto que muitos autores consideram que esses concentrados são todos os mesmos (DOHAN *et al.*, 2012).

É importante que se invista no entendimento da composição, aplicações clínicas e nomenclaturas dos concentrados de plaquetas, a fim de que essa terapia não perca seu potencial futuro, devido a resultados contraditórios – que, muitas vezes são facilmente explicados por algum parâmetro não caracterizado (DOHAN *et al.*, 2012). O desenvolvimento desses produtos depende de uma descrição precisa e objetiva de sua estrutura e aspectos biológicos, e esclarecer os pontos divergentes pode ser o primeiro passo a ser tomado (DOHAN; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

Pelos motivos aqui expostos, este projeto tem como objetivo avaliar as diversas metodologias descritas em referências bibliográficas, e caracterizar a composição de quatro delas, em busca da padronização de um protocolo único, de forma a possibilitar a sua posterior aplicação nos mais variados campos terapêuticos. Além do papel que os concentrados de plaquetas já desempenham, há muito a ser explorado e aprimorado nos próximos anos (DOHAN *et al.*, 2013).

2 METODOLOGIA

2.1 SELEÇÃO DOS PROTOCOLOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica buscando conhecer parte das diferentes metodologias de produção do PRF disponíveis na literatura. Com base nisso, foram selecionados quatro protocolos, que diferem entre si quanto ao tempo e força de centrifugação (na unidade de medida G ou RCF). Para todos eles, foram utilizados tubos secos, sem anticoagulantes.

A primeira metodologia (protocolo 1 - TABELA 1) selecionada para os testes foi baseada na técnica empregada por Choukroun *et al.* (2006) no desenvolvimento do primeiro PRF, partindo da coleta do sangue em tubos de 10 ml, seguida imediatamente de centrifugação a 400 G por 10 minutos (DOHAN *et al.*, 2006a). A fim de testar a influência do tempo nesse processo, optou-se pela escolha do protocolo 2 (TABELA 1), aplicado por Wu *et al.* (2012), que também utiliza 400 G de força de centrifugação, mas em um tempo de 12 minutos.

Ainda, buscando analisar a influência de diferentes velocidades de centrifugação no preparo do PRF, foi escolhido o protocolo 3 (TABELA 1), empregado por Choukroun *et al.* (2006) em um de seus trabalhos, que produziu PRF a partir da centrifugação do sangue em aproximadamente 280 G por 10 minutos. Por fim, para analisar uma força RCF maior que essas, foi selecionado o protocolo 4 (TABELA 1), que envolve uma centrifugação por 12 minutos em 708 G, que faz parte das pesquisas de Bagdadi *et al.* (2019).

Tabela 1 - PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO DE PRF SELECIONADOS

Protocolos	Força de centrifugação	Tempo de centrifugação
Protocolo 1	400 G	10 minutos
Protocolo 2	400 G	12 minutos
Protocolo 3	280 G	10 minutos
Protocolo 4	708 G	12 minutos

FONTE: Autora (2023)

2.2 RECRUTAMENTO

Para este estudo, foram incluídos indivíduos maiores de 18 anos, sem distinção de sexo, cor ou etnia, e considerados saudáveis, isto é, pessoas que estivessem na ausência de doenças infectocontagiosas ativas, doenças crônicas descompensadas (como diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica) ou traumas físicos, como fraturas. Esses aspectos foram avaliados através de um questionário.

O recrutamento foi voltado para pessoas frequentadoras do Campus Toledo da Universidade Federal do Paraná, entre discentes, docentes, técnicos e funcionários terceirizados. Estes indivíduos foram convidados a participar da

pesquisa quando estavam no campus para desempenho de suas atividades de rotina, durante horário comercial. Portanto, não foi necessário o deslocamento exclusivo para participação neste estudo. Além disso, o convite foi realizado de forma coletiva, para que não houvesse exposição ou constrangimento individual.

Aqueles que concordaram em se voluntariar, assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e responderam um questionário semiestruturado com questões de cunho epidemiológico e duração aproximada de 20 minutos. Tal questionário foi aplicado apenas com a finalidade de triagem, para selecionar os indivíduos considerados saudáveis, bem como servir de material para possíveis etapas que esta pesquisa venha a ter futuramente.

2.3 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue seguiu um protocolo padrão com palpação da veia a ser puncionada, colocação de garrote, antissepsia do local de punção, e punção com seringa de 10 ml e agulha do tipo 23G. Embora o objetivo da coleta fosse obter 10 ml de sangue periférico, isso não foi possível em todas as situações, devido a dificuldades técnicas na coleta, mas as etapas se seguiram mesmo dispondo de um volume sanguíneo inferior.

O tempo de garrote foi cronometrado, além do tempo decorrido desde o início da coleta até o início da centrifugação, com o objetivo de avaliar se esses critérios influenciaram na formação do PRF e da membrana.

2.4 PRODUÇÃO DO PRF

A partir da coleta de sangue, a pesquisa seguiu com a centrifugação imediata da amostra, segundo os diferentes protocolos selecionados. O objetivo era testar as quatro metodologias com um mesmo voluntário, no mínimo, para analisar as possíveis variações da composição e morfologia celular dos produtos obtidos.

Todos os testes se seguiram com a coleta de sangue do voluntário, com seringa de 10 ml. A seguir, a maior parte do volume de sangue era transferido da seringa para um tubo seco de coleta de sangue de material plástico. No menor tempo possível, o tubo era colocado na centrífuga, com os parâmetros de RCF e

tempo previamente ajustados, e o peso desse tubo era balanceado com outro tubo idêntico preenchido com volume semelhante de água.

Além disso, uma pequena porção (menos de 1 ml) do sangue coletado era armazenada em um tubo de coleta de sangue com anticoagulante EDTA, para que pudessem ser realizadas as contagens de células no sangue total, sem que este viesse a coagular e impossibilitar sua análise.

Após a centrifugação do material, o concentrado se formava aderido a um coágulo de sangue. Esse material era então pesado e medido. Em seguida, o coágulo era retirado e apenas o PRF final passava por nova pesagem e medição. Além disso, com o auxílio de uma micropipeta, era coletada uma quantidade do sobrenadante do PRF, isto é, sua porção mais liquefeita, para que também fossem realizadas as contagens de células e sua análise.

2.5 ANÁLISE DOS COMPONENTES

2.5.1 Hemácias

Para cada um dos testes, a estimativa da contagem de hemácias foi realizada através da diluição de 1:200 da amostra de sangue em soro fisiológico, ou seja, 10 microlitros de sangue total dissolvidos em 2000 microlitros de soro fisiológico, com o auxílio de micropipetas. O mesmo foi feito para a análise do PRF: 10 microlitros do sobrenadante do PRF dissolvidos em 2000 microlitros de soro fisiológico.

A partir disso, 10 microlitros da amostra eram introduzidos em uma câmara de Neubauer com o auxílio de uma micropipeta. A observação foi feita em microscópio óptico, com ajuste de foco a partir do aumento de 40 vezes, enquanto a contagem foi realizada no aumento de 400 vezes.

A contagem de hemácias ocorreu em cinco porções do quadrado central (de 1 mm^2 , delimitado pelas linhas triplas) da câmara: nos quatro quadrados dos cantos e no central. De acordo com as dimensões da câmara, o volume da área contada corresponde a $0,02 \text{ mm}^3$, portanto, o número de hemácias contadas foi multiplicado por 50 para obtermos o correspondente em 1 mm^3 ou microlitro. Além disso, multiplicamos esse valor por 200, já que a diluição foi de 1:200. Assim, o

número total de hemácias contadas nesses cinco quadrados foi multiplicado por 10 mil para obtermos a concentração estimada de hemácias por microlitro.

2.5.2 Leucócitos

Para a contagem estimada de leucócitos, foi utilizado o líquido de Turk, composto de ácido acético e violeta genciana. A partir disso, foram dissolvidos 10 microlitros de sangue total em 190 microlitros de líquido de Turk. Foi feito o mesmo procedimento para a contagem de leucócitos no PRF: 10 microlitros do sobrenadante do PRF dissolvidos em 190 microlitros de líquido de Turk.

A contagem de leucócitos foi efetuada nos quatro quadrantes laterais maiores da câmara, isto é, em quatro regiões de 1 mm^2 cada. De acordo com as dimensões da câmara, essa área corresponde a um volume de $0,4 \text{ mm}^3$, então, multiplicamos o número de leucócitos contados por 2,5 para obtermos o correspondente em 1 mm^3 ou microlitro. Além disso, devemos multiplicar esse valor também por 20, por conta da diluição realizada. Desse modo, o valor contado de leucócitos foi multiplicado por 50 para obtermos a concentração estimada de leucócitos por microlitro.

2.5.3 Plaquetas:

Para a contagem estimada de plaquetas, foi necessário o preparo de um corante, o líquido diluidor de Brecher. Esse corante foi obtido a partir da mistura de 1 g de oxalato de amônio, 2 gotas de azul de metileno 1% e 100 ml de água destilada. A partir disso, 10 microlitros de sangue total foram dissolvidos em 2000 microlitros de líquido de Brecher. O mesmo foi feito com o sobrenadante do PRF (10 microlitros do sobrenadante diluídos em 2000 microlitros de líquido de Brecher).

A contagem de plaquetas foi realizada nos mesmos quadrados que a de hemácias, mas nos dois lados da câmara, o que resultou em um volume de contagem de $0,04 \text{ mm}^3$. Dessa forma, o número de plaquetas contadas foi multiplicado por 25 para obtermos o correspondente em 1 mm^3 . Ainda, esse valor precisava ser multiplicado por 200, visto que a diluição foi de 1:200. Por fim, então, multiplicamos o número de plaquetas contadas por 5000 para obtermos a concentração estimada de plaquetas por microlitro.

2.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após o processamento na centrífuga, retirava-se o agregado formado de dentro do tubo com o auxílio de uma pinça. Nesse caso, o PRF era formado aderido a um coágulo de sangue. Assim, realizava-se a pesagem desse produto em balança analítica, bem como a tomada de suas medidas de comprimento e largura. Após esse procedimento, com o auxílio de uma tesoura, retirava-se o coágulo de sangue, deixando apenas o PRF, que passava por nova pesagem e medição.

2.7 ANÁLISE DOS DADOS COLETADOS

A partir dos resultados das contagens de células, bem como da avaliação macroscópica, foi construída uma tabela compilando todos esses valores.

2.8 SIGILO DOS DADOS COLETADOS

Nessa pesquisa, é proibida a divulgação de dados que identifiquem os voluntários. Com o objetivo de proteger as informações coletadas, os participantes foram identificados através de um código alfanumérico (neste caso, voluntários “A” e “B”) e apenas membros da equipe de pesquisa terão acesso aos dados para análise.

2.9 BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos de coleta de sangue e processamento dos materiais biológicos decorreram com a utilização dos equipamentos de segurança individual: jaleco, máscara e luvas. Além disso, os materiais perfurocortantes receberam descarte adequado, bem como os resíduos contaminados.

3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

3.1 TABULAÇÃO DOS RESULTADOS

Tabela 2 - TABULAÇÃO DOS DADOS COLETADOS NOS EXPERIMENTOS COM OS QUATRO PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO DO PRF PARA OS INDIVÍDUOS A E B

Parâmetros	Protocolo 1		Protocolo 2		Protocolo 3		Protocolo 4	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Volume de sangue coletado	10 ml	7 ml	8 ml	9 ml	6 ml	9 ml	6 ml	9 ml
Tempo de garrote	38 s	3 min 12 s	56 s	42 s	4 min 20 s	46 s	4 min 8 s	54 s
Tempo de início da centrifugação	4 min 33 s	3 min 12 s	3 min 54 s	3 min 51 s	4 min 20 s	3 min 19 s	4 min 8 s	3 min 2 s
Hemácias ST	5.350.000	5.850.000	5.400.000	5.690.000	5.240.000	6.020.000	5.470.000	4.960.000
Leucócitos ST	9.850	12.650	9.050	6.850	7.200	13.150	11.650	12.250
Plaquetas ST	270.000	317.500	315.000	430.000	247.500	377.500	297.500	217.500
Hemácias PRF	0	0	0	40.000	10.000	70.000	10.000	0
Leucócitos PRF	350	900	2.800	0	600	0	2.800	200
Plaquetas PRF	772.500	710.000	417.500	1.015.000	545.000	235.000	685.000	517.500
Peso do concentrado com coágulo de sangue	5,99 g	4,4 g	1,162 g	6,456 g	4,464 g	6,228 g	3,197 g	6,096 g
Peso do concentrado final (sem o coágulo)	0,887 g	0,565 g	0,687 g	0,652 g	0,728 g	0,483 g	0,768 g	1,174 g
Tamanho do concentrado com coágulo de sangue	9 x 1cm	6 x 1cm	2,7 x 1cm	9 x 1cm	8 x 1cm	8 x 1cm	5 x 1cm	9,5 x 1cm
Tamanho do concentrado final (sem o coágulo)	2,5 x 1cm	1,5 x 1cm	1,5 x 1cm	2,5 x 1cm	1,5 x 1cm	2 x 1cm	1,5 x 1cm	2,5 x 1cm

Legenda: Os valores de hemácias, leucócitos e plaquetas se encontram na unidade de medida de número de células por microlitro. ST= sangue total.

FONTE: Autora (2023)

A TABELA 2 foi montada com base nos experimentos finais realizados para esta pesquisa. Ela reúne os resultados dos testes feitos com os quatro protocolos selecionados (apresentados na TABELA 1), e com as mesmos dois voluntários (indivíduo A e indivíduo B) em cada um deles, como pode ser observado nas colunas da TABELA 2. Já em suas linhas, estão todos os parâmetros que foram analisados no estudo: volume de sangue coletado; tempo de garrote e tempo de início da centrifugação; contagens de plaquetas, hemácias e leucócitos no sangue total e no PRF; e peso e tamanho do concentrado com e sem coágulo de sangue.

3.2 VOLUME DE SANGUE COLETADO

O objetivo de todas as coletas de sangue era obter um volume padrão de 10 ml de sangue. No entanto, por dificuldades técnicas no momento da coleta, esse valor não foi alcançado em grande parte das tentativas. Desse modo, os testes se seguiram mesmo que com um valor de sangue inferior a 10 ml.

Considerando que muitos dos valores de sangue coletados foram diferentes entre si, foram realizados cálculos de equiparação dos valores para as análises de alguns resultados. Isto é, para que fosse possível comparar corretamente os valores de peso e de tamanho dos agregados formados, foi padronizado o valor de 6 ml de sangue coletado. Então, em coletas superiores a 6 ml, esses valores foram ajustados através de cálculos de proporção, para que todos os resultados fossem comparáveis entre si. No caso das contagens de células, isso não foi necessário, visto que os resultados já se apresentavam em unidades por microlitro.

3.3 TEMPO DE GARROTE E TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO

O tempo de garrote foi contado a partir do momento em que o garrote era colocado no braço do voluntário, até o instante em que era retirado. Esse valor foi considerado, na tentativa de avaliar se influenciaria os parâmetros finais do PRF formado, devido à sua capacidade de gerar lise celular (Clinical and Laboratory Standards Institute NCCLS, 2003).

Durante os testes, foram feitas coletas de sangue com liberação do garrote em seguida ao início do fluxo de sangue na seringa de punção, como também com liberação do garrote só ao fim da coleta. Podemos observar na TABELA 2, que, mesmo quando o tempo de garrote foi longo (protocolos 1-B, 3-A, 4-A), os parâmetros de células não foram afetados de maneira notável. Portanto, esse fator parece não ter exercido influência relevante sobre os resultados.

O tempo de centrifugação foi cronometrado a partir do momento em que o garrote foi colocado, até o início da centrifugação do produto. Essa medida foi feita com o objetivo de avaliar a influência do tempo decorrido no PRF formado, visto que sua centrifugação deve acontecer imediatamente após a coleta do sangue (Dohan *et al.*, 2006a).

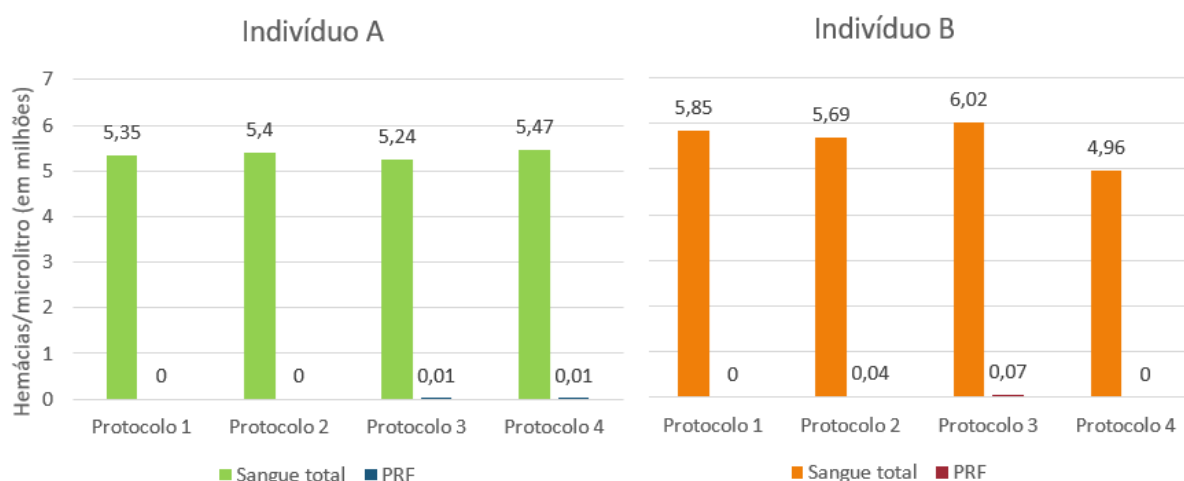
Em relação aos dados deste estudo, o tempo de centrifugação não parece ter sido diferente o suficiente entre cada teste, a ponto de produzir alterações perceptíveis no PRF formado.

3.4 HEMÁCIAS NO SANGUE TOTAL E NO PRF

A FIGURA 1 mostra a comparação entre os valores das contagens de hemácias (na unidade de medida de concentração de hemácias/microlitro) no sangue total e no PRF dos indivíduos A e B, em cada uma das metodologias selecionadas previamente.

Também na FIGURA 1, pode se observar que, como esperado, a concentração de hemácias foi menor no PRF, do que no sangue total. Entretanto, houve uma breve variabilidade entre os indivíduos e os protocolos. O protocolo 3 foi o que gerou maior resíduo de hemácias no PRF, para os dois indivíduos. A manutenção de um conteúdo significativo de hemácias pode influenciar de maneira significativa no estabelecimento do tampão de fibrina, motivo pelo qual esperamos padronizar um protocolo onde o conteúdo de hemácias seja nulo ou muito próximo de zero.

FIGURA 1 - CONCENTRAÇÃO DE HEMÁCIAS/MICROLITRO NO SANGUE TOTAL E NO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B, EM CADA UM DOS PROTOCOLOS



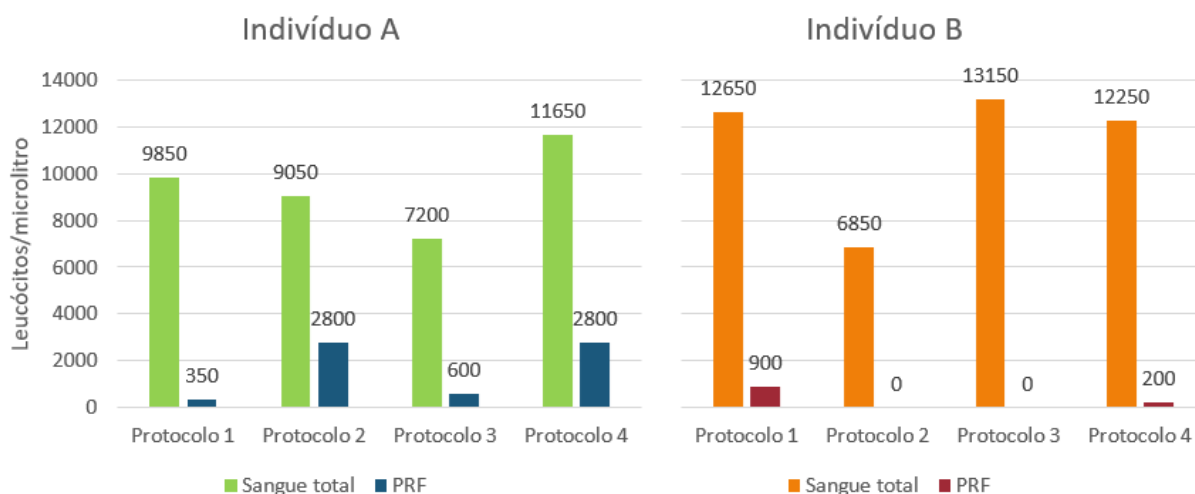
FONTE: Autora (2023)

3.5 LEUCÓCITOS NO SANGUE TOTAL E NO PRF

A FIGURA 2 apresenta os valores, comparativamente, das concentrações de leucócitos por microlitro no sangue total e no PRF dos indivíduos A e B, em cada um dos protocolos.

Na contagem de leucócitos do sangue total os valores se mantiveram dentro dos padrões de normalidade, o que indica uma fidedignidade da contagem. A variação efetiva pode ser percebida de um indivíduo para outro, visto que A manteve uma concentração de hemácias considerável após a centrifugação. Além disso, o indivíduo B tem concentração de hemácias no sangue total mais elevada do que o A, e, mesmo assim, concentração significativamente menor no PRF se também comparado ao A, chegando a ser nula em dois dos protocolos.

FIGURA 2 - CONCENTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS/MICROLITRO NO SANGUE TOTAL E NO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B, EM CADA UM DOS PROTOCOLOS

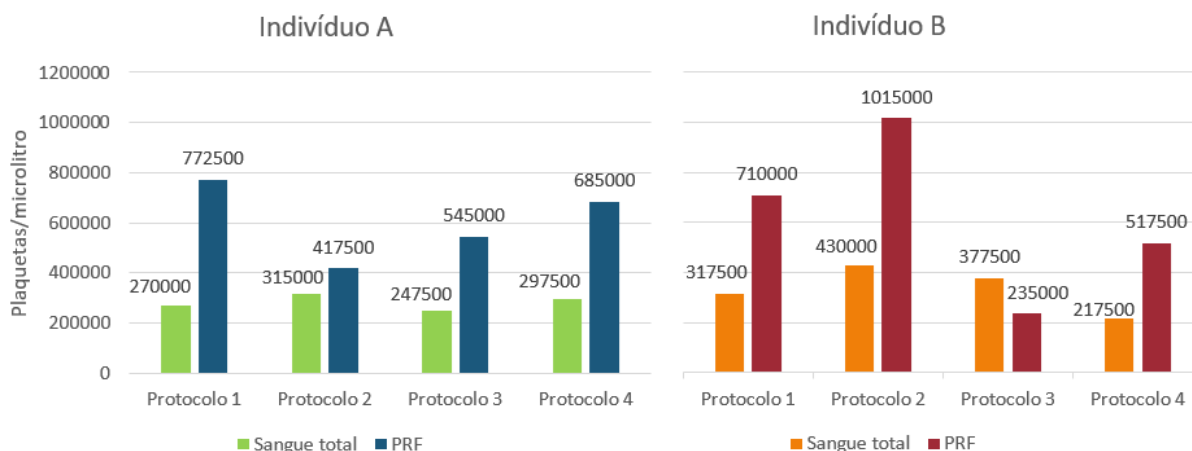


FONTE: Autora (2023)

3.6 PLAQUETAS NO SANGUE TOTAL E NO PRF

A FIGURA 3 mostra os resultados, em comparação, da quantificação das plaquetas no sangue total e no PRF dos dois indivíduos e nas quatro metodologias. É possível observar que, em ambas as pessoas, os protocolos de centrifugação concentraram significativamente as hemácias. A única exceção ocorreu com o protocolo 3 para o indivíduo B, onde houve redução da concentração.

FIGURA 3 - CONCENTRAÇÃO DE PLAQUETAS/MICROLITRO NO SANGUE TOTAL E NO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B, EM CADA UM DOS PROTOCOLOS



FONTE: Autora (2023)

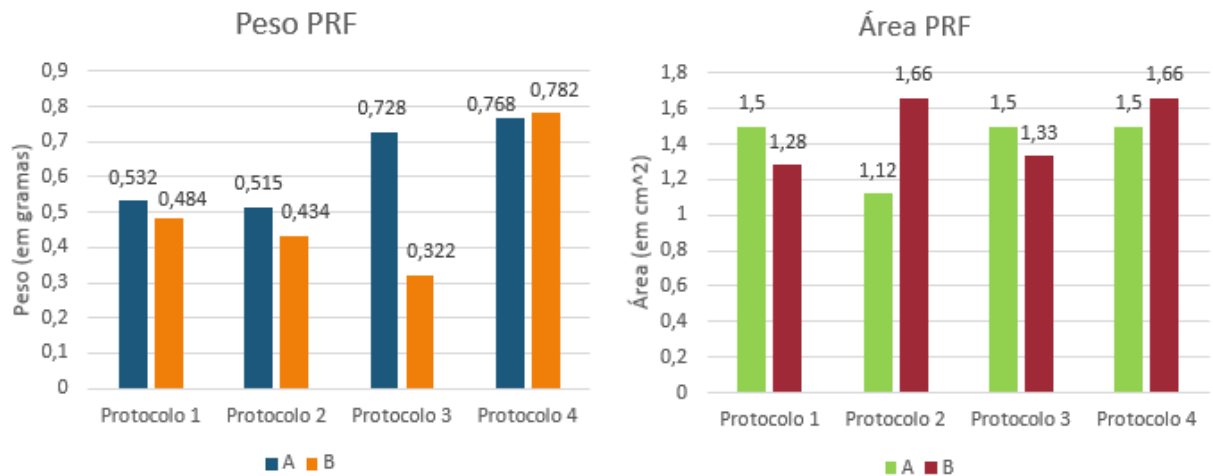
3.7 PESO E TAMANHO DO CONCENTRADO COM E SEM O COÁGULO DE SANGUE

Após a centrifugação, o PRF é obtido aderido a um coágulo sanguíneo. Entretanto, dados referentes aos coágulos não têm grande relevância para este estudo, visto que o interesse é a análise e caracterização apenas do PRF. Desse modo, a discussão será baseada nos valores de peso e tamanho referentes ao concentrado final (sem o coágulo). Após o coágulo de sangue ser retirado, o PRF era novamente pesado e medido. Todos os valores estão dispostos na TABELA 2.

Para que fosse possível comparar os resultados entre os dois indivíduos ou entre as metodologias, foi necessário realizar uma equiparação de valores. Para isso, o peso e o tamanho de cada agregado foram ajustados ao correspondente a uma coleta de sangue inicial de 6 ml. Assim, com todos os pesos e tamanhos corretamente ajustados para um mesmo volume de sangue, os resultados puderam ser comparados entre si.

As medidas do peso e da área do PRF formado estão dispostas na FIGURA 4, com os resultados gerados pelos quatro protocolos e em comparação entre os dois indivíduos. Todos esses valores foram ajustados para um volume padrão de coleta de sangue de 6 ml.

FIGURA 4 - COMPARAÇÃO DE PESO E ÁREA DO PRF DOS INDIVÍDUOS A E B EM CADA UM DOS PROTOCOLOS



Legenda: Todos os valores de peso e área foram equiparados para um valor padrão de coleta de sangue de 6 ml, com fins de comparação.

FONTE: Autora (2023)

4 DISCUSSÃO

Os concentrados de plaquetas, como PRP e o PRF, são amostras de sangue autólogo com concentração plaquetária ou fibrinosa mais elevada que a do sangue normal. Os recentes estudos sobre esses materiais têm demonstrado sua utilidade no tratamento de feridas de pele e lesões osteomusculares, além de sua aplicação em campos, como a odontologia e a oftalmologia (TAMBELLA *et al.*, 2018). Tais usos se devem ao potencial de as plaquetas influenciarem os mecanismos de hemostasia, coagulação e cicatrização, devido à presença de componentes importantes, como fatores de crescimento e citocinas, bem como à ação da fibrina na ativação plaquetária e hemostasia (BOSWELL *et al.*, 2012).

Histologicamente, evidencia-se que o uso do PRF resulta em uma capacidade de cicatrização acelerada nos tecidos ósseos e moles, com aumento de sua vascularização e recuperação menos dolorosa no pós-operatório (MIRANDA *et al.*, 2019). Além disso, o uso do PRF com ou sem combinação com outros biomateriais parece ter várias vantagens e indicações na medicina e na odontologia, por ser uma técnica minimamente invasiva, com baixos riscos e resultados clínicos satisfatórios (BORIE *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016).

No entanto, mesmo diante de tal relevância terapêutica, trata-se de uma metodologia relativamente recente, que ainda requer uma padronização que permita uma melhor caracterização dos componentes, tanto do PRP quanto do PRF. Diversos são os protocolos e técnicas disponíveis e relatados na literatura, mas a maioria possui pontos discordantes entre si, que podem gerar variações em relação à concentração de plaquetas ou à presença ou não de leucócitos, por exemplo (PEREZ *et al.*, 2014).

Como pode ser notado na FIGURA 3, a concentração de plaquetas no PRF é consideravelmente maior do que no sangue total (praticamente 2 vezes a quantidade). Consonante a isto, um dos estudos de Dohan *et al.* (2006b) analisou a concentração de citocinas plaquetárias no soro, plasma, PRF e PRP, e concluiu que a concentração da citocina IGF-I no exsudato do PRF também é praticamente o dobro em relação à do soro e do plasma. Além disso, é interessante destacar que as citocinas PDGF-BB e TGF beta-1, por sua vez, estavam aumentadas no soro e no PRP, em relação ao PRF. Segundo o artigo, isso se justifica porque, no PRF, as citocinas geradas pela ativação das plaquetas estão presentes sim, mas se encontram presas no interior da rede de fibrina, onde ficam até serem estimuladas no momento ideal, como na remodelação da matriz cicatricial. Por esse motivo, também, que o PRF pode ser considerado mais eficiente para a proliferação e migração celular (WU *et al.*, 2012).

Choukroun e Ghanaati (2018) realizaram um estudo relacionando as concentrações de plaquetas e leucócitos no PRF com a força de centrifugação (RCF ou G). Seus resultados apontaram que a concentração de plaquetas e leucócitos aumentava conforme a RCF era reduzida, mantendo-se o tempo. Nesse estudo, os resultados serão analisados a partir da comparação entre protocolos de mesmo tempo, portanto, entre os protocolos 1 e 3 (10 minutos) e entre 2 e 4 (12 minutos) - TABELA 1. Entre os protocolos 1 (400 G) e 3 (280 G), com a redução da RCF, a concentração de leucócitos aumentou para a pessoa A, e diminuiu para B. Em relação às plaquetas, com a redução da RCF, a concentração diminuiu consideravelmente em ambos os indivíduos. Já comparando os protocolos 2 (400 G) e 4 (708 G), enquanto a RCF aumentou, a concentração de leucócitos se manteve em A, e se elevou muito discretamente em B. Quanto às plaquetas, sua concentração aumentou em A e reduziu em B, ambas de forma expressiva.

Frente a esses dados, é possível perceber que esta pesquisa não refletiu os resultados encontrados por Choukroun e Ghanaati (2018). Entretanto, existem algumas diferenças entre esses estudos. O primeiro ponto considerado foi se essas diferenças poderiam ser justificadas pelos métodos de contagem utilizados, visto que para este estudo foi feita contagem manual com câmara de Neubauer, que seriam mais subjetivas e sujeitas a erros, enquanto que as quantificações na pesquisa citada foram automatizadas. Entretanto, segundo o trabalho de Messias *et al.* (2009), os dois tipos de contagens não apresentaram diferenças significativas na quantificação de leucócitos, além de que analisadores automatizados podem, por exemplo, superestimar a concentração de plaquetas em algumas situações, como na plaquetopenia (KUNZ, 2001).

Ademais, a análise de Choukroun e Ghanaati partiu da comparação de 3 protocolos, dobrando suas velocidades de centrifugação: 600 rpm (44 G), 1200 rpm (177 G) e 2400 rpm (710), todos por 8 minutos, em uma centrífuga de 110 mm. Além do tempo de centrifugação diferente, esta presente pesquisa comparou os protocolos de 400 G e 280 G que, na centrífuga utilizada (raio de 80 mm) correspondem a 2113 rpm e 1768 rpm, respectivamente. Da mesma forma, os protocolos 2 e 4 equivalem a 2113 rpm e 2811 rpm. Isto é, enquanto o estudo citado compara velocidades em rpm 2 e 4 vezes maiores (ou RCF 4 e 16 vezes maiores, aproximadamente), este compara velocidades consideravelmente próximas: as velocidades em rpm não chegam a dobrar (nem mesmo a RCF). Outra situação muito semelhante a essa, é referida por Kobayashi *et al.* (2016), quando relatam o preparo de PRF padrão em 2700 rpm por 12 minutos, e PRF avançado (com mais plaquetas e leucócitos, e, conseqüentemente, fatores de crescimento), em 1500 rpm por 14 minutos.

Mamajiwala *et al.* (2020) também avaliaram esse fator: nas velocidades de centrifugação de 1400 rpm (228 G), 2800 rpm (912 G) e 3500 rpm (1425 G), a concentração de plaquetas foi cada vez menor. Um dado a mais desse último estudo, foi que menores tempos de centrifugação (8 minutos em comparação com 14 minutos) também elevaram os níveis de plaquetas no PRF. Além disso, Mamajiwala *et al.* (2020) associaram as plaquetas e leucócitos com a atividade antimicrobiana do PRF, visto que esses três parâmetros foram influenciados positivamente pela redução do tempo ou da velocidade de centrifugação, implicando

que a composição do PRF pode ser ajustada conforme o resultado clínico que se espera.

Tovar *et al.* (2021) apresentaram em sua pesquisa testes com três diferentes valores de força de centrifugação para o preparo de L-PRF (plasma rico em fibrina e leucócitos): 200 G, 400 G e 600 G; todos por 12 minutos. Em relação aos agregados obtidos, seus pesos cresceram com o aumento da RCF. Isso está de acordo com o presente estudo, visto que o protocolo 4, de maior RCF, produziu os agregados de maior peso, visivelmente, para os dois indivíduos (FIGURA 4). No entanto, um dos valores ficou fora do padrão: o protocolo 3, de menor RCF, produziu a membrana de menor peso para o indivíduo B; mas, por outro lado, gerou o agregado com o segundo maior peso, para o paciente A, o que foge ao padrão. Possivelmente, essa situação se explique por algum erro técnico ou fator relacionado ao indivíduo A.

Para Dohan, Rasmusson e Albrektsson (2009), a concentração de plaquetas e leucócitos tem grande importância clínica, visto que ambos parecem ter seus efeitos somados a favor do sistema imunológico. Por essa razão, é importante que a quantidade dessas células seja um dos critérios avaliados na decisão de qual protocolo será seguido em determinada situação. Eles apresentam uma classificação dos concentrados de plaquetas, voltada para três parâmetros: A - Fatores relativos às centrífugas e kits (tamanho, tempo de processamento, custo e ergonomia); B - Fatores relativos às plaquetas e leucócitos (volume do agregado, eficiência de concentração das plaquetas e leucócitos, e seu estado final); C - Fatores relativos à rede de fibrina (densidade e tipo de polimerização da fibrina).

Considerando que, para este presente trabalho, os fatores do tipo A foram todos os mesmos, e que não foi possível a avaliação da rede de fibrina (fatores C), resta o grupo B de parâmetros para analisar os concentrados plaquetários formados. Dentro dos parâmetros B, o volume praticamente não se altera nessa classificação, nem o estado das células. Por fim, então, com base na eficiência de concentração das plaquetas e leucócitos, temos, em ordem de classificação quanto à eficiência média de concentração de plaquetas, protocolos $3 < 2 < 4 < 1$; e, quanto a leucócitos, protocolos $3 < 1 < 4 < 2$.

Nesse sentido, percebemos que o protocolo 3 parece ser o menos eficiente. Quanto aos dados restantes, ficam dúvidas; mas podemos perceber, também, que a metodologia 2 gerou um PRF sem leucócitos para o paciente B, além de não ser tão efetiva na concentração de plaquetas, constatações que poderiam favorecer os

protocolos 1 e 4 como mais efetivos. Finalmente, é sabido que, para tirar conclusões, de fato, seria necessário que os protocolos fossem testados em um número maior de pessoas, entretanto, essa pesquisa por si só reflete que existe, sim, variabilidade quanto aos componentes e morfologia de cada um dos concentrados produzidos, seja com diferenças de metodologias, ou de doadores.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os parâmetros avaliados, tempo de garrote, tempo até o início da centrifugação e peso e tamanho do coágulo de sangue aderido ao PRF parecem não ter interferido de maneira significativa nas características dos agregados. Já as contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas no sangue total e no PRF, além do peso e tamanho do concentrado final, tiveram maior variabilidade.

Os resultados da avaliação de peso, área e contagem de células dos agregados formados não apontaram para a superioridade absoluta de nenhuma dessas metodologias, mas a maioria desses fatores age em desvantagem ao protocolo 3. Ademais, alguns parâmetros também sugerem uma possível prevalência dos protocolos 1 e 4 sobre o 2. O mais notável, no entanto, é que parece haver uma interferência significativa do estado individual de cada pessoa nas características de composição e morfologia do produto final.

Portanto, é necessário que esse estudo prossiga, incluindo um crescente número de indivíduos, para que os resultados sejam mais significativos estatisticamente. Além disso, futuramente pretendemos também correlacionar a morfologia e os componentes desses concentrados celulares com os dados epidemiológicos dos doadores, a partir da coleta de informações sobre o estado de saúde e os hábitos de vida dessas pessoas. Assim, esperamos que seja possível compreender melhor as interferências próprias de cada indivíduo nas características finais dos concentrados plaquetários.

6 REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Amit Arvind. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. **World journal of clinical cases**, v. 5, n. 5, p. 159, 2017.

BLANKE, Fabian et al. Percutaneous injections of Platelet rich plasma for treatment of intrasubstance meniscal lesions. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 5, n. 3, p. 162, 2015.

BORIE, Eduardo et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 5, p. 7922, 2015

BOSWELL, Stacie G. et al. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. **Arthroscopy: The journal of arthroscopic & related surgery**, v. 28, n. 3, p. 429-439, 2012.

CHOUKROUN, Joseph et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. 299-303, 2006.

CHOUKROUN, Joseph; GHANAATI, Shahram. 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**, v. 44, p. 87-95, 2018

DEAL, J. Banks et al. Platelet-rich plasma for primary treatment of partial ulnar collateral ligament tears: MRI correlation with results. **Orthopaedic journal of sports medicine**, v. 5, n. 11, p. 2325967117738238, 2017.

DOHAN EHRENFEST, David et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 7, p. 1131-1137, 2012.

DOHAN EHRENFEST, David 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, 2018.

DOHAN, David M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. e37-e44, 2006a.

DOHAN, David M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. e45-e50, 2006b

EHRENFEST, David M. Dohan; RASMUSSEN, Lars; ALBREKTSSON, Tomas. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.

EHRENFEST, DM Dohan et al. Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, or Platelet-Rich Fibrin-PRF): the international classification of the POSEIDO. **Poseido J**, v. 1, p. 17-28, 2013.

EL BAGDADI, Karima et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 45, p. 467-479, 2019.

EVERTS, Peter et al. Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 20, p. 7794, 2020.

FAN, Yijiao; PEREZ, Karla; DYM, Harry. Clinical uses of platelet-rich fibrin in oral and maxillofacial surgery. **Dental Clinics**, v. 64, n. 2, p. 291-303, 2020.

GASSLING, Volker LW et al. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 108, n. 1, p. 48-55, 2009.

GRECU, Alexandru Florian et al. Platelet-rich fibrin and its emerging therapeutic benefits for musculoskeletal injury treatment. **Medicina**, v. 55, n. 5, p. 141, 2019.
KARIMI, Kian; ROCKWELL, Helena. The benefits of platelet-rich fibrin. **Facial Plastic Surgery Clinics**, v. 27, n. 3, p. 331-340, 2019.

KOBAYASHI, Eizaburo et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. **Clinical oral investigations**, v. 20, p. 2353-2360, 2016.

KRAEUTLER, Matthew J.; GARABEKYAN, Tigran; MEI-DAN, Omer. The use of platelet-rich plasma to augment conservative and surgical treatment of hip and pelvic disorders. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v. 6, n. 3, p. 410, 2016.

KUNZ, Dagmar. Possibilities and limitations of automated platelet counting procedures in the thrombocytopenic range. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.: + 1 (212) 584-4662, 2001. p. 229-236.

MAMAJIWALA, Alefiya S. et al. Impact of different platelet-rich fibrin (PRF) procurement methods on the platelet count, antimicrobial efficacy, and fibrin network pattern in different age groups: an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, p. 1663-1675, 2020.

MATRAS, Helene. Fibrin seal: the state of the art. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 8, p. 605-611, ago. 1985.

MESSIAS, J. B. et al. Hematological parameters of rattus norvegicus gotten through automatized and not automatized method. **Medicina Veterinária (Brasil)**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2009.

MIRANDA, Rodrigo Correia; NETO, MD Ferreira. Plasma rico em fibrina para implante imediato: revisão de literatura. **Id on Line Rev Mult Psic**, v. 47, n. 13, p. 889-99, 2019.

NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Fifth Edition. **NCCLS document H3-A5** [ISBN 1-56238-515-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003

PEREZ, Amanda GM et al. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. *International Scholarly Research Notices*, v. 2014, 2014.

PRAKASH, Shobha; THAKUR, Aditi. Platelet concentrates: past, present and future. **Journal of maxillofacial and oral surgery**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2011.
RORIGUES, Gabriel et al. Fibrinas ricas em plaquetas, uma alternativa para regeneração tecidual: revisão de literatura. **Journal of Oral Investigations**, v. 4, n. 2, p. 57-62, 2016.

ROWAN, Tracy L.; DROUIN, Jillian L. A multidisciplinary approach including the use of platelet-rich plasma to treat an elite athlete with patellar tendinopathy—a case report. **The Journal of the Canadian Chiropractic Association**, v. 57, n. 4, p. 301, 2013.

STEENVOORDE, P. et al. Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds. **Journal of wound care**, v. 17, n. 2, p. 60-63, 2008.

TAMBELLA, Adolfo Maria et al. Platelet-rich plasma to treat experimentally-induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, v. 13, n. 1, p. e0191093, 2018.

TOVAR, Nick et al. Effects of relative centrifugation force on L-PRF: An in vivo submandibular bone defect regeneration study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, n. 12, p. 2237-2245, 2021.
WU, C.-L. et al. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. **Australian dental journal**, v. 57, n. 2, p. 207-212, 2012.