



**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**  
**ÀREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA**

**LEANDRO LÉCIO DE LIMA SOUSA**

COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS AGREGADOS  
PLAQUETÁRIOS REALIZADAS POR MEIO DE DIFERENTES CENTRÍFUGAS E  
SUA CORRELAÇÃO COM OS COMPONENTES CELULARES SANGUÍNEOS

**Guarulhos**

**2018**



**LEANDRO LÉCIO DE LIMA SOUSA**

**COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS AGREGADOS  
PLAQUETÁRIOS REALIZADAS POR MEIO DE DIFERENTES CENTRÍFUGAS E  
SUA CORRELAÇÃO COM OS COMPONENTES CELULARES SANGUÍNEOS**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para  
exame de qualificação de Mestre em Odontologia  
Área de Concentração: Implantodontia

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Marcelo de Faveri

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Gabriela Giro Araújo

**Guarulhos**

**2018**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS AGREGADOS PLAQUETÁRIOS REALIZADAS POR MEIO DE DIFERENTES CENTRÍFUGAS E SUA CORRELAÇÃO COM OS COMPONENTES CELULARES SANGUÍNEOS" em sessão pública realizada em 28 de março de 2018, considerou o candidato LEANDRO LÉCIO DE LIMA SOUSA aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Prof. Dr. Hélio Doyle Pereira da Silva (UNG) 

2. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (Orientador) 

3. Prof. Dr. Rafael de Oliveira Dias (UMC) 

4. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UNG) 

Guarulhos, 28 de março de 2018.

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca**

S731c

Sousa, Leandro Lécio de Lima

Comparação das características macroscópicas dos agregados plaquetários realizadas por meio de diferentes centrífugas e sua correlação com os componentes celulares sanguíneo. / Leandro Lécio de Lima Sousa. -- 2018.

34 f.; 31 cm.

Orientador: Profº. Dr. Marcelo de Faveri

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2018.

1. Implantes dentários 2. Plasma rico em Fibrina 3 Tecidos periimplantares 4. Hemograma I. Título II. Faveri, Marcelo de (Orientador). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada esposa Karen e meu querido José Lucas pela paciência, amor e incentivo a sempre continuar. A minha mãe Francineide, que acima de tudo, sempre estará presente em meu coração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por conceder sempre força, coragem e sabedoria em meus desafios.

À Universidade Guarulhos, instituição onde tive a oportunidade de dar um importante passo rumo ao crescimento científico e profissional.

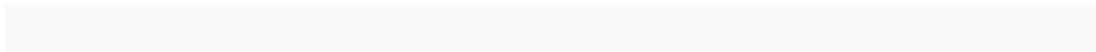
Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Faveri pelo brilhantismo em sua orientação colaboração em todos os momentos e acima de tudo, por sua amizade.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Gabriela Giro Araújo pelo apoio incondicional e sua dedicação ao ensino durante o mestrado.

À minha colega de pesquisa no laboratório da UNG, Profa. Dra. Daiane Brunale, que sempre se dedicou e cedeu sua experiência de forma gentil, bem como os alunos de iniciação Thiago e Daniela, tão importantes quanto.

Aos meus colegas de turma pela amizade e companheirismo. (Anibal, Celson, Fábio, Guilherme, Leonardo, Marcela, Paulo, Ricardo Cabrales e Sueli), Sidney Watinaga, agradeço pelas orientações e conselhos, em tempo agradeço especialmente a Luis Ricardo Linard grande amigo e irmão e aos meus queridos André e Felipe Braga, por sempre apoiarem e motivarem.

À toda equipe de professores do Mestrado Acadêmico: Prof. Dr. José Augusto, Prof. Dr. André Reis, Profa. Dra. Poliana Mendes, Profa. Dra. Alessandra Cassoni, Profa. Dra. Marta Bastos, Profa. Dra. Luciene, Prof. Dra. Alessandra, Profa. dra. Magda, Profa. Dra. Marina, Prof. Dr. Murilo. Prof. Dr. Hélio, Prof. Dr. Bruno, especialmente ao Prof. Dr. Jamil Awad Shibli pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo de profissional e pela amizade constante.



*“A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles.”*

Albert Einstein

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as medidas macroscópicas de peso (kg) e medida (mm) de membranas autólogas de plasma rico em fibrina (PRF) produzido por diferentes centrifugas e correlacionar estes valores com componentes celulares sanguíneos. Foram selecionados 12 participantes sistemicamente saudáveis, que foram submetidos a cirurgia de instalação de implantes com a associação de enxerto de membrana autógena de PRF na região do implante. Previamente a cirurgia, os participantes selecionados realizaram exames de hemograma e coagulograma. Foram coletados 9 tubos contendo 10ml de sangue venoso de cada indivíduo. Os tubos de cada indivíduo foram distribuídos aleatoriamente e posicionados em três diferentes centrífuga (Intra-lock L-PRF Process [C1], Alemanha; Kasvi Digital [C2], China; Prf Montserrat [C3], China), e o processamento da membrana do PRF realizado conforme a descrição de cada fabricante. Após o processamento, os plugs de PRF formados foram colocados no recipiente designado pelo fabricante, para formação das membranas autólogas. As medidas de pesos (Kg) e medidas (mm) dos plugs e das membranas de PRF foram realizadas em ambiente asséptico por meio de uma balança de precisão e paquímetro digital. Foram colhidos no presente estudo 108 tubos de coleta sanguíneas, e o tempo médio de coleta de cada tubo individualmente foi de  $21.5 \pm 9,9$  segundos. O tempo médio gasto para fazer a coleta dos 9 tubos em cada um dos 12 indivíduos foi de  $193.1 \pm 72.4$  segundos. Não foram encontradas diferenças no tempo médio de coleta dos tubos entre as centrifugas ( $p=0,728$ ). Os valores médios foram muito similares entre as centrifugas, tanto para a medida e peso do “plug” bem como para a medida linear ( $p>0,05$ ). No que se relaciona ao peso úmido e a medida linear da membrana de PRF, encontrou-se que o peso úmido variou de 0,22 a 0,25mg e a medida linear de 24,1 a 26,7mm, entretanto sem diferenças estatísticas entre as centrífugas ( $p>0,05$ ). Os dados apresentados pelas centrifugas C1 e C2 apresentam dados mais homogêneos, sendo que ambos apresentaram um valor inferior a 25% de variabilidade, quando comparados a centrífuga C3 que apresentou valores superiores a 33%. Em conclusão, observamos que do ponto de vista macroscópico, não existem diferenças existentes entre os agregados plaquetários formados por diferentes centrífugas e nenhuma correlação foi encontrada entre estes PRF e o hemograma dos pacientes.

Palavras-chave: implantes dentários, plasma rico em fibrina, tecidos periimplantares, hemograma.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the macroscopic measures of weight (kg) and measurement (mm) of autologous membranes of platelet rich fibrin (PRF) produced by different centrifuges and to correlate these values with blood cellular components. Twelve healthy systemic participants were selected, who underwent implant surgery with the association of autogenous PRF membrane graft in the implant region. Before the surgery, the selected participants underwent hemogram and coagulation tests. 9 tubes containing 10 ml of venous blood were collected from each individual. The tubes of each individual were randomly distributed and positioned in three different centrifuges (Intra-Lock L-PRF Process [C1], Germany; Kasvi Digital [C2], China; Prf Montserrat [C3], China) as described by each manufacturer. After processing, the PRF plugs formed were placed in the container designated by the manufacturer for formation of the autologous membranes. Measurements of weights (kg) and measurements (mm) of plugs and Prf membranes were carried out in an aseptic environment using a precision scale and digital parking meter. 108 blood collection tubes were collected in the present study, and the mean collection time of these tubes was  $21.5 \pm 9.9$  seconds. The mean time spent collecting the 9 tubes in each of the 12 individuals was  $193.1 \pm 72.4$  seconds. No differences were found in the mean collection time of the tubes between the centrifuges ( $p = 0.728$ ). The mean values were very similar between the centrifuges, both for the measurement and weight of the plug as well as for the linear measurement ( $p > 0.05$ ). In relation to the wet weight and the linear mean of the PRF membrane, it was found that the wet weight ranged from 0.22 to 0.25mg and the linear measurement from 24.1 to 26.7mm, but without statistical differences between the centrifuges ( $p > 0.05$ ). The data presented by the C1 and C2 centrifuges presented more homogeneous data, both of which presented a value inferior to 25% of variability, when compared to the C3 centrifuge that presented values superior to 33%. In conclusion, we observed that from the macroscopic point of view, there are no differences between platelet aggregates formed by different centrifuges and no correlation was found between these Prf and the cellular blood data.

Key words: dental implants, plasma rich fibrin, peri-implant tissues.

## SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. PROPOSIÇÃO	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES	18
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DA AMOSTRA	18
3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DA AMOSTRA	19
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL	19
3.5 PROCEDIMENTOS DE ENXERTIA (Plasma rico em fibrina)	20
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS	31

## 1. INTRODUÇÃO

A expressão conhecida como “engenharia de tecidos” surgiu, quando começou-se o desenvolvimento laboratorial de dispositivos que visam facilitar a regeneração de determinados tecidos. Normalmente combinam-se três elementos chaves: matriz (scaffolds - estruturas tridimensionais que serve, de suporte ao crescimento celular); moléculas de sinalização (como os fatores de crescimento) e células (e.g., osteoblastos, fibroblastos, ou outras populações adequadas à regeneração do tecido lesado) (Sunitha, 2008). Todos estes agentes trabalham em sinergia durante o processo de reparação e/ou regeneração, e muitos produtos tentam adaptar-se a esses mecanismos naturais, a fim de melhorar a cicatrização de um local cirúrgico. Assim, de acordo com Agrawal et al. (2014), o início da cicatrização de qualquer ferimento é realizado pela formação de coágulos e inflamação, seguido por uma fase proliferativa, que compreende de epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e, finalmente, maturação do colágeno e contração.

Com isso, surgiram os concentrados de plaquetas, como mais uma opção de tratamento. Marx et al. (1998) denominaram pela primeira vez o plasma rico em plaquetas – PRP e ofereceram o conceito de fator de crescimento, após realizarem um estudo comparando a cicatrização de 38 enxertos, obtidos da crista ilíaca para reconstruções mandibulares, sendo que em metade deles acrescentou o PRP. O PRP foi obtido através da coleta de sangue com anticoagulante, centrifugada em 2 passos e induzida usando cloreto de cálcio e trombina bovina. Foi demonstrada, por meio de análise histoquímicas, a presença de fatores de crescimento como PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), TGFB-2 (Fator de crescimento transformador Beta) nos concentrados de plaquetas. A concentração de plaquetas foi 338% maior que no sangue circulante. Foi detectada a presença de receptores nas células do enxerto, que responderam aos fatores de crescimento. A maturação óssea nos enxertos com PRP foi 1,62 a 2,16 maior que no grupo controle e a densidade foi de 55,1% no grupo controle e 74,0% no grupo teste em 6 meses. Os concentrados de plaquetas, segundo Marx et al. (1998), são preparações autólogas, portanto, eliminam o risco de transmissão de doenças e reações imunológicas, sem risco de infecção e podem trazer benefícios ao paciente (Anitua, 1999).

Estas substâncias transformam a cicatrização um processo mais rápido e eficiente, beneficiando a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura. O plasma rico em plaquetas (PRP) dispõe de proteínas como a fibrina, fibronectina e vitronectina, que promovem a osteocondução através de sua ação na adesão celular, além da própria ação do TGF $\beta$  e do PDGF na estimulação dos osteoclastos, aperfeiçoando a qualidade dos resultados obtidos nos enxertos ósseos (Vendrami et al., 2006).

Choukroun em 2001, apresentou à literatura, através de um estudo o plasma rico em fibrina (PRF), desde então, tem sido proposto o uso deste biomaterial extraído do sangue do próprio paciente como uma barreira mecânica e um estimulador biológico que modula a remodelação óssea e tecidual proporcionando melhor qualidade ao novo tecido formado. O PRF é a segunda geração de concentrado de plasma e consiste em um concentrado de fibrina utilizado para aceleração cicatricial dos tecidos moles e duros através da estimulação de uma maior angiogênese e proteção da ferida cirúrgica com a liberação de citocinas e leucócitos. Este biomaterial possui a qualidade de ser totalmente natural pois diferente do plasma rico em plaquetas não é associado nem um tipo de reação química (Dohan et al., 2006; Choukroun et al., 2006). As plaquetas possuem uma vida útil de 10 dias em média e durante este período secretam grânulos que contém proteínas que irão promover a coagulação através de fatores de coagulação como  $\beta$ -tromboglobulina, fibronectina, trombospondina, fibrinogênio. Também são liberados neste processo fatores de crescimento, inibidores de fibrinólise e imunoglobulinas, além disso são aderidos a membrana plaquetária o colágeno e a trombina que são responsáveis pela hemostasia. Durante este processo são liberados citocinas que acabam estimulando a migração e proliferação de células dentro da rede de fibrina. Também são liberados fatores que irão regular o processo inflamatório e cicatricial fibrosa como o TGF  $\beta$  -1 e os PDGFs responsáveis pela migração, proliferação e sobrevivência de células mesenquimais responsáveis pelo mecanismo de remodelação do tecido cicatricial (Dohan et al. 2006).

Su e colaboradores (2009) avaliaram a concentração dos fatores de crescimento encontrados no concentrado do PRF determinando a existência de fatores de crescimento derivados de plaqueta (PDGF), transformadores de fator de crescimento  $\beta$ (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de insulina 1(IGF-1). Tais fatores pre-

sentes no plasma são importantes por exercerem efeitos quimiotáticos estimuladores de osteoblastos, o TGF-  $\beta$  importante na promoção de matriz óssea e o PDGF-AB atuar no mecanismo de reparação de cartilagem ambos processos importantes na reparação e estimulação óssea.

Del Corso et al. (2012) apresentaram uma revisão sobre plasma rico em plaqueta (PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF), em que afirmam que o concentrado de plaquetas para uso cirúrgico são ferramentas inovadoras de medicina regenerativa e foram amplamente testados na cirurgia oral e maxilo-facial. Um antigo e verdadeiro conceito é que um sítio cirúrgico com bom sangramento irá cicatrizar corretamente, enquanto um local com sangramento limitado poderá levar à necrose, infecção ou sangramento atrasado. O conceito da cola de fibrina imita e amplifica esse efeito natural.

Del Corso et al. (2012) e Ehrenfest et al. (2013) classificaram os concentrados de plaquetas em quatro famílias: PRPP (plasma rico em plaqueta puro), PRP-I (plasma rico em plaquetas e leucócitos), PRFP (fibrina rica em plaqueta pura) e L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos). Os dois primeiros são suspensões de plaquetas respectivamente com ou sem leucócitos que podem ser usados em forma líquida ou gel, após ativação, usando trombina e cloreto de cálcio, uma rede de fibrina leve e não muito bem estruturada. A fibrina rica em plaquetas é o desenvolvimento da técnica simplificada sem trombina (Hauser et al., 2013). Ehrenfest et al. (2010) afirmaram que o PRF é um biomaterial de fibrina autóloga densa em forma sólida carregada com células autólogas, uma rede de fibrina tridimensional altamente biocompatível e indutiva para aplicação em engenharia de tecidos (Li et al., 2013). É um coágulo natural otimizado (Simonpieri et al., 2012) após a coagulação do sangue em uma matriz de fibrina homogênea e forte sem as células vermelhas do sangue mas com plaquetas, leucócitos e células mesenquimais indiferenciadas circulantes. Segundo Choukroun (2006), a membrana de fibrina tem todos os constituintes do sangue favoráveis a cicatrização e imunidade. Essa estrutura forma um andaime natural complexo, que permite o repovoamento com células do próprio paciente. Histologicamente, segundo Li et al. (2013) a membrana de PRF é composta por um coágulo de fibrina sem células, leucócitos, plaquetas e células vermelhas do sangue. O I-PRP é produzido sem qualquer modificação do sangue e é a consequência natural da coagulação durante a centrifugação sendo um tecido vivo e um biomaterial sólido

capaz de preencher um espaço (Simonpieri et al., 2012). A polimerização lenta cria uma rede de fibrina muito semelhante à natural com a incorporação das plaquetas que leva a migração de células. As plaquetas são ativadas, que resulta em sua degranulação com liberação de citocinas como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epitelial (EGF) (Hauser et al., 2013). Segundo Del Corso et al. (2012) pode-se denominar o processo de cicatrização com a utilização do PRF como uma regeneração óssea natural (RON).

O PRP é obtido através da coleta de sangue com anticoagulante, centrifugada em 2 passos e induzida usando cloreto de cálcio e trombina bovina, (Dohan et al., 2009). Trata-se uma técnica cara e demorada, com evidências científicas contraditórias sobre seus efeitos benéficos, devido as diferenças no desenho do estudo, métodos de preparação, métodos de quantificação (Simon et al., 2011). A PRF é obtida através da coleta de sangue sem anticoagulante, processada em uma única centrifugação e sem uso de aditivos (Dohan et al., 2006), com baixo custo, produzindo um coágulo mais estável que o coágulo de sangue natural, desempenhando o mesmo papel, estimulando o potencial de cicatrização dos tecidos (Del corso et al., 2012). Segundo Choukroun et al., (2001) o PRF possui mais de 60 mediadores biológicos, os quais envolvem mecanismos como quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação, angiogênese, deposição da matriz intracelular, modulação imune, atividade antimicrobiana e remodelação. Fatores de crescimento, segundo Giannobile et al. (1996), são mediadores biológicos naturais, que regulam importantes eventos celulares envolvidos na reparação do tecido, por se ligarem a receptores específicos. Podem melhorar a capacidade do osso alveolar de se regenerar, melhorando a atração química, a diferenciação e proliferação celular. Melhoram a vascularização, a cicatrização de tecido mole e tem efeito mitogênico. A matriz de fibrina, além de possuir fatores de crescimento, que influenciam as células mesenquimais indiferenciadas, age como uma matriz física, que direciona os movimentos celulares, funcionando como andaime. Produz um coágulo mais estável que o coágulo de sangue natural, desempenhando o mesmo papel, estimulando o potencial de cicatrização dos tecidos e promove a regeneração de tecidos moles e ósseo (Del corso et al., 2012). Existem evidências in vitro de que o PRF estimula a proliferação e diferenciação de osteoblastos e esta estimulação foi relacionada com a lenta liberação de fatores de

crescimento e outras moléculas do sangue durante 7 dias (Dohan et al., 2009), o que corrobora com o estudo in vitro de Carroll (2006), em que existia uma liberação controlada até o sétimo dia, quase idêntica ao momento inicial, e que diminuía gradualmente e estaria presente por longos períodos (Simon et al., 2011). A lenta liberação, segundo Simon et al. (2009), permite que os fatores de crescimento afetem o tempo necessário para regeneração de tecido duro e mole, melhorando os sítios tratados, diferentemente do PRP, em que ocorre imediata degranulação das plaquetas e liberação dos fatores de crescimento dentro da área cirúrgica, tendo pouco efeito sobre os estágios da cicatrização. Um estudo in vitro realizado por Li et al., 2013, teve como resultado, que a proliferação celular de osteoblastos em meio de cultura com PRF foi 20 vezes maior quando comparado com meio de cultura DMEM. Esta estimulação e proliferação pode ser devido a uma liberação progressiva dos fatores de crescimento provenientes das plaquetas, quimiocinas liberadas por leucócitos aprisionados no PRF ou pelo efeito de componentes de fibrinas solúveis, que gradualmente se difundem ao meio de cultura (Dohan et al., 2006).

O PRF é altamente biodegradável, o que foi confirmado em um estudo de Li et al. (2013). Membranas de PRF foram colocadas em subcutâneo de camundongos e em duas semanas foram substituídas por colágeno denso. Um estudo promissor utilizou PRF em alvéolos dentários após a extração demonstrando uma melhor resposta cicatricial de tecido ósseo e tecido mole (Hauser et al., 2013). Seguindo do estudo que utilizou o PRF para preenchimentos de espaços entre implante instalados imediatamente pós extração e crista óssea vestibular. O estudo pode constatar a manutenção de crista óssea, rápida cicatrização do tecido mole e consequentemente a manutenção de papila (Marrelli et al., 2013). Novos estudos em modelo animal tem demonstrado que a utilização do PRF quando combinado com outros biomateriais como o biovidro, hidroxiapatita e  $\beta$ -tricalciofosfato tem demonstrado um aumento significativo no ganho ósseo (Acar et al., 2014). Anwandter et al. (2016), observou através de um estudo clínico que o PRF mostrou resultados semelhantes para os procedimentos de preservação crista óssea obtidos com enxertos heterógenos ou alogenos e até mesmos superiores a enxertos aloplásticos ou cicatrização natural, podendo ser eficaz ao mesmo nível que o substitutos ósseos, mas sem ter partículas remanescentes de enxerto e custo elevado.

O PRF por ser um material autógeno, não está associado a reação de corpo estranho, que causa resposta inflamatória, que pode estar associada a reabsorção do alvéolo e atraso da cicatrização (Del corso et al., 2012).

Jeong et al. (2014), através de um estudo de avaliação histológica em cães, observaram o comportamento do material PRF como material único de enxerto em cirurgias de levantamento de seio associadas a instalação de implantes. Os dados histológicos do estudo levaram a concluir que o material não possui uma previsibilidade quanto à formação óssea quando utilizado na técnica de levantamento de seio com instalação de implantes simultânea. Entretanto, outros estudos mostram que a técnica de levantamento de seio maxilar associado a imediata instalação de implantes utilizando apenas membranas do PRF para preenchimento do seio maxilar, leva a uma formação óssea (Tajima et al., 2013; Simonpieri et al., 2011; Mazor et al., 2009). Outros estudos comprovam que a simples inserção de implantes para manutenção da membrana sinusal promove uma formação de coágulo que, como consequência, estimula a formação óssea (Borges et al., 2011). Entretanto, estas técnicas possuem a limitação de ser necessária uma altura de osso remanescente maxilar de, no mínimo, 4 mm para se obter o travamento dos implantes (Garlini et al., 2010).

Castro et.al. (2017a) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise e analisaram extensivamente o potencial regenerativo do PRF durante a cirurgia periodontal. A metanálise mostrou benefícios clínicos significativos para o uso do PRF para o tratamento de defeitos intra-ósseos e para defeitos de furca e resultados semelhantes quando um enxerto de tecido conjuntivo (CTG) foi substituído por membranas PRF durante a cirurgia plástica periodontal. Estes resultados indicam que o PRF tem efeitos favoráveis na cicatrização de feridas periodontais e na redução do desconforto no pós operatório. No entanto, a padronização do protocolo é necessária para obter este efeito.

Em outro estudo os autores realizaram outra revisão sistemática para analisar o efeito da PRF na regeneração óssea e osseointegração. Quando PRF foi adicionado a um substituto ósseo durante a elevação do seio maxilar, a cicatrização óssea ocorreu mais rápida, quando isolado ou combinado com substitutos ósseos, melhorou a preservação do rebordo alveolar em comparação com a cicatrização natural. Na terapia de implantes osseointegrados, foi observada uma melhora ao longo do



tempo e uma menor perda óssea marginal após o uso de PRF. Embora haja uma falta de evidência forte, estes resultados mostraram efeitos favoráveis do PRF na regeneração óssea e osseointegração (Castro et al., 2017b).

Ehrenfest et. al (2017), analisaram as diferenças entre os diversos protocolos para obtenção do PRF, em comparação ao protocolo original descrito por Choukroun em 2001, utilizando diferentes centrifugas. Os autores observaram componentes biológicos distintos formado pelas centrifugas, demonstrando clara diferença entre os agregados plaquetários obtidos, principalmente em relação ao comprometimento estrutural da fibrina. Os autores descrevem que este fator poder influenciar no limiar de liberação dos fatores de crescimento. Além disso, os pesquisadores observaram que a escolha do equipamento podem afetar o peso e tamanho do PRF e possivelmente impactam no conteúdo celular final e seus efeitos biológicos (Dohan et. al., 2014). Conseqüentemente, os efeitos biológicos de diferentes processamento podem gerar fenômeno regenerativos diferentes o que podem impactar diretamente na relevância científica e clínica destes procedimentos uma vez que vários fatores de crescimento podem ser encontrados nas membranas autólogas de PRF, tais como PDGFs (fatores de crescimento derivados de plaquetas), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta). Assim, estes fatores podem melhorar o desempenho da reparação tecidual (Chouckroun et. al. 2017), entretanto este efeito deve ser melhor estudado dentre as diferentes centrifugas utilizadas no mercado odontológico atualmente.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi comparar as características macroscópicas de peso (kg) e medida (mm) de membranas autólogas de fibrina rica em plaquetas (PRF) produzido por diferentes centrifugas e correlacionar estes valores com níveis séricos de exames de hemograma.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados apresentados neste estudo são provenientes de uma avaliação secundária de um projeto que teve por objetivo avaliar o uso de membranas de PRF no ganho de volume e queratinização da mucosa periimplantar durante a instalação de implantes. Desta forma, os procedimentos cirúrgicos relacionados a instalação dos implantes serão descritos resumidamente no item 3.4 (Desenho Experimental).

#### 3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Doze indivíduos sistemicamente saudáveis que procuraram tratamento reabilitador com prótese implantossuportadas na Clínica de Estudos Avançados da UNG Universidade e apresentassem necessidade de reabilitação oral na região posterior de mandíbula foram selecionados para a participação no estudo. Os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e coletas de amostras e, aqueles que concordaram em participar do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e, após anamnese e planejamento do caso, receberam a terapia cirúrgicas propostas gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 466/12). O protocolo deste estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNG Universidade, sob o número 56949216.8.0000.5506.

#### 3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DA AMOSTRA

Para a participação neste estudo, os participantes deveriam preencher os seguintes requisitos clínicos:

1. Apresentar ausência de ao menos um elemento dental posterior da mandíbula (pré-molares e/ou molares).
2. Apresentar a necessidade de reabilitação com pelo menos um implante na região posterior da mandíbula, com disponibilidade óssea para inserção dos implantes osseointegráveis.

3. Não apresentar doença periodontal (periodontite e gengivite) no momento da cirurgia de instalação dos implantes;
4. Não apresentar nenhum tipo de doença sistêmica que contra-indique a cirurgia de inserção dos implantes;

### 3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DA AMOSTRA

Os critérios de exclusão da amostra para este estudo foram:

1. Apresentar histórico de doenças crônicas debilitantes, como hepatite, febre reumática, diabetes, desordens imunes ou sanguíneas ou outras doenças que contraindique a realização da cirurgia;
2. Doenças autoimunes com manifestações orais
3. Apresentar histórico de desordens osteometabólicas, com exceção à osteoporose/osteopenia, que interferissem na reparação dos implantes osseointegráveis;
4. Necessidade de cirurgias regenerativas previamente a inserção dos implantes;
5. Áreas que receberam enxertos ósseos;
6. Presença de alvéolos frescos no sítio de colocação do implante;
7. Utilização de antiinflamatórios esteróidais nos três meses que antecederam ao estudo;
8. Tabagismo.

### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

No tempo inicial, todos os indivíduos foram submetidos à anamnese, exame clínico diagnóstico (triagem) e exame tomográfico. Nesse momento, foram obtidos os dados clínicos dos dentes presentes na cavidade oral e uma moldagem para confecção de guia cirúrgico foi realizado. Foram solicitados aos pacientes exames de hemograma e coagulograma, realizados no Laboratório Carlos Chagas (Guarulhos, SP - Brasil) previamente ao procedimento cirúrgico (1 dias antes da cirurgia). Para instalação dos implantes selecionados foram seguidos todos os protocolos de biossegurança necessários para o procedimento. A instalação dos implantes planejados

foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e foram utilizados implantes de dois estágios cirúrgicos. Toda a fresagem óssea e inserção dos implantes foram realizados sob abundante irrigação com solução salina estéril. Após inserção dos implantes a membrana de PRF foi recortada conforme o número de implantes a serem cobertos e posicionada sobre a crista óssea na região do implante instalado para posterior coaptação dos bordos do retalho por meio de suturas realizadas com fios de nylon 5.0 em pontos simples interrompidos.

### 3.5 PROCEDIMENTOS DE ENXERTIA (Plasma rico em fibrina)

Nos participantes selecionados foram realizada uma coleta de sangue venoso, tomado no antebraço por meio de scalpe para coleta de sangue à vácuo (21Gx3/4x7, BD Franklin Lakes, NJ, USA) e o sangue foi coletado em tubos de 10 ml (BD Vacutainer Serum, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) sem a adição de anticoagulantes, trombina bovina, ou qualquer outro agente químico. A coleta dos tubos foi realizada sempre no período da manhã, entre 8 e 10 horas, afim de padronizar os procedimentos. A coleta de tubos foi feita por apenas um profissional treinado para coleta de sangue venoso, afim de padronizar os procedimentos. Desta forma, foram coletados 9 tubos de cada indivíduo contendo aproximadamente 10ml de sangue venoso. As coletas foram sequenciadas a cada 3 tubos (blocos de 3 tubos de coleta) e os mesmos foram imediatamente alocados nas centrífugas selecionadas. A ordem dos blocos de coleta e as centrífugas utilizadas foram randomizadas por meio de uma tabela gerada por um software estatístico (SPSS versão 23.0) Os procedimentos de coleta venosa foram cronometrados afim de avaliar a influência do tempo de coleta no processamento das membranas. Após as coletas (bloco de 3 tubos), em um tempo máximo de 2 minutos, os tubos coletados foram adicionados nas centrífugas, um quarto tubo contendo 10 ml de água foi adicionados a cada centrífuga afim de balancear o procedimento de centrifugação. As centrífugas utilizadas foram:

Teste 1 (C1): Intra-lock LPRF Process, Alemanha

Teste 2 (C2): Kasvi Digital, China

Teste 3 (C3): Prf Montserrat, China



Figura 1. Imagem ilustrativa das 03 diferentes centrífugas utilizadas no presente estudo. (a) Intra-lock L-PRF Process, Alemanha; (b) Kasvi Digital, China e (c) Prf Montserrat, China

Desta forma, cada centrífuga recebeu três tubos de coleta venosa e um tubo contendo 10 ml de água. Os protocolos de centrifugação de cada centrífuga estão descritos abaixo e foram realizados segundo a recomendação dos fabricantes:

**Teste 1 (C1)** : Intra-lock LPRF Process, Alemanha: processo de centrifugação por 12 minutos, a 2700 rpm,

**Teste 2 (C2)** : Kasvi Digital, China: processo de centrifugação por 10 minutos, a 2500 rpm,

**Teste 3 (C3)** : Prf Montserrat, China: processo de centrifugação por 10 minutos, a 2500 rpm,

Após a retirada dos plugs de PRF de cada centrífuga os mesmos foram imediatamente mensurados conforme sua extensão linear usando um paquímetro digital (Paquímetro Digital ABS Absolute 6 Pol. - MITUTOYO-500-171-30B, Figura 2) e posteriormente seu peso úmido foi mensurado em balança de precisão (9094 Plus Toledo do Brasil, Figura 2). Os plugs foram acondicionados em caixas apropriadas para formação das membranas autólogas (Supremo Odonto, São Paulo, SP - Brasil). Posteriormente, os mesmos procedimentos de medida linear e peso úmido foram realizados nas membranas formadas após o processamento dos plugs de PRF.

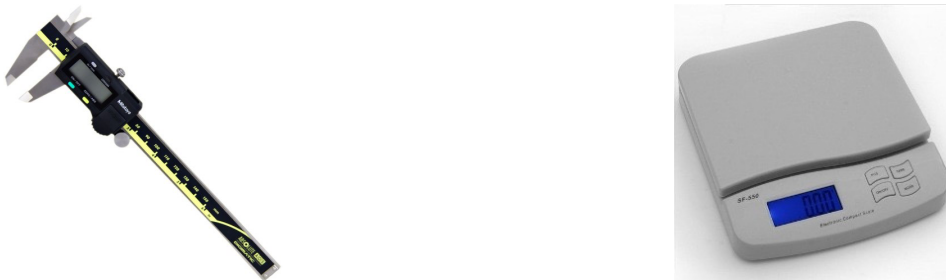


Figura 2. Imagem ilustrativa do paquímetro digital e da balança de precisão utilizada no presente estudo.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média e o desvio padrão das medidas macroscópicas (Kg, mm) e do tempo de coleta do sangue venoso foram computados para cada indivíduo e para cada amostra dentro das diferentes centrífugas utilizadas. As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste Friedmann e Teste Dumm. Testes de correlação de Pearson foram realizados entre os dados macroscópicos e o dados dos exames séricos realizados pelos indivíduos. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

## 5. RESULTADOS

Foram triados 50 indivíduos entre maio/2017 e agosto/2018, sendo que destes, 12 foram selecionados para participar do presente estudo. Dos indivíduos selecionados 6 eram do gênero feminino e 6 eram do gênero masculino, com uma média de idade de 36,1. Foram colhidos no presente estudo 108 tubos de coleta sanguíneas, e o tempo médio de coleta destes tubos foi de  $21.5 \pm 9,9$  segundos. O tempo médio gasto para fazer a coleta dos 9 tubos em cada um dos 12 indivíduos foi de  $193.1 \pm 72.4$  segundos. A figura 3 apresenta a média do tempo de coleta de cada um dos tubos que foram randomizados nas três centrífugas testadas. Observamos que não houve diferença no tempo médio de coleta dos tubos entre as centrífugas ( $p=0,728$ ), sendo que o grupo C1 apresentou uma média inferior ( $20,0 \pm 7,0$  segundos), seguido pelo grupo C3 ( $21,0 \pm 9,5$  segundos) e C2 ( $23,8 \pm 11,9$  segundos), entretanto sem diferenças estatísticas ( $p=0,728$ ).

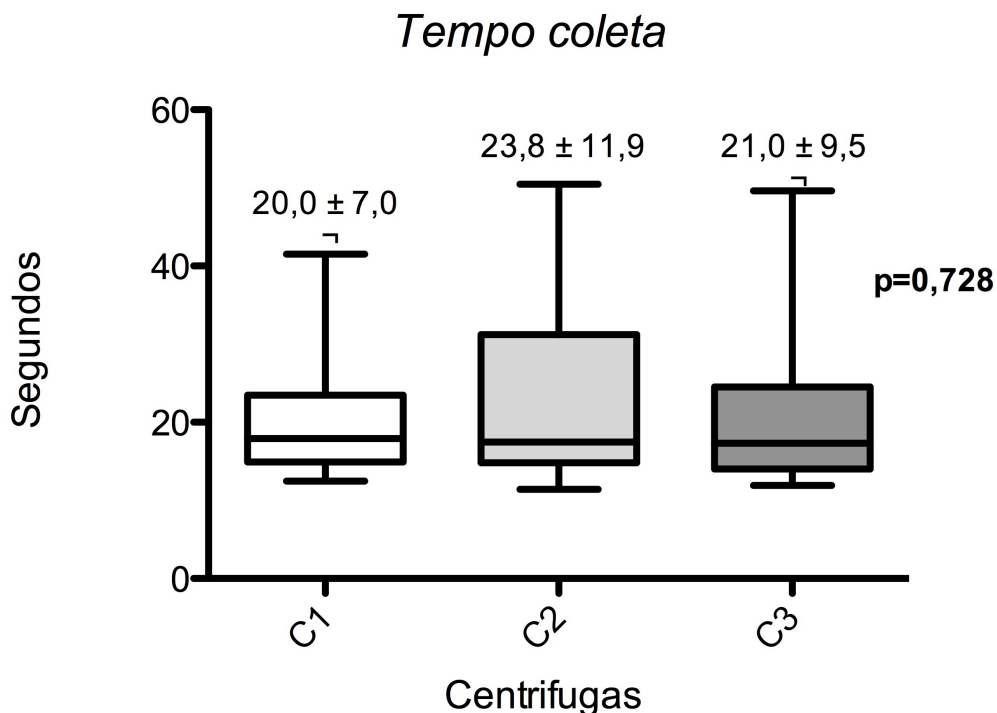


Figura 3. Blox-plot da diferença dos tempos de coleta de sangue venoso realizado para as diferentes centrífugas. As diferenças significativas entre os grupos foram realizadas pelo teste Friedmann ( $p=0,728$ ). C1; Intra-lock L-PRF Process, Alemanha; (C2) : Kasvi Digital, China; (C3); Prf Montserrat, China.



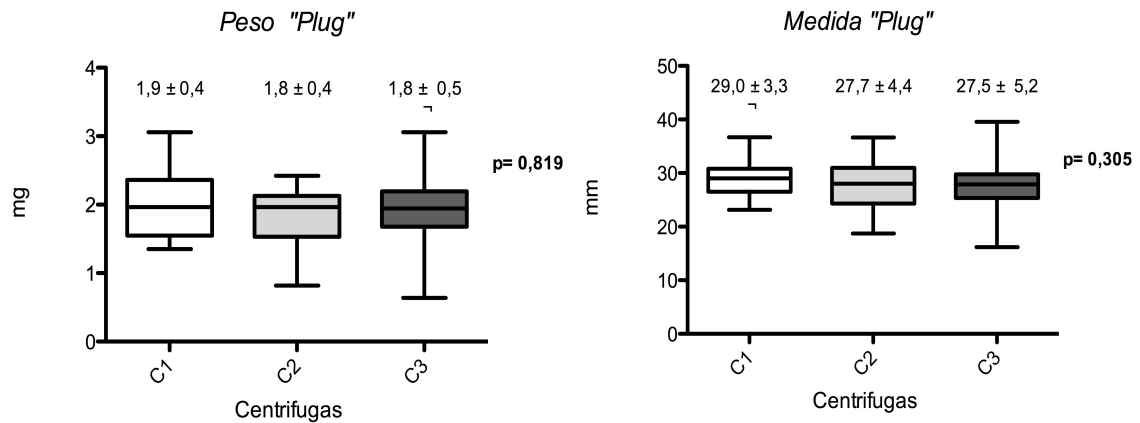


Figura 4. Blox-plot da diferença entre o peso e medida do Plug de PRF formado pelas diferentes centrífugas. As diferenças significativas entre os grupos foram realizadas pelo teste Friedmann ( $p > 0,05$ ). C1; Intra-lock L-PRF Process, Alemanha; (C2) : Kasvi Digital, China: (C3); Prf Montserrat, China.

As medidas macroscópicas estão descritas nas figuras 4 e 5. Foram feitas medidas lineares de comprimento dos “plugs” dos agregados de plasma rico em fibrina das três centrífugas testadas bem como o peso úmido dos mesmos, antes e após o processamento da membrana. A figura 2 apresenta a distribuição dos valores e a média do peso e da medida do agregado plaquetário antes do processamento da membrana. Observamos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos de centrífugas para nenhuma das análises. As medidas do peso e da medida linear muito semelhantes entre as centrífugas.

A figura 5 apresenta as mesmas mensurações de peso e medida linear após a formação da membrana de PRF. Os valores médios foram muito similares entre as centrífugas, no que se relaciona ao peso úmido e a media linear, sendo que o peso úmido variou de 0,22 a 0, 25mg e a medida linear de 24,1 a 26,7mm ( $p > 0,05$ ).

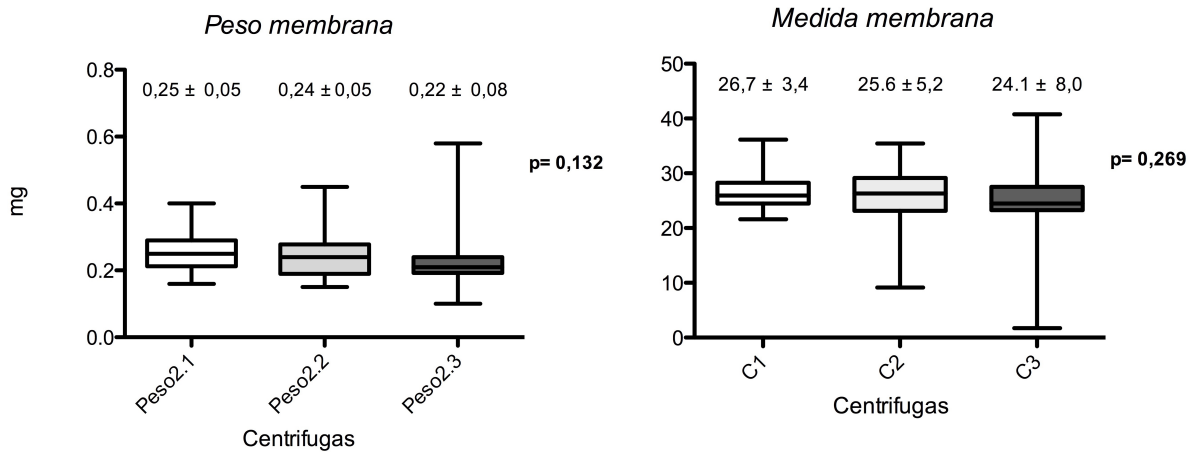


Figura 5. Blox-plot da diferença entre o peso e pedida da membrana de PRF formado pelas diferentes centrífugas. As diferenças significativas entre os grupos foram realizadas pelo teste Friedmann ( $p > 0,05$ ). C1; Intra-lock L-PRF Process, Alemanha; (C2) : Kasvi Digital, China: (C3); Prf Montserrat, China.

A tabela 1 apresenta o coeficiente de variabilidade entre as centrífugas para as quatro medidas macroscópicas realizadas no presente estudo. Observamos que os dados apresentados pelas centrífugas C1 e C2 apresentam dados mais homogêneos quando comparados a centrífuga C3. Os menores valores de dispersão foram observados para a centrífuga C1 e os dados mais heterogêneos foram encontrados para a centrífuga C3.

Tabela 1. Coeficiente de variabilidade entre as centrífugas testadas e as medidas macroscópicas realizadas.

Centrífugas	Peso "Plug"	Medida "Plug"	Peso membrana	Medida membrana
C1	20%	11%	20%	12%
C2	24%	15%	21%	22%
C3	33%	22%	36%	33%

A tabela 2 apresenta a média dos valores séricos de componentes sanguíneos dos indivíduos selecionados para o presente estudo.

COMPONENTE SANGUÍNEO	PACIENTES	REFERENCIA
Eritrocitos	5,025	4,5 - 5,5
Hemoglobina	14,72	13,0 - 17,0
Hematocrito	43,87	40,0 - 50,0
Plaquetas	238.666,66	150-400mil/ mm <sup>3</sup>
Leucócitos totais	7,14	4,5 - 11,00
Neutrófilos	4,28	1,80 - 7,70
Linfócitos totais	2,48	1,0 - 4,0
Monocitos	0,37	0,0 - 0,8
Tempo protrombina (seg)	10,99	1,00 até 1,20
Atividade protrombina (%)	98,90	70 até 130%
Tempo de tromboplastina parcial ativada (seg)	25,25	0,85 a 1,20
Tempo de sangramento (min)	2,1	1,00 até 4,00 min

Não foram encontradas correlações significantes entre as medidas de peso e medida do plug e da membrana de PRF e os dados sanguíneos dos pacientes individualmente para cada centrífuga e também quando os dados foram todos analisados conjuntamente.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado para comparar e verificar a similaridade dos aspectos macroscópicos de “plugs” e membranas produzidas a partir de diferentes centrífugas e seus respectivos protocolos de centrifugação dos agregados plaquetários. Além disso, correlacionar os resultados macroscópicos e os níveis séricos sanguíneos obtidos através da análise do hemograma e coagulograma dos pacientes selecionados. Os resultados do presente estudo demonstram uma similaridade em termos macroscópicos quando comparamos as diferentes centrífugas utilizadas na obtenção das membranas de fibrina rica em plaquetas (PRF). Desta forma, não foram observados diferenças significativas no peso e na medida linear dos “plugs” e das membranas de PRF obtidas após os diferentes protocolos de centrifugação.

Nossos dados corroboram em parte com os dados obtidos por Ehrenfest et al. (2017), que compararam macroscopicamente o peso e medida dos “plugs” e membranas de PRF de 04 diferentes centrífugas (Intra-Spin-Intra-Lock, A-PRF 12- Advanced PRF Process; Salvin 1310- Salvin Dental; e LW - UPD8- LW Scientific). Para isso selecionaram 8 voluntários e nove tubos foram coletados e cada voluntários. Os valores do peso do “plug” e da membrana de PRF obtidos por Ehrenfest et al., (2017) foram similares aos obtidos no presente estudo. Os autores observaram não haver diferenças estatísticas para os dados macroscópicos entre a centrífugas Intra-Spin e Salvi Dental, todavia, foram encontradas diferenças em relação as outras marcas comerciais de centrífugas. Diferente de nossa metodologia, no estudo de Ehrenfest et al., (2017), os autores utilizaram o mesmo protocolo de centrifugação para todas as centrífugas (12 minutos, a 2700 rpm). Sabe-se que o melhor protocolo de obtenção é obtido com 400g de força durante o processamento, assim os autores justificam as diferenças estatísticas encontradas a estes fatores, além da diferença de vibração entre as centrífugas. Em teoria, a ausência de diferenças estatísticas encontradas no presente estudo pode ser justificada na individualização dos protocolos de centrifugação utilizado em nosso estudo, onde individualizou-se os processamentos afim de obter-se 400g de força durante a obtenção do PRF.

Pelos dados obtidos no presente estudo, observamos um menor valor de variabilidade para as centrifugas C1 e C2 quando comparadas a centrifuga C3 (Tabela 1). Uma das explicações para este dado, pode ser a força de centrifugação, bem como a vibração obtido durante o processamento. Estudos observaram diferenças físicas e moleculares quando diferentes vibrações ocorreram durante o processamento (Ehrenfest et al., 2010, Dohan et al., 2012, Enhenfest et al., 2017). Enhenfest et al., em 2017, relataram que quando a vibração do rotor esteja acima de 1 influencia diretamente o tamanho e a homogeneidade das membranas de PRF.

No presente estudo buscamos correlacionar os achados dos componentes celulares sanguíneos obtidos por meio de hemograma e os dados macroscópicos dos “plugs” e das membranas de PRF das diferentes centrifugas. Novamente, não foram encontradas correlações entre estas medidas e os componentes celulares dos hemogramas. Quando observamos os dados obtidos pelo exame de hemograma notamos que todos os dados celulares estão de acordo com os índices de referência de normalidade (Tabela 2). Assim sendo, este fato pode explicar a ausência de correlação encontradas entre os dados, visto que uma vez que o paciente esteja com o exame de hemograma dentro dos padrões de normalidade os valores para o peso e dimensão da membrana de PRF estarão dentro dos valores médios obtidos no presente estudo, entretanto, este é o primeiro estudo que buscou relacionar estes fatores.

Em relação o tempo de coleta do sangue venoso, nossos dados são similares aos obtidos por outros estudos (Choukroun et al., 2017, Enhenfest et al., 2017). No presente estudo a média de tempo de coleta, independentemente do centrifuga foi de  $21.5 \pm 9,9$  segundos, valores próximos aos obtidos pelos autores citados acima, que foi de 22 segundos (Enhenfest et al., 2017). Assim, esta padronização pode justificar também a similaridade de peso e medida obtida no presente estudo.

Dentre as limitações do presente estudo, podemos citar principalmente a ausência de uma análise molecular das membranas de PRF obtidas pelas diferentes centrifugas estudadas. Vários autores relataram diferentes assinaturas biológicas obtidas de diferentes centrifugas para PRF (Su et al. 2009, Enhenfest et al. 2014, Enhenfest et al. 2017, Choukroun et al. 2017). Estes autores relataram diferentes concentrações de fatores de crescimento tais como fatores de crescimento de derivados de plaqueta (PDGF), transformadores de fator de crescimento  $\beta$ (TGF- $\beta$ ), fator

de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de insulina 1(IGF-1). Assim sendo, a análise de diferentes moléculas de fatores de crescimento poderão ajudar a compreender a real diferença ou similaridade existente entre as membranas obtidas no presente estudo. Todavia, é importante salientar que não existe dados na literatura que definam quais seriam os melhores valores e as concentrações ideais destes fatores de crescimento presentes nas membranas de PRF. Além disso, a influencia destes diferentes níveis de fatores de crescimento devem ser testados clinicamente.

## 7. CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, podemos concluir que do ponto de vista macroscópico, não existem diferenças existentes entre os agregados plaquetários formados por diferentes centrífugas e nenhuma correlação foi encontrada entre estes PRF e os dados celulares obtidos pelo hemograma

## REFERÊNCIAS

Acar, A.; Yoicu, Ü.; Gül, M.; Keles, A.; Erdem, N.; Altundag, S. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol.* 2014 Oct 14;60(4):606-614

Agrawal, M.; Agrawa, V. Platelet rich fibrin and its applications in dentistry: a review article. *National Journal of Medical and Dental Research, India:* v. 2, n. 3, p. 51-58, jun./2014.

Anilkumar, K.; Geetha, A.; Umasudhakar; Ramakrishnan, T.; VIJAYALAKSHMI, R.; Pameela, E. Platelet-rich-fibrin: A novel root coverage approach, *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 13, n. 1, Jan-Abri./2009.

Anitua, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 14, p. 529-535, 1999.

Anwandter A1, Bohmann S2, Nally M3, Castro AB4, Quirynen M5, Pinto N6. Dimensional changes of the post extraction alveolar ridge, preserved with Leukocyte- and Platelet Rich Fibrin: A clinical pilot study. *J Dent.* 2016 Sep;52:23-9.

Borges FL1, Dias RO, Piattelli A, Onuma T, Gouveia Cardoso LA, Salomão M, Scarano A, Ayub E, Shibli JA. Simultaneous sinus membrane elevation and dental implant placement without bone graft: a 6-month follow-up study. *J Periodontol.* 2011 Mar;82(3):403-12.

Buser D1, Martin W, Belser UC. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19 Suppl:43-61.



Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, Quirynen M. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2017 Jan;44(1):67-82. doi: 10.1111/jcpe.12643. Epub 2016 Nov 24. Review.

Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, Quirynen M. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2017 Feb;44(2):225-234.

Choukroun, J.; ET AL. Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*, v. 42, p. 55-62, 2000.

Choukroun, J.; Diss, A.; Simonpieri, A.; Girard, M.O.; Schoeffler, C.; Dohan, S.L.; Dohan, A.J.; Mouhyi, J.; Dohan, D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral.Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:E56-60

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 Trauma Emergence and Surgery*, 2017

Del Corso, M. et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v. 13, n. 7, p. 1207-1230, Jul. 2012.

Dohan, D.M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S.L.; Dohan, A.J.; Mouhyi, J.; Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:E45-50.

Dohan, D.M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S.L.; Mouhyi, J.; Gogly, B. 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:E37-44).

Dohan, D.M.; Choukroun, J.; Diss, A.; Dohan, S.L.; Mouhyi, J.; Gogly, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates?. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:E51-5.

Ehrenfest, D. M. D.; Andia I.; Zumstein M. A.; Zhang C. Q.; Pinto N. R.; Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*; 4 (1): 3-9, 2014

Ehrenfest, D. M. D. 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, n. 1, p. 17-27, 2013.

Ehrenfest, D. M. D.; Pinto N. R.; Pereda A.; Jimenez P.; Corso M.; Kang B. S.; Nally M.; Lanata N.; Wang H.L.; Quirynen M. 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*, Early Online: 1–14. 2017.

Ehrenfest, D. M. D. et al. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: growth factor release and contradictory results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 110, n. 4, Oct. 2010.

Ehrenfest, D. M. D.; Rasmusson, L.; Albrektsson, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*, v. 27, n. 3, Mar. 2009.

Garlini, G.; Redemagni, M.; Donini, M.; Maiorana, C. Maxillary sinus elevation with an alloplastic material and implants: 11 years of clinical and radiologic follow up. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 May;68(5):1152-7.

Giannobili, W.V. Periodontal tissues engineering by growth factors. *Bone.* v. 19, suplemento 1, p. 23S-37S, Jul. 1996

Griffin TJ1, Cheung WS, Zavras AI, Damoulis PD. Postoperative complications following gingival augmentation procedures. *J Periodontol.* 2006 Dec;77(12):2070-9.

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

Jeong, SM.; Lee, C.U.; Son, J.S.; Oh, J.H.; Fang, Y.; Choi, B.H. Simultaneous sinus lift and implantation using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014 Sep;42(6):990-4.

Kazor CE1, Al-Shammari K, Sarment DP, Misch CE, Wang HL. Implant plastic surgery: a review and rationale. *J Oral Implantol.* 2004;30(4):240-54.

Kim JB1, Morita M, Kusumoto M, Watanabe T, Takagi S, Nishijima K. Preservation of permanent teeth in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome by professional tooth-cleaning. *ASDC J Dent Child.* 1997 May-Jun;64(3):222-6.

Li, Q. et al. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *BioMed Res. Int.*, v.13, Article ID 638043, 13 pages, 2013 Mar.

Mazor, Z.; Harowitz, R.; Del Corso, M.; Prasad, H.; Rohrer, M.; Dohan Ehrenfest, D. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *J Periodontol.* 2009 Dec;80(12):2056-64.

Marrelli, M.; Tatullo, M. Influence of PRF in the healing of bone and gingival tissues. Clinical and histological evaluations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013 Jul; 17(14):1958-62.

Marx, R. E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 85, n. 6, p. 638-646, June 1998.

Sanz M1, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009 Oct;36(10):868-76. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01460.x. Epub 2009 Aug 12.

Shibli JA1, d'avila S, Marcantonio E Jr. Connective tissue graft to correct peri-implant soft tissue margin: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 2004 Feb;91(2):119-22

Simon BI1, Gupta P, Tajbakhsh S. Quantitative evaluation of extraction socket healing following the use of autologous platelet-rich fibrin matrix in humans. *nt J Periodontics Restorative Dent.* 2011 Jun;31(3):285-95.

Simon BI1, Zatcoff AL, Kong JJ, O'Connell SM. Clinical and Histological Comparison of Extraction Socket Healing Following the Use of Autologous Platelet-Rich Fibrin Matrix (PRFM) to Ridge Preservation Procedures Employing Demineralized Freeze Dried Bone Allograft Material and Membrane. *Open Dent J.* 2009 May 20;3:92-9.

Simonpieri, A.; Choukroun, J.; Del Corso, M.; Sammartino, G.; Dohan, D. Simultaneous Sinus-Lift and Implantation Using Microthreaded Implants and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material: A Six-Year Experience. *Implant Dent* 2011;20:2–12.

Su, C.; Kuo, Y.; Tseng, Y.; Su, C.; Burnouf, T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jul;108(1):56-61.

Sunitha, R.V.; Munirathanam, N.E. Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research.* 2008, 19 (1): 42-46.

Tajima, N.; Ohba, S.; Sawase, T.; Asahina, I. Evaluation of Sinus Floor Augmentation with Simultaneous Implant Placement Using Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:77– 83.

Vendramin, F. S.; Franco, D.; Nogueira, C. M.; Pereira, M. S.; Franco, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica, *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 33, n. 1, p. 24-28, Jan./Fev 2006.