



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de Biologia Básica e Oral

Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral

Efeitos de agregados plaquetários produzidos por três protocolos de centrifugação na neoformação óssea em defeitos criados em calvária de ratos

DÉBORA DE SOUZA FERREIRA SÁVIO

RIBEIRÃO PRETO

2022

DÉBORA DE SOUZA FERREIRA SÁVIO

Efeitos de agregados plaquetários produzidos por três protocolos de centrifugação na neoformação óssea em defeitos criados em calvária de ratos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messoria.

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Sávio, Débora de Souza Ferreira.

Efeitos de agregados plaquetários produzidos por três protocolos de centrifugação na neoformação óssea em defeitos criados em calvária de ratos / Débora de Souza Ferreira Sávio; orientador Michel Reis Messora – Ribeirão Preto, 2022.

162 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2022.

Versão Corrigida

1. Regeneração Óssea. 2. Regeneração Tecidual Guiada. 3. Fibrina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SÁVIO, D. S. F. **Efeitos de agregados plaquetários produzidos por três protocolos de centrifugação na neoformação óssea em defeitos criados em calvária de ratos.** 2022. 162 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Ao meu filho, Henrique,
 por me dar a chance de ser
 melhor a cada dia.*

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por iluminar o meu caminho, dando-me força e determinação para alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais (Rose e Francisco), por todo o amor e dedicação, por estarem ao meu lado nas grandes conquistas e nas maiores dificuldades. Meu amor por vocês é infinito!

A minha irmã, Fernanda, por ter me ensinado a me preocupar e cuidar de você. Você tem toda a minha admiração pela pessoa incrível que se tornou.

Ao meu marido e companheiro de vida, João Luís, por me impulsionar, pelo apoio e amor incondicional. Devo a você as minhas melhores conquistas.

Ao meu filho, Henrique, pela oportunidade de ser sua mãe e aprender a cada dia a ser uma pessoa melhor. Já não lembro mais como minha vida era antes de você!

Aos meus sogros, Juliana e Luís, por serem sempre tão presentes e ajudarem a tornar mais leve minha jornada.

Ao meu orientador, Prof. Michel, por me abrir tantas portas, por me proporcionar tanto conhecimento, e acima de tudo, pela paciência.

Aos amigos da FORP, Lúcia, Natacha, Felipe, Ulli, Raphael, Gabriel, Ricardo, Pedro. Vocês foram fundamentais para o

*desenvolvimento deste projeto. Em especial, à **Lúcia** e à **Natacha**, por cuidarem dos meus ratos durante a pandemia!*

*A todos os **professores** e demais **funcionários** da **FORP**, especialmente da **Biologia Oral** e da **Periodontia**, pelo papel fundamental no desenvolvimento da ciência.*

*A professora **Roberta Okamoto** (**UNESP - Aracatuba**), pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho.*

Resumo

RESUMO

SÁVIO, D. S. F. **Efeitos de agregados plaquetários produzidos por três protocolos de centrifugação na neoformação óssea em defeitos criados em calvária de ratos.** 2022. 162 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Este estudo avaliou o potencial regenerativo de agregados plaquetários obtidos por 3 protocolos diferentes produzidos em equipamentos de centrifugação horizontal (H-PRF) e de ângulo fixo (L-PRF e A-PRF) na neoformação óssea em defeitos de tamanho crítico (DTCs) em calvária de ratos. Previamente à execução do experimento principal, animais adicionais foram utilizados para validação dos protocolos de centrifugação utilizados neste estudo por meio de análise por pipetagem sequencial. Para o experimento principal, 32 ratos foram divididos em quatro grupos: C, L-PRF, A-PRF e H-PRF. Após coleta de sangue dos animais por punção cardíaca, agregados plaquetários foram preparados por protocolos de centrifugação vertical (L-PRF e A-PRF, preparados em centrífuga de ângulo fixo [33° de angulação do rotor, 55mm de raio na altura do coágulo, 86mm de raio máximo]) e horizontal (H-PRF, preparado em centrífuga de rotor basculante). Para o preparo da L-PRF, o sangue foi centrifugado a uma Força Centrífuga Relativa máxima (RCFmax) de 701g (Força G) por 12 minutos; para o preparo da A-PRF, o sangue foi centrifugado a uma RCFmax de 216g, por 14 minutos; o preparo da H-PRF foi realizado pela centrifugação do sangue a uma RCFmax de 700g por 8 minutos. Foram criados DTCs de 5mm de diâmetro nas calvárias dos animais por osteotomia com broca trefina em baixa rotação e irrigação abundante com solução salina estéril. Marcações de amálgama foram feitas para auxiliar a identificação das margens originais do defeito durante o processamento laboratorial. Os defeitos dos grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF foram preenchidos com coágulo sanguíneo, L-PRF, A-PRF e H-PRF, respectivamente. Aos 14 e 30 dias foram realizadas injeções dos fluorocromos calceína (CA) e alizarina (AL), respectivamente. A eutanásia ocorreu aos 35 dias pós-operatórios. Análises microtomográficas, por microscopia de fluorescência e histomorfométricas foram realizadas. Os dados foram estatisticamente analisados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Os grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF apresentaram maiores valores de volume ósseo percentual (BV/TV), área de osso neoformado (AON) e maior precipitação de CA e AL do que o grupo C ($p < 0,05$). O grupo H-PRF apresentou maiores valores de BV/TV, número de trabéculas ósseas (Tb.N), AON e maior precipitação de AL do que os grupos A-PRF e L-PRF ($p < 0,05$). Pode-se concluir que: i) os agregados plaquetários L-PRF, A-PRF e H-PRF potencializam a neoformação óssea em DTCs em calvária de ratos; ii) o protocolo de centrifugação horizontal promoveu maior neoformação óssea no tratamento de DTCs criados em calvária de ratos.

Palavras-chave: Regeneração Óssea. Fibrina Rica em Plaquetas. Ratos.

Abstract

ABSTRACT

SÁVIO, D. S. F. **Effects of platelet aggregates produced by three centrifugation protocols on bone neoformation in defects created in rat calvaria.** 2022. 162 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

This study evaluated the regenerative potential of platelet aggregates obtained by 3 different protocols produced in horizontal (H-PRF) and fixed-angle (L-PRF and A-PRF) centrifuge in bone neoformation in critical size defects (CSDs) in rat calvaria. Prior to the execution of the main experiment, additional animals were used to validate the centrifugation protocols used in this study by sequential pipetting analysis. For the main experiment, 32 rats were divided into four groups: C, L-PRF, A-PRF and H-PRF. After collecting blood from the animals by cardiac puncture, platelet aggregates were prepared by vertical centrifugation protocols (L-PRF and A-PRF, prepared in a fixed-angle centrifuge [33° rotor angle, 55mm radius at the clot height, 86mm maximum radius]) and horizontal (H-PRF, prepared in a swing-out rotor centrifuge). To prepare the L-PRF, the blood was centrifuged at a Relative Centrifugal Force (RCF)-max of 701g (G-force) for 12 minutes; to prepare the A-PRF, the blood was centrifuged at 216g RCFmax for 14 minutes; H-PRF preparation was performed by centrifuging the blood at 700g RCFmax for 8 minutes. 5mm diameter DTCs were created in the animals' calvaria by osteotomy with a trephine drill at low rotation and abundant irrigation with sterile saline solution. Amalgam markings were made to help identify the original margins of the defect during laboratory processing. Defects in groups C, L-PRF, A-PRF and H-PRF were filled with blood clot, L-PRF, A-PRF and H-PRF, respectively. At 14 and 30 days, injections of the fluorochromes calcein (CA) and alizarin (AL) were performed, respectively. Euthanasia took place 35 days after surgery. Microtomographic, fluorescence microscopy and histomorphometric analyzes were performed. Data were statistically analyzed (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). The L-PRF, A-PRF and H-PRF groups showed higher values of percent bone volume (BV/TV), newly formed bone area (NFBA) and greater precipitation of CA and AL than the C group ($p < 0.05$). The H-PRF group showed higher values of BV/TV, number of trabeculae (Tb.N), NFBA and higher precipitation of AL than the A-PRF and L-PRF groups ($p < 0.05$). It can be concluded that: i) platelet aggregates L-PRF, A-PRF and H-PRF potentiate bone neoformation in DTCs in rat calvaria; ii) the horizontal centrifugation protocol promoted greater bone neoformation in the treatment of CSDs created in rat calvaria.

Key words: Bone Regeneration. Platelet-Rich Fibrin. Rats.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Obtenção das matrizes de PRF pela centrifugação vertical (A-C) e horizontal (D-F). **A** – Inserção do tubo contendo a amostra sanguínea na centrífuga vertical; **B** – Tubo após processo de centrifugação: observar a separação entre o coágulo e a camada de células vermelhas formando um ângulo com o tubo; **C** – Coleta da matriz de PRF; **D** – Inserção do tubo contendo a amostra sanguínea na centrífuga horizontal; **E** – Tubo após processo de centrifugação: observar a melhor separação das camadas, evidenciada pela interface horizontal entre o coágulo e a camada de células vermelhas; **F** – Coleta da matriz de PRF. 61

Figura 2 – Caracterização das matrizes de PRF. **A** – Pipetagem sequencial das camadas de PRF dentro do tubo. **B** – Amostras coletadas, prontas para serem levadas para análise. A seta representa a camada de buffy coat. 63

Figura 3 – Confeção do DTC. **A** – Incisão semilunar na calvária do animal; **B** – Retalho de espessura total rebatido em direção posterior; **C** – Osteotomia com broca trefina; **D** – Remoção do segmento ósseo no osso parietal; **E** – Marcação com broca diamantada em alta rotação; **F** – Marcações preenchidas com amálgama. 65

Figura 4 – Preparo da membrana de PRF para tratamento dos DTCs. **A** – Padronização do volume de PRF utilizando seringa de 1 mL adaptada; **B** – Defeito preenchido com 0,01 mL de PRF. **C** – Posicionamento da membrana de PRF, cobrindo o defeito cirúrgico; **D** – Sutura do retalho com pontos interrompidos simples. Todos os procedimentos são idênticos para os grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF. 66

Figura 5 – Imagens do centro do DTC obtidas por microscopia confocal. **A** – precipitação de calceína (verde); **B** – precipitação de alizarina (vermelho); **C** – sobreposição das imagens, mostrando ambos os fluorocromos. 70

Figura 6 - Delimitação e mensuração da área marcada por calceína e alizarina utilizando o software ImageJ (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canadá). 70

Figura 7 – Imagens capturadas de cortes histológicos para ilustração da Análise Histométrica. **A** – A Área Total (AT) é delimitada pela linha azul e corresponde à área da calvária onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A altura da AT (X) corresponde à média entre a altura do coto direito (CD) e do coto esquerdo (CE). A largura da AT é de 5 mm, correspondente à largura do defeito original. Aumento = 1,6x. **B** – As formas circuladas em preto correspondem à Área de Osso Neoformado (AON). B é uma aproximação do retângulo AT representado em A. 72

Figura 8 – Número de plaquetas na amostra de sangue não centrifugado (amostra controle – A0) e após centrifugação (camadas A1 a A10). **A** – L-PRF; **B** – A-PRF; **C** – H-PRF. 78

Figura 9 – Número de leucócitos na amostra de sangue não centrifugado (amostra controle – A0) e após centrifugação (camadas A1 a A10). **A** – L-PRF; **B** – A-PRF; **C** – H-PRF. 80

Figura 10 – Micro-CT das calvárias. Médias e desvios-padrão (DP) de BV/TV, PO (tot), Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn dos grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 83

Figura 11 – Imagens representativas das reconstruções tridimensionais das calvárias dos grupos C (A), L-PRF (B), A-PRF (C) e H-PRF (D). 84

Figura 12 – Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando a sobreposição da calceína (verde) e da alizarina (vermelho) nos grupos experimentais. Imagens representativas do centro do DTC (A, C, E, G) e da região próxima a um dos cotos originais (B, D, F, H). Grupos: C (A,B); L-PRF (C,D); A-PRF (E,F); H-PRF (G,H). As setas representam as margens do defeito cirúrgico original. Aumento original = 10x. 86

Figura 13 – Médias e desvios-padrão para precipitação de calceína e alizarina para os grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações intragrupos. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 87

Figura 14 – Médias e desvios-padrão para precipitação de calceína (A) e alizarina (B) para os grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

88

Figura 15 – Médias e desvios-padrão para AON para os grupos C, L-PRF, A-PRF e 2.209 \pm 0.9602 N=10H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

89

Figura 16 – Imagem panorâmica dos cortes histológicos. **A** – Grupo C; **B** – Grupo L-PRF; **C** – Grupo A-PRF; **D** – Grupo H-PRF. Aumento original = 1,6x.

91

Figura 17 – Imagens representativas de cortes histológicos. Grupos: C (A, B); L-PRF (C, D); A-PRF (E, F); H-PRF (G, H). ON = osso neoformado; seta não preenchida = margens do defeito cirúrgico original. *As imagens G, H representam porções distantes das margens do defeito cirúrgico. Coloração: Azul de Stevenell e Vermelho de Alizarina. Aumento original = 10x (A, C, E, G); 20x (B, D, F, H).

92

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição percentual de plaquetas em todas as camadas (A1-A10) após centrifugação do sangue para preparo de L-PRF, A-PRF e H-PRF. 79

Tabela 2 – Distribuição percentual de leucócitos em todas as camadas (A1-A10) após centrifugação do sangue para preparo de L-PRF, A-PRF e H-PRF. 81

Tabela 3 – Micro-CT das calvárias. Médias e desvios-padrão (DP) de BV/TV, PO (tot), Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn dos grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 82

Tabela 4 – Análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Médias e desvios-padrão (DP) para precipitação de calceína e alizarina para os grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 88

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-TCP	Beta Fosfato Tricálcico
μA	Microampère
μm	Micrometro
μL	Microlitro
AON	Área de Osso Neoformado
A-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas Avançada
ANOVA	Análise de Variância
AT	Área Total
H-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas produzida pela centrifugação horizontal
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BV/TV	Volume Ósseo Percentual
C	Controle
CCI	Coeficiente de Correlação Intraclasse
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Conn.Dn	Densidade de conectividade
DTC	Defeito de Tamanho Crítico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMD	Matriz derivada de esmalte
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Força g
IGF	Fator de Crescimento semelhante à Insulina
i-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas injetável
Kg	Quilograma
kV	Quilovolt
L-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
mg	Miligrama
micro-CT	Microtomografia computadorizada
mL	Mililitro

mm	–	Milímetro
PDGF	–	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pH	–	Potencial Hidrogeniônico
PO	–	Porosidade Total
PRF	–	Fibrina Rica em Plaquetas
PRP	–	Plasma Rico em Plaquetas
RCFmax	–	Força Centrífuga Relativa máxima
ROG	–	Regeneração Óssea Guiada
ROI	–	Região de Interesse
rpm	–	Rotações por minuto
S-PRF	–	Fibrina Rica em Plaquetas Padrão
Tb.N	–	Número de trabéculas ósseas
Tb.Sp	–	Espaçamento entre as trabéculas ósseas
TGF	–	Fator de Crescimento Transformante
UI	–	Unidades Internacionais
USP	–	Universidade de São Paulo
VEGF	–	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VOI	–	Volume de Interesse

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

~	Valores aproximados
#	Número
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
®	Marca registrada
™	Marca comercial
°	Grau Lussac
°C	Grau Celsius
n	Tamanho da amostra
=	Igual
x	Vezez
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	45
2 OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo geral.....	55
2.2 Objetivos específicos.....	55
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1 Animais.....	59
3.2 Desenho experimental.....	59
3.3 Anestesia.....	60
3.4 Coleta sanguínea e processamento da PRF.....	60
3.5 Validação dos protocolos L-PRF, A-PRF e H-PRF.....	62
3.6 Confeção dos DTCs.....	63
3.7 Administração de fluorocromos.....	67
3.8 Eutanásia.....	67
3.9 Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT).....	67
3.10 Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	68
3.10.1 Processamento laboratorial.....	68
3.10.2 Análise das imagens.....	69
3.11 Análise Histomorfométrica.....	71
3.12 Variáveis de resultado.....	72
3.13 Análise estatística.....	72
4 RESULTADOS.....	77
4.1 Validação dos protocolos L-PRF, A-PRF e H-PRF.....	77
4.2 Análise por microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT das calvárias).....	81
4.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	84

4.4 Análise histomorfológica	88
4.4.1 Análise histométrica	88
4.4.2 Análise histopatológica.....	89
5 DISCUSSÃO.....	95
6 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS.....	120

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos – L-PRF

Um dos maiores desafios de terapias regenerativas na Odontologia, principalmente após o advento dos implantes de titânio, encontra-se em repor adequadamente os tecidos perdidos, ou mesmo evitar a perda antes que ela ocorra, para que o tratamento instituído resulte em sucesso e longevidade. A complexidade dos tecidos orais, tratando-se de tecidos moles ou mineralizados, com diferentes tipos celulares organizados em matrizes extracelulares altamente especializadas, estimula a busca pelo desenvolvimento de materiais que promovam a regeneração de maneira efetiva em áreas de defeito (GHANAATI et al., 2014; MIRON et al., 2017; SANTINONI et al., 2020; URBAN; MONJE, 2019).

Com isso, a engenharia tecidual evoluiu e introduziu uma série de procedimentos e materiais regenerativos, tais como membranas e enxertos ósseos de origem humana, animal ou sintética, fatores de crescimento como Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) e Matriz Derivada de Esmalte (EMD), transplante de células estromais da medula óssea, culturas celulares, que variam de intervenções mais simples até as mais ambiciosas (FUCHS et al., 2009; GHANAATI et al., 2011; MIRON et al., 2017; OKAMOTO et al., 2011; SARBAN et al., 2009; UNGER et al., 2010).

Porém, muitas das terapias regenerativas estabelecidas em literatura envolvem técnicas complexas, de alto custo e que demandam tempo para sua aplicação, levando à necessidade de desenvolvimento de estratégias terapêuticas fáceis de serem aplicadas na clínica diária, por meio de materiais que atuem como barreira temporária e estimulem a regeneração tecidual. Nesse sentido, tem sido proposta nos últimos anos a utilização de concentrados plaquetários produzidos a partir do sangue do próprio paciente, obtendo-se uma membrana tridimensional facilmente aplicável e com resultados promissores na promoção da regeneração tecidual. Esta estratégia terapêutica utiliza células e fatores de crescimento coletados do próprio paciente, os quais são aplicados no sítio cirúrgico para estimular a regeneração dos tecidos (DOHAN et al., 2006a; DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009; FIJNHEER et al., 1990; GHANAATI et al., 2018; MIRON et al., 2017).

O uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), primeira geração de concentrados plaquetários obtidos por meio da centrifugação de sangue autólogo, foi relatado pela

primeira vez por Marx e colaboradores (1998). O método demonstra resultados positivos em relação à concentração de plaquetas e liberação de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação e migração celular (MARX, 2004). Porém, a obtenção do PRP exige a necessidade da coleta de sangue em tubos contendo anticoagulantes, o que pode ser prejudicial para seu potencial biológico, visto que a coagulação é um processo importante durante a regeneração tecidual (FIJNHEER et al., 1990; MARX, 2004; MIRON et al., 2019a).

Nesse sentido, a Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) surge como uma técnica mais acessível e de simples obtenção, permitindo sua aplicação nos mais diversos procedimentos cirúrgicos orais com o objetivo de acelerar a formação de novos tecidos (DEL FABBRO; GALLESIO; MOZZATI, 2015). Além da facilidade de obtenção e aplicação e da não utilização de anticoagulantes na coleta do sangue, a L-PRF apresenta outras vantagens em relação ao PRP, tais como a manutenção da estabilidade da membrana nos tecidos por mais tempo, o que permite a retenção das plaquetas e liberação de fatores de crescimento de maneira mais lenta e gradual (KOBAYASHI et al., 2016).

Descrita pela primeira vez por Choukroun e colaboradores (2001), a L-PRF consiste em uma rede de fibrina tridimensional, característica dos estágios finais da cascata de coagulação, formando um arcabouço biológico que atua como fonte de citocinas e fatores de crescimento, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF)- β , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1, fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Assim, promove a aceleração da migração e proliferação celular, angiogênese, modulação da resposta imunológica e recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, o que favorece a reparação e regeneração de tecidos moles e duros (BASLARLI et al., 2015; CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; GHANAATI et al., 2018; LI et al., 2014; SOFFER; OUHAYOUN; ANAGNOSTOU, 2003; ZHAO; TSAI; CHANG, 2011).

A liberação dos fatores de crescimento ocorre de maneira lenta, podendo se estender até 28 dias após o procedimento cirúrgico (HE et al., 2009). O potencial dessas citocinas na regeneração tecidual tem sido demonstrado em diversos estudos (CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN et al., 2006b; DOHAN et al., 2006c). Evidências demonstram que a L-PRF favorece a proliferação e diferenciação de osteoblastos e

fibroblastos por meio do aumento na expressão de osteoprotegerina e fosfatase alcalina (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a,b; HE et al., 2009).

Durante o processo regenerativo, a degradação da rede de fibrina estimula a migração e ativação de neutrófilos, que agem eliminando bactérias e patógenos da região por meio da fagocitose e produção de radicais livres, contribuindo para a prevenção da contaminação por microrganismos durante a regeneração tecidual (CLARK, 2001). De fato, tem sido demonstrada uma menor ocorrência de infecções pós-operatórias em alvéolos pós-extração preenchidos com membranas de PRF (HOAGLIN; LINES, 2013).

Para o preparo da L-PRF, o sangue é coletado em tubos sem a adição de anticoagulantes (LI et al., 2014). Após a coleta do sangue venoso em tubos de 10mL, este é imediatamente centrifugado em uma velocidade de 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Durante a centrifugação, a trombina circulante transforma o fibrinogênio em uma rede de fibrina, que aprisiona as plaquetas em seu interior. Formam-se três camadas: uma mais superficial que corresponde ao plasma acelular; outra mais profunda que representa as células da série vermelha do sangue; e a porção intermediária, relativa ao coágulo de PRF. O coágulo é, então, coletado e comprimido em gaze estéril ou em kits específicos para a formação da membrana de PRF (CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN EHRENFEST et al., 2010).

Evidências científicas do potencial regenerativo da L-PRF

Estudos demonstram que a utilização de concentrados plaquetários permite redução da dor, inflamação e ocorrência de complicações pós-operatórias (GRUBER et al., 2002; GÜRBÜZER et al., 2010). Inicialmente proposta para a potencialização da neoformação óssea após instalação de implantes dentários, atualmente a utilização da L-PRF se estende a terapias periodontais e reconstruções ósseas, podendo ser associadas a substitutos ósseos em procedimentos de enxertia e preservação de alvéolo pós-extração (INCHINGOLO et al., 2010; TEMMERMAN et al., 2016; ZHANG et al., 2012).

Yilmaz e colaboradores (2014) demonstraram que a combinação de membranas de PRF e enxerto sintético (Beta Fosfato Tricálcico – β -TCP) acelerou a neoformação óssea em defeitos criados em tíbias de suínos, em comparação com o uso isolado da PRF ou do β -TCP.

A utilização de concentrados plaquetários tem sido relatada em terapias regenerativas periodontais em associação ao debridamento em campo aberto, em regiões de defeito infra-ósseo, apresentando resultados promissores demonstrados por maiores diminuições da profundidade de sondagem e maiores ganhos de nível de inserção, em comparação com áreas onde somente o debridamento foi realizado (AJWANI et al., 2015; PRADEEP et al., 2012; SHARMA; PRADEEP, 2011). Quando combinada a enxertos ósseos, a PRF promove melhores resultados no preenchimento de defeitos infra-ósseos quando comparada ao uso do enxerto ósseo isolado (AGARWAL; GUPTA; JAIN, 2016; ELGENDY; ABO SHADY, 2015). A combinação da PRF a membranas de colágeno reabsorvíveis também leva a resultados estatisticamente mais efetivos no tratamento cirúrgico de defeitos periodontais infra-ósseos, demonstrados por maiores reduções na profundidade de sondagem, melhores níveis de inserção clínica e maiores reduções do defeito na avaliação radiográfica, quando comparada à utilização da membrana de colágeno de forma isolada (PANDA et al., 2016).

Sabe-se que, após a perda de um dente, a crista alveolar passa por um processo de remodelação óssea que culmina com uma reabsorção natural (ARAÚJO; LINDHE, 2005; CHAPPUIS et al., 2015; SCHROPP et al., 2003). Esse processo, que ocorre de maneira pronunciada nos primeiros três meses, pode resultar em impactos significativos na altura e espessura ósseas. Tem se relatado na literatura uma média de reabsorção óssea vertical de 0,7-1,5mm, enquanto a perda óssea horizontal pode variar entre 4,0-4,5mm (IASELLA et al., 2003; LEKOVIC et al., 1997; LEKOVIC et al., 1998; TEN HEGGELER; SLOT; VAN DER WEIJDEN, 2011). Nesses casos, a reabilitação da região é, muitas vezes, acompanhada da necessidade de procedimentos para recuperação dos tecidos de sustentação, prevenindo, assim, complicações estéticas e funcionais (MILINKOVIC; CORDARO, 2014; URBAN et al., 2016). Diversas técnicas e materiais regenerativos têm sido sugeridos ao longo dos anos para manutenção ou recuperação do tecido ósseo perdido após exodontias (ÁVILA-ORTIZ et al., 2014; ELNAYEF et al., 2017; HALLMAN; THOR, 2008; KUCHLER; von ARX, 2014; WANG; LANG, 2012). O advento dos concentrados plaquetários de origem autóloga representou uma nova abordagem promissora para o manejo de alterações ósseas dimensionais provocadas por perdas dentárias. O preenchimento de alvéolos pós-extração com membranas de PRF tem demonstrado resultados efetivos na manutenção dos tecidos e prevenção de perdas ósseas

significativas, em comparação a alvéolos preenchidos apenas com o coágulo sanguíneo. Observa-se a preservação da qualidade e densidade ósseas e menor tempo de cicatrização, associados a uma técnica de baixo custo (GIRISH RAO et al., 2013; HAUSER et al., 2013; SUTTAPREYASRI; LUPONG, 2013).

Outros procedimentos regenerativos orais também têm se beneficiado da utilização de concentrados plaquetários autógenos de forma isolada ou associados a outros biomateriais, tais como reparo tecidual em defeitos de furca (BAJAJ et al., 2013; PRADEEP et al., 2016), recobrimento radicular em recessões gengivais (AGARWAL et al., 2016; KECALI et al., 2015; TUNALI et al., 2015) e procedimentos para levantamento de seio maxilar (SIMONPIERI et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

Novas gerações de concentrados plaquetários autógenos

Variações na Força Centrífuga Relativa (RCF) e no tempo de centrifugação, bem como a introdução de novas centrífugas e tubos para coleta do sangue, levaram a modificações no método original de Choukroun e colaboradores (2001) e ao surgimento de novos protocolos, tais como Fator de Crescimento Concentrado (CGF), A-PRF e concentrados obtidos pela centrifugação horizontal (H-PRF) (AIZAWA et al., 2020).

Sabe-se, atualmente, que altas velocidades de centrifugação podem direcionar as células para a porção inferior do tubo. Como a PRF é coletada das camadas mais superiores, nos últimos anos tem sido sugerido que reduções na velocidade e no tempo de centrifugação podem levar a um aumento na quantidade de leucócitos aprisionados na matriz de PRF, potencializando seus efeitos regenerativos e cicatriciais, levando ao surgimento da Fibrina Rica em Plaquetas Avançada (A-PRF). Por sua vez, a liberação de fatores de crescimento também se demonstra aumentada com a utilização de protocolos de velocidade reduzida (GHANAATI et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016).

Ghanaati e colaboradores (2014) avaliaram comparativamente, por meio de estudo *in vitro*, a distribuição das células em coágulos de PRF produzidos por meio da centrifugação padrão e por meio de protocolo de velocidade reduzida. Após a coleta de amostras de sangue de doadores saudáveis, a PRF padrão (S-PRF) foi produzida pela centrifugação do sangue a 2700 rpm por 12 minutos, enquanto a A-PRF foi produzida a uma velocidade de 1500 rpm por 14 minutos. Os resultados

demonstraram que a diminuição da velocidade e o aumento do tempo de centrifugação levaram a um aumento do número de neutrófilos nas porções mais distais do coágulo, enquanto no coágulo de S-PRF as mesmas células apresentavam-se em maior proximidade com a camada de células vermelhas. Sugere-se que a melhor distribuição celular na A-PRF pode favorecer a regeneração tecidual.

Kobayashi et al. (2016) compararam *in vitro* a liberação de fatores de crescimento de coágulos de PRP, PRF e A-PRF. Nos primeiros 15 a 60 minutos de incubação, maior liberação de fatores de crescimento foi encontrada no PRP. Porém, após 10 dias, o grupo A-PRF demonstrou valores estatisticamente mais altos de acúmulo e liberação de fatores de crescimento comparado aos outros grupos, evidenciando um padrão de liberação lento, contínuo e gradual, o que pode favorecer a manutenção dos seus efeitos por um maior período.

Fujioka-Kobayashi et al. (2017) avaliaram *in vitro* a influência da alteração da velocidade e do tempo de centrifugação na liberação de fatores de crescimento de coágulos de L-PRF (produzidos a 2700 rpm por 12 minutos), A-PRF (1300 rpm por 14 minutos) e A-PRF+ (1300 rpm por 8 minutos), por meio de análise imunohistoquímica e cultura celular. Os resultados demonstram que os protocolos de velocidade reduzida levaram a um aumento na liberação de fatores de crescimento, sendo que o grupo A-PRF+ apresentou os maiores valores entre os grupos. Os níveis de migração e proliferação de fibroblastos foram mais altos em culturas contendo A-PRF e A-PRF+.

Recentemente, com o desenvolvimento dos protocolos de velocidade e tempo reduzidos, surgiu o PRF injetável, ou i-PRF, que vem demonstrando resultados promissores no aumento da concentração de plaquetas e leucócitos. O desenvolvimento de um PRF líquido permite sua inclusão em diversos procedimentos regenerativos que necessitam de sua injeção diretamente no sítio cirúrgico, bem como sua associação a outros biomateriais, potencializando suas propriedades cicatriciais. A associação de enxertos ósseos com i-PRF permite a incorporação de fatores de crescimento no interior da área a ser regenerada, potencializando a migração e proliferação celular (MOURÃO et al., 2015; WEND et al., 2017).

Atualmente, a centrifugação horizontal por meio de uma centrífuga de ângulo variável, já muito usada na área médica, vem sendo utilizada em estudos *in vitro* para a produção de membranas de PRF, devido à sua capacidade de melhor separação dos tipos celulares. Neste tipo de centrifugação, as células podem circular livremente pelo tubo e não se chocam contra suas paredes. O protocolo vem demonstrando

excelentes resultados em termos de estabilidade estrutural, celularidade e liberação de fatores de crescimento (LOURENÇO et al., 2018; LOURENÇO et al., 2021; MIRON et al., 2019a,b).

O protocolo original de L-PRF foi desenvolvido em uma centrífuga com características específicas, utilizando-se tubos de plástico revestidos de vidro para a coleta do sangue. Com a difusão da técnica, novas centrífugas e diferentes tipos de tubo surgiram no mercado, aumentando a acessibilidade e a aplicabilidade da técnica por muitos profissionais. Porém, o que se observa é uma variabilidade na arquitetura e na composição dos coágulos de L-PRF obtidos, o que pode implicar em resultados diferentes na sua aplicação clínica. Estudos comparativos surgem, então, com o intuito de analisar e orientar quanto à variabilidade na obtenção de concentrados plaquetários em centrífugas e tubos disponíveis no mercado (DOHAN-EHRENFEST et al., 2018; MIRON et al., 2019b; TSUJINO et al., 2019).

Importante salientar que o uso de diferentes centrífugas exige o ajuste da velocidade de centrifugação de acordo com o raio e o ângulo do rotor, a fim de se obter a Força Centrífuga Relativa máxima (RCF_{max}) adequada. A falta desse ajuste pode levar à adoção de protocolos de maneira errônea, produzindo coágulos de PRF com características indesejadas, tais como baixa concentração celular e menor liberação de fatores de crescimento (MIRON; CHOUKROUN; GHANAATI, 2019; PINTO; QUIRYNEN, 2019).

Até o momento, a literatura tem se concentrado em estudos *in vitro* que avaliam as características estruturais e a composição de coágulos de PRF obtidos com diferentes protocolos; contudo, ainda é escassa em relação a estudos pré-clínicos e clínicos que avaliam o potencial biológico resultante da aplicação *in vivo* das diferentes matrizes de PRF. Em relação à A-PRF e H-PRF, a literatura ainda é recente e são raros os estudos *in vivo* que avaliam o seu potencial na neoformação óssea. A A-PRF vem sendo proposta para o manejo de complicações pós-exodontia de terceiro molar (YÜCE; KÖMERIK, 2019); na aceleração da regeneração tecidual pós-exodontia em modelos animais (LIU et al., 2021; TO et al., 2019); em associação a enxerto autógeno para o tratamento de fissura labiopalatina (RAO et al., 2021) e em associação a técnica de inversão periosteal no tratamento de recessão gengival (CHELLATHURAI; GANESH; RAJARAM, 2020). No tratamento de DTCs criados em calvária de ratos, a A-PRF potencializou a neoformação óssea, promovendo maiores valores de volume ósseo e área de osso neoformado em comparação ao grupo controle, mas não foram

encontradas diferenças estatisticamente significantes em comparação à L-PRF (SILVA et al., 2022). A H-PRF demonstrou resultados melhores em relação à L-PRF na regeneração periodontal de recessões gengivais e defeitos infra-ósseos de duas paredes em cães, proporcionando maiores valores de neoformação de tecido ósseo e cimento em análise histológica (SHIRAKATA et al., 2021).

Considerando-se os recentes relatos de resultados positivos da L-PRF na Regeneração Óssea Guiada (ROG) (ENGLER-PINTO et al., 2019; LIU et al., 2021; MIRON et al., 2021; SILVA et al., 2022) e os melhores resultados da A-PRF e H-PRF em relação à L-PRF em termos de distribuição celular e liberação de fatores de crescimento, demonstrados em estudos *in vitro* (AIZAWA et al., 2020; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; GHANAATI et al., 2014; LOURENÇO et al., 2021; MIRON et al., 2019a,b; SIMÕES-PEDRO et al., 2022; TSUJINO et al., 2019), tornam-se relevantes os estudos que busquem avaliar *in vivo*, comparativamente, o potencial regenerativo de diferentes matrizes de PRF.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a neoformação óssea em Defeitos de Tamanho Crítico (DTCs) criados em calvária de ratos e tratados com concentrados plaquetários de origem autógena, obtidos por três protocolos distintos envolvendo centrifugação em alta e baixa velocidade, bem como equipamentos de centrifugação horizontal (H-PRF) e de ângulo fixo (L-PRF e A-PRF).

2.2 Objetivos específicos

- a. determinar, por meio de análise microtomográfica, o volume ósseo percentual (BV/TV), a porosidade óssea [PO (tot)], o número de trabéculas ósseas (Tb.N), o espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp) e a densidade de conectividade (Conn.Dn);
- b. avaliar, por meio de análise de epifluorescência e microscopia confocal, a dinâmica da neoformação óssea;
- c. quantificar, por meio de análise histomorfométrica, a área de osso neoformado (AON).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo, foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), com idade de 14 semanas (3,5 meses), massa corpórea entre 350g e 450g, obtidos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP) após submissão e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FORP-USP, sob nº 2019.1.930.58.0.

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pela CEUA/FORP, as normas instituídas pela legislação vigente no que se refere às práticas para o uso científico de animais (Lei 11.794/2008) e as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24°C, consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*.

3.2 Desenho experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=8): C, L-PRF, A-PRF e H-PRF. O cálculo do número de animais por grupo experimental foi realizado pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), com o objetivo de obter tamanho amostral adequado para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos no estudo, considerando-se as médias e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) nos grupos experimentais de estudos prévios (MESSORA et al., 2008; NAGATA et al., 2010; MARIANO et al., 2010), ajustando-se o valor de α em 0,05.

Os investigadores (operadores, avaliadores de resultados e bioestatística) foram calibrados ao longo de todas as etapas, e desconheciam os grupos experimentais do presente estudo.

3.3 Anestesia

Os procedimentos cirúrgicos experimentais (coleta de sangue para o preparo da PRF e criação do defeito) foram realizados após anestesia inalatória dos animais, inicialmente realizada pela indução em câmara contendo Isoflurano a 4% (Instituto Biochimico Ind. Farm. Ltda, Itatiaia, RJ, Brasil), e mantida por máscara com o mesmo anestésico em concentração de 1,5-3%. Após a indução anestésica, foram administrados aos animais Sulfato de Morfina 8 mg/Kg (Dimorf, Cristália ® Prod. Quím. Farm. Ltda, Itapira, SP) por via intramuscular; Flunixin Meglumina 2 mg/Kg (Aplonal 1%, König ®, Buenos Aires, Argentina) por via subcutânea; e 24.000 UI/Kg de penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Animal Health ®, Campinas, SP, Brasil) por via intramuscular.

3.4 Coleta sanguínea e processamento da PRF

Logo após a anestesia e antes da criação do DTC, os animais dos grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF foram submetidos à punção cardíaca para a coleta de 3mL de sangue, utilizados no preparo da PRF. O sangue foi coletado em seringa descartável de 5 mL (Descarpack, São Paulo, Brasil), armazenado em tubos de plástico revestidos por sílica de 5 mL (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) sem a presença de substâncias anticoagulantes, e imediatamente processado. Os animais receberam, logo após, injeção subcutânea de 5 mL de soro fisiológico (JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto, Brasil) para reidratação. Os animais do grupo C também foram submetidos a punção cardíaca e reposição hídrica para padronizar o estresse sofrido por todos os animais.

A obtenção da PRF seguiu três protocolos distintos (FIGURA 1). Os preparos da L-PRF e da A-PRF seguiram uma adaptação dos protocolos estabelecidos por Choukroun e colaboradores (2001) em uma centrífuga de ângulo fixo (centrifugação vertical). Para o preparo da fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), o sangue foi centrifugado em uma velocidade de 2700 rotações por minuto (rpm), durante 12 minutos (~ 700g Força Centrífuga Relativa máxima [RCFmax]) em uma centrífuga Intra-Spin™ (33° de angulação do rotor, 55mm de raio na altura do coágulo, 86mm de raio máximo; Intra-Lock® International, Inc, Boca Raton, FL, EUA). Para a obtenção

da fibrina rica em plaquetas avançada (A-PRF), o sangue foi centrifugado em uma velocidade de 1500 rpm, por 14 minutos (~ 200g RCFmax). Para o preparo do H-PRF, utilizou-se uma centrífuga horizontal Eppendorf (Eppendorf 5702 centrifuge, Alemanha), onde o sangue foi centrifugado a uma RCFmax de 700g, durante 8 minutos, de acordo com protocolo estabelecido por Miron e colaboradores (2019a).

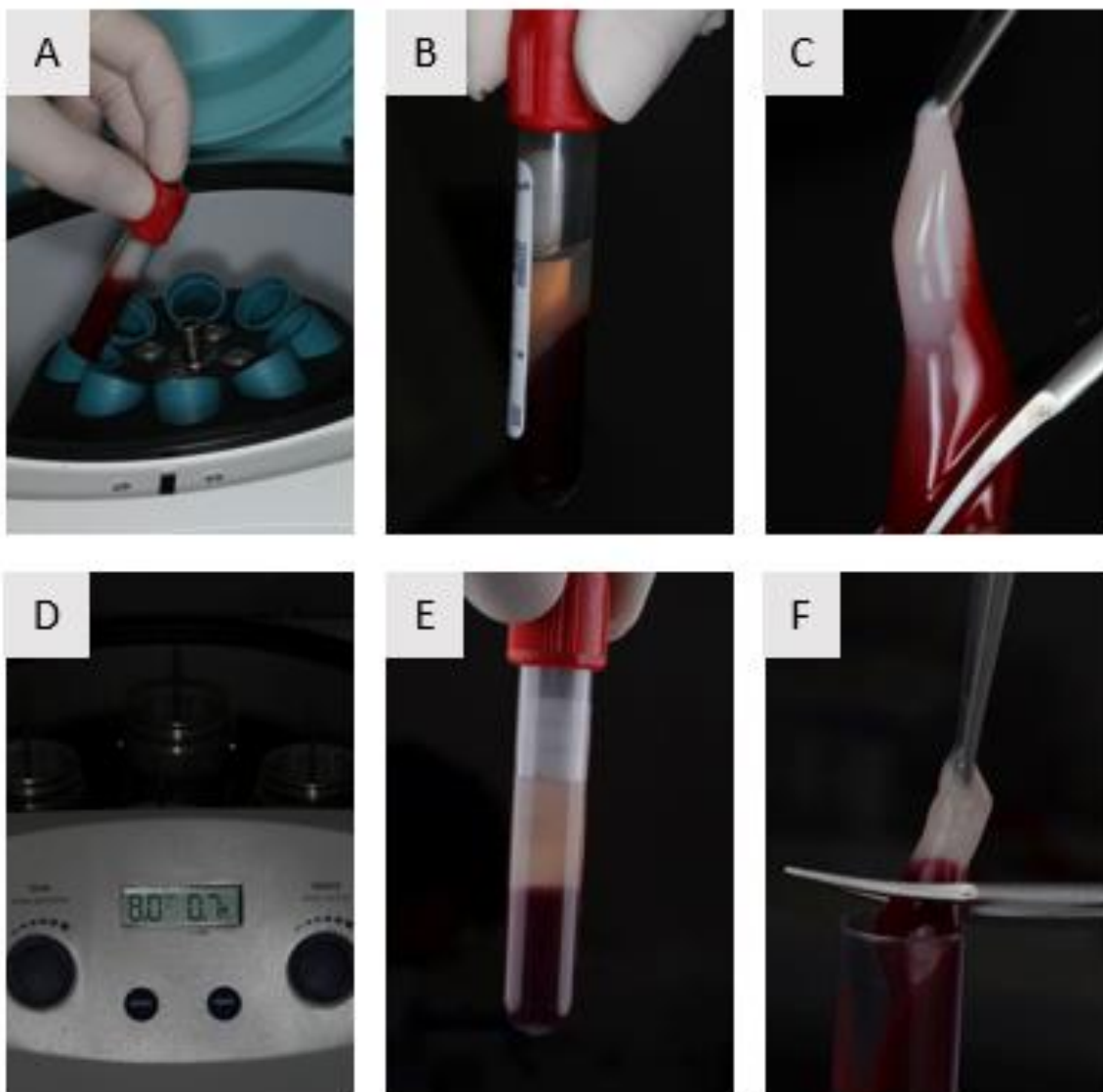


Figura 1 – Obtenção das matrizes de PRF pela centrifugação vertical (A-C) e horizontal (D-F). **A** – Inserção do tubo contendo a amostra sanguínea na centrífuga vertical; **B** – Tubo após processo de centrifugação: observar a separação entre o coágulo e a camada de células vermelhas formando um ângulo com o tubo; **C** – Coleta da matriz de PRF; **D** – Inserção do tubo contendo a amostra sanguínea na centrífuga horizontal; **E** – Tubo após processo de centrifugação: observar a melhor separação das camadas, evidenciada pela interface horizontal entre o coágulo e a camada de células vermelhas; **F** – Coleta da matriz de PRF.

Após o processamento, a porção intermediária, que representa o coágulo de PRF, foi coletada e processada com instrumentais específicos (Tissue Regeneration Kit and Xpression™ Box, Intra-Lock® International, Inc), por meio de compressão pelo período entre a confecção dos DTCs e as marcações de amálgama (descritas na sessão 3.6) até a formação da membrana de PRF, utilizada para o preenchimento dos defeitos nas calvárias dos animais dos grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF. A camada superficial, correspondente ao plasma acelular, e a camada profunda, relativa às células da série vermelha do sangue, foram descartadas.

3.5 Validação dos protocolos L-PRF, A-PRF e H-PRF

Para quantificar e determinar a localização das células ao longo do tubo após a centrifugação e produção da PRF, foi realizada a análise por pipetagem sequencial, utilizando-se uma adaptação do trabalho de Miron e colaboradores (2019a). Para tanto, foram utilizados animais adicionais, dos quais foram coletados 4 mL de sangue em tubos contendo ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), para que, após a centrifugação, ocorresse a separação das camadas, mas não a formação do coágulo, permitindo a pipetagem das camadas para análises laboratoriais. Previamente à centrifugação, foi realizada a coleta de 500 µL da amostra inicial, considerada controle. Após a centrifugação dos protocolos L-PRF, A-PRF e H-PRF (conforme descrito na seção 3.4), foram pipetadas camadas de 350 µL em sequência, desde a camada mais superficial até o fundo do tubo, totalizando 10 amostras por tubo (FIGURA 2). Estas amostras foram armazenadas em frascos *ependorf* e encaminhadas para análise e quantificação de plaquetas, leucócitos e hemácias, de forma a verificar a localização destas células ao longo do tubo. Importante salientar que uma dessas amostras foi coletada entre as camadas de plasma/*buffy coat* e a camada de células vermelhas, sendo marcada para permitir a localização da *buffy coat* no tubo.

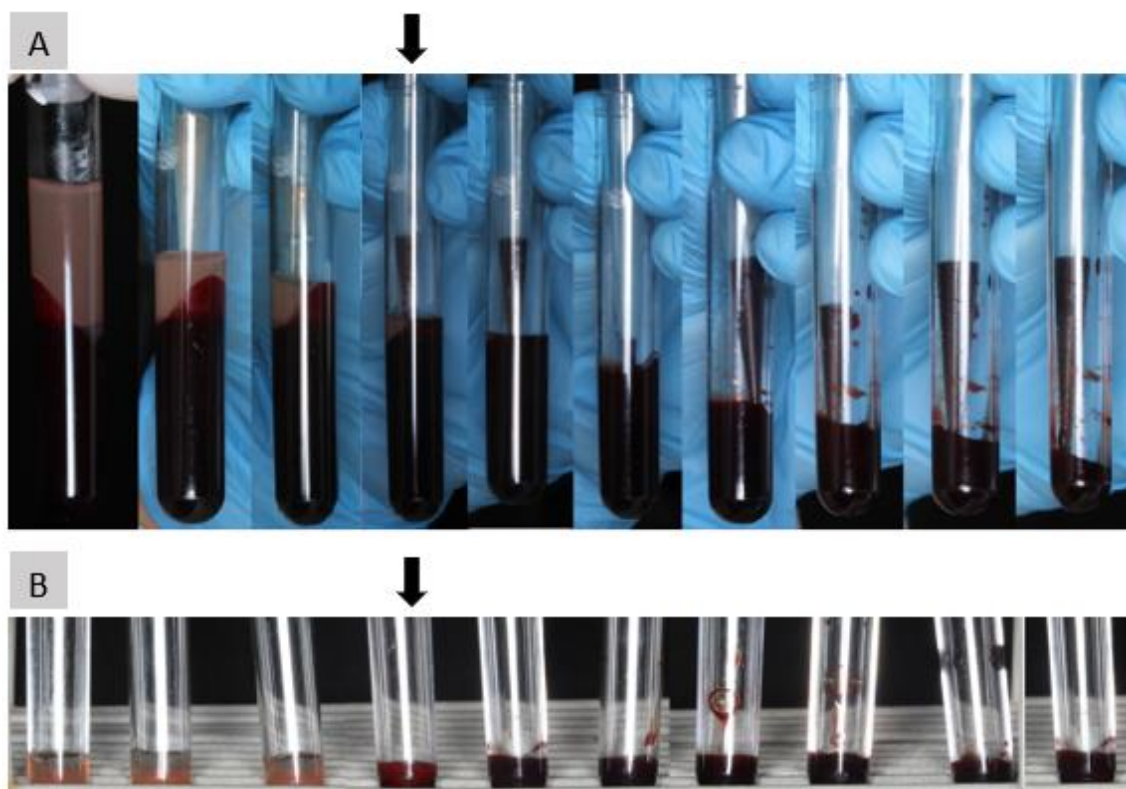


Figura 2 – Caracterização das matrizes de PRF. **A** – Pipetagem sequencial das camadas de PRF dentro do tubo. **B** – Amostras coletadas, prontas para serem levadas para análise. A seta representa a camada de buffy coat.

3.6 Confeção dos DTCs

Após a coleta sanguínea para preparo da PRF, foram confeccionados DTCs nas calvárias dos animais de todos os grupos experimentais (FIGURA 3). Iniciou-se com a tricotomia da região dorsal do crânio de cada animal com lâmina de barbear, seguida da antissepsia com iodo. Então, foi feita uma incisão semilunar na calvária com lâmina de bisturi 15C, rebatendo-se um retalho de espessura total em direção posterior. Um DTC de 5mm de diâmetro foi criado no osso parietal direito de cada animal por meio de osteotomia com trefina (Broca Trefina 5mm, Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) acoplada em um contra-ângulo em baixa rotação em velocidade constante de 1000 rpm, sob irrigação constante com solução salina estéril, com todo o cuidado para que a dura-máter cerebral não fosse atingida no processo. O segmento ósseo de espessura total no osso parietal foi, então, removido delicadamente com o auxílio de uma espátula Hollemback (Esculpidor Hollemback # 3SS, SSWHITE®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), mantendo-se a integridade da dura-máter e do encéfalo.

Após a confecção do DTC, com auxílio de uma sonda periodontal milimetrada (sonda milimetrada Carolina do Norte #15 ponta única, Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA), uma marcação foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico. As marcações foram feitas com uma broca diamantada (Ponta diamantada #1014, KG Sorensen®, Cotia, SP, Brasil) em peça de mão de alta rotação, sob irrigação contínua com solução salina estéril e, posteriormente, preenchidas com amálgama (Amalgam gs-80, SDI Limited, Bayswater, Australia), com o auxílio de um sugador de alta potência, a fim de evitar o extravasamento de material para dentro do DTC. Esse procedimento tem como objetivo a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, a localização das suas margens ósseas originais durante a análise histométrica.

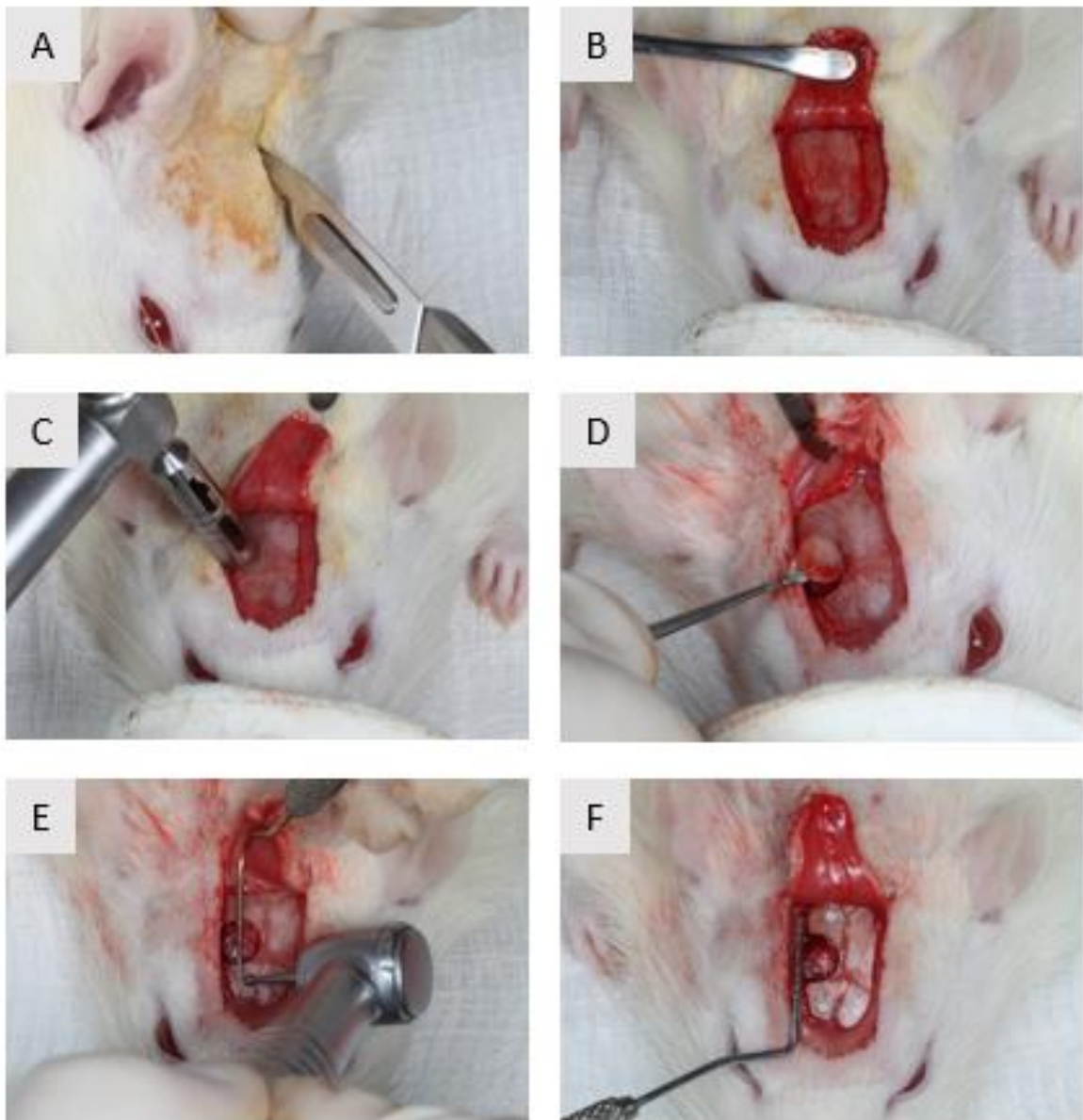


Figura 3 – Confeção do DTC. **A** – Incisão semilunar na calvária do animal; **B** – Retalho de espessura total rebatido em direção posterior; **C** – Osteotomia com broca trefina; **D** – Remoção do segmento ósseo no osso parietal; **E** – Marcação com broca diamantada em alta rotação; **F** – Marcações preenchidas com amálgama.

Estes defeitos foram preenchidos somente com o coágulo sanguíneo, no grupo C; com L-PRF, no grupo L-PRF; com A-PRF, no grupo A-PRF; ou com H-PRF, no grupo H-PRF. Após compressão das membranas de PRF, estas foram divididas aproximadamente ao meio com auxílio de uma tesoura cirúrgica. A porção mais próxima das células vermelhas, com maior quantidade de fatores de crescimento, plaquetas e leucócitos (MIRON et al., 2019a) foi picotada e utilizada para preenchimento do defeito. Para padronização da quantidade de PRF inserida em cada

animal, utilizou-se uma seringa de 1 mL adaptada. A outra metade da membrana foi utilizada para cobrir o defeito, de modo a manter o material em seu interior (FIGURA 4).

Após o preenchimento do defeito, os tecidos foram suturados em pontos simples com fio de seda 4.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) para se obter um fechamento primário da ferida. Cada animal recebeu, no pós-operatório, injeção de cloridrato de tramadol a 20 mg/Kg (Cronidor 2%, Agener União®, Apucarana, PR, Brasil) e flunixin meglumina a 2 mg/Kg (Aplonal 1%, Könir®, Buenos Aires, Argentina) a cada 12 horas durante dois dias.

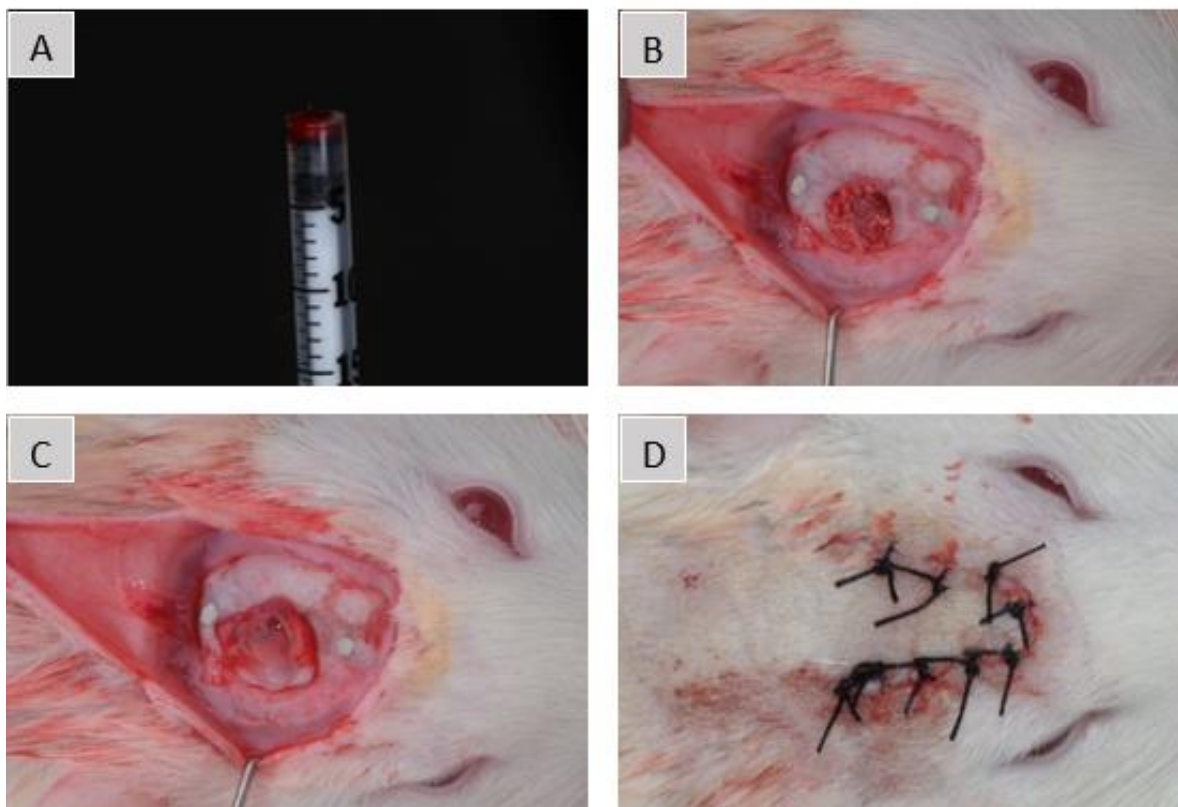


Figura 4 – Preparo da membrana de PRF para tratamento dos DTCs. **A** – Padronização do volume de PRF utilizando seringa de 1 mL adaptada; **B** – Defeito preenchido com 0,01 mL de PRF. **C** – Posicionamento da membrana de PRF, cobrindo o defeito cirúrgico; **D** – Sutura do retalho com pontos interrompidos simples. Todos os procedimentos são idênticos para os grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF.

3.7 Administração de fluorocromos

Aos 14 dias após a confecção dos DTCs, os animais receberam, por via intramuscular, o fluorocromo verde de calceína (20mg/Kg). Aos 30 dias após a confecção dos DTCs, foi administrado, também por via intramuscular, o fluorocromo vermelho de alizarina (30mg/Kg). A administração dos fluorocromos permite a avaliação da precipitação de cálcio a partir do momento da injeção (MULINARI-SANTOS et al., 2019; PUTTINI et al., 2019).

3.8 Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada 35 dias após a criação dos DTCs, por meio de câmara de CO₂ com fluxo controlado após anestesia com a associação de Ketamina 10% (80 mg/Kg) e Xilazina 2% (10 mg/Kg). Amostras das calvárias dos animais contendo a área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidas em bloco com disco diamantado e fixadas em solução de formol neutro tamponado a 10% por 24 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente por mais 24 horas, e então identificadas e armazenadas em cassetes dentro de frascos com álcool 70°.

3.9 Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT)

Amostras não-descalcificadas das calvárias foram escaneadas por micro-CT cone-beam SkyScan 1172 (SkyScan N.V., Kontich, Bélgica) para gerar imagens tridimensionais (3D). Para a aquisição das imagens, adotou-se uma resolução espacial de 10µm e o gerador de raio-x operou com um potencial de aceleração de 60kV, corrente de 165µA.

Utilizando o *software* DataViewer v. 1.4.3 (SkyScan N.V., Kontich, Bélgica), a imagem 3D gerada foi rotacionada até uma posição padrão para análise e, então, foi determinada uma região de interesse (ROI) de 5 mm de diâmetro e um volume de interesse (VOI) de 0,5x5x5 mm.

Para avaliação do tecido ósseo trabecular presente na calvária em cada VOI, foi utilizada uma escala de cinza (0-255), adotando-se o intervalo (*threshold*) entre 80 (mínimo) e 170 (máximo).

Utilizando o *software* CT-Analyzer® v.1.13.5.1+ (Bruker, Kontich, Bélgica), os seguintes parâmetros estruturais foram avaliados em cada VOI por um examinador calibrado (L.M.S.P): i) BV/TV – percentual do VOI preenchido por tecido ósseo; ii) PO (tot) – percentual de porosidade presente no tecido ósseo determinado no VOI; iii) Tb.N – número (mm^{-1}) de trabéculas ósseas presentes no VOI; iv) Tb.Sp – total de espaços (mm) entre as trabéculas ósseas presentes no VOI; v) Conn.Dn – densidade de conectividade entre as trabéculas ósseas presentes no VOI.

Reconstruções renderizadas das secções microtomográficas das calvárias também foram obtidas.

3.10 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

3.10.1 Processamento laboratorial

A dinâmica da neoformação óssea foi avaliada por meio de análise por fluorescência, de acordo com protocolos previamente publicados (MULINARI-SANTOS et al., 2019; PUTTINI et al., 2019; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015).

As peças obtidas foram fixadas em solução de formalina a 10% com pH 7 por 10 dias, com troca da solução a cada dois dias. Após esse período, as peças foram transferidas para recipientes contendo soluções crescentes de álcool para desidratação, permanecendo em cada uma das concentrações por um período de 48 horas (70%, 80%, 96% e 100%). A cada troca, as amostras foram submetidas a agitação durante 4 horas. As amostras desidratadas foram, então, colocadas em recipientes de polietileno contendo resina pura (LR White Hard Grade, London, UK) e mantidas sob agitação por 60 minutos. Após esse período, as peças foram armazenadas e mantidas em refrigerador a 4°C por no mínimo 12 horas. Decorrido esse prazo, as peças foram mantidas no vácuo por uma hora, agitadas por igual tempo e novamente armazenadas em refrigerador a 4°C por 24 horas. Esta rotina se repetiu por 15 dias, trocando-se a resina a cada 48 horas. No 15º dia, após a troca da resina, as peças foram incluídas em moldes de teflon preparados para este fim e levadas ao

forno a 60°C por 12 horas, para a polimerização da resina. O tempo de polimerização e a temperatura são fundamentais para as características físicas do bloco, permitindo uma perfeita infiltração da resina, tornando os blocos duros, transparentes e facilmente cortados. Os blocos de resina polimerizada contendo as amostras foram, então, cortados ao meio em sistema Exakt, utilizando-se serra diamantada e irrigação contínua com água. As superfícies contendo as amostras foram desgastadas no sistema Exakt utilizando-se lixas com granulação crescente (320, 800, 2500, 4000) até a superfície da peça ficar lisa. Os blocos lixados e polidos foram, então, colados a uma lâmina acrílica por meio do sistema Exakt, e a superfície exposta da peça colada à lâmina foi novamente lixada e polida até a obtenção de espessura aproximada de 70µm.

3.10.2 Análise das imagens

O escaneamento das peças foi realizado com Microscópio Trinocular Motorizado para Imunofluorescência e Campo Claro (modelo AXIO IMAGER M2, Carl Zeiss®, Alemanha) com objetiva de 10x acoplado a uma câmera AxioCam MRm Rev.3 FireWire (Carl Zeiss®). Após a reconstrução das imagens por um *software* específico (AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss®, Alemanha), pôde-se visualizar a precipitação de calceína aos 14 dias, evidenciada pela cor verde, representando a deposição de cálcio no osso antigo; e a precipitação de alizarina aos 30 dias, em cor vermelha, que demonstra a deposição de cálcio no osso neoformado. A sobreposição das duas camadas de fluorocromos foi realizada, permitindo a visualização da deposição de cálcio em ambos os períodos, o que representa a conversão do osso antigo em osso neoformado (FIGURA 5). As imagens foram padronizadas em matiz, saturação e brilho. Foram realizadas capturas de imagens no centro do DTC e nas regiões próximas aos cotos originais.

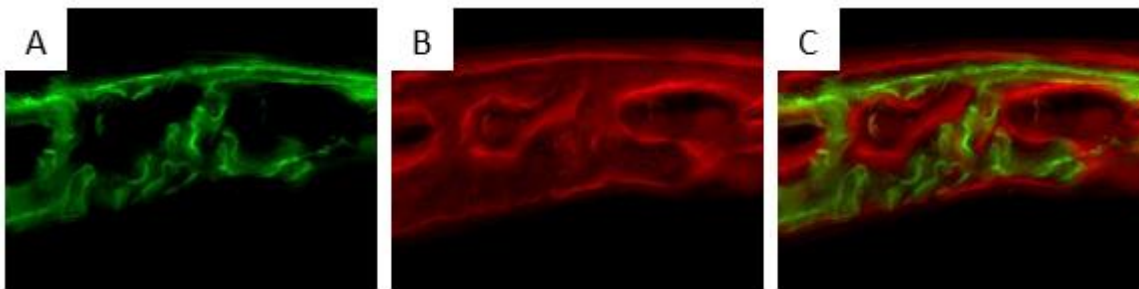


Figura 5 – Imagens do centro do DTC obtidas por microscopia confocal. **A** – precipitação de calceína (verde); **B** – precipitação de alizarina (vermelho); **C** – sobreposição das imagens, mostrando ambos os fluorocromos.

As imagens salvas foram, então, transferidas ao programa Image J (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canadá). Para cada amostra analisada, realizou-se a delimitação da calceína em uma região central do DTC com a ferramenta “*free hand*”, mensurando-se a área em mm²; o mesmo procedimento foi realizado com a alizarina (FIGURA 6). Os valores de calceína e alizarina permitem a observação da dinâmica da neoformação óssea e sua comparação entre os diferentes grupos experimentais. A diferença entre o osso antigo (calceína) e o osso neoformado (alizarina) representa os diferentes estágios da remodelação óssea. A extensão da marcação pelos fluorocromos é diretamente proporcional à quantidade de cálcio depositada na matriz óssea; assim, nos permite mensurar o fenômeno da neoformação óssea (MULINARI-SANTOS et al., 2019; PUTTINI et al., 2019; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015).

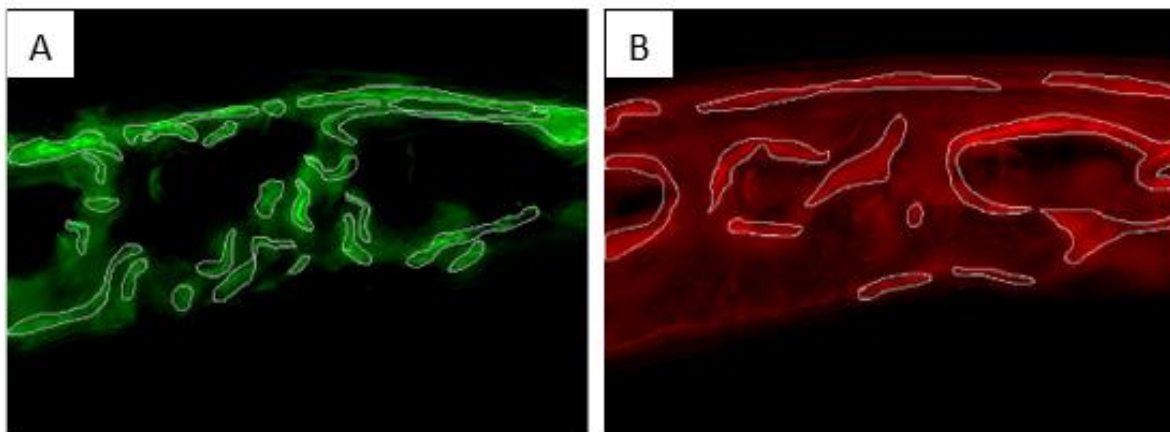


Figura 6 - Delimitação e mensuração da área marcada por calceína e alizarina utilizando o software ImageJ (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canadá).

3.11 Análise Histomorfométrica

Após a realização da Microscopia Confocal, as lâminas já processadas foram submetidas à coloração com Azul de Stevenel e Vermelho de Alizarina para análises com microscopia de luz. Em cada corte foram analisadas as características histopatológicas do tecido ósseo neoformado.

A análise histométrica foi realizada por um examinador calibrado (D.S.F.S.) utilizando sistema de avaliação de imagem por computador e um software específico de aquisição e análise de imagens (LAS EZ versão 4.1.0, Leica Mycrosystems®). Foi selecionado 1 corte histológico da área do defeito cirúrgico de cada espécime. Cada corte histológico foi fotografado por um microscópio trinocular para campo claro e fluorescência (modelo DMLB, Leica Mycrosystems® Wetzlar GmbH, Heidelberg, Alemanha) com objetiva de 1,6x acoplado a uma câmera DFC300FX (Leica Mycrosystems®). Em cada imagem foi realizada uma delimitação da área analisada, que correspondia à região do osso da calvária onde o defeito foi originalmente criado, denominada Área Total (AT). Dentro da AT, foi selecionada e delimitada a Área de Osso Neoformado (AON) (FIGURA 7). O valor de AT foi considerado como sendo 100% da área analisada e o valor de AON foi calculado como sendo uma porcentagem de AT.

A análise histopatológica foi realizada por observação dos cortes histológicos selecionados, utilizando o mesmo microscópio, com objetivas de 10x e 20x acoplados à mesma câmera utilizadas na análise histométrica.

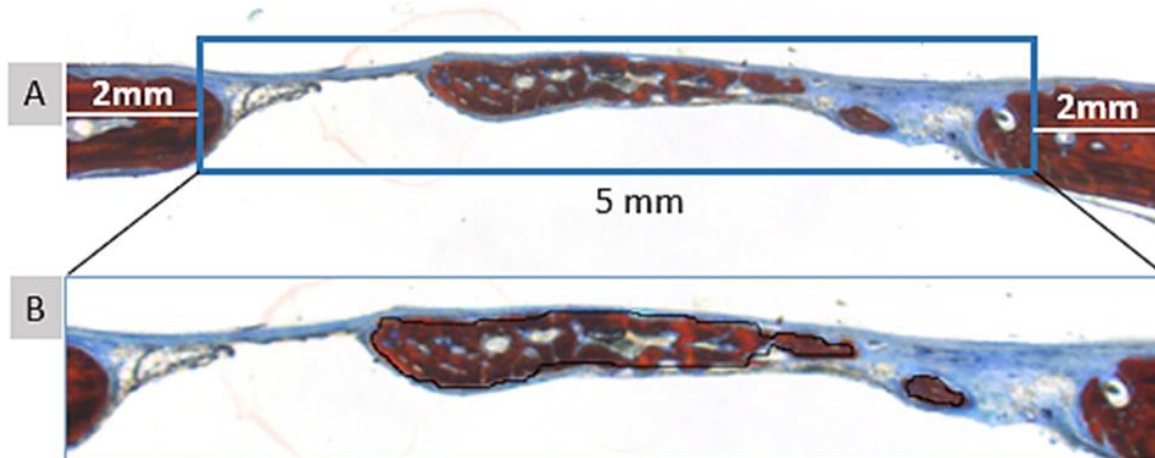


Figura 7 – Imagens capturadas de cortes histológicos para ilustração da Análise Histométrica. **A** – A Área Total (AT) é delimitada pela linha azul e corresponde à área da calvária onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A altura da AT corresponde à média entre a altura do coto direito e do coto esquerdo. A largura da AT é de 5 mm, correspondente à largura do defeito original. Aumento = 1,6x. **B** – As formas circulares em preto correspondem à Área de Osso Neoformado (AON). B é uma aproximação do retângulo AT representado em A.

3.12 Variáveis de resultado

As diferenças entre os grupos obtidas na análise microtomográfica de BV/TV das calvárias foi definida como variável primária deste estudo. Os demais parâmetros microtomográficos de microarquitetura óssea e histomorfométricos foram definidos como variáveis secundárias.

3.13 Análise estatística

As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, v. 5.01, San Diego, CA, EUA). O animal foi considerado como a unidade estatística. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram agrupados e apresentados como médias, medianas e desvios-padrão. A distribuição dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Todas as avaliações microtomográficas, por microscopia confocal e histomorfométricas foram realizadas por examinadores calibrados. Para calibração dos examinadores, um terço da amostra foi avaliada em dois períodos com um intervalo de 48 horas. O coeficiente de correlação intraclasse (CCI) foi utilizado para determinar a reprodutibilidade dos

examinadores nas duas avaliações realizadas considerando valores de BV/TV e AON. Valores de CCI maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração dos examinadores.

A significância das diferenças entre os grupos para todas as variáveis foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Validação dos protocolos L-PRF, A-PRF e H-PRF

A quantificação e determinação da localização de plaquetas e leucócitos ao longo do tubo após a centrifugação e produção da PRF pelos três protocolos testados neste estudo (L-PRF, A-PRF e H-PRF) por meio da análise por pipetagem sequencial estão representadas nas Figuras 8 e 9 e nas Tabelas 1 e 2.

Pôde-se observar que, no protocolo L-PRF, as plaquetas encontravam-se significativamente concentradas na camada 5 (FIGURA 8A), onde estava localizada a interface entre a porção correspondente à PRF e a camada de células vermelhas, correspondendo a 62,6% do total de plaquetas após a centrifugação (TABELA 1). Em comparação à amostra controle, contendo sangue não centrifugado, houve um aumento de ~8,83 vezes no número de plaquetas na camada 5. No protocolo A-PRF, por sua vez, houve uma maior concentração de plaquetas nas camadas 4 e 5 (FIGURA 8B), totalizando ~55% do total de plaquetas após a centrifugação e representando um aumento de 4,8 vezes em relação à amostra controle. Em comparação à L-PRF, houve uma distribuição mais homogênea das plaquetas por todo o tubo. No protocolo H-PRF, pôde-se observar alta concentração de plaquetas nas primeiras 4 camadas do tubo (FIGURA 8C), distribuídas de forma homogênea nessas camadas, correspondendo a 87,4% do total destas células no tubo após a centrifugação.

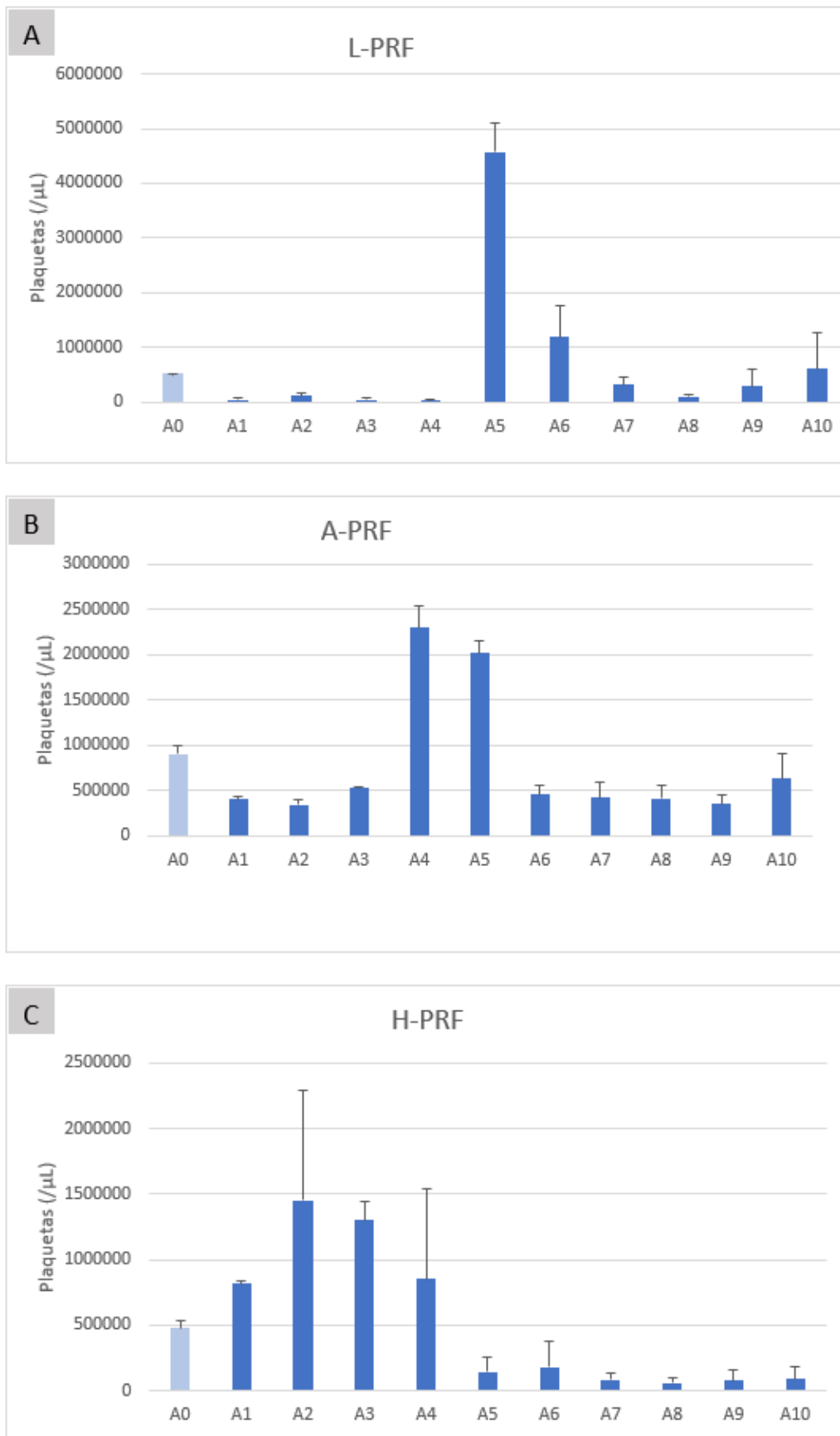


Figura 8 – Número de plaquetas (/µL) na amostra de sangue não centrifugado (amostra controle – A0) e após centrifugação (camadas A1 a A10). **A** – L-PRF; **B** – A-PRF; **C** – H-PRF.

Tabela 1 – Distribuição percentual de plaquetas em todas as camadas (A1-A10) após centrifugação do sangue para preparo de L-PRF, A-PRF e H-PRF.

Camada	L-PRF	A-PRF	H-PRF
A1	0,55	5,15	16,08
A2	1,58	4,36	28,66
A3	0,57	6,71	25,75
A4	0,45	29,30	16,89
A5	62,58	25,69	2,81
A6	16,27	5,75	3,54
A7	4,44	5,32	1,64
A8	1,38	5,24	1,19
A9	3,90	4,41	1,61
A10	8,27	8,06	1,82

Em relação ao número de leucócitos, no protocolo L-PRF, pôde-se observar também uma maior concentração na camada 5 (FIGURA 9A), correspondendo a 40,2% do total de leucócitos após a centrifugação (TABELA 2). Em comparação à amostra controle, houve um aumento de ~4,6 vezes no número de leucócitos na camada 5. Diferentemente das plaquetas, não foi possível observar a presença de leucócitos nas primeiras 4 camadas do tubo, o que evidencia sua distribuição desigual no coágulo de PRF. Grande quantidade de leucócitos também foi encontrada na camada de células vermelhas, abaixo da região correspondente à PRF. No protocolo A-PRF, as camadas 4 e 5 também concentraram a maior quantidade de leucócitos após a centrifugação (FIGURA 9B), correspondendo a quase 40% do total de leucócitos e representando um aumento de 4 vezes em comparação à amostra controle. A distribuição de leucócitos ao longo do tubo de PRF se mostrou mais homogênea na A-PRF em comparação à L-PRF, porém, também não foram observados leucócitos nas duas primeiras camadas. No protocolo H-PRF, uma distribuição mais homogênea de leucócitos foi encontrada entre as camadas 2 e 6 (FIGURA 9C), representando 80,7% do total de leucócitos após centrifugação e um aumento de 7,7 vezes em comparação à amostra controle. Não foram encontrados leucócitos na primeira camada do tubo.

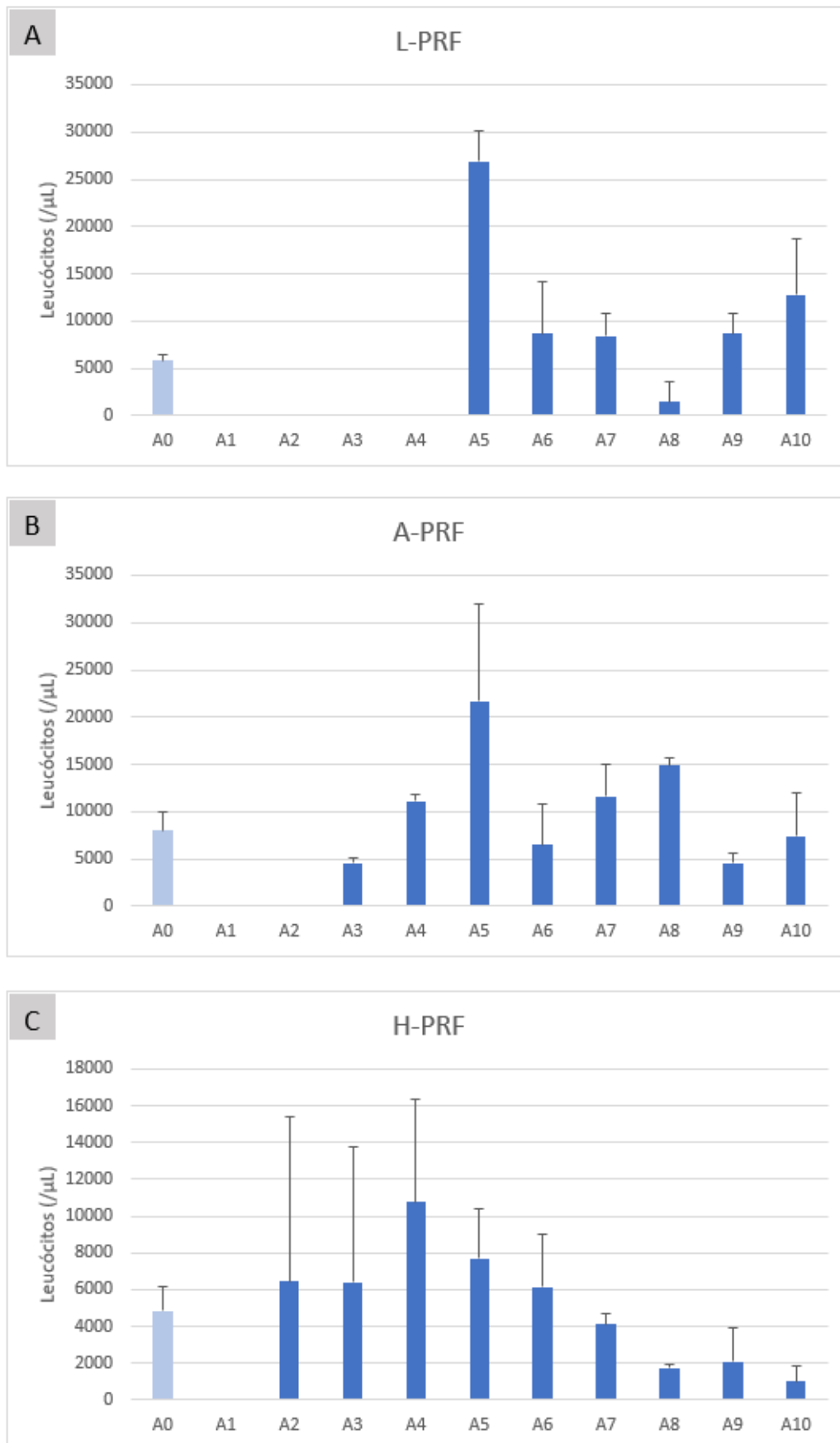


Figura 9 – Número de leucócitos na amostra de sangue não centrifugado (amostra controle – A0) e após centrifugação (camadas A1 a A10). **A** – L-PRF; **B** – A-PRF; **C** – H-PRF.

Tabela 2 – Distribuição percentual de leucócitos em todas as camadas (A1-A10) após centrifugação do sangue para preparo de L-PRF, A-PRF e H-PRF.

Camadas	L-PRF	A-PRF	H-PRF
A1	0	0	0
A2	0	0	13,90
A3	0	5,59	13,79
A4	0	13,49	23,17
A5	40,16	26,31	16,59
A6	12,94	7,90	13,25
A7	12,56	14,09	8,84
A8	2,24	18,10	3,77
A9	12,94	5,53	4,52
A10	19,15	8,99	2,15

4.2 Análise por microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT das calvárias)

As médias e os desvios-padrão de BV/TV, PO (tot), Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn para todos os grupos experimentais, bem como o resultado das comparações entre os grupos estão representados na Tabela 3 e na Figura 10. O grupo H-PRF apresentou maiores valores de BV/TV e Tb.N quando comparado aos grupos C, L-PRF e A-PRF. Na análise de BV/TV, L-PRF e A-PRF apresentaram valores significativamente maiores que aqueles do grupo C, não havendo, para esse mesmo parâmetro, diferenças significativas entre os grupos L-PRF e A-PRF. Na análise de Tb.N, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos C, L-PRF e A-PRF. Para os parâmetros microtomográficos de PO (tot) e Tb.Sp, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais. Na análise de Conn.Dn, diferenças significantes foram observadas apenas entre os grupos H-PRF e A-PRF. Na Figura 11, pode-se observar as reconstruções tridimensionais obtidas das calvárias.

Tabela 3 – Micro-CT das calvárias. Médias e desvios-padrão (DP) de BV/TV, PO (tot), Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn dos grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Grupos experimentais				
	C n=8	L-PRF n=8	A-PRF n=8	H-PRF n=8
Variável	Médias \pm DP	Médias \pm DP	Médias \pm DP	Médias \pm DP
BV/TV	2,10 \pm 1,75 ^a	4,96 \pm 1,81 ^b	5,73 \pm 2,40 ^b	11,83 \pm 7,40 ^c
PO (tot)	95,71 \pm 4,50 ^a	95,48 \pm 2,08 ^a	94,27 \pm 2,40 ^a	90,75 \pm 7,89 ^a
Tb.N	0,34 \pm 0,31 ^a	0,34 \pm 0,17 ^a	0,43 \pm 0,16 ^a	0,89 \pm 0,55 ^b
Tb.Sp	0,51 \pm 0,02 ^a	0,51 \pm 0,01 ^a	0,50 \pm 0,01 ^a	0,49 \pm 0,04 ^a
Conn.Dn	18,56 \pm 10,86 ^{ab}	16,50 \pm 7,40 ^{ab}	18,13 \pm 8,23 ^a	35,14 \pm 18,63 ^b

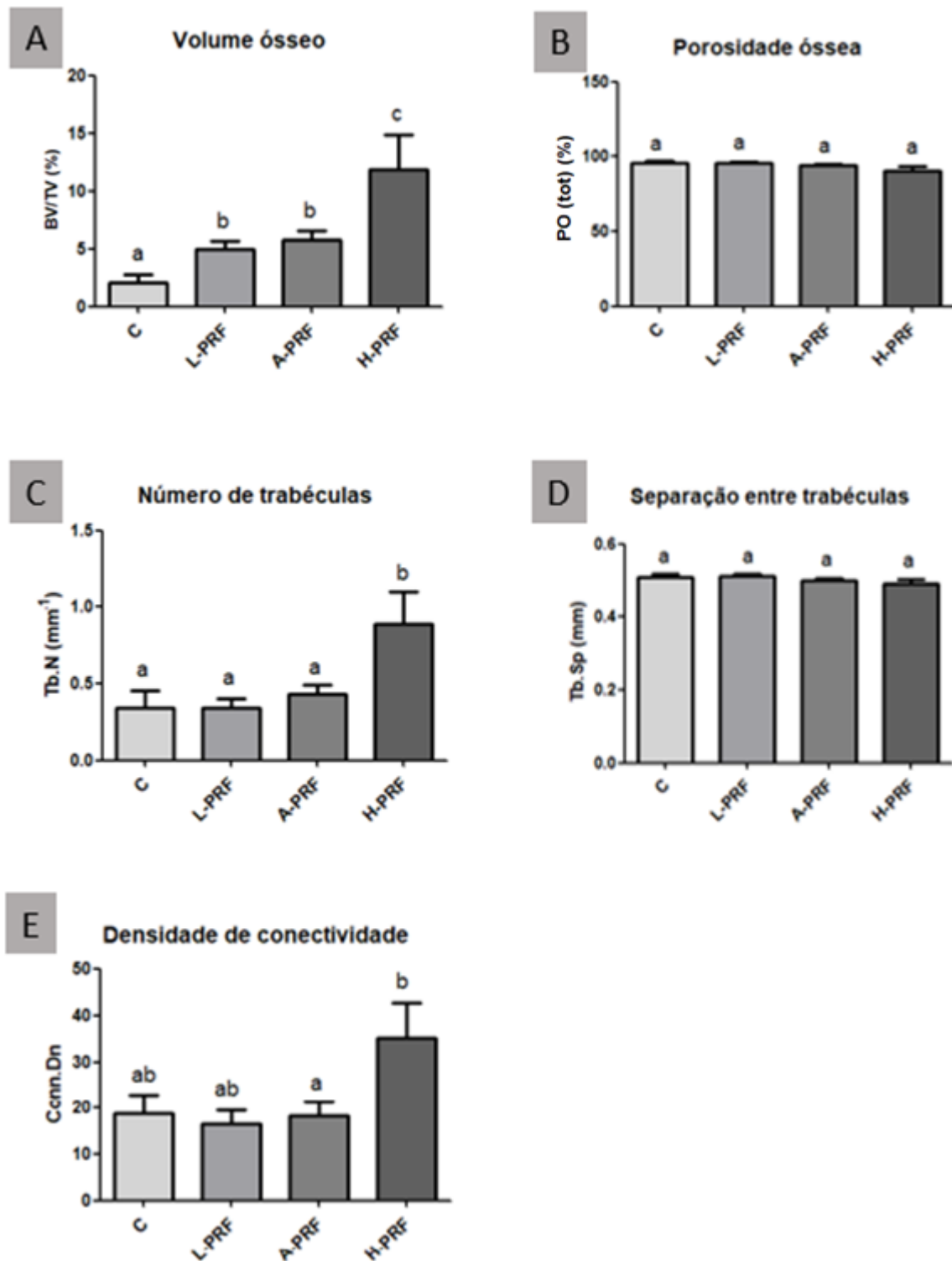


Figura 10 – Micro-CT das calvárias. Médias e desvios-padrão (DP) de BV/TV, PO (tot), Tb.N, Tb.Sp e Conn.Dn dos grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

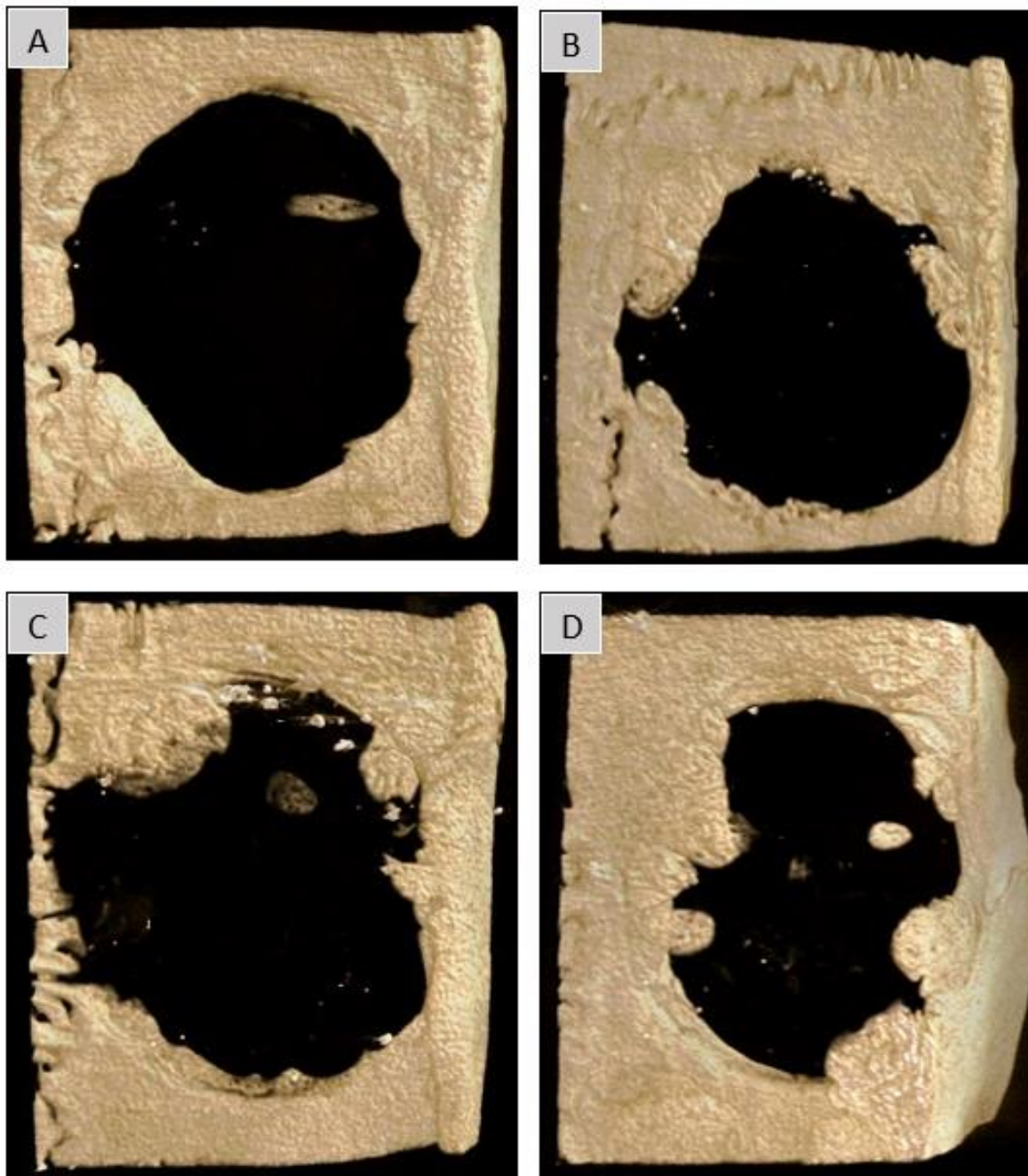


Figura 11 – Imagens representativas das reconstruções tridimensionais das calvárias dos grupos C (A), L-PRF (B), A-PRF (C) e H-PRF (D).

4.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

As imagens obtidas pela Microscopia Confocal permitiram a observação de faixas de calceína (injetada 14 dias após a confecção dos DTCs, cor verde) e alizarina (injetada 30 dias após a confecção dos DTCs, cor vermelha), formadas pela precipitação de cálcio na matriz orgânica. A sobreposição das imagens permitiu

comparar o osso antigo e o osso neoformado nos diferentes grupos experimentais (FIGURA 12).

No grupo C, na região central (FIGURA 12A), observou-se pequena marcação de calceína e alizarina, que se mostraram sobrepostas, de espessura bem inferior à encontrada na região próxima às margens do defeito original. Na região próxima a um dos cotos originais (FIGURA 12B), uma fina camada de calceína e alizarina foi observada, evidenciando o processo lento de neoformação óssea.

Nos grupos L-PRF e A-PRF, observou-se maior precipitação de calceína e alizarina na região central (FIGURA 12 C,E) e na região próxima a um dos cotos originais (FIGURA 12 D,F), manifestada pela maior intensidade na fluorescência.

No grupo H-PRF, a região central (FIGURA 12G) demonstrou intensa marcação de calceína e alizarina, evidenciando maior velocidade de neoformação óssea, bem como menores taxas de reabsorção do osso antigo. Além disso, a espessura observada na região central do defeito apresentava-se bem próxima àquela presente na região próxima às margens do defeito original. Na região próxima a um dos cotos originais (FIGURA 12H), também foram observadas faixas de calceína e alizarina mais evidentes em comparação ao grupo C.

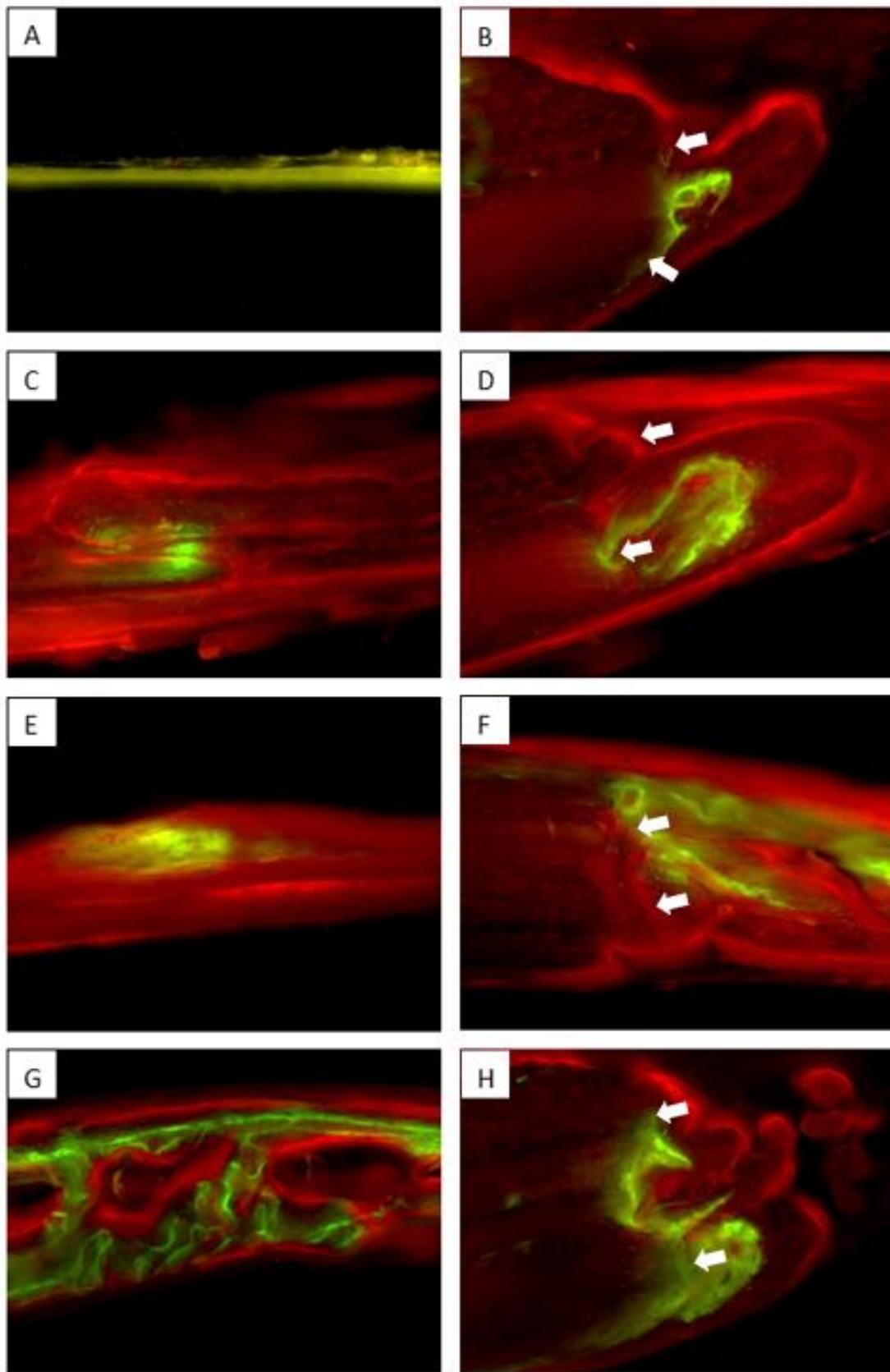


Figura 12 – Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando a sobreposição da calceína (verde) e da alizarina (vermelho) nos grupos experimentais. Imagens representativas do centro do DTC (A, C, E, G) e da região próxima a um dos cotos originais (B, D, F, H). Grupos: C (A,B); L-PRF (C,D); A-PRF (E,F); H-PRF (G,H). As setas representam as margens do defeito cirúrgico original. Aumento original = 10x.

As médias e desvios-padrão para precipitação de calceína e alizarina nos diferentes grupos experimentais estão representadas nas Figuras 13 e 14 e na Tabela 3. A análise intragrupo mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os fluorocromos injetados aos 14 dias (calceína) e 30 dias (alizarina) ($p < 0,05$), manifestadas por uma maior marcação de alizarina e menor marcação de calceína nos grupos L-PRF e H-PRF, indicando um turnover ósseo aumentado. Nos grupos C e A-PRF, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a área corada por calceína e a área corada pela alizarina, indicando um processo de neoformação óssea mais lento (FIGURA 13).

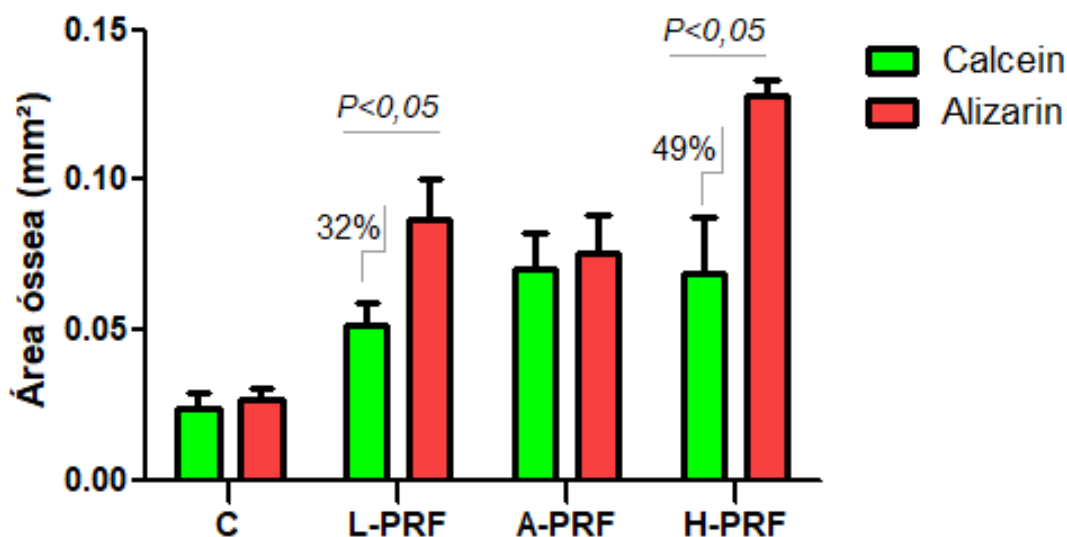


Figura 13 – Médias e desvios-padrão para precipitação de calceína e alizarina para os grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações intragrupos. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Maiores valores de calceína foram encontrados nos grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF em comparação ao grupo C. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF no que se refere à precipitação de calceína (FIGURA 14A). O grupo H-PRF apresentou a maior marcação de alizarina, com diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos C, L-PRF e A-PRF. Os grupos L-PRF e A-PRF apresentaram maiores valores de alizarina em relação ao grupo C. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes de alizarina entre os grupos L-PRF e A-PRF (FIGURA 14B).

Tabela 4 – Análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Médias e desvios-padrão (DP) para precipitação de calceína e alizarina para os grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Grupos experimentais				
	C	L-PRF	A-PRF	H-PRF
Fluorocromo	Médias \pm DP	Médias \pm DP	Médias \pm DP	Médias \pm DP
Calceína	0,02 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,02 ^b	0,07 \pm 0,04 ^b	0,07 \pm 0,06 ^b
Alizarina	0,02 \pm 0,01 ^a	0,09 \pm 0,05 ^b	0,07 \pm 0,04 ^b	0,13 \pm 0,01 ^c

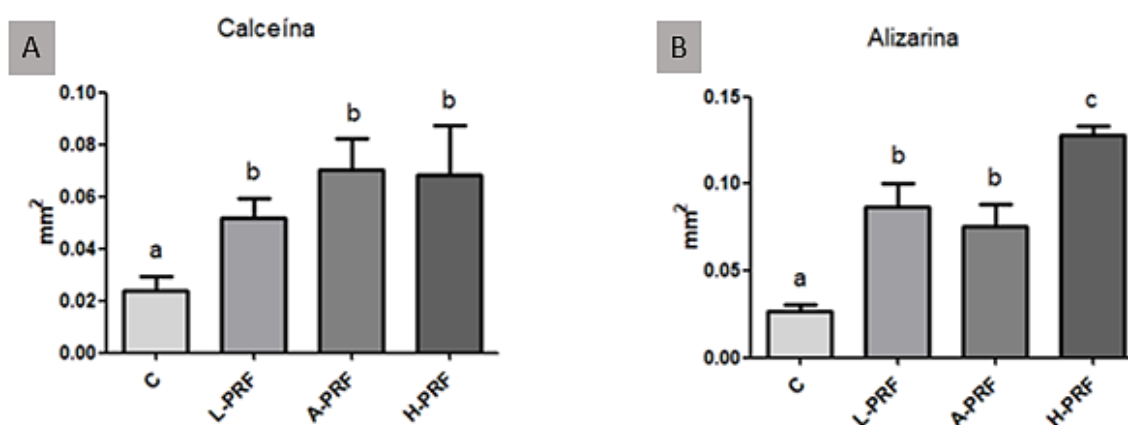


Figura 14 – Médias e desvios-padrão para precipitação de calceína (A) e alizarina (B) para os grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

4.4 Análise histomorfométrica

4.4.1 Análise histométrica

As médias e desvios-padrão de AON, bem como o resultado das comparações intergrupos, estão representadas na Figura 15. O grupo H-PRF ($n=8$; AON = $12,67 \pm 9,247$) apresentou maiores valores ($p < 0,05$) de AON em comparação aos grupos C ($n=8$; $0,2125 \pm 0,3934$), L-PRF ($n=8$; $3,682 \pm 3,176$) e A-PRF ($n=8$; $2,129 \pm 1,783$). Os

grupos L-PRF e A-PRF apresentaram maiores valores de AON que o grupo C ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para AON entre os grupos L-PRF e A-PRF ($p > 0,05$).

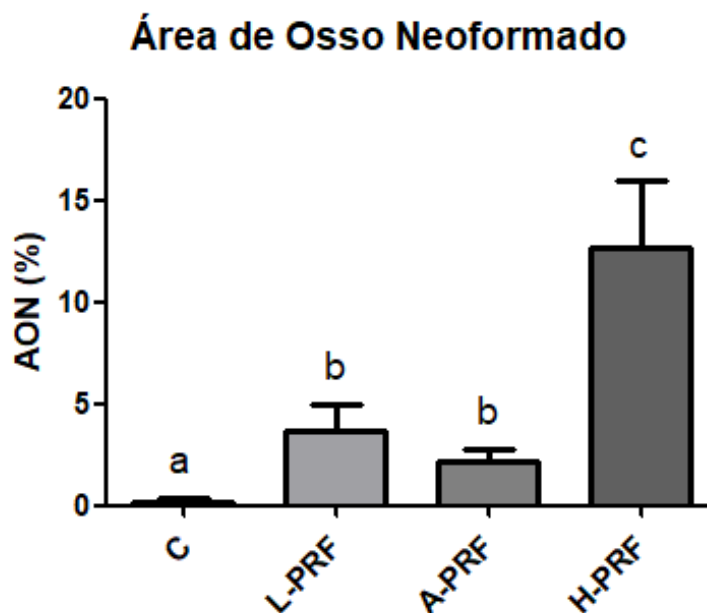


Figura 15 – Médias e desvios-padrão para AON para os grupos C, L-PRF, A-PRF e H-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

4.4.2 Análise histopatológica

Grupo controle

Observou-se tecido conjuntivo composto por fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida em quase toda a extensão do defeito cirúrgico (FIGURA 16A). Em todas as amostras, o tecido conjuntivo na parte central do defeito possuía espessura bem inferior à encontrada no tecido ósseo original da calota. Junto às margens do defeito cirúrgico, pôde ser observada pequena quantidade de tecido

ósseo neoformado (FIGURA 17 A,B), exibindo pequeno número de osteoblastos em suas bordas. Encontrou-se, em todos os espécimes, pequeno número de vasos sanguíneos e moderado número de fibroblastos. Observou-se, também, infiltrado inflamatório geralmente leve, com presença de linfócitos e plasmócitos, distribuídos ao longo do defeito.

Grupo L-PRF

O tecido ósseo neoformado exibia pequeno número de osteoblastos em suas bordas. O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentava numerosos feixes de fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície da ferida, porém mais organizadas e com maior espessura que aquelas observadas nos espécimes do Grupo C, apesar de ainda inferior à espessura da margem do defeito cirúrgico (FIGURA 16B). A maioria dos espécimes do Grupo L-PRF apresentou maior quantidade de tecido ósseo neoformado junto às margens do defeito cirúrgico quando comparados aos espécimes do Grupo C (FIGURA 17 C,D). Em alguns espécimes, também se observou neoformação óssea ao longo do defeito, formando ilhotas. Observou-se significativa presença de vasos sanguíneos ao longo de toda sua extensão.

Grupo A-PRF

O tecido ósseo neoformado exibia pequeno número de osteoblastos em suas bordas. O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentava numerosos feixes de fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície da ferida, porém mais organizadas e com maior espessura que aquelas observadas nos espécimes do Grupo C (FIGURA 16C). A maioria dos espécimes do Grupo A-PRF apresentou maior quantidade de tecido ósseo neoformado junto às margens do defeito cirúrgico quando comparados aos espécimes do Grupo C (FIGURA 17 E,F). Em alguns espécimes, também se observou neoformação óssea ao longo do defeito, formando ilhotas. Observou-se significativa presença de vasos sanguíneos ao longo de toda sua extensão.

Grupo H-PRF

O tecido ósseo neoformado exibiu expressivo número de osteoblastos em suas bordas. O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentava numerosos feixes de fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície da ferida, porém mais organizadas e com maior espessura que aquelas observadas nos espécimes do Grupo C (FIGURA 16D). A maioria dos espécimes do Grupo H-PRF apresentou maior quantidade de tecido ósseo neoformado junto às margens do defeito cirúrgico quando comparados aos espécimes do Grupo C, L-PRF e A-PRF (FIGURA 17 G,H). Na maioria dos espécimes, também se observou intensa neoformação óssea ao longo do defeito, formando ilhotas. Observou-se significativa presença de vasos sanguíneos ao longo de toda sua extensão.

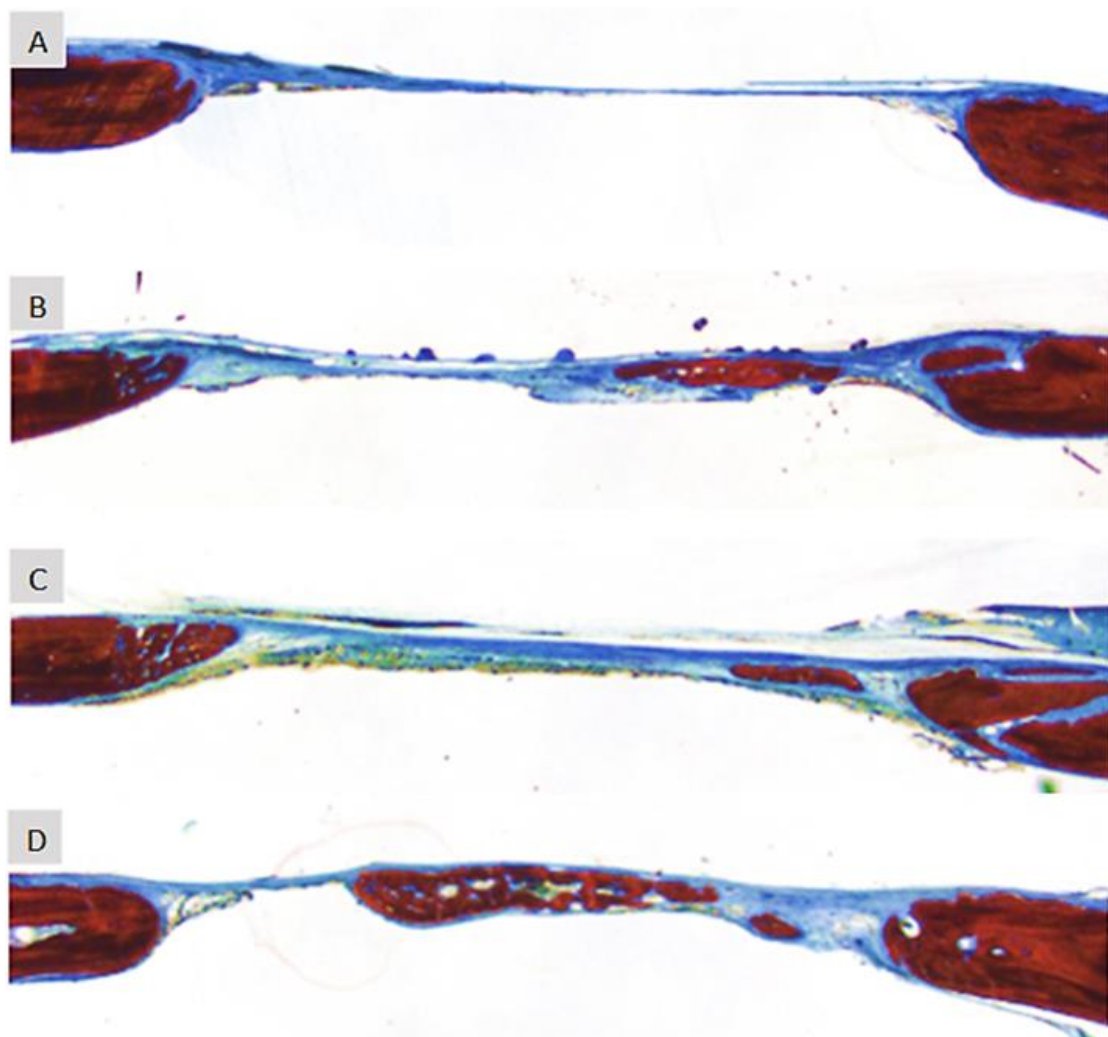


Figura 16 – Imagem panorâmica dos cortes histológicos. **A** – Grupo C; **B** – Grupo L-PRF; **C** – Grupo A-PRF; **D** – Grupo H-PRF. Aumento original = 1,6x.

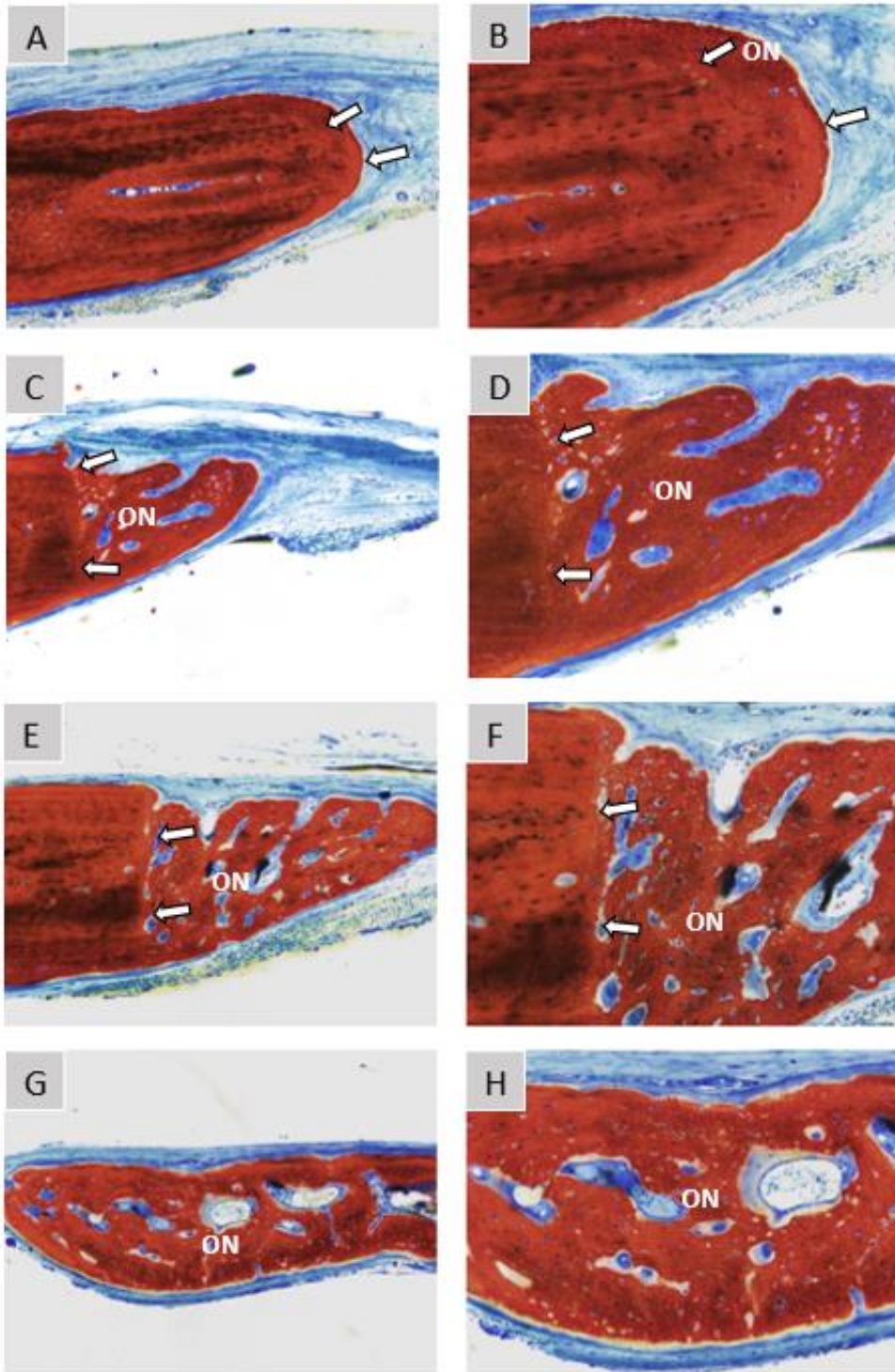


Figura 17 – Imagens representativas de cortes histológicos. Grupos: C (A, B); L-PRF (C, D); A-PRF (E, F); H-PRF (G, H). ON = osso neoformado; seta não preenchida = margens do defeito cirúrgico original. *As imagens G, H representam porções distantes das margens do defeito cirúrgico. Coloração: Azul de Stevenell e Vermelho de Alizarina. Aumento original = 10x (A, C, E, G); 20x (B, D, F, H).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a literatura vem se concentrando na proposição de novas formulações de concentrados plaquetários obtidos pela centrifugação de sangue autólogo, com o objetivo de aprimorar as características estruturais e moleculares dessas matrizes, tais como resistência mecânica e taxas de retenção e liberação de fatores de crescimento. O impacto biológico em estudos *in vivo* dessas modificações ainda é um campo obscuro na literatura. O presente estudo é o primeiro a avaliar a neoformação óssea em DTCs criados em calvária de ratos e tratados com concentrados plaquetários de origem autógena, obtidos por três protocolos distintos envolvendo centrifugação em alta e baixa velocidade, bem como equipamentos de centrifugação horizontal e de ângulo fixo. Os resultados obtidos demonstraram, em suma, que os agregados plaquetários potencializam a neoformação óssea em DTCs em calvária de ratos. Contudo, o protocolo de centrifugação horizontal produziu agregados plaquetários com maior potencial biológico para a regeneração óssea.

Neste estudo, foram utilizados três diferentes protocolos de centrifugação para a obtenção das membranas de PRF. Sendo assim, torna-se essencial para a reprodutibilidade do estudo que as características celulares e estruturais encontradas na PRF produzida com amostras sanguíneas do rato sejam semelhantes àquelas encontradas na PRF produzida com sangue humano. As membranas de PRF produzidas com sangue do rato demonstraram características semelhantes à PRF produzida com sangue humano no que se refere ao número e distribuição celular, conforme achados de estudos prévios (GHANAATI et al., 2014; MIRON et al., 2019a,b), sendo possível observar que os protocolos de centrifugação em baixa velocidade e de centrifugação horizontal foram mais eficazes na concentração de plaquetas e na sua distribuição de maneira mais homogênea ao longo da matriz de PRF do que o protocolo original de L-PRF. No que se refere aos leucócitos, a centrifugação horizontal promoveu um maior aumento na quantidade de células, bem como sua distribuição mais uniforme entre as camadas de PRF, quando comparada aos protocolos de centrifugação de ângulo fixo.

No que se refere ao modelo experimental abordado neste estudo, a utilização de ratos em experimentos científicos é uma técnica bem estabelecida e amplamente difundida na literatura. As pesquisas pré-clínicas configuram um método importante na busca de respostas e alternativas previamente à pesquisa em humanos. Além do

mais, os roedores são a ordem de mamíferos mais utilizada em experimentação animal, visto sua facilidade de criação e manejo e características anatômicas, fisiológicas e genéticas que permitem extrapolar as conclusões e resultados obtidos para a espécie humana. Nestes modelos animais, DTC) com diâmetro igual ou superior a 5 mm são comumente utilizados na avaliação da regeneração óssea, visto que configuram feridas que não se cicatrizam espontaneamente no período de duração de um estudo. Sendo assim, alternativas terapêuticas podem ser facilmente avaliadas quanto ao seu potencial na promoção e aceleração da regeneração tecidual (SHANBHAG et al., 2017; VAJGEL et al., 2014). Em relação à coleta sanguínea, a técnica de punção cardíaca foi empregada para que se pudesse obter amostra sanguínea em quantidade suficiente e em tempo hábil para a produção das membranas de PRF, sendo possível obter 3 mL de sangue de cada animal, de acordo com a massa corpórea média dos animais empregados neste estudo, sem causar sofrimento ou extrapolar os limites fisiológicos (HARKNESS; WAGNER, 2010; HOFF, 2000).

A análise por fluorescência, por meio de microscopia confocal, vem sendo amplamente empregada nos estudos envolvendo a avaliação da regeneração óssea, devido à capacidade dos fluorocromos de se ligarem aos íons cálcio no momento de sua precipitação na matriz, sendo que a quantidade de fluorescência permite a visualização direta da quantidade de osso presente. A administração de diferentes fluorocromos em períodos distintos permite a avaliação e diferenciação do osso antigo e do osso neoformado, o que, por sua vez, possibilita a mensuração do fenômeno da neoformação óssea (MULINARI-SANTOS et al., 2019; PUTTINI et al., 2019; RAMALHO-FERREIRA et al., 2015). Neste estudo, observou-se turnover ósseo aumentado nos grupos L-PRF e H-PRF, demonstrado pela maior marcação de alizarina e menor marcação de calceína. A maior presença de calceína nos grupos L-PRF, A-PRF e H-PRF em comparação ao grupo controle indica menores taxas de reabsorção óssea, enquanto a presença mais expressiva de alizarina no grupo H-PRF evidencia o seu potencial na promoção da neoformação óssea. De forma geral, todas as matrizes de PRF estimularam o processo de neoformação óssea no presente estudo. De fato, a concentração celular e liberação de fatores de crescimento tornam a PRF um arcabouço biológico ideal, promovendo a aceleração da migração e proliferação celular, angiogênese, modulação da resposta imunológica e recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, o que favorece a reparação e regeneração

de tecidos moles e duros (BASLARLI et al., 2015; CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; GHANAATI et al., 2018; LI et al., 2014; SOFFER; OUHAYOUN; ANAGNOSTOU, 2003; ZHAO; TSAI; CHANG, 2011).

Estudos prévios já demonstraram o potencial da L-PRF e A-PRF na aceleração da neoformação óssea de DTCs criados em calvária de ratos. Foram demonstradas maiores quantidades de osso neoformado em análises microtomográficas e histomorfométricas, em valores estatisticamente significantes, quando comparadas ao preenchimento dos DTCs com coágulo, apenas (grupo controle) (SILVA et al., 2022). A associação da L-PRF a enxerto xenógeno bovino promoveu maiores taxas de osso neoformado em parâmetros microtomográficos e histomorfométricos frente à osteoporose induzida experimentalmente, bem como maior expressão de fatores de crescimento importantes para a promoção da regeneração óssea, em comparação a grupo controle (ENGLER-PINTO et al., 2019).

O papel dos concentrados plaquetários na regeneração tecidual pode ser explicado pela disponibilização de células e fatores de crescimento diretamente no local de ação. A rede de fibrina formada após a centrifugação aprisiona as plaquetas em seu interior, responsáveis pela liberação de citocinas e fatores de crescimento que desempenham papel fundamental como mediadores de eventos inflamatórios e cicatriciais, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF)- β , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1, fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (BASLARLI et al., 2015; CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; ENGLER-PINTO et al., 2019; GHANAATI et al., 2018; LI et al., 2014; SOFFER; OUHAYOUN; ANAGNOSTOU, 2003; ZHAO; TSAI; CHANG, 2011). Estudos têm demonstrado um padrão de liberação lento e gradual das células e fatores de crescimento presentes nas matrizes de PRF, podendo se estender de 7 até 28 dias, garantindo a manutenção de concentrações favoráveis durante o período inicial do processo de regeneração óssea (DOHAN et al., 2006b; HE et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

O presente estudo produziu matrizes de PRF utilizando alta e baixa velocidade de centrifugação. Estudos *in vitro* têm demonstrado melhores características celulares e moleculares nos protocolos de centrifugação em velocidade reduzida (EL BAGDADI et al., 2019; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; GHANAATI et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016). A centrifugação em alta e baixa velocidade também foi comparada em

um estudo *in vivo* com a aplicação de matrizes de PRF em tecidos subcutâneos de ratos, onde se demonstrou a formação de uma estrutura de fibrina densa e estável em protocolo de alta velocidade de centrifugação, o que prejudicava sua infiltração no tecido receptor, enquanto a centrifugação em baixa velocidade permitiu a formação de uma matriz de PRF mais porosa, com altas taxas de vascularização no tecido (KUBESCH et al., 2019). Supõe-se, assim, que mudanças estruturais nos coágulos de PRF podem alterar seu potencial regenerativo.

Em todos os parâmetros analisados neste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos L-PRF e A-PRF, o que corrobora os achados de Silva e colaboradores (2022), onde os dois tipos diferentes de matrizes de PRF promoveram maior neoformação óssea em comparação ao grupo controle, em parâmetros microtomográficos e histomorfométricos, mas não apresentaram diferenças significantes entre si. Maiores taxas de liberação de fatores de crescimento importantes para a promoção da neoformação óssea têm sido demonstradas em protocolos de centrifugação em baixa velocidade, em comparação aos protocolos originais de centrifugação em alta velocidade (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; KOBAYASHI et al., 2016). Por outro lado, DOHAN EHRENFEST e colaboradores (2018) observaram que a liberação lenta de alguns fatores de crescimento das membranas L-PRF originais foi significativamente mais potente em todos os tempos experimentais do que a liberação das membranas A-PRF.

Uma limitação do presente estudo foi a ausência de análise dos níveis de fatores de crescimento nas amostras de PRF. Futuros estudos são importantes para esclarecer a correlação existente entre diferentes níveis de fatores de crescimento em diferentes matrizes de PRF e a quantidade de osso neoformado. À luz dos padrões de retenção e liberação de fatores de crescimento promovidos por variações no protocolo de centrifugação (LOURENÇO et al., 2021; TSUJINO et al., 2019), é necessário esclarecer as propriedades resultantes nas diferentes matrizes de PRF. Ressalta-se que, mais importante do que a quantidade de plaquetas aprisionadas na matriz de PRF, seu papel principal na promoção da neoformação tecidual se encontra na inter-relação entre plaquetas, leucócitos, fibrina e fatores de crescimento (FUJIOKA-KOBAYASHI, 2017). Assim, as evidências diretas da distribuição e liberação de fatores de crescimento no aprimoramento de diferentes formulações de PRF ainda necessitam ser elucidadas.

De forma inédita, o presente estudo avaliou com poder estatístico adequado o impacto biológico de matrizes de PRF produzidas a partir de diferentes ângulos de centrifugação na regeneração óssea. As membranas produzidas pela centrifugação horizontal proporcionaram maiores valores de BV/TV, Tb.N, AON, bem como maior expressão de Alizarina, quando comparadas àquelas produzidas por meio de centrífugas com rotores de ângulo fixo. De fato, ao longo dos anos, novos protocolos vêm sendo propostos baseados em conceitos de centrifugação em baixa velocidade e tempo reduzido, tais como a A-PRF e i-PRF, além da introdução à centrifugação horizontal (H-PRF), com a finalidade de melhorar as características estruturais das membranas de PRF e aumentar a biodisponibilidade de células e fatores de crescimento, o que poderia potencializar seus efeitos regenerativos (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; GHANAATI et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016; LOURENÇO et al., 2018; MIRON et al., 2019a,b; MOURÃO et al., 2015; WEND et al., 2017). A produção de matrizes de PRF com a utilização de centrífugas verticais de ângulo fixo vem sendo empregada por anos, visto que a maioria das centrífugas disponíveis comercialmente são sistemas de ângulo fixo. A utilização de centrífugas horizontais, já muito empregadas na área médica, tem sido proposta recentemente devido à sua capacidade de melhor separação dos tipos celulares, em teoria, devido às células circularem livremente pelo tubo, evitando que elas se choquem contra suas paredes (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2021).

No presente estudo, as amostras de H-PRF apresentaram uma distribuição mais homogênea de leucócitos e um aumento de 7,7 vezes em comparação às amostras de sangue periférico. Esse aumento também foi superior àqueles observados nas amostras de L-PRF e A-PRF. Essas informações corroboram achados de estudos prévios, onde a centrifugação horizontal permitiu um aumento de 4 vezes no número de células (especialmente leucócitos) presentes nas camadas correspondentes à PRF em comparação à centrifugação de ângulo fixo (MIRON et al., 2019a). Os leucócitos são muito mais difíceis de acumular dentro da matriz de PRF, principalmente quando se utiliza centrifugação de ângulo fixo, onde o número de células da série vermelha supera as células da série branca em razão de 1000:1 e a maioria das células se acumula ao longo da superfície distal posterior dos tubos PRF, onde eles geralmente não podem se separar com precisão. Foi demonstrado previamente que, embora as plaquetas pudessem aumentar o rendimento em ~ 20% na centrifugação horizontal versus ângulo fixo, os leucócitos demonstraram um

aumento mais pronunciado (próximo a 400%) (MIRON et al., 2019a). Células da série branca, em particular, são importantes durante a cicatrização de feridas, especialmente durante a integração de biomateriais e formação de tecidos (BATOON et al., 2017; CHANG et al., 2008; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2021; MIRON; BOSSHARDT, 2015; SINDER; PETTIT; MCCAULEY, 2015; WINKLER et al., 2010).

Em suma, o presente estudo demonstrou que, utilizando centrífugas de ângulo fixo, a velocidade de centrifugação na produção de agregados plaquetários não alterou seu potencial biológico. Ambas as matrizes de agregados plaquetários (L-PRF e A-PRF) promoveram resultados semelhantes na regeneração de tecidos duros. Contudo, a modificação do equipamento de centrifugação, ou seja, a utilização de centrifugação horizontal, produziu agregados plaquetários (H-PRF) com maior potencial biológico para a regeneração óssea. O H-PRF proporcionou aumento no BV/TV de 464%, 238% e 206% em relação aos grupos C, L-PRF e A-PRF, respectivamente. As diferenças entre H-PRF e os demais agregados plaquetários relatadas em diversos estudos *in vitro* (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2021; LOURENÇO et al., 2021; MIRON et al., 2019a,b) podem explicar esses resultados. É importante destacar que a literatura ainda é controversa no que diz respeito à previsibilidade no tratamento com PRF, especialmente na regeneração óssea. Estudos clínicos controlados aleatorizados de alta qualidade e metanálises são requeridos para reverter essa limitação da literatura, e, para tanto, torna-se fundamental a padronização dos protocolos de preparação e aplicação das matrizes de PRF, minimizando a ocorrência de variáveis que podem comprometer a eficácia do tratamento e o resultado final (DOHAN-EHRENFEST et al., 2018; TSUJINO et al., 2019).

Os dados desse estudo devem ser interpretados com cautela. O preparo dos agregados plaquetários autólogos em ratos exigiu a necessidade de adaptações dos protocolos originais no que diz respeito ao volume total de sangue coletado em cada tubo. Além disso, os níveis de fatores de crescimento nas amostras de PRF não foram mensurados. Utilizou-se também matrizes de PRF isoladas nos DTCs criados. Futuros estudos avaliando a associação dessas matrizes com biomateriais, bem como avaliação da correlação existente entre os níveis de fatores de crescimento, número de plaquetas e quantidade de osso neoformado são importantes. Períodos de acompanhamento mais prolongado, além da utilização de animais com comprometimentos sistêmicos e animais de maior escala filogenética também devem

ser realizados para melhor elucidar o papel dos concentrados plaquetários na promoção da neoformação tecidual (SILVA et al., 2022).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que: i) os agregados plaquetários produzidos em centrífugas de ângulo fixo por meio de altas velocidades (L-PRF) ou baixas velocidades (A-PRF) de centrifugação, bem como aqueles produzidos por meio de centrifugação horizontal (H-PRF) potencializam a neoformação óssea em DTCs em calvária de ratos; ii) o protocolo de centrifugação horizontal promoveu maior neoformação óssea no tratamento de DTCs criados em calvária de ratos.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, N. D.; JAIN, A. Platelet rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: a randomized split mouth clinical trial. **Acta Odontol Scand**, v. 74, p. 36-43, 2016.
- AGARWAL, S. K.; JHINGRAN, R.; BAINS, V. K.; SRIVASTAVA, R.; MADAN, R.; RIZVI, I. Patient-centered evaluation of microsurgical management of gingival recession using coronally advanced flap with platelet-rich fibrin or amnion membrane: a comparative analysis. **Eur J Dent**, v. 10, n. 1, p. 121-133, 2016.
- AIZAWA, H.; TSUJINO, T.; WATANABE, T.; ISOBE, K.; KITAMURA, Y.; SATO, A.; YAMAGUCHI, S.; OKUDERA, H.; OKUDA, K.; KAWASE, T. Quantitative Near-Infrared Imaging of platelets in platelet-rich fibrin (PRF) matrices: comparative analysis of H-PRF, leukocyte-rich PRF, advanced-PRF and concentrated growth factors. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 12, 2020.
- AJWANI, H.; SHETTY, S.; GOPALAKRISHNAN, D.; KATHARIYA, R.; KULLOLI, A.; DOLAS, R. S.; PRADEEP, A. R. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin biomaterial and open flap debridement in the treatment of two and three wall intrabony defects. **J Int Oral Health**, v. 7, p. 32-37, 2015.
- ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, 212–218, 2005.
- AVILA-ORTIZ, G.; ELANGOVA, S.; KRAMER, K.W.O.; BLANCHETTE, D.; DAWSON, D.V. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: A systematic review and meta-analysis. **J Dent Res**, v. 93, n. 10, p. 950-958, 2014.
- BAJAJ, P.; PRADEEP, A. R.; AGARWAL, E.; RAO, N. S.; NAIK, S. B.; PRIYANKA, N.; KALRA, N. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol Res**, v. 48, n. 5, p. 573-581, 2013.
- BASLARLI, O.; TUMER, C.; UGUR, O.; VATANKULU, B. Evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 20, n. 1, p. 111–116, 2015.
- BATOON, L.; MILLARD, S. M.; RAGGATT, L-J.; PETTIT, A. R. Osteomacs and bone regeneration, **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, p. 385-395, 2017.
- BOORA, P.; RATHEE, M.; BHORIA, M. Effect of Platelet Rich Fibrin (PRF) on peri-implant soft tissue and crestal bone in one-stage implant placement: a randomized controlled trial. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 4, p. 18-21, 2015.
- CHANG, M. K.; RAGGATT, L-J.; ALEXANDER, K. A.; KULIWABA, J. S.; FAZZALARI, N. L.; SCHRODER, K.; MAYLIN, E. R.; RIPOLI, V. M.; HUME, D. A.; PETTIT, A. R. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining

tissues and regulated osteoblast function in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 181, n. 2, p. 1232-1244, 2008.

CHAPPUIS, V.; ENGEL, O.; SHAHIM, K.; REYES, M.; KATSAROS, C.; BUSER, D. Soft tissue alterations in esthetic postextraction sites: A 3-dimensional analysis. **J Dent Res**, v. 94, p. 187-193, 2015.

CHELLATHURAI, B. N. K.; GANESH, B.; RAJARAM, V. Advanced platelet-rich fibrin in periosteal inversion technique for root coverage: a case report. **Clinical Advances in Periodontics**, v. 10, n. 4, p. 181-185, 2020.

CHOUKROUN, J.; ADDA, F.; SCHOEFFLER, C.; VERVELLE, A. Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. **Implantodontie**, v. 42, p. 55-62, 2001.

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**, v. 101, n. 3, p. 56-60, 2006.

CLARK, R. A. Fibrin and wound healing. **Ann N Y Acad Sci**, v. 936, p. 355-367, 2001.

DEL FABBRO, M.; GALLESIO, G.; MOZZATI, M. Autologous platelet concentrates for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw treatment and prevention. A systematic review of the literature. **Eur J Cancer**, v. 51, n. 1, p. 62-74, 2015.

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 I: technological concepts and evolution. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 101, p. 37-44, 2006a.

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**, v. 101, p. 45-50, 2006b.

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 III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? **Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, p. 51-55, 2006c.

DOHAN EHRENFEST, D.M.; DE PEPPA, G.M.; DOGLIOLI, P.; SAMMARTINO, G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): A gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. **Growth Factors**, v. 27, n. 1, p. 63-69, 2009a.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; DEL CORSO, M.; DISS, A.; MOUHYI, J.; CHARRIER, J. B. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. **J Periodontol**, v. 81, p. 546-555, 2010.

DOHAN EHRENFEST, D.M.; DISS, A.; ODIN, G.; DOGLIOLI, P.; HIPPOLYTE, M.P.; CHARRIER, J.B. *In vitro* effects of Choukroun's PRF (Platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 3, p. 341-352, 2009b.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; PINTO, N. R.; PEREDA, A.; JIMÉNEZ, P.; CORSO, M. D.; 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**, v. 29, n. 2, p. 171-184, 2018.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.

EL BAGDADI, K.; KUBESCH, A.; YU, X.; AL-MAAWI, S.; ORLOWSKA, A.; DIAS, A.; BOOMS, P.; DOHLE, E.; SADER, R.; KIRKPATRICK, C. J.; CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. 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). **Eur J Trauma Emerg Surg**, v. 45, p. 467-479, 2019.

ELGENDY, E. A.; ABO SHADY, T. E. Clinical and radiographic evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite with or without platelet-rich fibrin membrane in the treatment of periodontal intrabony defects. **J Indian Soc Periodontol**, v. 19, p. 61-65, 2015.

ELNAYEF, B.; MONJE, A.; GARGALLO-ALBIOL, J.; GALINDO-MORENO, P.; WANG, H. L.; HERNÁNDEZ-ALFARO, F. Vertical ridge augmentation in the atrophic mandible: A systematic review and meta-analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 32, n. 2, p. 291-312, 2017.

ENGLER-PINTO, A.; SIÉSSERE, S.; CALEFI, A.; OLIVEIRA, L.; ERVOLINO, E.; SOUZA, S.; FURLANETO, F.; MESSORA, M. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. **Clin Oral Impl Res**, v. 30, p. 962-976, 2019.

FIJNHEER, R.; PIETERSZ, R. N.; DE KORTE, D.; GOUWEROK, C. W.; DEKKER, W. J.; REESINK, H. W.; ROOS, D. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. **Transfusion**, v. 30, p. 634-638, 1990.

FUCHS, S.; GHANAATI, S.; ORTH, C.; BARBECK, M.; KOLBE, M.; HOFMANN, A.; EBLENKAMP, M.; GOMES, M.; REIS, R. L.; KIRKPATRICK, C. J. Contribution of outgrowth endothelial cells from human peripheral blood on *in vivo* vascularization of bone tissue engineered constructs based on starch polycaprolactone scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, p. 526-534, 2009.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; KONO, M.; KATAGIRI, H.; SCHALLER, B.; ZHANG, Y.; SCULEAN, A.; MIRON, R. J. Histological comparison of platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation. **Platelets**, v. 32, n. 3, p. 413-419, 2021.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; MIRON, R. J.; HERNANDEZ, M.; KANDALAM, U.; ZHANG, Y.; CHOUKROUN, J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. **J Periodontol**, v. 88, n. 1, p. 112-121, 2017.

GHANAATI, S.; BOOMS, P.; ORLOWSKA, A.; KUBESCH, A.; LORENZ, J.; RUTKOWSKI, J.; LANDES, C.; SADER, R.; KIRKPATRICK, C.; CHOUKROUN, J. Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. **J Oral Implantol**, v. 40, n. 6, p. 679-689, 2014.

GHANAATI, S.; HERRERA-VIZCAINO, C.; AL-MAAWI, S.; LORENZ, J.; MIRON, R.J.; NELSON, K.; SCHWARZ, F.; CHOUKROUN, J.; SADER, R. Fifteen years of platelet rich fibrin (PRF) in dentistry and oromaxillofacial surgery: How high is the level of scientific evidence? **J Oral Implantol**, v. 44, n. 6, p. 471–492, 2018.

GHANAATI, S.; UNGER, R. E.; WEBBER, M. J.; BARBECK, M.; ORTH, C.; KIRKPATRICK, J. A.; BOOMS, P.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C.; SADER, R. A.; KIRKPATRICK, C. J. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. **Biomaterials**, v. 32, p. 8150-8160, 2011.

GIRISH RAO, S.; BHAT, P.; NAGESH, K. S.; RAO, G. H.; MIRLE, B.; KHARBHARI, L.; GANGAPRASAD, B. Bone regeneration in extraction sockets with autologous platelet rich fibrin gel. **J Maxillofac Oral Surg**, v. 12, n. 1, p. 11-16, 2013.

GRUBER, R.; VARGA, F.; FISCHER, M. B.; WATZEK, G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. **Clin Oral Implants Res**, v. 13, n. 5, p. 529-535, 2002.

GÜRBÜZER, B.; PIKDÖKEN, L.; TUNALI, M.; URHAN, M.; KÜÇÜKODACI, Z.; ERCAN F. Scintigraphic evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 5, p. 980-989, 2010.

HALLMAN, M.; THOR, A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. **Periodontol 2000**, v. 41, n. 1, p. 172-192, 2008.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Clinical procedures. **The biology and medicine of rabbits and rodents**. 5^a. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2010. P. 107-194.

HAUSER, F.; GAYDAROV, N.; BADOUD, I.; VAZQUEZ, L.; BERNARD, J. P.; AMMANN, P. 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, 2013.

HE, L.; LIN, Y.; HU, X.; ZHANG, Y.; WU, H. A comparative study of Platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 5, p. 707-713, 2009.

HOAGLIN, D. R. LINES, G. K. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. **Int J Dent**, 2013:875380, 2013.

HOFF, J.; Methods of blood collection in the mouse. **Lab Animal**, v. 29, n. 10, p. 47-53, 2000.

IASELLA, J. M.; GREENWELL, H.; MILLER, R. L.; HILL, M.; DRISKO, C.; BOHRA, A. A.; SCHEETZ, J. P. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. **J Periodontol**, v. 74, n. 7, p. 990-999, 2003.

INCHINGOLO, F.; TATULLO, M.; MARRELLI, M.; INCHINGOLO, A.M.; SCACCO, S.; INCHINGOLO, A.D.; DIPALMA, G.; VERMESAN, D.; ABBINANTE, A.; CAGIANO, R. Trial with Platelet-rich fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 14, n. 12, p. 1075-1084, 2010.

KECELI, H. G.; KAMAK, G.; ERDEMIR, E. O.; EVGINER, M. S.; DOLGUN, A. The adjunctive effect of platelet-rich fibrin to connective tissue graft in the treatment of buccal recession defects: results of a randomized, parallel-group controlled trial. **J Periodontol**, v. 86, n. 11, p. 1221-1230, 2015.

KOBAYASHI, E.; FLÜCKIGER, L.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; SAWADA, K.; SCULEAN, A.; SCHALLER, B.; MIRON, R. J. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 9, p. 2353-2360, 2016.

KUBESH, A.; BARBECK, M.; AL-MAAWI, S.; ORLOWSKA, A.; BOOMS, P. F.; SADER, R. A.; MIRON, R. J.; KIRKPATRICK, C. J.; CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study *in vivo*. **Platelets**, v. 30, p. 329-340, 2019.

KUCHLER, U.; VON ARX, T. Horizontal ridge augmentation in conjunction with or prior to implant placement in the anterior maxilla: A systematic review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, p. 14-24, 2014.

LEKOVIC, V.; CAMARGO, P. M.; KLOKKEVOLD, P. R.; WEINLAENDER, M.; KENNEY, E. B.; DIMITRIJEVIC, B.; NEDIC, M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. **J Periodontol**, v. 69, n. 9, p. 1044-1049, 1998.

LEKOVIC, V.; KENNEY, E. B.; WEINLAENDER, M.; HAN, T.; KLOKKEVOLD, P.; NEDIC, M.; ORSINI, M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance

following tooth extraction. Report of 10 cases. **J Periodontol**, v. 68, n. 6, p. 563-570, 1997.

LI, Q.; REED, D. A.; MIN, L.; GOPINATHAN, G.; LI, S.; DANGARIA, S. J.; LI, L.; GENG, Y.; GALANG, M-T.; GAJENDRAREDDY, P.; ZHOU, Y.; LUAN, X.; DIEKWISCH, T. G. H. Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 5, p. 8509-8525, 2014.

LIU, K.; HUANG, Z.; CHEN, Z.; HAN, B.; OUYANG, X. Treatment of periodontal intrabony defects using bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration with/without platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 92, n. 11, p. 1546-1553, 2021.

LIU, Y-H.; TO, M.; OKUDERA, T.; WADA-TAKAHASHI, S.; TAKAHASHI, S-S.; SU, C-Y.; MATSUO, M. Advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) has an impact on the initial healing of gingival regeneration after tooth extraction. **J Oral Biosciences**, v. 64, n. 1, p. 141-147, 2021.

LOURENÇO, E. S.; ALVES, G. G.; BARBOSA, R. L.; SPIEGEL, C. N.; MELO-MACHADO, R. C.; AL-MAAWI, S.; GHANAATI, S.; MOURÃO, C. F. Effects of rotor angle and time after centrifugation on the biological in vitro properties of platelet rich fibrin membranes. **J Biomed Mater Res**, v. 109, p. 60-68, 2021.

LOURENÇO, E. S.; MOURÃO, C. F. A. B.; LEITE, P. E. C.; GRANJEIRO, J. M.; CALASANS-MAIA, M. D.; ALVES, G. G. The in vitro release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. **J Biomed Mater Res A**, v. 106, n. 5, p. 1373-1380, 2018.

MARIANO, R.; MESSORA, M.; de MORAIS, A.; NAGATA, M.; FURLANETO, F.; AVELINO, C.; PAULA, F.; FERREIRA, S.; PINHEIRO, M.; de SENE, J. P. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 1, p. 72-78, 2010.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. 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, 1998.

MESSORA, M. R.; NAGATA, M. J.; DORNELLES, R. C.; BOMFIM, S. R.; FURLANETO, F. A.; de MELO, L. G.; DELIBERADOR, T. M.; BOSCO, A. F.; GARCIA, V. G.; FUCINI, S. E. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2008.

MILINKOVIC, I.; CORDARO, L. Are there specific indications for the different alveolar bone augmentation procedures for implant placement? A systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 5, p. 606–625, 2014.

MIRON, R. J.; BOSSHARDT, D. D. OsteoMacs: key players around bone biomaterials. **Biomaterials**, v. 82, p. 1-19, 2015.

MIRON, R. J.; CHAI, J.; ZHENG, S.; FENG, M.; SCULEAN, A.; ZHANG, Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. **J Biomed Mater Res A**, v. 107, n. 10, p. 2257-2271, 2019a.

MIRON, R. J.; CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Reply from authors: RE: Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response: necessity for standardization of relative centrifugal force values in studies on platelet-rich fibrin. **J Periodontol**, v. 90, n. 2, p. 122-125, 2019.

MIRON, R. J.; MORASCHINI, V.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; ZHANG, Y.; KAWASE, T.; COSGAREA, R.; JEPSEN, S.; BISHARA, M.; CANULLO, L.; SHIRAKATA, Y.; GRUBER, R.; FERENC, D.; CALASANS-MAIA, M. D.; WANG, H-L.; SCULEAN, A. Use of platelet-rich fibrin for the treatment of periodontal intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Invest**, v. 25, p. 2461-2478, 2021.

MIRON, R. J.; XU, H.; CHAI, J.; WANG, J.; ZHENG, S.; FENG, M.; ZHANG, X.; WEI, Y.; CHEN, Y.; MOURÃO, C. F. A. B.; SCULEAN, A.; ZHANG, Y. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~700g) and low (~200g) relative centrifugation forces. **Clin Oral Invest**, v. 24, n. 3, p. 1171-1182, 2019b.

MIRON, R. J.; ZUCHELLI, G.; PIKOS, M. A.; SALAMA, M.; LEE, S.; GUILLEMETTE, V.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; BISHARA, M.; ZHANG, Y.; WANG, H-L.; CHANDAD, F.; NACOPOULOS, C.; SIMONPIERI, A.; AALAM, A. A.; FELICE, P.; SAMMARTINO, G.; GHANAATI, S.; HERNANDEZ, M. A.; CHOUKROUN, J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. **Clin Oral Invest**, v. 21, p. 1913-1927, 2017.

MOURAO, C.; VALIENSE, H.; MELO, R.; MOURÃO, N. B.; MAIA, M. D. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. **Rev Col Bras Cir**, v. 42, n. 6, p. 421-423, 2015.

MULINARI-SANTOS, G.; SANTOS, J. S.; PALIN, L. P.; SILVA, A. C. E.; ANTONIALI, C.; FAVERANI, L. P.; OKAMOTO, R. Losartan improves alveolar bone dynamics in normotensive rats but not in hypertensive rats. **J Appl Oral Sci**, v. 27, 2019.

NAGATA, M. J.; MESSORA, M.; POLA, N.; CAMPOS, N.; VIEIRA, R.; ESPER, L. A.; SBRANA, M.; FUCINI, S.; GARCIA, V.; BOSCO, A. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Orthop Res**, v. 28, n. 4, p. 468-473, 2010.

OKAMOTO, Y.; TATEISHI, H.; KINOSHITA, K.; TSUCHIYA, S.; HIBI, H.; UEDA, M. An experimental study of bone healing around the titanium screw implants in ovariectomized rats: enhancement of bone healing by bone marrow stromal cells transplantation. **Implant Dent**, v. 20, n. 3, p. 236-245, 2011.

PANDA, S.; SANKARI, M.; SATPATHY, A.; JAYAKUMAR, D.; MOZZATI, M.; MORTELLARO, C.; GALLESIO, G.; TASCHIERI, S.; DEL FABBRO, M. Adjunctive effect of autologous platelet-rich fibrin to barrier membrane in the treatment of periodontal intrabony defects. **J Craniofac Surg**, v. 27, p. 691-696, 2016.

PINOTTI, F. E.; OLIVEIRA, G. J. P. L.; ARONI, M. A. T.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO JR, E. Analysis of osseointegration of implants with hydrophilic surfaces in grafted areas: a preclinical study. **Clin Oral Impl Res**, v. 29, p. 963-972, 2018.

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

PRADEEP, A. R.; KARVEKAR, S.; NAGPAL, K.; PATNAIK, K.; RAJU, A.; SINGH, P. Rosuvastatin 1.2 mg in situ gel combined with 1:1 mixture of autologous platelet-rich fibrin and porous hydroxyapatite bone graft in surgical treatment of mandibular class II furcation defects: a randomized clinical control trial. **J Periodontol**, v. 87, n. 1, p. 5-13, 2016.

PRADEEP, A. R.; RAO, N. S.; AGARWAL, E.; BAJAJ, P.; KUMARI, M.; NAIK, S. B. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 83, p. 1499-1507, 2012.

PRIPATNANONT, P.; NUNTANARANONT, T.; VONGVATCHARANON, S.; PHURISAT, K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. **J CranioMaxilloFac Surg**, v. 41, p. 191-200, 2013.

PUTTINI, I. O.; GOMES-FERREIRA, P. H. S.; OLIVEIRA, D.; HASSUMI, J. S.; GONÇALVES, P. Z.; OKAMOTO, R. Teriparatide improves alveolar bone modelling after tooth extraction in orchietomized rats. **Archives of Oral Biology**, v. 102, p. 147-154, 2019.

RAMALHO-FERREIRA, G.; FAVERANI, L. P.; GROSSI-OLIVEIRA, G. A.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 3, 2015.

RAO, J. K. D.; BHATNAGAR, A.; PANDEY, R.; ARYA, V.; ARORA, G.; KUMAR, J.; BOOTWALA, F.; DEVI, W. N. A comparative evaluation of iliac crest bone graft with and without injectable and advanced platelet rich fibrin in secondary alveolar bone grafting for cleft alveolus in unilateral cleft lip and palate patients: a randomized prospective study. **J Stomatol Oral Maxillofac Surg**, v. 122, p. 241-247, 2021.

- SANTINONI, C. S.; NEVES, A. P. C.; ALMEIDA, B. F. M.; KAJIMOTO, N. C.; POLA, N. M.; CALIENTE, E. A.; BELEM, E. L. G.; LELIS, J. B.; FUCINI, S. E.; MESSORA, M. R.; GARCIA, V. G.; BOMFIM, S. R. M.; ERVOLINO, E.; NAGATA, M. J. H. Bone marrow coagulated and low-level laser therapy accelerate bone healing by enhancing angiogenesis, cell proliferation, osteoblast differentiation, and mineralization. **J Biomed Mat Res**, v. 109, n. 6, p. 849-858, 2020.
- SARBAN, S.; SENKOYLU, A.; ISIKAN, U. E.; KORKUSUZ, P.; KORKUSUZ, F. Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats? A preliminary study. **Clin Orthop Relat Res**, v. 467, n. 12, p. 3113-3120, 2009.
- SCHROPP, L.; WENZEL, A.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 23, n. 4, p. 313-323, 2003.
- SHANBHAG, S.; PANDIS, N.; MUSTAFA, K.; NYENGAARD, J. R.; STAVROPOULOS, A. Alveolar bone tissue engineering in critical-size defects of experimental animal models a systematic review and meta-analysis. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 11, p. 2935-2949, 2017.
- SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 82, p. 1705-1712, 2011.
- SHIRAKATA, Y.; SENA, K.; NAKAMURA, T.; SHINOHARA, Y.; IMAFUJI, T.; SETOGUCHI, F.; NOGUCHI, K.; KAWASE, T.; MIRON, R. Histological evaluation of gingival and intrabony periodontal defects treated with platelet-rich fibrin using different protocols: a canine study. **Oral Health Prev Dent**, v. 19, p. 537-546, 2021.
- SILVA, L. M. P.; SÁVIO, D. S. F.; ÁVILA, F. C.; VICENTE, R. M.; REIS, G. G. D.; DENARDI, R. J.; COSTA, N. M. M.; SILVA, P. H. F.; MOURÃO, C. F. A. B.; MIRON, R. J.; MESSORA, M. R. Comparison of the effects of platelet concentrates produced by high and low-speed centrifugation protocols on the healing of critical-size defects in rat calvaria: a microomographic and histomorphometric study. **Platelets**, v. 19, p. 1-10, 2022.
- SIMÕES-PEDRO, M.; TRÓIA, P. M. B. P. S.; SANTOS, N. B. M.; COMPLETO, A. M. G.; CASTILHO, R. M.; FERNANDES, G. V. O. Tensile strenght essay comparing three different platelet-rich fibrin membranes (L-PRF, A-PRF, and A-PRF+): a mechanical and structural in vitro evaluation. **Polymers**, v. 14, n. 7, 2022.
- SIMONPIERI, A.; CHOUKROUN, J.; DEL CORSO, M.; SAMMARTINO, G.; DOHAN EHRENFEST, D. M. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. **Implant Dent**, v. 20, n. 1, p. 2-12, 2011.
- SINDER, B. P.; PETTIT, A. R.; MCCAULEY, L. K. Macrophages: their emerging roles in bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 12, p. 2140-2149, 2015.

SOFFER, E.; OUHAYOUN, J. P.; ANAGNOSTOU, F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 5, p. 521-528, 2003.

SUTTAPREYASRI, S.; LEEPONG, N. Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation. **J Craniofac Surg**, v. 24, n. 4, p. 1088-1094, 2013.

TABRIZI, R.; ARABION, H.; KARAGH, T. Does platelet-rich fibrin increase the stability of implants in the posterior of the maxilla? A split-mouth randomized clinical trial. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, p. 672-675, 2018.

TEMMERMAN, A.; VANDESSEL, J.; CASTRO, A.; JACOBS, R.; TEUGHEL, W.; PINTO, N.; QUIRYNEN, M. The use of Leucocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomised, controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 43, n. 11, p. 990-999, 2016.

TEN HEGGELER, J. M.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 8, p. 779-788, 2011.

TO, M.; SU, C.; HIDAKA, K.; OKUDERA, T.; MATSUO, M. Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. **Anatomical Science International**, v. 94, p. 238-244, 2019.

TSUJINO, T.; MASUKI, H.; NAKAMURA, M.; ISOBE, K.; KAWABATA, H.; AIZAWA, H.; WATANABE, T.; KITAMURA, Y.; OKUDERA, H.; OKUDA, K.; NAKATA, K.; KAWASE, T. Striking differences in platelet distribution between Advanced-Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factors: effects of silica-containing plastic tubes. **J Funct Biomater**, v. 10, n. 3, 2019.

TUNALI, M.; OZDEMIR, H.; ARABACIOTA, T.; GURBUZER, B.; PIKDOKEN, L.; FIRATLI, E. Clinical evaluation of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of multiple adjacent gingival recession defects: a 12-month study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 35, n. 1, p. 105-114, 2015.

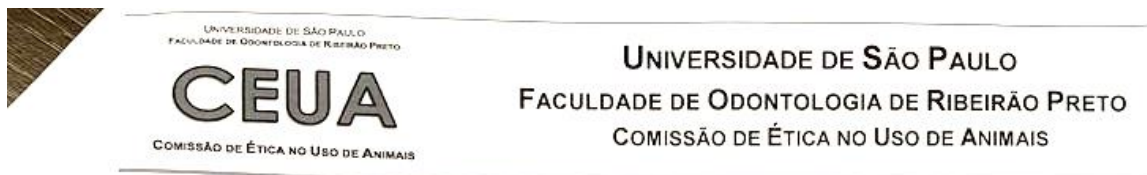
UNGER, R. E.; GHANAATI, S.; ORTH, C.; SARTORIS, A.; BARBECK, M.; HALSTENBERG, S.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C.; KIRKPATRICK, C. J. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. **Biomaterials**, v. 31, p. 6959-6967, 2010.

URBAN, I. A.; MONJE, A. Guided bone regeneration in alveolar bone reconstruction. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, v. 31, p. 331-338, 2019.

URBAN, I. A.; MONJE, A.; NEVINS, M.; NEVINS, M. L.; LOZADA, J.; WANG, H. L. Surgical management of significant maxillary anterior vertical ridge defects. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 36, n. 3, p. 329-337, 2016.

- VAJGEL, A.; MARDAS, N.; FARIAS, B. C.; PETRIE, A.; CIMÕES, R.; DONOS, N. A systematic review on the critical size defect model. **Clin Oral Impl Res**, v. 25, p. 879-893, 2014.
- WANG, R. E.; LANG, N. P. Ridge preservation after tooth extraction. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, p. 147-156, 2012.
- WEND, S.; KUBESCH, A.; ORLOWSKA, A.; AL-MAAWI, S.; ZENDER, N.; DIAS, A.; MIRON, R. J.; SADER, R.; BOOMS, P.; KIRKPATRICK, C. J.; CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Reduction of the relative centrifugal force influence cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. **J Mater Sci Mater Med**, v. 28, n. 12, p. 188, 2017.
- WINKLER, I. G.; SIMS, N. A.; PETTIT, A. R.; BARBIER, V.; NOWLAN, B.; HELWANI, F.; POULTON, T. J.; van ROOIJEN, N.; ALEXANDER, K. A.; RAGGATT, L. J.; LÉVESQUE, J-P. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. **Blood**, v. 116, n. 23, p. 4815-4828, 2010.
- YILMAZ, D.; DOGAN, N.; OZKAN, A.; SENCIMEN, M.; ORA, B. E.; MUTLU, I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. **Acta Cir Bras**, v. 29, n. 1, p. 59-65, 2014.
- YÜCE, E.; KÖMERIK, N. Potential effects of advanced platelet rich fibrin as a wound-healing accelerator in the management of alveolar osteitis: a randomized clinical trial. **Niger J Clin Pract**, v. 22, p. 1189-1195, 2019.
- ZHANG, Y.; TANGL, S.; HUBER, C. D.; LIN, Y.; QIU, L.; RAUSCH-FAN, X. Effects of Choukroun's Platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 40, n. 4, p. 321-328, 2012.
- ZHAO, J.-H.; TSAI, C.-H.; CHANG, Y.-C. Clinical and histologic evaluations of healing in an extraction socket filled with platelet-rich fibrin. **J Dent. Sci**, v. 6, p. 116-122, 2011.

Anexos

ANEXO A**Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.****CERTIFICADO CEUA – FORP/USP**

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da associação da Fibrina Rica em Plaquetas produzida por dois diferentes protocolos ao enxerto xenógeno bovino na cicatrização de defeitos ósseos em calvária de ratos**”, Protocolo nº 2019.1.930.58.0, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Michel Reis Messora – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 07/02/2020.

Vigência do Projeto	07/02/2020 a 09/03/2021
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Wistar Hannover
Nº de animais	32
Peso/Idade	250 - 300g / 42-56 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 07 de fevereiro de 2020.

Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B**Artigo científico para submissão no periódico *Platelets*.****Effects of platelet aggregates produced by three centrifugation protocols on bone neoformation in defects created in rat calvaria**

Débora de Souza Ferreira Sávio¹, Lucia Moitrel Pequeno da Silva², Gabriel Guerra David Reis², Ricardo Junior Denardi², Natacha Malu Miranda da Costa², Flávia Aparecida Chaves Furlaneto², Sérgio Luís Scombatti de Souza², Carlos Fernando de Almeida Barros Mourão³, Richard J. Miron⁴, Roberta Okamoto⁵, Michel Reis Messoria^{2*}

¹ *Department of Morphology, Physiology, and Basic Pathology – DMFPB, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil;* ² *Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology – DCTBMF, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil;* ³ *Clinical Research Unit, Antônio Pedro University Hospital, Fluminense Federal University, Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil;* ⁴ *Department of Periodontology, University of Bern, Bern, Switzerland;* ⁵ *Department of Basic Sciences - DCB, School of Dentistry of Araçatuba, Paulista State University – UNESP, Araçatuba, SP, Brazil.*

*corresponding author e-mail: m.messoria@forp.usp.br

Débora de Souza Ferreira Sávio - ORCID: 0000-0003-4073-0297

Lucia Moitrel Pequeno da Silva - ORCID: 0000-0003-3317-8393

Gabriel Guerra David Reis – ORCID: 0000-0002-9541-5238

Ricardo Junior Denardi – ORCID: 0000-0001-8312-7493

Natacha Malu Miranda da Costa - ORCID: 0000-0001-7852-4697

Flávia Aparecida Chaves Furlaneto – ORCID: 0000-0002-8072-3983

Sérgio Luís Scombatti de Souza – ORCID: 0000-0002-6199-7348

Carlos Fernando de Almeida Barros Mourão – ORCID: 0000-0001-5775-0222

Richard J. Miron – ORCID: 0000-0003-3290-3418

Roberta Okamoto – ORCID: 0000-0002-6773-6966

Michel Reis Messoria – ORCID: 0000-0001-8485-9645

Effects of platelet aggregates produced by three centrifugation protocols on bone neoformation in defects created in rat calvaria

This study evaluated the potential of platelet aggregates obtained by fixed-angle (L-PRF and A-PRF) and horizontal (H-PRF) centrifugation in bone neoformation in critical size defects (CSDs) in rat calvaria. 32 rats were divided into groups: C, L-PRF, A-PRF and H-PRF. 5mm diameter CSDs were created in the animals' calvaria. Defects from groups Control (C), L-PRF, A-PRF and H-PRF were filled with blood clot, L-PRF, A-PRF and H-PRF, respectively. L-PRF, A-PRF and H-PRF were prepared from animal blood collection and specific centrifugation protocols. At 14 and 30 days, injections of calcein (CA) and alizarin (AL) were performed, respectively. Animals were euthanized at 35 days. Microtomographic, laser confocal microscopy and histomorphometric analyzes were performed. Data were statistically analyzed (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). L-PRF, A-PRF and H-PRF groups showed higher values of bone volume (BV), newly formed bone area (NFBA) and precipitation of CA and AL than C group ($p < 0.05$). H-PRF group showed higher values of BV, number of trabeculae (Tb.N), NFBA and higher precipitation of AL than A-PRF and L-PRF groups ($p < 0.05$). Therefore, it can be concluded that: i) L-PRF, A-PRF and H-PRF potentiate bone neoformation in CSDs in rat calvaria; ii) H-PRF produces platelet aggregates with more biological potential for bone healing.

Keywords: Bone Regeneration. Platelet-Rich Fibrin. Rats.

Introduction

One of the biggest challenges of regenerative therapies in Dentistry, especially after the advent of titanium implants, is to replace lost tissues properly, or even prevent loss before it occurs, so that the introduced treatment results in success and longevity, leading to the search for the development of materials that promote regeneration effectively in defect areas^{1,2}.

In this sense, the use of platelet concentrates made from the patient's blood has been proposed in recent years, obtaining an easily applicable three-dimensional membrane with promising results in promoting tissue regeneration. With this concept, it is suggested that cells and growth factors can be collected from the patient and applied to the surgical site to stimulate tissue regeneration²⁻⁶.

Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) consists of a three-dimensional fibrin network, characteristic of the final stages of the coagulation cascade, forming a biological framework that acts as a source of cytokines and growth factors such as platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF)- β , insulin-like growth factor (IGF)-1, fibroblast growth factor (FGF), and vascular endothelial growth (VEGF). Thus, it promotes the acceleration of cell migration and proliferation, angiogenesis, modulation of the immune response, and recruitment of undifferentiated mesenchymal cells, which favors the repair and regeneration of soft and hard tissues⁶⁻¹⁴.

Initially proposed for the potentiation of bone neoformation after the installation of dental implants, the use of L-PRF currently extends to periodontal therapies and bone reconstructions, such as grafting procedures and post-extraction socket preservation^{15,16}, tissue repair in furcation defects^{17,18}, root coverage in gingival recessions,¹⁹⁻²¹ and procedures for maxillary sinus lift^{22,23}.

In recent years, new protocols for the production of platelet concentrates have been proposed, giving rise to the concepts of centrifugation at reduced speed and time, including

Advanced Platelet Rich Fibrin (A-PRF), in addition to the introduction of horizontal centrifugation, with the aim of promoting greater retention of platelets and leukocytes and consequently greater release of growth factors, enhancing regenerative and healing effects. *In vitro* studies have, in fact, demonstrated better structural characteristics, such as a more homogeneous cellular distribution along the PRF clot, as well as a greater accumulation and release of growth factors, in the protocols of reduced speed and time and in horizontal centrifugation compared to the standard protocol of L-PRF^{1,14, 24-30}.

However, the literature is still scarce regarding *in vivo* studies comparing the biological potential of PRF membranes produced by different protocols³¹⁻³⁷. Thus, the aim of the present study was to evaluate bone neoformation in CSDs treated with PRF membranes produced by fixed-angle and horizontal centrifugation protocols.

Methods

Animals

Thirty-two rats (*Rattus Norvergicus, albinus*, Wistar), aged 14 weeks, body mass between 350g and 450g, were obtained after submission and approval by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA) of the School of Dentistry of Ribeirão Preto (FORP) of Universidade de São Paulo (USP), under number 2019.1.930.58.0. The animals were kept in an environment with a 12-hour light cycle per day and a temperature between 22 and 24°C, consumed selected solid chow and water *ad libitum*.

The animals were randomly divided into four experimental groups (n=8): C, L-PRF, A-PRF, and H-PRF. The sample size allowed to ensure a power of 80% in the statistical analysis of the data obtained in the study, considering the means and standard deviations of the Area of Neoformed Bone (ANB) in the experimental groups of previous studies³⁰⁻³², adjusting the α value at 0.05.

The experimental surgical procedures (blood collection for the preparation of PRF and creation of the defect) were performed after inhalation anesthesia of the animals in a chamber containing 4% isoflurane (Instituto Biochimico Ind. Farm. Ltda, Itatiaia, RJ, Brazil). The animals were given Morphine Sulfate 8 mg/Kg (Dimorf, Cristália ® Prod. Quím. Farm. Ltda, Itapira, SP, Brazil) intramuscularly; Flunixin Meglumine 2 mg/Kg (Aplonal 1%, König ®, Buenos Aires, Argentina) subcutaneously; and 24,000 IU/Kg of penicillin G-benzathine (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Animal Health ®, Campinas, SP, Brazil) intramuscularly.

Blood collection and PRF processing

3 mL of blood were collected from each animal, by means of cardiac puncture, for the preparation of the PRF. Blood was collected in a 5 mL disposable syringe (Descarpack, São Paulo, Brazil), stored in 5 mL silica-coated plastic tubes (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) without the presence of anticoagulant substances, and immediately processed.

PRF collection followed three different protocols. In the L-PRF group, blood was centrifuged at a speed of 2700 revolutions per minute (rpm) for 12 minutes (~700g maximum Relative Centrifugal Force [RCFmax]) in an Intra-Spin™ centrifuge (Intra-Lock® International, Inc, Boca Raton, FL, USA). In the A-PRF group, blood was centrifuged at 1500 rpm for 14 minutes (~ 200g RCFmax). In the H-PRF group, an horizontal centrifuge (Eppendorf 5702 centrifuge, Hamburg, Germany) was used, where blood was centrifuged at an RCFmax of 700g for 8 minutes, according to a protocol previously established in the literature¹⁴.

After processing, the intermediate portion, which represents the PRF clot, was collected and processed to fill the defects in the calvaria of animals in the L-PRF, A-PRF, and H-PRF groups.

Validation of L-PRF, A-PRF, and H-PRF protocols

To quantify and determine the location of cells along the tube after centrifugation and production of PRF, sequential pipetting analysis was performed, using an adaptation of the work by Miron et al.⁹. Six rats (two for each PRF protocol) were subjected to the collection of 4 mL of blood in tubes containing EDTA, so that, after centrifugation, the layers were separated but no clot was formed, allowing the layers to be pipetted to laboratory analyses. After centrifugation of the L-PRF, A-PRF, and H-PRF protocols, 350-µL layers were pipetted in

sequence, from the most superficial layer to the bottom of the tube, totaling ten samples per tube. These samples were stored in eppendorf flasks and sent for quantification of platelets, leukocytes, and red blood cells, in order to verify the location of these cells along the tube.

Creation of CSD

After blood collection for PRF preparation, a 5-mm diameter CSD was created on the calvaria of each animal using a trephine bur (5-mm Trephine Burr, Neodent®, Curitiba, PR, Brazil) at low rotation under constant irrigation with sterile saline solution. Defects from groups C, L-PRF, A-PRF, and H-PRF were filled with blood clot, L-PRF, A-PRF, or H-PRF, respectively. The PRF membranes were divided approximately in half with the aid of surgical scissors. The portion closest to the red cells was cut in small pieces and used to fill the defect. The other half of the membrane was used to cover the defect, in order to keep the material inside.

Tissues were joined in single sutures with 4.0 silk thread (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brazil) to achieve primary wound closure. Postoperatively, each animal received an injection of tramadol hydrochloride at 20 mg/kg (Cronidor 2%, Agener União®, Apucarana, PR, Brazil) and flunixin meglumine at 2 mg/kg (Aplonal 1%, Könir®, Buenos Aires, Argentina) every 12 hours for two days.

Fluorochrome administration

At 14 days after making the CSDs, the animals received fluorochrome calcein (20 mg/Kg) intramuscularly. At 30 days after making the CSDs, alizarin red fluorochrome (20 mg/kg) was also administered intramuscularly. The administration of calcein allows the

visualization of calcium deposition in the old bone, while alizarin allows its observation in the newly formed bone^{33,34}.

Euthanasia

The animals were euthanized 35 days after the making of the CSDs, using a CO₂ chamber with controlled flow after anesthesia with the association of 10% Ketamine (80 mg/Kg) and 2% Xylazine (10 mg/Kg). Samples of the calvaria containing the area of the original surgical defect and the surrounding tissues were removed *en bloc* with a diamond disc and fixed in a 10% neutral buffered formalin solution for 24 hours. Then, they were washed in running water for another 24 hours, and then identified and stored in flasks containing 70° alcohol.

Analysis by micro-computed tomography (micro-CT)

Undecalcified samples of the calvaria were scanned by a SkyScan 1172 cone-beam micro-CT (SkyScan N.V., Kontich, Belgium) to generate three-dimensional (3D) images. Using DataViewer software v. 1.4.3 (SkyScan N.V., Kontich, Belgium), the 3D image was rotated to a standard position for analysis and then a 5-mm diameter region of interest (ROI) and a volume of interest (VOI) of 0.5x5x5 mm was determined. To evaluate the trabecular bone tissue present in the calvaria in each VOI, a grayscale (0-255) was used, adopting the threshold between 80 (minimum) and 170 (maximum).

Using the CT-Analyzer® v.1.13.5.1+ software (Bruker, Kontich, Belgium), the following structural parameters were evaluated in each VOI by a calibrated examiner (L.M.S.P): i) BV – percentage of VOI filled by bone tissue; ii) BP – percentage of porosity

present in the bone tissue determined in the VOI; iii) Tb.N – number (mm^{-1}) of bone trabeculae present in the VOI; iv) Tb.Sp – total spaces (mm) between the bone trabeculae present in the VOI; v) Conn.Dn – connectivity density between the bone trabeculae present in the VOI.

Confocal Scanning Laser Microscopy

Laboratory processing

The dynamics of bone neoformation were evaluated by means of fluorescence analysis, according to previously published protocols³⁸⁻⁴⁰.

The pieces obtained were fixed in 10% formalin solution with pH 7 for 10 days, with the solution being changed every two days. After this period, the pieces were transferred to recipients containing increasing solutions of alcohol for dehydration (70%, 80%, 96%, and 100%), being subjected to agitation at each change. The samples were then placed in polyethylene containers containing pure resin (LR White Hard Grade, London, UK) and kept under agitation for 60 minutes. After this period, the pieces were stored and kept in a refrigerator at 4°C for at least 12 hours. Then, the pieces were kept in a vacuum for one hour, shaken for the same period and again stored in a refrigerator at 4°C for 24 hours. This routine was repeated for 15 days, changing the resin every 48 hours. On the 15th day, after changing the resin, the pieces were placed in Teflon molds and taken to the oven at 60°C for 12 hours, for the resin polymerization. The polymerized resin blocks containing the samples were then cut in half using an Exakt system, using a diamond saw and continuous irrigation with water. The surfaces containing the samples were ground in the Exakt system using sandpaper with increasing grit (320, 800, 2500, 4000) until the surface of the part was smooth. The sanded and polished blocks were then glued to an acrylic sheet using the Exakt system, and the exposed surface of the piece

glued to the sheet was sanded and polished again until a thickness of approximately 70 μm was obtained.

Image analysis

The scanning of the pieces was performed with a Trinocular Motorized Microscope for Immunofluorescence and Bright Field (model AXIO IMAGER M2, Carl Zeiss®, Germany) with a 10x objective coupled to an AxioCam MRm Rev.3 FireWire camera (Carl Zeiss®). After image reconstruction using AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss®, Germany), it was possible to visualize the calcein precipitation at 14 days (FIGURE 1A), evidenced by the green color, representing the deposition of calcium in the old bone; and the precipitation of alizarin at 30 days (FIGURE 1B), in red color, which demonstrates the deposition of calcium in the newly formed bone. The overlapping of the two layers of fluorochromes was performed, allowing the visualization of calcium deposition in both periods, which represents the conversion of old bone into newly formed bone (FIGURE 1C). The images were standardized in hue, saturation, and brightness. Image captures were performed in the center of the CSD and in the regions close to the original borders of the defect.

The saved images were then transferred to the Image J program (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada). For each analyzed sample, calcein was delimited in a central region of the CSD with the “free hand” tool, measuring the area in mm^2 ; the same procedure was performed with alizarin. Calcein and alizarin values allow the observation of the dynamics of bone neof ormation and its comparison between different experimental groups³⁸⁻⁴⁰.

Histomorphometric Analysis

After performing Confocal Microscopy, the slides already processed were stained with Stevenel Blue and Alizarin Red for analysis with light microscopy. In each section, the histopathological characteristics of the newly formed bone tissue were analyzed.

Histometric analysis was performed by a calibrated examiner (D.S.F.S.) using a computer image assessment system and image acquisition and analysis software (LAS EZ version 4.1.0, Leica Microsystems®). Each histological section was photographed using a trinocular microscope for brightfield and fluorescence (DMLB, Leica Microsystems® Wetzlar GmbH, Heidelberg, Germany) with a 1.6x objective coupled to a DFC300FX camera (Leica Microsystems®). In each image, a delimitation of the analyzed area was performed, which corresponded to the region of the calvaria bone where the defect was originally created, called Total Area (TA). Within the TA, the Area of Neoformed Bone (ANB) was selected and delimited. The TA value was considered to be 100% of the analyzed area and the ANB value was calculated as a percentage of TA.

The histopathological analysis was performed by observing the selected histological sections, using the same microscope, with 10x and 20x objectives coupled to the same camera used in the histometric analysis.

Statistical analysis

Analyzes were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc, v. 5.01, San Diego, CA, USA). The animal was considered as the statistical unit. A significance level of 5% was chosen ($p < 0.05$). Data distribution was verified by the Shapiro-Wilk test.

The significance of differences between groups for all variables was determined by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test.

Results

Validation of L-PRF, A-PRF, and H-PRF protocols

The quantification and location of platelets and leukocytes throughout the tube after centrifugation and production of PRF by three protocols (L-PRF, A-PRF, and H-PRF) was investigated by means of sequential pipetting analysis and represented in Table 1.

It was observed that, in the L-PRF protocol, platelets and leukocytes were significantly concentrated in layer 5, in the region of the interface between the portion corresponding to the PRF and the red cell layer, corresponding to 62.6% and 40.2% of the total of these cells after centrifugation, respectively. It was not possible to observe the presence of leukocytes in the first 4 layers of the tube. A large number of leukocytes was also found in the red cell layer, below the region corresponding to the PRF.

In turn, in the A-PRF protocol, there was a higher concentration of platelets and leukocytes in layers 4 and 5, totaling ~55% and almost 40% of the total of these cells after centrifugation, respectively. Compared to the L-PRF, there was a more homogeneous distribution of platelets and leukocytes throughout the tube. However, leukocytes were also not observed in the first two layers.

In the H-PRF protocol, it was possible to observe a high concentration of platelets in the first 4 layers of the tube, evenly distributed in these layers, corresponding to 87.4% of the total of these cells in the tube after centrifugation. A more homogeneous distribution of leukocytes was also found between layers 2 and 6, representing 80.7% of the total leukocytes after centrifugation.

Analysis by micro-computed tomography (micro-CT)

The three-dimensional reconstructions obtained from the calvaria, as well as the means and standard deviations of BV, BP, Tb.N, Tb.Sp, and Conn.Dn for all experimental groups are shown in Figure 2. The H-PRF group (n=8) showed higher statistically significant values ($p<0.05$) of BV ($11.83 \pm 7,399$) and Tb.N (0.8929 ± 0.5553) when compared to groups C (n=8; BV: 2.096 ± 1.749 ; Tb.N: 0.3426 ± 0.3151), L-PRF (n=8; BV: $4.96 \pm 1,807$; Tb.N: 0.3431 ± 0.1744), and A-PRF (n=8; BV: 5.733 ± 2.399 ; Tb.N: 0.4358 ± 0.1571). In the analysis of BV, L-PRF and A-PRF showed significantly higher values ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) than those of group C, with no significant differences between groups L-PRF and A-PRF for this same parameter ($p>0.05$). In the analysis of Tb.N, no statistically significant differences were found among groups C, L-PRF, and A-PRF ($p>0.05$). For the microtomographic parameters of BP and Tb.Sp, no statistically significant differences ($p>0.05$) were found among groups C (BP: 95.71 ± 4.497 ; Tb.Sp: 0.5085 ± 0.02597), L-PRF (BP: $95.48 \pm 2,081$; Tb.Sp: 0.5134 ± 0.009539), A-PRF (BP: $94.27 \pm 2,399$; Tb.Sp: 0.5006 ± 0.1521) and H-PRF (BP: $90.75 \pm 7,892$; Tb.Sp: 0.4896 ± 0.04201). In the Conn.Dn analysis, statistically significant differences ($p<0.05$) were observed only between the H-PRF (35.14 ± 18.63) and A-PRF (18.13 ± 8.227) groups. Groups C (18.56 ± 10.86) and L-PRF ($16.5 \pm 7,397$) did not present statistically significant differences between themselves or in relation to the other groups for the Conn.Dn parameter ($p>0.05$).

Confocal Scanning Laser Microscopy

Images obtained by Confocal Microscopy allowed the observation of bands of calcein (injected 14 days after creating the CSDs, green color) and alizarin (injected 30 days after making the CSDs, red color), formed by the precipitation of calcium in the organic matrix

(FIGURE 3). In group C, in the central region (FIGURE 3A), small markings of calcein and alizarin were observed, which were superimposed, with a thickness much smaller than that found in the region close to the margins of the original defect. In the region close to one of the original borders (FIGURE 3B), a thin layer of calcein and alizarin was observed, demonstrating the slow process of bone neoformation. In the L-PRF and A-PRF groups, greater precipitation of calcein and alizarin was observed in the central region (FIGURE 3 C,E) and in the region close to one of the original borders (FIGURE 3 D,F), manifested by the greater intensity in fluorescence. In the H-PRF group, the central region (FIGURE 3G) showed intense labeling of calcein and alizarin, evidencing a higher rate of bone neoformation, as well as lower rates of resorption of old bone. In addition, the thickness observed in the central region of the defect was very close to that present in the region close to the margins of the original defect. In the region close to one of the original borders (FIGURE 3H), more evident bands of calcein and alizarin were also observed compared to group C.

Figure 4 represents the means and standard deviations of calcein and alizarin for all experimental groups. Intragroup analysis showed statistically significant differences between fluorochromes injected at 14 days (calcein) and 30 days (alizarin) ($p < 0.05$), manifested by higher alizarin labeling and lower calcein labeling in the L-PRF groups ($n=8$; CA: 0.0516 ± 0.02406 ; AL: 0.0865 ± 0.04706) and H-PRF ($n=8$; CA: 0.0684 ± 0.06011 ; AL: 0.1283 ± 0.01332), indicating an increased bone turnover (FIGURE 4A). In groups C ($n=8$; CA: 0.02375 ± 0.01575 ; AL: 0.0268 ± 0.01230) and A-PRF ($n=8$; CA: 0.0704 ± 0.03750 ; AL: 0.0756 ± 0.04430), no statistically significant differences were observed between the area stained by calcein and the area stained by alizarin, indicating a slower bone neoformation process.

Higher statistically significant values of calcein were found in the L-PRF, A-PRF, and H-PRF groups compared to the C group (FIGURE 4B). No statistically significant differences were found between the L-PRF, A-PRF, and H-PRF groups regarding calcein precipitation. The

H-PRF group showed the highest alizarin labeling, with statistically significant differences in relation to the C, L-PRF, and A-PRF groups (FIGURE 4C). The L-PRF and A-PRF groups had statistically significant higher values of alizarin in relation to the C group. There were no statistically significant differences in alizarin between the L-PRF and A-PRF groups.

Histomorphometric analysis

Histometric analysis

The means and standard deviations of ANB, as well as the result of the intergroup comparisons, are represented in Figure 5. The H-PRF group (n=8; ANB = 12.67 ± 9.247) showed the highest statistically significant values of ANB ($p < 0.01$; $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) compared to groups C (n=8; 0.2125 ± 0.3934), L-PRF (n=8; 3.682 ± 3.176) and A-PRF (n=8; 2.129 ± 1.783). The L-PRF and A-PRF groups showed higher ANB values than the C group ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). No statistically significant differences in ANB were found for the L-PRF and A-PRF groups ($p > 0.05$).

Histopathological analysis

Control Group

A connective tissue composed of collagen fibers oriented parallel to the surface of the wound was observed along almost the entire length of the surgical defect, which, in the central part of the defect had a thickness much smaller than that found in the original bone tissue of the cap. Along the margins of the surgical defect, a small amount of newly formed bone tissue was observed, showing a small number of osteoblasts on its edges (FIGURE 6A). In all specimens, a small number of blood vessels and a moderate number of fibroblasts were found. A generally

mild inflammatory infiltrate was also observed, with the presence of lymphocytes and plasma cells, distributed along the defect.

L-PRF Group

The newly formed bone tissue exhibited a small number of osteoblasts at its edges. The connective tissue presented numerous bundles of collagen fibers arranged parallel to the wound surface, but more organized and thicker than those observed in specimens from Group C, although still smaller than the thickness of the surgical defect margin. Most specimens from the L-PRF Group had a greater amount of newly formed bone tissue near the margins of the surgical defect when compared to specimens from Group C (FIGURE 6B). In some specimens, bone neoformation was also observed along the defect, forming islets. A significant presence of blood vessels was observed along its entire length.

A-PRF Group

The newly formed bone tissue exhibited a small number of osteoblasts at its edges. The connective tissue had numerous bundles of collagen fibers arranged parallel to the wound surface, but were more organized and thicker than those observed in specimens from Group C. Most samples from the A-PRF Group had a more significant amount of newly formed bone tissue along the margins of the surgical defect when compared to specimens from Group C (FIGURE 6C). In some specimens, bone neoformation was also observed along the defect, forming islets. A significant presence of blood vessels was observed along its entire length.

H-PRF Group

The newly formed bone tissue exhibited a substantial number of osteoblasts at its edges. The connective tissue had numerous bundles of collagen fibers arranged parallel to the wound surface, but more organized and thicker than those observed in specimens from Group C. Most specimens from H-PRF Group had a greater amount of newly formed bone tissue along the margins of the surgical defect when compared to specimens from Group C, L-PRF, and A-PRF. In most specimens, intense bone neoformation was also observed along the defect, forming islets (FIGURE 6D). A significant presence of blood vessels was observed along its entire length.

Discussion

In recent years, literature has focused on proposing new formulations of platelet concentrates obtained by centrifugation of autologous blood, with the objective of improving the structural and molecular characteristics of these matrices, such as mechanical strength and retention and release rates of growth factors. Variations in Relative Centrifugal Force (RCF) and centrifugation time, as well as the introduction of new centrifuges and tubes for blood collection, led to changes in the original method proposed by Choukroun et al. (2001)⁷ and the emergence of new protocols, such as Concentrated Growth Factor (CGF), A-PRF, and concentrates obtained by horizontal centrifugation (H-PRF)²⁷. The biological impact in *in vivo* studies of these modifications is still an obscure field in the literature. The present study is the first one to evaluate bone neoformation in CSDs created in rat calvaria and treated with platelet concentrates of autogenous origin, obtained by three different protocols involving high and low speed centrifugation, as well as horizontal and fixed-angle centrifugation equipment. The results obtained showed, in short, that platelet aggregates potentiate bone neoformation in CSDs in rat calvaria. However, the horizontal centrifugation protocol produced platelet aggregates with greater biological potential for bone regeneration.

In this study, three different centrifugation protocols were used to obtain PRF membranes. The PRF membranes produced with rat blood showed characteristics similar to the PRF produced with human blood in terms of cell number and distribution, according to findings from previous studies^{1,14,41}, and it is possible to observe that the protocols of low-speed centrifugation and protocols using horizontal centrifugation were more effective in concentrating platelets and distributing them more evenly along the PRF matrix than the original L-PRF protocol. Regarding leukocytes, horizontal centrifugation promoted over a 2-fold increase in the number of cells, as well as a more uniform distribution between the PRF layers, when compared to fixed-angle centrifugation protocols.

In this study, increased bone turnover was observed in the L-PRF and H-PRF groups, demonstrated by the higher alizarin labeling and lower calcein labeling. The greater presence of calcein in the L-PRF, A-PRF, and H-PRF groups compared to the control group indicates lower rates of bone resorption, while the more expressive presence of alizarin in the H-PRF group highlights its potential in promoting neoformation bone. In general, all PRF matrices stimulated the process of bone neoformation in the present study. In fact, the cell concentration and release of growth factors make PRF an ideal biological framework, promoting the acceleration of cell migration and proliferation, angiogenesis, modulation of the immune response and recruitment of undifferentiated mesenchymal cells, which favors the repair and regeneration of soft and hard tissues^{6,8-13}.

Previous studies have already demonstrated the potential of L-PRF and A-PRF in accelerating bone neoformation of CSDs created in rat calvaria. Higher amounts of newly formed bone were demonstrated in microtomographic and histomorphometric analyses, in statistically significant values, when compared to filling the CSDs with clot alone (control group)³⁷. The association of L-PRF with bovine xenograft promoted higher rates of neoformed bone in microtomographic and histomorphometric parameters against experimentally induced osteoporosis, as well as greater expression of important growth factors for the promotion of bone regeneration, compared to the control group⁴².

The present study produced PRF matrices using high and low speed centrifugation. *In vitro* studies have demonstrated better cellular and molecular characteristics in low-speed centrifugation protocols^{1,28,43,44}. It is thus assumed that structural changes in PRF clots may alter their regenerative potential. In all parameters analyzed in this study, no statistically significant differences were found between the L-PRF and A-PRF groups, which supports the findings of Silva et al. (2022)³⁷, where the two different types of PRF matrices promoted greater bone neoformation compared to the control group, in microtomographic and histomorphometric

parameters, but there were no significant differences between them. Higher rates of release of important growth factors for the promotion of bone neof ormation have been demonstrated in low-speed centrifugation protocols, compared to the original high-speed centrifugation protocols^{24,28}. On the other hand, Dohan Ehrenfest and colleagues (2018)⁴⁵ observed that the slow release of some growth factors from the original L-PRF membranes was significantly more potent at all experimental times than the release from the A-PRF membranes. It is important to emphasize that more important than the number of platelets or growth factors present in the PRF samples is the dynamics in the interrelationship between platelets, leukocytes, fibrin, and growth factors²⁸. It is not just the amount that matters, but how the cells/molecules are distributed in the PRF matrix, their retention level, and their release pattern.

In an unprecedented way, the present study evaluated with proper statistical power the biological impact of PRF matrices produced from different centrifugation angles on bone regeneration. Membranes produced by horizontal centrifugation provided higher values of BV, Tb.N, ANB, as well as higher expression of Alizarin, when compared to those produced by centrifuges with fixed-angle rotors. In fact, over the years, new protocols have been proposed based on concepts of low speed and reduced time centrifugation, such as A-PRF and i-PRF, in addition to the introduction of horizontal centrifugation (H-PRF), with the purpose of improving the structural characteristics of PRF membranes and increasing the bioavailability of cells and growth factors, which could potentiate their regenerative effects^{1,14,24,25,28,41,46,47}.

In the present study, H-PRF samples showed a more homogeneous distribution of leukocytes and a 7.7-fold increase compared to peripheral blood samples. This increase was also higher than those observed in the L-PRF and A-PRF samples. This information supports findings from previous studies, where horizontal centrifugation allowed a 4-fold increase in the number of cells (especially leukocytes) present in the layers corresponding to PRF compared

to fixed-angle centrifugation¹⁴. White blood cells, in particular, are important during wound healing, especially during biomaterial integration and tissue formation⁴⁸⁻⁵³.

In summary, the present study demonstrated that, using fixed-angle centrifuges, the centrifugation speed in the production of platelet aggregates did not alter their biological potential. Both arrays of platelet aggregates (L-PRF and A-PRF) promoted comparable results in hard tissue regeneration. However, the modification of the centrifuge equipment, i.e., the use of horizontal centrifuge, produced platelet aggregates (H-PRF) with greater biological potential for bone regeneration. H-PRF provided an increase in BV of 464%, 238%, and 206% in relation to groups C, L-PRF, and A-PRF, respectively. The differences between H-PRF and other platelet aggregates reported in several *in vitro* studies^{14,26,41,51} may explain these results. It is important to highlight that the literature is still controversial regarding predictability in PRF treatment, especially in bone regeneration. High-quality randomized controlled clinical studies and meta-analyses are required to reverse this limitation of the literature, and therefore it is essential to standardize the protocols for the preparation and application of PRF matrices, minimizing the occurrence of variables that can compromise the effectiveness, treatment, and final result^{30,45}.

Data from this study should be interpreted with caution. The preparation of autologous platelet aggregates in rats required adaptations of the original protocols regarding the total volume of blood collected in each tube. In addition, the levels of growth factors in the PRF samples were not measured. Furthermore, isolated PRF matrices were used in the creation of CSDs. Future studies evaluating the association of these matrices with biomaterials, as well as evaluating the correlation between the levels of growth factors, number of platelets, and amount of newly formed bone are important. Longer follow-up periods, in addition to the use of animals with systemic compromises and animals with a larger phylogenetic scale, should also

be performed to better elucidate the role of platelet concentrates in promoting tissue neoformation³⁷.

Conclusion

Within the limits of this study, it can be concluded that: i) the platelet aggregates L-PRF, A-PRF, and H-PRF potentiate bone neoformation in CSDs in rat calvaria; ii) the horizontal centrifugation protocol produces platelet aggregates with greater biological potential for bone regeneration.

Declaration of interest statement

There is no relationship between any authors and commercial companies that may generate a conflict of interest.

References

1. Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, Landes C, Sader R, Kirkpatrick C, Choukroun J. Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014; 40 (6): 679-689. doi: 10.1563/aaid-joi-D-14-00138.
2. Miron RJ, Zuchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, Fujioka-Kobaiashi M, Bishara M, Zhang Y, Wang H-L et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Invest*. 2017; 21 (6): 1913-1927. doi: 10.1007/s00784-017-2133-z.
3. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, 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 (3): 37-44. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.008.
4. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009; 27 (3): 158-167. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009.
5. Fijnheer R, Pietersz RN, De Korte D, Gouwerok CW, Dekker WJ, Reesink HW, Roos D. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion*, 1990; 30: 634-638. doi: 10.1046/j.1537-2995.1990.30790385523.x.
6. Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, Schwarz F, Choukroun J, Sader R. Fifteen years of platelet rich fibrin (PRF) in dentistry and oromaxillofacial surgery: How high is the level of scientific evidence? *J Oral Implantol*. 2018; 44 (6): 471-492. doi: 10.1563/aaid-joi-D-17-00179.
7. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001; 42: 55-62.
8. Baslarli O, Tumer C, Ugur O, Vatankulu B. Evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015; 20 (1): 111-116. doi: 10.4317/medoral.19999.
9. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM. 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 (3): 56-60. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.011.
10. Dohan Ehrenfest DM, De Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): A gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009; 27 (1): 63-69. doi: 10.1080/08977190802636713.
11. Li Q, Reed DA, Min L, Gopinathan G, Li S, Dangaria SJ, Li L, Geng Y, Galang M-T, Gajendrareddy P et al. Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. *Int J Mol Sci*. 2014; 15 (5): 8509-8525. doi: 10.3390/ijms15058509.

12. Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95 (5): 521-528. doi: 10.1067/moe.2003.152.
13. Zhao J-H, Tsai C-H, Chang Y-C. Clinical and histologic evaluations of healing in an extraction socket filled with platelet-rich fibrin. *J Dent. Sci.* 2011; 6: 116-122. doi.org/10.1016/j.jds.2011.03.004.
14. Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res A.* 2019; 107 (10): 2257-2271. doi: 10.1002/jbm.a.36734.
15. Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo AM, Scacco S, Inchingolo AD, Dipalma G, Vermesan D, Abbinante A, Cagiano R. Trial with Platelet-rich fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010; 14 (12): 1075-1084. PMID: 21375140.
16. Temmerman A, Vandessel J, Castro A, Jacobs R, Teughels W, Pinto N, Quirynen M. The use of Leucocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomised, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2016; 43 (11): 990-999. doi: 10.1111/jcpe.12612.
17. Bajaj P, Pradeep AR, Agarwal E, Rao NS, Naik SB, Priyanka N, Kalra N. Comparative evaluation of autologous plateletrich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontal Res.* 2013; 48 (5): 573-581. doi: 10.1111/jre.12040.
18. Pradeep AR, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K, Raju A, Singh P. Rosuvastatin 1.2 mg in situ gel combined with 1:1 mixture of autologous platelet-rich fibrin and porous hydroxyapatite bone graft in surgical treatment of mandibular class II furcation defects: a randomized clinical control trial. *J Periodontol.* 2016; 87 (1): 5-13. doi: 10.1902/jop.2015.150131.
19. Agarwal SK, Jhingran R, Bains VK, Srivastava R, Madan R, Rizvi I. Patient-centered evaluation of microsurgical management of gingival recession using coronally advanced flap with platelet-rich fibrin or amnion membrane: a comparative analysis. *Eur J Dent.* 2016; 10 (1): 121-133. doi: 10.4103/1305-7456.175686.
20. Keceli HG, Kamak G, Erdemir EO, Evginer MS, Dolgun A. The adjunctive effect of platelet-rich fibrin to connective tissue graft in the treatment of buccal recession defects: results of a randomized, parallel-group controlled trial. *J Periodontol.* 2015; 86 (11): 1221-1230. doi: 10.1902/jop.2015.150015.
21. Tunali M, Ozdemir H, Arabaciota T, Gurbuzer B, Pikdoken L, Firatli E. Clinical evaluation of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of multiple adjacent gingival recession defects: a 12-month study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2015; 35 (1): 105-114. doi: 10.11607/prd.1826.
22. Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's Platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone

- mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012; 40 (4): 321-328. doi: 10.1016/j.jcms.2011.04.020.
23. Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. 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 (1): 2-12. doi: 10.1097/ID.0b013e3181faa8af.
 24. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016; 20 (9): 2353-2360. doi: 10.1007/s00784-016-1719-1.
 25. Lourenço ES, Mourão CFAB, Leite PEC, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD, Alves GG. The in vitro release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res A.* 2018; 106 (5): 1373-1380. doi: 10.1002/jbm.a.36346.
 26. Lourenço ES, Alves GG, Barbosa RL, Spiegel CN, Melo-Machado RC, Al-Maawi S, Ghanaati S, Mourão CF. Effects of rotor angle and time after centrifugation on the biological in vitro properties of platelet rich fibrin membranes. *J Biomed Mater Res.* 2021; 109: 60-68. doi.org/10.1002/jbm.b.34680.
 27. Aizawa H, Tsujino T, Watanabe T, Isobe K, Kitamura Y, Sato A, Yamaguchi S, Okudera H, Okuda K, Kawase T. Quantitative Near-Infrared Imaging of platelets in platelet-rich fibrin (PRF) matrices: comparative analysis of H-PRF, leukocyte-rich PRF, advanced-PRF and concentrated growth factors. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (12): 4426. doi: 10.3390/ijms21124426.
 28. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol.* 2017; 88 (1): 112-121. doi: 10.1902/jop.2016.160443.
 29. Simões-Pedro M, Tróia PMBPS, Santos NBM, Completo AMG, Castilho RM, Fernandes GVO. Tensile strength essay comparing three different platelet-rich fibrin membranes (L-PRF, A-PRF, and A-PRF+): a mechanical and structural in vitro evaluation. *Polymers.* 2022; 14 (7): 1392. doi: 10.3390/polym14071392.
 30. Tsujino T, Masuki H, Nakamura M, Isobe K, Kawabata H, Aizawa H, Watanabe T, Kitamura Y, Okudera H, Okuda K, et al. Striking differences in platelet distribution between Advanced-Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factors: effects of silica-containing plastic tubes. *J Funct Biomater.* 2019; 10 (3): 43. doi: 10.3390/jfb10030043.
 31. Yüce E, Kömerik N. Potential effects of advanced platelet rich fibrin as a wound-healing accelerator in the management of alveolar osteitis: a randomized clinical trial. *Niger J Clin Pract.* 2019; 22 (9): 1189-1195. doi: 10.4103/njcp.njcp_27_19.

32. To M, Su C, Hidaka K, Okudera T, Matsuo M. Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. *Anatomical Science International*. 2019; 94 (3): 238-244. doi: 10.1007/s12565-019-00479-1.
33. Liu Y-H, To M, Okudera T, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Su C-Y, Matsuo M. Advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) has an impact on the initial healing of gingival regeneration after tooth extraction. *J Oral Biosciences*. 2021; 64 (1):141-147. <https://doi.org/10.1016/j.job2021.11.001>.
34. Rao JKD, Bhatnagar A, Pandey R, Arya V, Arora G, Kumar J, Bootwala F, Devi WN. A comparative evaluation of iliac crest bone graft with and without injectable and advanced platelet rich fibrin in secondary alveolar bone grafting for cleft alveolus in unilateral cleft lip and palate patients: a randomized prospective study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2021; 122 (3): 241-247. doi: 10.1016/j.jormas.2020.07.007.
35. Chellathurai BNK, Ganesh B, Rajaram V. Advanced platelet-rich fibrin in periosteal inversion technique for root coverage: a case report. *Clinical Advances in Periodontics*. 2020; 10 (4): 181-185. doi: 10.1002/cap.10119.
36. Shirakata Y, Sena K, Nakamura T, Shinohara Y, Imafuji T, Setoguchi F, Noguchi K, Kawase T, Miron R. Histological evaluation of gingival and intrabony periodontal defects treated with platelet-rich fibrin using different protocols: a canine study. *Oral Health Prev Dent*. 2021; 19 (1): 537-546. doi: 10.3290/j.ohpd.b2182985
37. Silva LMP, Sávio DSF, Ávila FC, Vicente RM, Reis GGD, Denardi RJ, Costa NMM, Silva PHF, Mourão CFAB, Miron RJ, Messoria MR. Comparison of the effects of platelet concentrates produced by high and low-speed centrifugation protocols on the healing of critical-size defects in rat calvaria: a microomographic and histomorphometric study. *Platelets*. 2022; 19: 1-10. doi: 10.1080/09537104.2022.2071851.
38. Mulinari-Santos G, Santos JS, Palin LP, Silva ACE, Antoniali C, Faverani LP, Okamoto R. Losartan improves alveolar bone dynamics in normotensive rats but not in hypertensive rats. *J Appl Oral Sci*. 2019; 27: e20180574. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0574.
39. Puttini IO, Gomes-Ferreira PHS, Oliveira D, Hassumi JS, Gonçalves PZ, Okamoto R. Teriparatide improves alveolar bone modelling after tooth extraction in orchietomized rats. *Archives of Oral Biology*. 2019; 102: 147-154. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.04.007.
40. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of Biomedical Optics*. 2015; 20 (3): 038003. doi: 10.1117/1.JBO.20.3.038003.

41. Miron RJ, Xu H, Chai J, Wang J, Zheng S, Feng M, Zhang X, Wei Y, Chen Y, Mourão CFAB, et al. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~700g) and low (~200g) relative centrifugation forces. *Clin Oral Investig*. 2020; 24 (3): 1171-1182. doi: 10.1007/s00784-019-02981-2.
42. Engler-Pinto A, Siéssere S, Calefi A, Oliveira L, Ervolino E, Souza S, Furlaneto F, Messori M. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. *Clin Oral Impl Res*. 2019; 30 (10): 962-976. doi: 10.1111/clr.13503.
43. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, Booms P, Dohle E, Sader R, Kirkpatrick CJ, 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). *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019; 45 (3): 467-479. doi: 10.1007/s00068-017-0785-7.
44. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest*. 2016; 20 (9): 2353-2360. doi: 10.1007/s00784-016-1719-1.
45. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS, Nally M, Lanata N, Wang HL, 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*. 2018; 29 (2): 171-184. doi: 10.1080/09537104.2017.1293812.
46. Mourão C, Valiense H, Melo R, Mourão NB, Maia MD. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*. 2015; 42 (6): 421-423. doi: 10.1590/0100-69912015006013.
47. Wend S, Kubesch A, Orłowska A, Al-Maawi S, Zender N, Dias A, Miron RJ, Sader R, Booms P, Kirkpatrick CJ, et al. Reduction of the relative centrifugal force influence cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med*. 2017; 28 (12): 188. doi: 10.1007/s10856-017-5992-6.
48. Miron RJ, Bosshardt DD. OsteoMacs: key players around bone biomaterials. *Biomaterials*. 2015; 82: 1-19. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.
49. Chang MK, Raggatt L-J, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, Maylin ER, Ripoli VM, Hume DA, Pettit AR. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulated osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2008; 181 (2): 1232-1244. doi: 10.4049/jimmunol.181.2.1232.
50. Batoon L, Millard SM, Raggatt L-J, Pettit AR. Osteomacs and bone regeneration, *Current Osteoporosis Reports*. 2017; 15 (4): 385-395. doi: 10.1007/s11914-017-0384-x.
51. Fujioka-Kobayashi M, Kono M, Katagiri H, Schaller B, Zhang Y, Sculean A, Miron RJ. Histological comparison of platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus

horizontal centrifugation. *Platelets*. 2021; 32 (3): 413-419. doi: 10.1080/09537104.2020.1754382.

52. Sinder BP, Pettit AR, Mccauley LK. Macrophages: their emerging roles in bone. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015; 30 (12): 2140-2149. doi: 10.1002/jbmr.2735.
53. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton TJ, van Rooijen N, Alexander KA, Raggatt LJ, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*. 2010; 116 (23): 4815-4828. doi: 10.1182/blood-2009-11-253534.

Tables and Figures

Table 1 – Percentual distribution of platelets and leukocytes in all layers (A1-A10) after blood centrifugation to prepare L-PRF, A-PRF and H-PRF.

LAYERS	PLATELETS (%)			LEUKOCYTES (%)		
	L-PRF	A-PRF	H-PRF	L-PRF	A-PRF	H-PRF
A1	0,55	5,15	16,08	0	0	0
A2	1,58	4,36	28,66	0	0	13,90
A3	0,57	6,71	25,75	0	5,59	13,79
A4	0,45	29,30	16,89	0	13,49	23,17
A5	62,58	25,69	2,81	40,16	26,31	16,59
A6	16,27	5,75	3,54	12,94	7,90	13,25
A7	4,44	5,32	1,64	12,56	14,09	8,84
A8	1,38	5,24	1,19	2,24	18,10	3,77
A9	3,90	4,41	1,61	12,94	5,53	4,52
A10	8,27	8,06	1,82	19,15	8,99	2,15

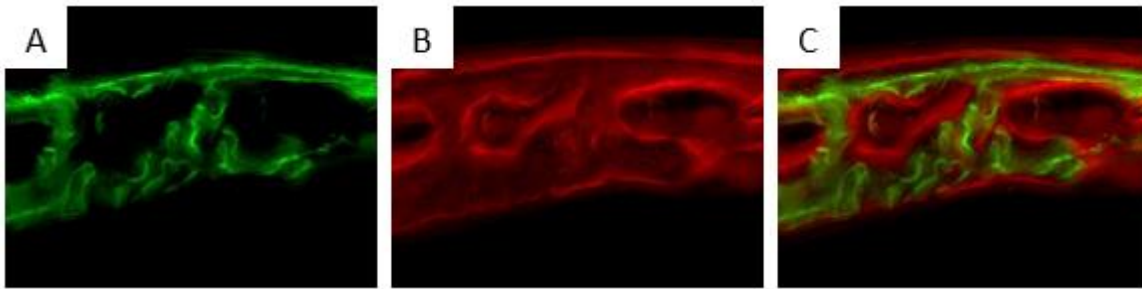


Figure 1: Images of the center of the CSD obtained by confocal microscopy. A – Calcein precipitation (green); B – Alizarin precipitation (red); C – Overlap of images, showing both fluorochromes.

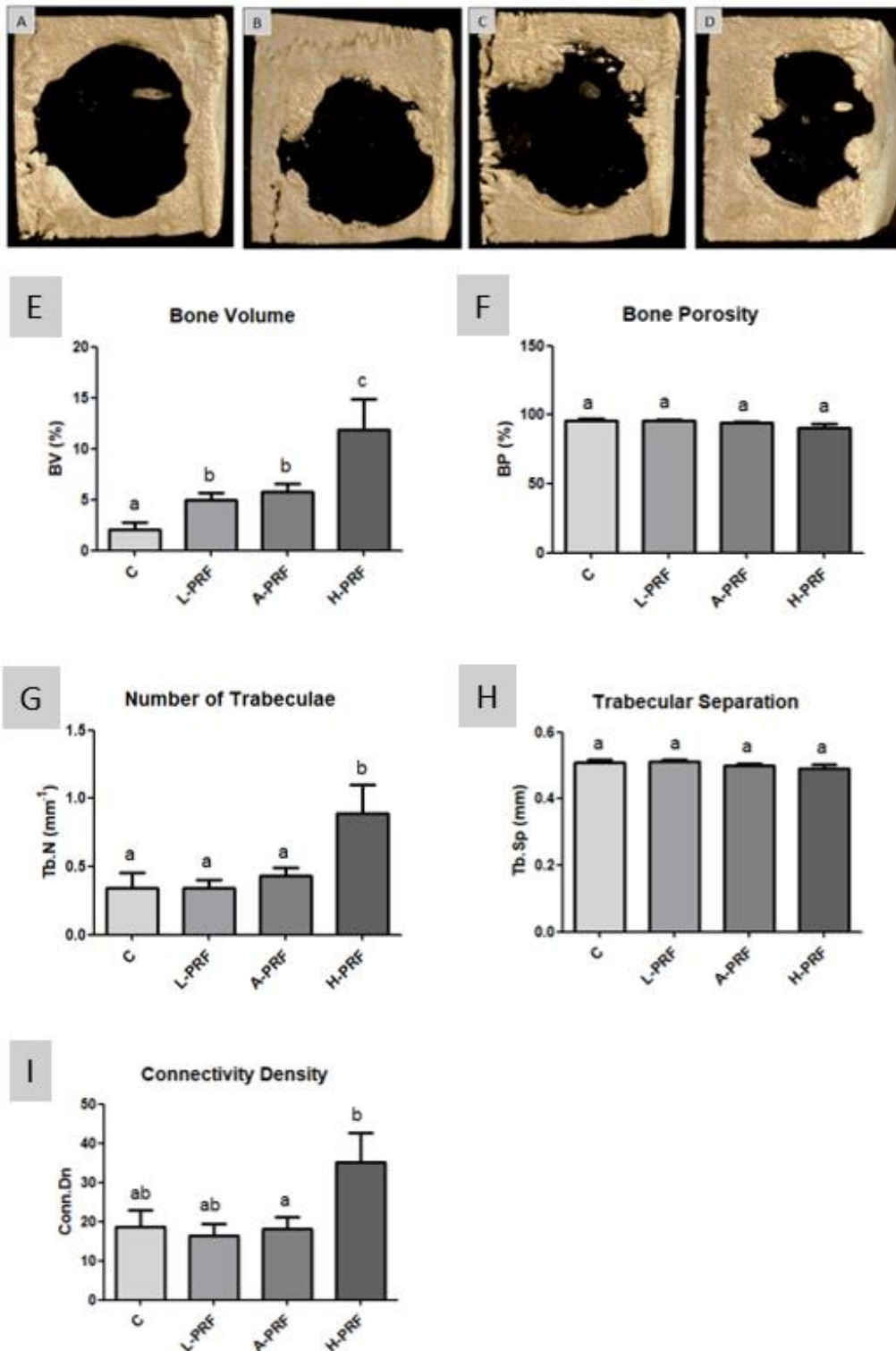


Figure 2: Micro-CT of the calvaria. Rendered reconstructions of the Control (A), L-PRF (B), A-PRF (C), and H-PRF (D) groups calvaria. Pixel size = 15.9 μ m. Means and standard deviations (SD) of BV (E), BP (F), Tb.N (G), Tb.Sp (H) and Conn.Dn (I) of groups C, L-PRF, A-PRF and H-PRF, with the results of comparisons between groups. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

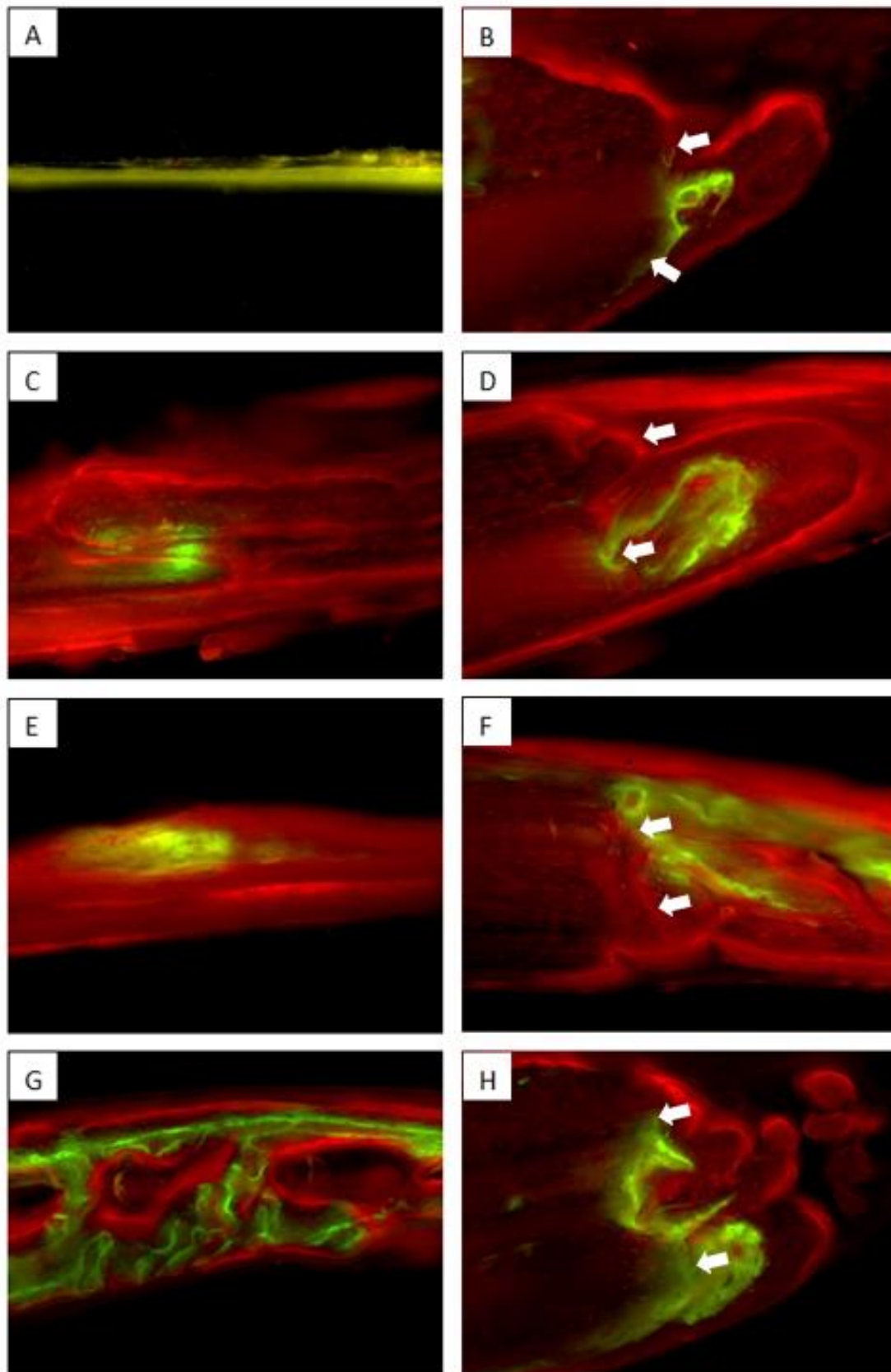


Figure 3: Images obtained by confocal microscopy showing the overlapping of calcein (green) and alizarin (red) in the experimental groups. Representative images of the center of the CSD

(A, C, E, G) and the region close to margins of the original surgical defect (B, D, F, H). Groups: C (A,B); L-PRF (C,D); A-PRF (E,F); H-PRF (G,H). Arrows represent the margins of the original surgical defect. Original magnification = 10x.

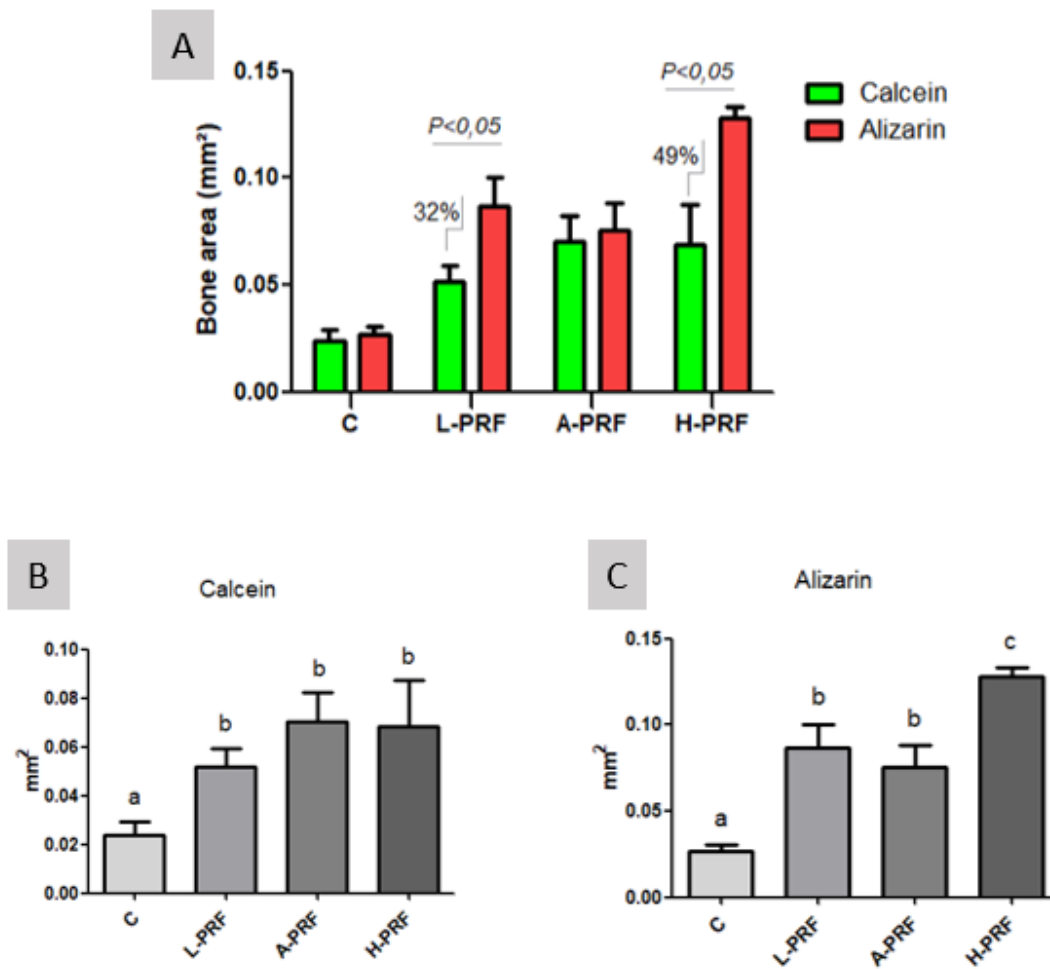


Figure 4: Means and standard deviations for calcein and alizarin precipitations for groups C, L-PRF, A-PRF and H-PRF, with the results of intragroup and intergroup comparisons. * indicates statistically significant differences ($p < 0.05$).

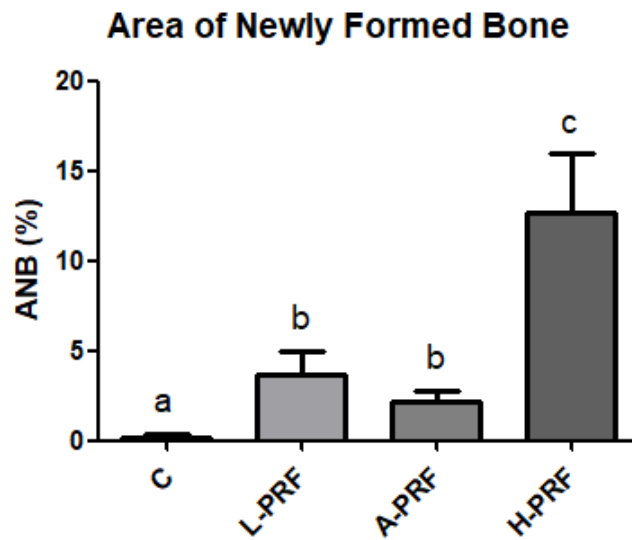


Figure 5: Means and standard deviations for ANB for groups C, L-PRF, A-PRF and H-PRF, with the results of comparisons between groups. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

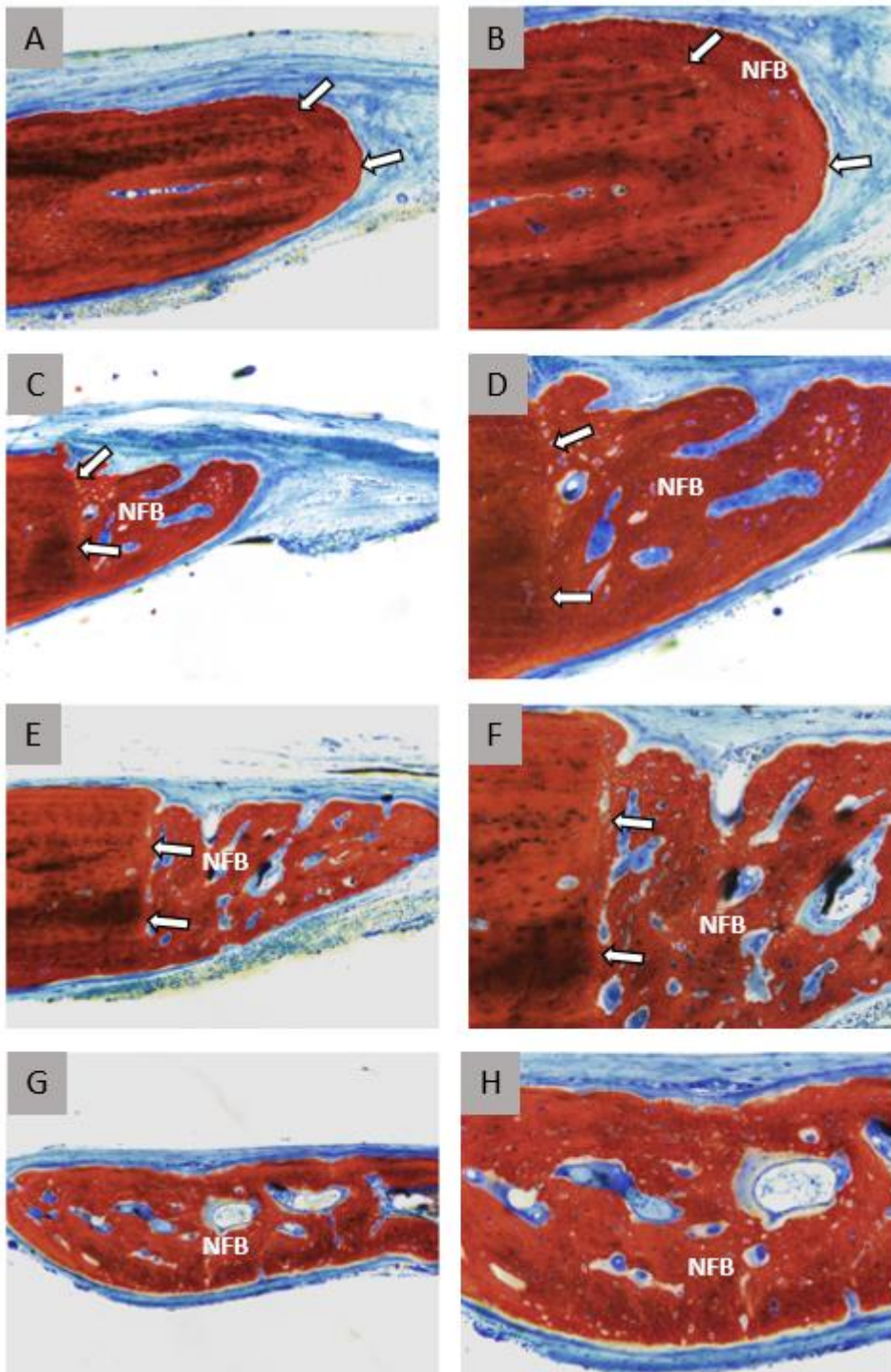


Figure 6: Representative images of histological sections. Groups: C (A, B); L-PRF (C, D); A-PRF (E, F); H-PRF (G, H). NFB = newly formed bone; unfilled arrow = margins of the original surgical defect. *Images G, H represent portions distant from the margins of the original surgical defect. Coloration: Stevenell Blue and Alizarin Red. Original magnification = 10x (A, C, E, G); 20x (B, D, F, H).