

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO Departamento de CTBMF e Periodontia Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

Comparação dos efeitos de agregados plaquetários produzidos por protocolos de alta e baixa velocidade de centrifugação na cicatrização de defeitos de tamanho crítico em calvária em ratos: estudo microtomográfico e histomorfométrico.

LUCIA MOITREL PEQUENO DA SILVA

VERSÃO CORRIGIDA



RIBEIRÃO PRETO - SP

2021

LUCIA MOITREL PEQUENO DA SILVA

Comparação dos efeitos de agregados plaquetários produzidos por protocolos de alta e baixa velocidade de centrifugação na cicatrização de defeitos de tamanho crítico em calvária em ratos: estudo microtomográfico e histomorfométrico.

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

Área de Concentração: Periodontia Orientador: Prof. Dr. Michel Reis Messora.

> RIBEIRÃO PRETO – SP 2021

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.

Catalogação da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Moitrel, Lucia Pequeno da Silva.

Comparação dos efeitos de agregados plaquetários produzidos por protocolos de alta e baixa velocidade de centrifugação na cicatrização de defeitos de tamanho crítico em calvária em ratos: estudo microtomográfico e histomorfométrico. / Lucia Moitrel Pequeno da Silva; orientador Michel Reis Messora – Ribeirão Preto, 2021.

133 p.: il.

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Dissertação (Mestrado)—Universidade de São Paulo, 2021.

1. Fibrina rica em plaquetas. 2. Regeneração óssea. 3. Plaquetas sanguíneas.

MOITREL, L. P. S. Comparação dos efeitos de agregados plaquetários produzidos por protocolos de alta e baixa velocidade de centrifugação na cicatrização de defeitos de tamanho crítico em calvária em ratos: estudo microtomográfico e histomorfométrico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovada em: ___/__/___

Banca Examinadora

Prof. Dr	_Instituição:
Julgamento:	_Assinatura:
Prof. Dr	_Instituição:
Julgamento:	_Assinatura:
Prof. Dr	_Instituição:
Julgamento:	_Assinatura:

Dedicatória

Á minha família,

minha base.

Hmo vocês!

Agradecimentos

Este trabalho é fruto da dedicação, direta ou indireta, de muitas pessoas. Vocês têm minha eterna gratidão por tornar real esse sonho e ciclo importante em minha vida.

Agradeço primeiramente a **Deus** por guiar meus passos dando a oportunidade de conviver com pessoas de bem e proporcionar momentos tão bons. Agradeço também aos meus Orixás, guias e amigos espirituais por guiarem meu caminho e nunca me abandonarem, me dando luz até nos meus dias mais difíceis.

Agradeço imensamente à minha família pelo apoio incondicional. Aos meus pais Márcia e Paulo Sérgio por me darem essa oportunidade. Sem vocês nada disso seria possível; esse sonho aqui é de vocês também. Aos meus irmãos Thiago e Marcos pelos conselhos quando mais precisei e pelo companheirismo. Às minhas sobrinhas Alice e Olívia, por me lembrarem o que é ser criança.

Ao meu namorado Homero, por me ensinar o que é o amor, pelo companheirismo, pelos incansáveis incentivos e pelo ombro amigo quando mais precisei.

À equipe coesa e eficiente desse trabalho: Natacha, Débora, Felipe, Ricardo, Raphael, Gabriel e Ulli. Formamos um time e tanto!

Ao meu atual orientador Michel Reis Messora e ao meu primeiro orientador Arthur Belém Novaes Jr. pelas direções, oportunidades, e até pelos puxões de orelha. Agradeço também aos outros professores do departamento - Daniela, Sérgio, Mário e Flávia - pelos aprendizados e disponibilidade em ensinar. Cresci muito profissionalmente nesses quase quatro anos.

Às funcionárias do departamento Isabel, Dulce e Daniela por tornarem tudo mais fácil pra nós; às funcionárias da clínica Dani e Karina pelo carinho com que executam seu trabalho; à técnica de laboratório Adriana pela ajuda na execução de grande parte desse trabalho; à assistente social Renata pelos conselhos e conversas que tanto precisei; e a todos os outros tantos funcionários da FORP-USP com quem tive o prazer de conviver nos últimos 4 anos: muito obrigada!

Às amigas do Rio, por estarem presentes mesmo quando eu estava a 700km de distância. Vocês são demais!

Às amigas que fiz em Ribeirão (Bárbara, Renata, Mariana, Monique, Letícia, Michelle e Milene) por me acolherem, apoiarem e aliviarem a barra do dia-a-dia nessa cidade. A "gringa" aqui amou cada uma das nossas segundas-feiras nas aulas, os domingos fazendo "parqueterapia", e tantos outros encontros especiais! Vou levar vocês pra vida toda no meu coração.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial Uislen, Natacha, Pedro e Giselle pelas risadas, pelo ombro nas horas de choro e por sempre estarem disponíveis pra ajudar. Ao Uislen, meu irmão que encontrei na FORP, pelos abraços de urso e por sempre estar perto, mesmo quando longe. À Natacha, por cuidar da Moana quando eu ia matar as saudades da família, pelas risadas escandalosas e, claro, por me ajudar a cuidar dos ratos em pleno *lockdown* e pela ajuda em todo o trabalho. Ao Pedro pela ajuda em tantas etapas desse trabalho, especialmente na estatística. À Giselle pelo incentivo, pela ajuda remota e até por compartilhar as frustrações.

Aos ratos que participaram do estudo por doarem suas vidas à ciência.

"A maior montanha a ser escalada e vencida é aquela que está dentro de si mesmo" Elanklever



Resumo

MOITREL, L. P. S. Comparação dos efeitos de agregados plaquetários produzidos por protocolos de alta e baixa velocidade de centrifugação na cicatrização de defeitos de tamanho crítico em calvária em ratos: estudo microtomográfico e histomorfométrico. 2021. Nº de 133 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O presente estudo avaliou a cicatrização de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados em calvária de ratos e tratados com agregados plaquetários produzidos por protocolos de alta velocidade (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos - L-PRF) e baixa velocidade (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos Avançada - A-PRF) de centrifugação. Vinte e quatro ratos foram divididos em 3 grupos: Controle (C), L-PRF e A-PRF. DTC de 5 mm de diâmetro foram criados na calvária dos animais. Os defeitos do Grupo C foram preenchidos com coágulo sanguíneo somente. Os defeitos dos grupos L-PRF e A-PRF foram preenchidos com 0,2 ml de L-PRF e A-PRF, respectivamente. Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 35 dias pós-operatórios. Análises histomorfométricas e microtomográficas foram realizadas. Os dados foram estatisticamente analisados (Anova, Tukey, p<0,05). Os grupos L-PRF e A-PRF apresentaram valores de Volume Ósseo e de Área de Osso Neoformado significativamente maiores que àqueles do grupo C, bem como menores valores de Porosidade Óssea (p < 0.05). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos A-PRF e L-PRF para esses parâmetros analisados. Pode-se concluir que i) L-PRF e A-PRF potencializaram a cicatrização de DTC em calvária de ratos; ii) protocolos de alta e baixa velocidade de centrifugação não produziram matrizes de agregados plaquetários com impactos biológicos diferentes na quantidade de neoformação óssea.

Palavras-Chave: Fibrina rica em plaquetas; Regeneração óssea; Plaquetas sanguíneas.

Abstract

Abstract

MOITREL, L. P. S. Comparison of the effects of platelet aggregates produced by high and low-speed centrifugation protocols on the healing of critical-size defects in rat calvaria: a microtomographic and histomorphometric study. 2021. N° de 133 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The current study evaluated the healing of critical-size defects (CSD) created in rat calvaria treated with platelet aggregates produced by high-speed (Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin - L-PRF) and low-speed (Advanced Platelet-Rich Fibrin - A-PRF) protocols of centrifugation. Twenty-four rats were divided into 3 groups: Control (C), L-PRF, and A-PRF. Five mm diameter CSD were created on the animals' calvaria. The defects of the L-PRF and A-PRF groups were filled with 0.01 ml of L-PRF and A-PRF, respectively. The C group defects were filled with a blood clot only. All animals were euthanized on the 35th postoperative day. Histomorphometric and microtomographic analysis were then performed. The L-PRF and A-PRF groups had significantly higher bone volume and neoformed bone area than those of the C group, as well as lower bone porosity values (p<0.05). No significant differences were observed between A-PRF and L-PRF groups for the analyzed parameters. It can be concluded that i) L-PRF and A-PRF potentiated the healing of CSD in rat calvaria; ii) high and low-speed centrifugation protocols did not produce PRF matrices with different biological impacts on the amount of bone neoformation.

Keywords: platelet-rich fibrin; blood platelet, bone regeneration, fibrin

Lista de Figuras

Lista de Figuras

- FIGURA 1 FOTOGRAFIAS REPRESENTANDO O PREPARO DAS MATRIZES DE PRF. A COLETA DE SANGUE USANDO TÉCNICA DE PUNÇÃO CARDÍACA; B – INSERÇÃO DO TUBO COM SANGUE COLETADO NA CENTRÍFUGA; C – TUBO APÓS CENTRIFUGAÇÃO – SANGUE SEPARADO EM CAMADAS; D – PINÇAMENTO DA MATRIZ DE PRF; E – SEPARAÇÃO DA MATRIZ DE PRF DA FAIXA RICA EM CÉLULAS VERMELHAS COM AUXÍLIO DE UMA TESOURA; F – MATRIZ DE AGREGADO PLAQUETÁRIO REMOVIDA DO TUBO. TODOS OS PROCEDIMENTOS SÃO IDÊNTICOS PARA AMBOS OS GRUPOS A-PRF E L-PRF, EXCETO O PROTOCOLO DE CENTRIFUGAÇÃO.
- FIGURA 2 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES DE AGREGADOS PLAQUETÁRIOS PRODUZIDAS EM PROTOCOLOS DE ALTA E BAIXA VELOCIDADE DE CENTRIFUGAÇÃO. A – PIPETAGEM DE 500 μL DO SANGUE NÃO CENTRIFUGADO (A0) E DE CAMADAS SEQUENCIAIS COM INTERVALOS DE 350 μL A PARTIR DO SANGUE CENTRIFUGADO (A1-A10). B – AMOSTRAS ARMAZENADAS EM TUBOS EPPENDORF PARA ANÁLISE HEMATOLÓGICA. AS SETAS PRETAS REPRESENTAM A CAMADA DE BUFFY COAT. 48
- FIGURA 3 CRIAÇÃO DO DTC. A INCISÃO SEMILUNAR NA CALVÁRIA DO ANIMAL; B RETALHO DE ESPESSURA TOTAL; C CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO COM BROCA TREFINA DE 5 MM DE DIÂMETRO; D CORTE DO DEFEITO ÓSSEO FINALIZADO; E SEGMENTO ÓSSEO SENDO REMOVIDO; F DEFEITO ÓSSEO FINALIZADO E DURA-MÁTER ÍNTEGRA.
 50
- FIGURA 4 MARCAÇÕES DE AMÁLGAMA. A CRIAÇÃO DA MARCAÇÃO COM BROCA DIAMANTADA ESFÉRICA; B – MARCAÇÕES POSICIONADAS A 2 MM DA MARGEM DO DTC, TANGENCIANDO SUA LINHA MÉDIA. C – MARCAÇÕES DE AMÁLGAMA FINALIZADAS. 51
- FIGURA 5 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE AGREGADOS PLAQUETÁRIOS PARA PREENCHIMENTO DOS DEFEITOS ÓSSEOS. A – MATRIZ DE AGREGADO PLAQUETÁRIO EM DISPOSITIVO COMPRESSOR; B – MATRIZ DE AGREGADO PLAQUETÁRIO APÓS ALGUNS MINUTOS DE COMPRESSÃO; C E D – SECÇÃO DA MEMBRANA DE AGREGADO PLAQUETÁRIO PRODUZIDA; E – PARTE DA MEMBRANA CONTENDO PORÇÃO PRÓXIMA À CAMADA DE CÉLULAS VERMELHAS SENDO PICOTADA; F – SERINGA ADAPTADA PARA PADRONIZAÇÃO DO VOLUME DE AGREGADO PLAQUETÁRIO A SER UTILIZADO NO PREENCHIMENTO DOS DEFEITOS ÓSSEOS.
- FIGURA 6 COLOCAÇÃO DAS MEMBRANAS DE AGREGADOS PLAQUETÁRIOS NOS DEFEITOS ÓSSEOS. A –
 VOLUME PADRONIZADO DE AGREGADO PLAQUETÁRIO SENDO LEVADO AO DEFEITO ÓSSEO; B –
 ACOMODAÇÃO DO AGREGADO PLAQUETÁRIO NO DEFEITO ÓSSEO; C DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO
 COM AGREGADO PLAQUETÁRIO PICOTADO E NA FORMA DE MEMBRANA; D SUTURA DO RETALHO
 TOTAL COM PONTOS INTERROMPIDOS SIMPLES.
- FIGURA 7 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REDUÇÃO DOS ESPÉCIMES DE CALVÁRIA. A CORTE LONGITUDINAL (LINHA TRACEJADA EM VERMELHO) DE CADA ESPÉCIME EM DOIS BLOCOS, EXATAMENTE AO LONGO DO CENTRO DO DEFEITO CIRÚRGICO ORIGINAL, USANDO-SE AS MARCAÇÕES DE AMÁLGAMA COMO REFERÊNCIA. B – CORTE TRANSVERSAL (LINHA TRACEJADA EM

VERDE), TANGENCIANDO AS MARCAÇÕES DE AMÁLGAMA. **C** - BLOCO COM 9 MM DE EXTENSÃO LONGITUDINAL PRONTO PARA SER INCLUÍDO EM PARAFINA. 55

- FIGURA 8 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) É REPRESENTADA PELA MÉDIA ARITMÉTICA SIMPLES OBTIDA A PARTIR DAS ALTURAS DAS BORDAS ÓSSEAS REMANESCENTES ANTERIOR (CD) E POSTERIOR (CE) AO DEFEITO CRIADO. A LARGURA DA AT É DE 5 MM, CORRESPONDENTE À LARGURA DO DEFEITO ORIGINAL. AUMENTO = 1,6X. B -APROXIMAÇÃO DO RETÂNGULO AT REPRESENTADO EM A. A ÁREA DE OSSO NEOFORMADO (AON) FOI CALCULADA COMO O PERCENTUAL DE OSSO NEOFORMADO (CIRCULADO EM PRETO) EM RELAÇÃO À AT.
- FIGURA 9 NÚMERO DE LEUCÓCITOS (A) E PLAQUETAS (B) NA AMOSTRA DE SANGUE NÃO
 CENTRIFUGADO (AMOSTRA CONTROLE A0) E APÓS CENTRIFUGAÇÃO (CAMADAS A1 A A10). A5 =
 AMOSTRA CORRESPONDENTE À CAMADA DE BUFFY COAT.
- FIGURA 10 GRÁFICOS REPRESENTANDO A DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE LEUCÓCITOS (A) E PLAQUETAS
 (B) EM TODAS AS CAMADAS (A1-A10) APÓS CENTRIFUGAÇÃO DO SANGUE PARA PREPARO DE L-PRF
 E A-PRF. A5 = AMOSTRA CORRESPONDENTE À CAMADA DE BUFFY COAT.

FIGURA 11 – RECONSTRUÇÕES RENDERIZADAS DAS CALVÁRIAS DOS GRUPOS CONTROLE (A), L-PRF (B) E
 A-PRF (C). TAMANHO DO PIXEL = 15,9μM. O CÍRCULO AZUL REPRESENTA OS LIMITES DO DTC.
 63

FIGURA 12 – GRÁFICOS REPRESENTANDO MEDIANAS, INTERVALO INTERQUARTIL E VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS DE VO, PO, TB.N, TB.SP E TB.TH NA ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA. 64

FIGURA 13 – MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO PARA AT (1) E AON (2) PARA OS GRUPOS C, L-PRF E A-PRF, COM
 OS RESULTADOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS. * INDICA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE
 SIGNIFICANTE ENTRE OS GRUPOS (P < 0,05).

FIGURA 14 – IMAGEM PANORÂMICA DOS CORTES HISTOLÓGICOS. A – GRUPO CONTROLE; B – GRUPO L-PRF; C – GRUPO A-PRF. COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA. AUMENTO ORIGINAL: 1.6X. 67

FIGURA 15 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DE CORTES HISTOLÓGICOS; GRUPOS C (A, B); L-PRF (C, D); A-PRF (E, F). ON = OSSO NEOFORMADO; CABEÇA DE SETA PREENCHIDA EM COR PRETA = VASOS SANGUÍNEOS; SETA NÃO PREENCHIDA = MATRIZ OSTEÓIDE; SETA PREENCHIDA EM COR PRETA = MARGENS DO DEFEITO CIRÚRGICO ORIGINAL; *AS IMAGENS C, D E F REPRESENTAM PORÇÕES DISTANTES DAS MARGENS DO DEFEITO CIRÚRGICO. COLORAÇÃO: HEMATOXICILINA E EOSINA. AUMENTO ORIGINAL: 10X (A, C, E); 20X (B, D, F).

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

μΑ	microampère
μL	Microlitro
AON	Área de osso neoformado
A-PRF	Fibrina rica em plaquetas avançada
AT	Área total
cm	Centímetro
DTC	Defeito de tamanho crítico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FC	Fator de crescimento
FDBA	Enxerto ósseo mineralizado congelado seco
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
g	Grama
h	Horas
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
Inc.	Incorporation
i-PRF	Fibrina rica em plaquetas injetável
Kg	Kilogramas
kV	quilovolt

L-PRF	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos
mg	Miligramas
min	minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
РО	Porosidade
PRF	Fibrina rica em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROI	Região de interesse
Rpm	Rotação por minuto
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Espaçamento entre as trabéculas
Tb.Th	Espessura das trabéculas
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidades internacionais
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VO	Volume ósseo
VOI	Volume de interesse

Lista de Símbolos

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
<	Menor
=	igual
>	Maior
\leq	Menor ou igual
2	Maior ou igual
®	Marca registrada
CO ₂	Dióxido de Carbono
8	Unidade de Aceleração
n	Tamanho da amostra
n°	número
°C	Grau Celsius
р	Probabilidade de significância
α	Alfa
β	Beta

Lista de Anexos

Lista de Anexos

Anexo A -	Certifica	ado de aprov	ação do	Comitê de Ét	ica en	n Animais	86
Anexo B -	Artigo	cientifico	para	submissão	no	periódico	88
	Platelet.	S			•••••	•••••	

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA29
1.1. Agregados plaquetários e cicatrização tecidual - Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
(L-PRF)29
1.2. Fibrina Rica em Plaquetas Avançada (A-PRF) – vantagens?
1. 3. L-PRF ou A-PRF - protocolos personalizados para a indicação clínica?
2. PROPOSIÇÃO
3. MATERIAL E MÉTODOS
3.1 Cálculo do tamanho da amostra44
3.2 Apreciação Ética44
3.3 Modelo experimental44
3.4 Anestesia45
3.5 Coleta de sangue para preparo dos agregados plaquetários45
3.5.1 Preparo da L-PRF46
3.5.2 Preparo da A-PRF46
3.6 Caracterização das matrizes de L-PRF e A-PRF47
3.7 Criação dos DTC49
3.8 Eutanásia53
3.9 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT) .54
3.10 Análise Histomorfométrica55
3.11 Variáveis de resultado

3.12 Análise estatística	57
RESULTADOS	59
4.1 Animais	59
4.2 Caracterização das matrizes de PRF	59
4.3 Análise microtomográfica	63
4.4 Análise histomorfométrica	65
4.4.1 Análise histométrica	65
4.4.2 Análise histopatológica	65
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	

Introdução e Revisão de

Giteratura

Introdução e Revisão de Literatura

1.1. Agregados plaquetários e cicatrização tecidual - Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF)

A cicatrização tecidual é caracterizada como um processo de quatro fases sobrepostas que demanda uma interação complexa de vários tipos celulares com uma matriz tridimensional extracelular, assim como fatores de crescimento (FC) capazes de facilitar a regeneração. As plaquetas são descritas como componentes-chave das fases iniciais da cicatrização tecidual, importantes durante a hemostase e na formação de coágulos de fibrina (MIRON; CHOUKROUN, 2017). Imediatamente após uma lesão, as plaquetas formam um tampão para a hemostase inicial, que é então substituído por um coágulo de fibrina. Também se forma um nódulo leucocítico, ou seja, chegam células responsáveis por coordenar uma cobertura antiinfecciosa do local. Uma vez ativadas, as células presentes no local, como plaquetas, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e monócitos liberam várias citocinas e promotores de crescimento. O recrutamento dessas moléculas é acompanhado de um aumento da angiogênese e linfangiogênese, que são de grande importância para a cicatrização tecidual. Além disso, os mediadores inflamatórios recrutam fibroblastos, induzem proliferação, e levam à secreção de proteases. Como os processos inflamatórios são inerentes ao ato cirúrgico em si, a adição de coágulos otimizados pode diminuir vários efeitos danosos, principalmente corrigindo certos excessos destrutivos durante a cicatrização (DOHAN et al., 2006c).

O uso de FC derivados do próprio sangue do paciente começou a ser utilizado em medicina desde a década de 1970 (ROSS *et al.*, 1974) como uma forma de otimizar a cicatrização tecidual, especialmente em cicatrização de feridas durante e após uma cirurgia. Esse conceito foi depois sedimentado no conhecido "plasma rico em plaquetas" (PRP), que foi introduzido na Odontologia no fim dos anos 1990 (MARX *et al.*, 1998; WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997).

Apesar do seu sucesso inicial, o PRP apresentava uma série de limitações práticas que contrastavam com seu potencial: seu protocolo era demorado – podia variar de 30 minutos a mais de 1 hora –, o que exigia o uso de anticoagulantes, como o citrato de sódio,

e de ativadores de coágulo, como trombina bovina e/ou cloreto de cálcio, que além de inibirem o processo de cicatrização, podem alterar a integridade de plaquetas e também há a possibilidade de provocarem o desenvolvimento de coagulopatias (LANDESBERG; MOSES; KARPATKIN, 1998; LANDESBERG; ROY; GLICKMAN, 2000). Ainda, o PRP requer o uso de centrífugas muito pesadas e kits específicos, o que deixa a técnica muito cara e impraticável para uso clínico (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSON; ALBREKTSSON, 2009). Além das dificuldades técnicas, após o processamento, formase uma matriz pequena e de baixa densidade, com fibrilas de pequeno diâmetro. Essa rede tem capacidade de concentração de plaquetas, mas ela rapidamente se dissolve, e não tem o mesmo potencial angiogênico e quimiotático de uma membrana (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSON; ALBREKTSSON, 2009; M. DOHAN EHRENFEST; BIELECKI; JIMBO; et al., 2012). A combinação dessas limitações forçou buscas por parte da comunidade científica por novas modalidades de regeneração. No começo dos anos 2000, Choukroun introduziu o que ficou conhecido como a segunda geração de agregados plaquetários, a chamada fibrina rica em plaquetas (PRF) (CHOUKROUN et al., 2001).

O objetivo principal com esse novo método era simplificar o processo de preparação e minimizar o tempo de processamento, de forma que fosse mais conveniente para o uso clínico. A eliminação de anticoagulantes permitiu que as funções celulares se mantivessem fisiológicas (FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017). A aplicação da matriz de PRF como um "bio-catalisador" na região afetada poderia acelerar a cicatrização pelo fornecimento de células necessárias imediatamente após o dano tecidual, de forma que menos recrutamento seja necessário. De fato, esse processo ativa a maior parte das plaquetas e também a cascata de coagulação. O fibrinogênio, inicialmente, concentra-se na parte superior do tubo, até que a trombina circulante o transforme em fibrina, formando um coágulo tridimensional de fibrina, rico em plaquetas e uma variedade de leucócitos, que ficam concentrados nessa rede. Após a centrifugação, a matriz de PRF concentra 97% das plaquetas e 50% dos leucócitos presentes no sangue circulante dentro da sua matriz (DOHAN *et al.*, 2006a; DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2010), e a literatura atual vem tentando aumentar esses números através de novos protocolos de centrifugação.

Na PRF, o sangue periférico do paciente é coletado em tubos específicos – de vidro ou plástico, sem anticoagulantes – e é imediatamente centrifugado por 12 minutos, a 2700 rotações por minuto (rpm) (CHOUKROUN *et al.*, 2001). O sangue começa a

coagular quase que imediatamente, devido à existência de ativadores de coágulo na parede do tubo, como a sílica. Dessa forma, o sucesso da técnica depende do tempo decorrido entre a coleta e sua centrifugação. Esse tempo deve ser de no máximo 90 segundos, de forma a aproveitar seu máximo potencial e evitar diferenças significativas na morfologia macroscópica da matriz de fibrina. Caso esse tempo não seja respeitado, a matriz formada terá tamanho reduzido (MIRON; DHAM; et al., 2019), ou sofrerá uma polimerização difusa, o que pode ocasionar a formação de um coágulo de sangue sem consistência adequada (DOHAN et al., 2006a). Após a centrifugação, o sangue dentro do tubo fica dividido em três camadas distintas: a base de células vermelhas, o líquido sobrenadante acelular contendo alguns leucócitos e plasma, e entre esses, um arcabouço tridimensional de fibrina - a chamada Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) (DOHAN et al., 2006a, b), um coágulo otimizado flexível, elástico e mecanicamente resistente, podendo inclusive ser suturado (DOHAN et al., 2006a; ISOBE et al., 2017; MADURANTAKAM; YOGANARASIMHA; HASAN, 2015). Essa elasticidade e resistência são possíveis devido ao processo de polimerização lenta com concentrações fisiológicas de trombina, resultando em uma matriz com junções equiláteras entre as fibrilas de fibrina, particularmente favoráveis à migração celular e retenção de moléculas solúveis (DOHAN *et al.*, 2006b).

Com auxílio de um kit específico para sua utilização (PRF Box[®] - Process Ltda., Nice, França) (TOFFLER *et al.*, 2009), esta matriz pode ser comprimida, geralmente quando é utilizada como membrana; ou assumir um formato cilíndrico, para facilitar sua inserção em alvéolos de extração, por exemplo; ou até mesmo ser picotada e misturada a biomateriais/substitutos ósseos, de forma a aumentar a sua bioatividade e também sua capacidade volumétrica. A vantagem na utilização da PRF Box[®] é a obtenção de membranas ou cilindros de espessuras uniformes, que se mantêm hidratados por horas, além da possibilidade de aproveitamento do exsudato coletado após a compressão da matriz de PRF. Esse exsudato é rico em proteínas, como a fibronectina e a vitronectina, podendo ser utilizado para hidratar enxertos e biomateriais (TOFFLER *et al.*, 2009).

De forma a padronizar o sistema de nomenclatura e assim facilitar a compreensão da comunidade científica, um grupo de especialistas categorizou os agregados plaquetários em quatro principais grupos, levando em consideração principalmente sua concentração de leucócitos e sua arquitetura de fibrina (M. DOHAN EHRENFEST; BIELECKI; MISHRA; *et al.*, 2012). A PRF idealizada por Choukroun (CHOUKROUN

et al., 2001), a partir de então, passou a ser denominada Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF), devido à sua arquitetura de fibrina resistente e com uma alta concentração de leucócitos.

A L-PRF passou a ser utilizada clinicamente em vários campos da Odontologia, especialmente por ser um protocolo fácil, curto, pouco invasivo e com resultados promissores. Algumas das aplicações da L-PRF em Odontologia são: preenchimento de alvéolo pós-extração (ALZAHRANI; MURRIKY; SHAFIK, 2017; HAUSER et al., 2013; KUMAR et al., 2015; MOURÃO, Carlos Fernando Almeida Barros et al., 2020; TEMMERMAN et al., 2016), regeneração de defeitos periapicais (HIREMATH et al., 2014; JAYALAKSHMI et al., 2012; JOHNS et al., 2013), levantamento de seio maxilar (ALI; BAKRY; ABD-ELHAKAM, 2015; KANAYAMA et al., 2016; MAZOR et al., 2009; SIMONPIERI et al., 2011; TATULLO et al., 2012; ZHANG et al., 2012), tratamento de perfuração de membrana de Schneider (ÖNCÜ; KAYMAZ, 2017; SIMONPIERI et al., 2011), tratamento de defeitos infraósseos (AGARWAL; GUPTA; JAIN, 2016; ELGENDY; ABO SHADY, 2015; LEKOVIC et al., 2012; MATHUR et al., 2015; PANDA; DORAISWAMY; et al., 2016; PANDA; SANKARI; et al., 2016; SHARMA; PRADEEP, 2011b), tratamento de lesões de bifurcação (KANORIYA et al., 2017; SHARMA; PRADEEP, 2011a), tratamento de recessão gengival (EREN; ATILLA, 2014; ÖNCÜ, 2017; TUNALI et al., 2015), tratamento com implantes, melhorando sua estabilidade (ÖNCÜ; ALAADDINOĞLU, 2015; ÖNCÜ; ERBEYOĞLU, 2019), e prevenção de osteonecrose óssea relacionada ao uso de bisfosfonatos (ASAKA et al., 2017; CANO-DURAN et al., 2017). A L-PRF também é utilizada em Medicina, como, por exemplo, em cicatrização de úlceras (SOMANI; RAI, 2017), reparo de tendão de Aquiles (SÁNCHEZ et al., 2007), reparo de manguito rotador (ZUMSTEIN et al., 2014) e tratamento de perfuração de tímpano (HABESOGLU et al., 2014).

As propriedades positivas da L-PRF para os processos de regeneração tecidual podem ser ainda mais significativas quando esta é associada a enxertos ósseos e biomateriais (CHOUKROUN *et al.*, 2006b; ENGLER-PINTO *et al.*, 2019; LEKOVIC *et al.*, 2012; TATULLO *et al.*, 2012). Quando misturada a enxertos ósseos, a L-PRF age como um conector biológico, atraindo células-tronco, favorecendo a migração de células osteoprogenitoras para o centro do enxerto e estimulando a neoangiogênese (CHOUKROUN *et al.*, 2006a). Por outro lado, o enxerto ósseo pode funcionar como um mantenedor de espaço para a formação tecidual e para o crescimento do tecido

mineralizado (LEKOVIC *et al.*, 2012). Além disso, a associação da L-PRF a enxertos ósseos e biomateriais pode reduzir o volume necessário dos mesmos em procedimentos cirúrgicos destinados à reconstrução óssea (CHOUKROUN *et al.*, 2006b), além de diminuir o tempo de cicatrização (TATULLO *et al.*, 2012). Ainda, os leucócitos presentes na L-PRF executam a função de reguladores pelo seu papel na ação anti-infecciosa e na regulação imune através da secreção de citocinas, controlando a habilidade dos biomateriais em se adaptar ao ambiente no novo hospedeiro (MIRON; CHOUKROUN, 2017).

Além de ser um protocolo de fácil utilização clínica, a L-PRF tem destaque por apresentar três características biológicas importantes para regeneração tecidual: (1) se apresenta numa forma de arcabouço tridimensional de fibrina; (2) dentro desse arcabouço, ficam presas células autólogas, como leucócitos, macrófagos, neutrófilos e plaquetas, que executam papéis importantes na cicatrização; e também (3) serve como reservatório de FC naturais que também são de extrema importância na regeneração. A descrição dessas propriedades será aprofundada nos parágrafos subsequentes.

A fibrina é a forma ativada de uma molécula plasmática chamada fibrinogênio, que está presente tanto no plasma sanguíneo quanto nos grânulos-α plaquetários. A fibrina desempenha um papel primordial na agregação plaquetária durante a hemostase, formando uma rede que permite a entrada de células e diminui a infiltração de tecido conjuntivo fibroso e, portanto, permite a regeneração tecidual (ACAR et al., 2015; DOHAN et al., 2006a, b). A rede de fibrina formada na centrifugação apresenta uma organização tridimensional homogênea, até mais coerente do que coágulos de fibrina naturais. Ela é uma rede de fibrina tridimensional e elástica, exercendo uma importante influência na sustentação mecânica dos processos de migração, proliferação e diferenciação de células mesenquimais (CHOUKROUN et al., 2006a; DOHAN et al., 2006a, b; KANG et al., 2011). Essas características físicas aliadas às suas características biológicas levaram Kang et al. (2011) a descreverem esse agregado plaquetário como um "bioesqueleto inato ideal". Ademais, a polimerização progressiva formada na ausência de anticoagulantes implica em uma incorporação aumentada das citocinas circulantes na rede de fibrina. Essa configuração permite um aumento da meia-vida dessas citocinas, de forma que elas são liberadas somente na remodelação cicatricial da matriz, ou seja, uma liberação a longo prazo (DOHAN et al., 2006b). As plaquetas ficam presas nessa rede,

que também contém os FC, que são liberados gradual e lentamente ao longo do tempo (HE *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2011; KOBAYASHI *et al.*, 2016).

Por sua vez, as plaquetas são responsáveis pela ativação e liberação de FC, fatores de coagulação, moléculas de adesão, citocinas e fatores de angiogênese, o que permite o recrutamento e atividade de fibroblastos, leucócitos, macrófagos e células mesenquimais indiferenciadas, além de organizar uma série de eventos fisiológicos complexos que resultam em reparo tecidual, remodelação vascular e regeneração tecidual (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013). Além das plaquetas, os leucócitos também são encontrados na membrana de L-PRF e desempenham um papel importante na cicatrização, devido à sua ação anti-infecciosa, bem como sua regulação imune através da liberação de citocinas inflamatórias, como interleucina (IL)-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e citocinas antiinflamatórias, como IL-4 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A presença dessas citocinas aumenta sua capacidade de facilitar o acesso de outras células ao sítio, através da neovascularização, sendo uma das maiores vantagens da L-PRF sobre o PRP (DOHAN *et al.*, 2006c).

Estudos clínicos comprovaram o papel da L-PRF na resistência contra patógenos e na regulação imune, inclusive diminuindo drasticamente casos de osteíte alveolar em exodontias de terceiros molares (CANELLAS *et al.*, 2019; ESHGHPOUR *et al.*, 2014; HOAGLIN; LINES, 2013). Da mesma forma, em um estudo que visava analisar e comparar a eficácia antimicrobiana dos agregados plaquetários, a L-PRF apresentou capacidade de inibição de patógenos em amostras de biofilme oral (KARDE *et al.*, 2017). Em outro estudo, que analisou essa eficácia contra cepas de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a L-PRF também apresentou resultados favoráveis (KOUR *et al.*, 2018).

Além disso, os FC presentes no L-PRF desempenham individualmente um papel na regeneração, estimulando ou inibindo migração celular, adesão, proliferação e diferenciação, inclusive de células endoteliais, levando à angiogênese. Eles estão presentes em todos os tecidos, mas o sangue serve como reservatório de vários FC e citocinas que promovem angiogênese e regeneração para cicatrização tecidual. Alguns dos FC presentes na L-PRF são: fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), e cada um desempenha um papel específico no auxílio à cicatrização. O TGF- β é, na verdade, uma superfamília de 30 isoformas diferentes - TGF- β 1, sua isoforma mais predominante, é importante na cicatrização, participando na inflamação, angiogênese, re-epitelização, e cicatrização de tecido conjuntivo. Esse FC é crucial durante a formação óssea, contribuindo para os precursores dos osteoblastos na quimiotaxia e mitogênese, e estimulando os osteoblastos na deposição de tecido mineralizado na matriz de colágeno ósseo. Outro FC importante é o PDGF, um regulador essencial para migração, proliferação e sobrevivência de células mesenquimais, que pode induzir estimulação e inibição dessas células. Também promove a produção de colágeno durante a cicatrização. As plaquetas são a maior fonte de PDGF, já que estas ficam depositadas nos grânulos α-plaquetários. O interessante é que a meia-vida da PDGF é curta, mas a matriz de L-PRF consegue liberar esse FC de forma lenta e gradual. Um terceiro FC importante é o VEGF, que atua na angiogênese dos tecidos, estimulando formação de novos vasos sanguíneos e, portanto, trazendo nutrientes e aumentando o fluxo sanguíneo no local. Além disso, também tem potentes efeitos na remodelação de tecidos e a sua incorporação em biomateriais aumenta nova formação óssea. Já o IGF é um regulador de proliferação e diferenciação da maioria das células, e também participa na regulação de morte celular programada (apoptose). Apesar dos IGF serem liberados na degranulação de plaquetas, eles também estão massivamente presentes na circulação sanguínea (DOHAN et al., 2006b; MIRON; CHOUKROUN, 2017).

Essas quatro principais citocinas plaquetárias anteriormente descritas exercem um papel fundamental nos mecanismos iniciais de cicatrização devido à sua capacidade de estimular migração celular e proliferação (particularmente pela PDGF) e induzir remodelação da matriz de fibrina, bem como a secreção da matriz de colágeno cicatricial (particularmente pelo TGF- β) (DOHAN *et al.*, 2006b). Essas citocinas, por serem pequenas moléculas, poderiam se concentrar na parte superior do tubo, devido à centrifugação. Porém, esses FC são encontrados dentro da matriz de L-PRF, tendo uma íntima ligação dessas moléculas na arquitetura molecular de fibrina (DOHAN *et al.*, 2006b). Na L-PRF, eles são liberados gradativamente ao longo de um período de dez dias, ao contrário do que acontece no PRP, que tem uma liberação rápida de FC nos primeiros 60 minutos, com declínio logo em seguida. Além disso, a L-PRF libera quantitativamente mais FC do que o PRP, devido, provavelmente, à sua maior quantidade de células

(GHANAATI *et al.*, 2014; KOBAYASHI *et al.*, 2016). Ainda, a liberação dos FC na L-PRF se dá de forma controlada e a longo prazo. No estudo de He et al. (2009), os níveis de TGF- β 1 e PDGF-AB aumentaram gradativamente até atingirem seu pico aos 14 dias e, a partir daí, houve um lento decréscimo subsequente. Em contraste, o PRP liberou esses FC descontroladamente e em um curto período, tendo seu pico no dia 1 e então decrescendo rapidamente. Além disso, após os 14 dias decorridos do estudo, a L-PRF ainda retinha níveis significativamente maiores de FC presos na sua matriz, comparado com o PRP (HE *et al.*, 2009).

Por fim, é interessante ressaltar que a matriz de L-PRF também abriga glicosaminoglicanos, como heparina e ácido hialurônico, advindos do sangue e das plaquetas. Esses glicosaminoglicanos ficam incorporados nos polímeros de fibrina e têm forte afinidade com pequenos peptídeos, como citocinas plaquetárias, e assim podem auxiliar na migração celular e em processos de cicatrização (DOHAN *et al.*, 2006b).

No estudo de He et al., (2009), o L-PRF foi capaz de aumentar a proliferação e diferenciação dos osteoblastos em calvária de ratos de uma maneira mais longa e forte do que o PRP. O exsudato da L-PRF coletado no 14° dia estimulou ao máximo os osteoblastos para proliferação e diferenciação, enquanto o exsudato do PRP coletado após o 7° dia não expressou efeitos positivos. Além disso, a L-PRF também estimulou fortemente a síntese de mineralização pelos osteoblastos, o que pode ser explicado pela liberação de TGF-β1, que aumenta a síntese de colágeno, e que teve sua liberação máxima em 14 dias. Por outro lado, o PRP liberou predominantemente PDGF-AB, e isso pode ter afetado seu efeito limitado na mineralização. O conteúdo de fibrinogênio da L-PRF pode também ter contribuído para a mineralização aumentada (HE *et al.*, 2009).

Em suma, a matriz de L-PRF pode ser considerada um biomaterial natural que inclui todas as células e citocinas essenciais para uma cicatrização ideal. Ela também favorece a microvascularização do local e é capaz de guiar migração celular epitelial até sua superfície. De um ponto de vista clínico, esse biomaterial acelera a cicatrização fisiológica, graças à presença dessas moléculas e à sua arquitetura tridimensional tetramolecular (CHOUKROUN *et al.*, 2006a, b).

1.2. Fibrina Rica em Plaquetas Avançada (A-PRF)
Em algumas análises histológicas da L-PRF foi possível atestar que a maioria das plaquetas se concentrava na parte inferior da matriz, próximo à base de células vermelhas, evidenciando que essa parte inferior da matriz é clinicamente mais importante do que a sua parte superior (DOHAN *et al.*, 2006a). Esse padrão de distribuição seria devido à velocidade de centrifugação alta, que "empurrava" os leucócitos para baixo (GHANAATI *et al.*, 2014). Nesse contexto, surgiu o conceito de "centrifugação de baixa velocidade", que reduz a velocidade de centrifugação, com o objetivo de uniformizar essa distribuição de plaquetas e leucócitos. Diversos novos protocolos surgiram com esse novo conceito, dentre eles a Fibrina Rica em Plaquetas Avançada (A-PRF) – uma matriz sólida semelhante à L-PRF (GHANAATI *et al.*, 2014) – e a Fibrina Rica em Plaquetas Injetável (i-PRF) – que apresenta uma forma líquida (MOURÃO *et al.*, 2015).

Na A-PRF, a velocidade de centrifugação é reduzida para 1500 rpm (~ 208g) e o tempo aumentado para 14 minutos. Isso resulta em uma matriz sólida, que apesar de ser menor que a L-PRF, apresenta uma distribuição mais homogênea de leucócitos por toda a sua matriz (EL BAGDADI *et al.*, 2019; MIRON; XU; *et al.*, 2020). Ainda, são encontradas mais plaquetas e granulócitos neutrofílicos na parte distal da A-PRF, o que pode influenciar a diferenciação dos macrófagos do hospedeiro e também dos macrófagos da matriz após a sua implantação (GHANAATI *et al.*, 2014). Além disso, apresenta uma estrutura mais porosa com um espaço interfibroso maior, comparado com a L-PRF, o que facilita significativamente a penetração celular na matriz de fibrina, mostrando uma vascularização significativamente maior dez dias após sua implantação subcutânea em ratos, comparado com a L-PRF (FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017; GHANAATI *et al.*, 2014; KUBESCH *et al.*, 2019; MIRON; XU; *et al.*, 2020). Por esses motivos, esse tipo de protocolo de centrifugação de baixa velocidade parece ser altamente favorável na regeneração de tecidos moles e duros, podendo influenciar a cicatrização, integração de biomateriais e osseointegração de implantes.

Investigando a redução da velocidade de centrifugação com a liberação de FC, Kobayashi e cols. investigaram *in vitro* a liberação de FC ao longo do tempo (15 e 60 minutos, 8 horas, 1 dia, 3 e 10 dias) em diferentes protocolos de centrifugação: PRP, L-PRF e A-PRF. Ao longo de 10 dias, as matrizes de PRF mostraram uma liberação lenta e contínua dos FC, como PDGF, TGF e VEGF, ao contrário do PRP, que mostrou uma liberação aumentada em tempos iniciais, isto é, em até 8 horas, fazendo desta uma grande vantagem do protocolo PRF no que diz respeito à biodisponibilidade de FC. Uma explicação para essa diferença é a estrutura sólida da PRF, que funciona como um reservatório e leva a uma liberação gradual e contínua dos FC. Comparativamente, a A-PRF liberou uma quantidade maior de FC ao longo dos dez dias, o que pode representar uma vantagem clínica (KOBAYASHI *et al.*, 2016). Em outro estudo, os principais FC - VEGF, TGFβ-1 e EGF - foram quantificados em tempos entre 6h e 10 dias para L-PRF, A-PRF e A-PRF+ (este último é uma adaptação do A-PRF, sendo preparado na mesma velocidade [1500 rpm], mas por um tempo menor [8 min]). Exceto para VEGF, observouse que não houve diferença significativa na liberação acumulada ao longo dos 10 dias entre os protocolos de baixa centrifugação, mas houve diferença entre esses e a L-PRF. Já para VEGF, a maior liberação foi em A-PRF+. Além disso, a liberação máxima de VEGF e TGFβ-1 ocorreu a partir do sétimo dia, o que mostra uma liberação a médio e longo prazos (EL BAGDADI *et al.*, 2019).

A A-PRF apresenta maior quantidade de neutrófilos presos na sua matriz, células que facilitam a chegada de macrófagos à ferida para fazerem fagocitose de remanescentes inflamatórios. Além disso, os neutrófilos também modulam tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa em uma maneira direta ou indireta pelo *crosstalk* com linfócitos B e T. Dessa forma, a distribuição dos neutrófilos na matriz de A-PRF pode ser a base para um melhor funcionamento dos monócitos e macrófagos e, também, dos linfócitos transplantados e residentes, podendo influenciar na cicatrização tecidual (GHANAATI *et al.*, 2014).

Outro estudo corrobora esse fato ao demonstrar que A-PRF e APRF+ apresentam um aumento nos níveis de mRNA de alguns FC, como PDGF e TGFβ, se comparado com L-PRF e controle. No entanto, a APRF+ demonstrou significativamente maior liberação de fatores de crescimento comparado com todos os outros grupos estudados. Esse fato pode estar correlacionado com o aumento do número de leucócitos e de fibroblastos gengivais, que secretam esses FC. A A-PRF e A-PRF+ foram capazes de produzir um aumento de 300% na migração de fibroblastos gengivais, contra 200% do L-PRF. Além disso, a exposição das células à A-PRF e à A-PRF+ fez aumentar os níveis de mRNA de colágeno, um dos fatores-chave durante a cicatrização de tecidos duro e mole, o que demonstra o potencial regenerativo destes protocolos (FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017). Em estudos *in vivo*, a A-PRF+ confirmou o potencial regenerativo achado em trabalhos *in vitro* anteriores. Em um estudo de preservação alveolar em cães, após 30 dias, o alvéolo dentário estava densamente preenchido com osso neoformado, além de apresentar uma intensidade de fluorescência muito maior que o grupo controle. Isso indica uma maior expressão de osteocalcina e osteopontina no osso neoformado, indicando, então, que a A-PRF+ aumenta a atividade osteoblástica no osso alveolar, promovendo uma maior formação óssea (TO *et al.*, 2019). Infelizmente, esse estudo não apresentou uma comparação com a L-PRF ou com a A-PRF, o que poderia ter sido interessante, uma vez que as vantagens da A-PRF+ descritas em estudos *in vitro* citados anteriormente não foram investigadas em modelos *in vivo* de regeneração óssea. Em um estudo clínico de preservação alveolar, a A-PRF obteve excelentes resultados, inclusive semelhantes ao biomaterial ósseo utilizado (enxerto ósseo mineralizado congelado seco - FDBA), com as vantagens já mencionadas de ser um material completamente autógeno (CLARK *et al.*, 2018).

1. 3. L-PRF ou A-PRF - protocolos personalizados para a indicação clínica?

Em vista do conceito de que diferentes protocolos de centrifugação produzem matrizes de PRF com diferentes características, podemos considerar que não há um protocolo único para todos os propósitos dentro da Odontologia, assim como não existe um só biomaterial ósseo que seja indicado a todos os procedimentos de enxertia. Assim, em algumas indicações - em reparos de membrana de Schneider, por ex. - pode ser promissor usar uma matriz de PRF mais densa e longa, como a L-PRF. Em outros casos, uma matriz com maior número de leucócitos e de FC pode ser uma vantagem, como em tratamento de alvéolos de extração, e quando misturado com biomateriais (MIRON; CHOUKROUN, 2017).

Algumas pesquisas têm investigado se a matriz de PRF mudaria de acordo com as características individuais de cada paciente. Um estudo recente mostrou que o tamanho da membrana pode variar de acordo com o sexo e a idade do paciente. Membranas coletadas de mulheres foram em geral 17% maiores que as dos homens. Além disso, pacientes mais idosos também produziram membranas maiores, e isso é especialmente relevante entre as mulheres mais idosas. Esses resultados podem ser explicados pelo fato

de mulheres terem um hematócrito geralmente mais baixo, o que facilita a separação do sangue em camadas na centrifugação. Da mesma forma, conforme envelhecemos, a tendência é que a taxa de hematócrito diminua, facilitando a separação e produzindo membranas maiores (MIRON; DHAM; *et al.*, 2019). Outro estudo evidencia que indivíduos mais jovens apresentam um padrão de rede de fibrina mais denso, o que leva a um maior aprisionamento de plaquetas e glóbulos brancos nessa rede, se comparado a indivíduos mais idosos. Considerando esses fatores como chave na cicatrização, pode-se dizer que a idade é um dos fatores que desempenha um papel significativo na qualidade da cicatrização almejada (YAJAMANYA *et al.*, 2016).

A L-PRF é uma matriz amplamente estudada há vinte anos, vastamente caracterizada, com benefícios em regeneração óssea comprovados em estudos *in vitro*, pré-clínicos e também clínicos. A A-PRF, por outro lado, é obtida por protocolo descrito mais recentemente. Embora estudos *in vitro* indiquem que o protocolo de produção da A-PRF pode ser extremamente vantajoso na regeneração óssea, a literatura carece ainda de estudos *in vivo* que comprovem sua efetiva ação. Além disso, nenhum estudo até o presente momento avaliou e comparou a cicatrização óssea potencializada com L-PRF e A-PRF.

Proposição

Proposição

Objetivos Primários:

O propósito deste estudo foi avaliar a cicatrização de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados em calvária de ratos e tratados com L-PRF ou A-PRF.

Objetivos Secundários:

 Determinar a composição e distribuição de plaquetas e leucócitos em sangue de ratos antes e após o processo de centrifugação para produção das matrizes de L-PRF e A-PRF;

2. Determinar nos DTC criados a quantidade de osso neoformado e a microarquitetura desse tecido ósseo por meio de análises microtomográficas, avaliando (1) volume ósseo (VO), (2) porosidade óssea (PO), (3) número de trabéculas ósseas (Tb.N), (4) espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp) e (5) espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th);

3. Determinar nos DTC criados a área de osso neoformado (AON) por meio de análises histomorfométricas, bem como as características histopatológicas dos tecidos presentes no interior dos defeitos.

Material e Métodos

Material e Métodos

3.1 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo programa *Graphpad Statemate* 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos nesta pesquisa foi calculado considerando-se médias e desvio-padrão de VO dos grupos experimentais de um estudo prévio (ENGLER-PINTO *et al.*, 2019) sendo o valor de α ajustado em 0,05. Dessa forma, chegou-se a um tamanho amostral adequado de 8 animais por grupo experimental.

3.2 Apreciação Ética

A pesquisa foi realizada respeitando-se os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivissecção dos mesmos (Lei 11.794/2008), a Declaração Universal dos Direitos dos Animais da UNESCO (Organização das Nações Unidas para Educação, a Ciência e a Cultura), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e a legislação em vigor (Lei 9605/1998). Esta pesquisa foi realizada somente após a apreciação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo nº 2019.1.752.58.4).

3.3 Modelo experimental

No presente estudo, foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com idade de 14 semanas (3,5 meses), pesando entre 350 g e 450 g (Biotério da FORP-USP, Ribeirão Preto, SP). Os ratos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=8): Controle, Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) e Fibrina Rica em Plaquetas Avançada (A-PRF). Todos os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24°C. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Ao longo de todas as etapas, os investigadores (operadores, avaliadores de resultados e bioestatística) foram calibrados e todos desconheciam os grupos experimentais do presente estudo.

3.4 Anestesia

Para realização dos procedimentos experimentais (coleta de sangue para o preparo da PRF e criação dos DTC), os animais foram induzidos inicialmente em câmara com Isoflurano a 4% (Instituto Biochimico Ind. Farm. Ltda, Itatiaia, RJ, Brasil) e mantidos em anestesia inalatória por máscara com o mesmo anestésico a concentração de 1,5 - 3%. Após indução anestésica, foi administrado Sulfato de Morfina (Dimorf, Cristália[®] Prod. Quím. Farm. Ltda., Itapira, SP, Brasil; 8 mg/kg) e penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Animal Health®, Campinas, SP, Brasil; 24.000 UI/Kg) por via intramuscular. Foi também administrada injeção subcutânea de Flunixin Meglumina (Aplonal 1%, König®, Buenos Aires, Argentina; 2 mg/kg).

3.5 Coleta de sangue para preparo dos agregados plaquetários

Antes da criação do DTC e logo após a anestesia, os animais dos grupos L-PRF e A-PRF foram submetidos à punção cardíaca para coleta de sangue. Foram coletados 3 mL de sangue de cada animal – quantidade considerada adequada para produção de membrana de PRF (GHANAATI *et al.*, 2018) – usando uma seringa descartável de 5 mL (Descarpack[®], São Paulo, Brasil). O sangue retirado foi rapidamente transferido para um tubo de 5 mL a vácuo, de plástico e revestido por sílica (BD Vacutainer[®], Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e imediatamente processado para preparo da L-PRF ou A-PRF. Foram injetados no dorso de cada animal, subcutaneamente, 5 mL de soro fisiológico (JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto, Brasil). Os animais do Grupo Controle também foram submetidos à punção cardíaca e coleta de sangue a fim de se padronizar as condições experimentais vivenciadas por todos os animais.

3.5.1 Preparo da L-PRF

O preparo da L-PRF foi feito de acordo com uma adaptação do protocolo de Choukroun et al. (CHOUKROUN et al., 2001). O sangue coletado foi centrifugado a 2700 rotações por minuto (rpm) por 12 minutos (força centrífuga relativa máxima no tubo– RCF-max = 701G) na centrífuga Intra-Spin[™] (33° de angulação do rotor, 55 mm de raio na altura do coágulo, 86 mm de raio máximo, Intra-Lock[®] International, Inc, Boca Raton, FL, USA). Após esse procedimento, foi possível observar três diferentes camadas: uma mais superficial, correspondente ao plasma acelular; uma faixa inferior, correspondente às células da série vermelha do sangue; e uma intermediária, correspondente à L-PRF. O coágulo de L-PRF foi, então, coletado com instrumentais e kits específicos (Tissue Regeneration Kit and Xpression[™] Box, Intra-Lock[®] International, Inc, Boca Raton, FL, USA) para aplicação no DTC dos animais no grupo L-PRF (Figura 1).

3.5.2 Preparo da A-PRF

O preparo da A-PRF também foi realizado de acordo com uma adaptação do protocolo de Choukroun et al. (CHOUKROUN et al., 2001), similar ao protocolo da L-PRF, à exceção da velocidade e tempo da centrifugação, que nessa técnica é de 1500 rpm durante 14 minutos (RCF-max = 216G). O coágulo de A-PRF foi também coletado através de uma pinça com instrumentais e kits específicos (Tissue Regeneration Kit and Xpression[™] Box, Intra-Lock[®] International, Inc.) (Figura 1).

Material e Métodos | 47



Figura 1 – Fotografias representando o preparo das matrizes de PRF. A – Coleta de sangue usando técnica de punção cardíaca; B – Inserção do tubo com sangue coletado na centrífuga; C – Tubo após centrifugação – sangue separado em camadas; D – Pinçamento da matriz de PRF; E – Separação da matriz de PRF da faixa rica em células vermelhas com auxílio de uma tesoura; F – Matriz de agregado plaquetário removida do tubo. Todos os procedimentos são idênticos para ambos os grupos A-PRF e L-PRF, exceto o protocolo de centrifugação.

3.6 Caracterização das matrizes de L-PRF e A-PRF

Uma adaptação do estudo de Miron et al. (2019) foi realizada com objetivo de investigar a localização precisa de plaquetas e leucócitos após centrifugação do sangue de ratos para preparo de L-PRF e A-PRF. Foi realizada coleta de 4 mL de sangue em animais que não foram utilizados nos grupos experimentais deste estudo em tubos contendo solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 5% como anticoagulante. Em seguida, foi realizada uma pipetagem de 500µL dessa amostra inicial, que foi

considerada controle (A0). Após centrifugação do sangue coletado, seguindo os protocolos para preparo de L-PRF e A-PRF (conforme descrito anteriormente), foram pipetadas porções sequenciais do sangue centrifugado, em intervalos de 350µL, totalizando 10 amostras por tubo (desde a camada mais superficial até o fundo do tubo - A1/A10). Estas amostras foram armazenadas em tubos eppendorf e encaminhadas para análise hematológica (Figura 2). Foram calculadas a quantidade de plaquetas e leucócitos. Os dados foram agrupados como médias, desvios-padrão e proporções para descrição dos resultados.



Figura 2 - Caracterização das matrizes de agregados plaquetários produzidas em protocolos de alta e baixa velocidade de centrifugação. A – Pipetagem de 500 µL do sangue não centrifugado (A0) e de camadas sequenciais com intervalos de 350 µl a partir do sangue centrifugado (A1-A10). B – Amostras armazenadas em tubos eppendorf para análise hematológica. As setas pretas representam a camada de buffy coat.

3.7 Criação dos DTC

Após a tricotomia com lâmina de barbear e antissepsia com iodo na parte dorsal do crânio de cada animal, foi feita uma incisão semilunar na calvária com lâmina de bisturi 15C e um retalho de espessura total foi rebatido em direção posterior. Um DTC circular de 5 mm de diâmetro foi criado no osso parietal direito de cada animal com uma broca trefina (Broca Trefina 5 mm, Neodent[®], Curitiba, PR, Brasil) acoplada em um contra-ângulo em baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. Como a calota craniana de ratos adultos é pouco espessa, todo cuidado foi tomado para que a dura-máter cerebral não fosse atingida durante a craniotomia. O segmento ósseo, de espessura total no osso parietal, foi removido delicadamente com uso de uma espátula Hollemback (esculpidor Hollemback #3SS, SSWHITE[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil), mantendo-se a integridade da dura-máter e do encéfalo (Figura 3).

Material e Métodos | 50



Figura 3 – Criação do DTC. A – Incisão semilunar na calvária do animal; B – Retalho de espessura total; C – Criação do defeito ósseo com broca trefina de 5 mm de diâmetro; D – Corte do defeito ósseo finalizado; E – segmento ósseo sendo removido; F – Defeito ósseo finalizado e dura-máter íntegra.

Com auxílio de uma sonda periodontal milimetrada (sonda milimetrada Carolina do Norte #15 ponta única, Hu-Friedy[®], Chicago, IL, EUA), duas marcações circulares foram feitas 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 aspiração. Posteriormente, essas marcações foram preenchidas com amálgama (Amalgam gs-80, SDI Limited, Bayswater, Australia), com auxílio de um sugador de alta potência, de forma a evitar o extravasamento do material para dentro do

DTC. Estas marcações são úteis para a identificação do centro do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial histomorfométrico (Figura 4).



Figura 4 – Marcações de amálgama. A – Criação da marcação com broca diamantada esférica; B – Marcações posicionadas a 2 mm da margem do DTC, tangenciando sua linha média. C – Marcações de amálgama finalizadas.

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo. Nos Grupos L-PRF e A-PRF, foi preenchido com L-PRF e A-PRF, respectivamente. As membranas obtidas após compressão foram divididas aproximadamente ao meio com auxílio de uma tesoura cirúrgica. Para preencher o defeito, foi utilizada a metade mais próxima das células vermelhas, por ser a parte com maior quantidade de FC, plaquetas e leucócitos (MIRON; CHAI; *et al.*, 2019, 2020), e esta foi picotada com auxílio de tesoura cirúrgica para melhor se adaptar ao leito cirúrgico.

Os volumes de L-PRF e A-PRF foram padronizados para todos os animais: utilizando uma seringa de 1 mL adaptada, foram mensurados 0,01 mL de L-PRF ou A-PRF (dependendo do grupo) para aplicação nos DTC criados (Figura 5). Com auxílio de um calcador, os pedaços de membrana foram aplicados de forma a preencher todo o DTC, e a outra metade da membrana foi utilizada para cobrir o defeito e impedir o extravasamento do material. Em seguida, os tecidos moles foram reposicionados e suturados em ponto simples com fio de sutura seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Nova Jersey, EUA) para se obter um fechamento primário da ferida (Figura 6).

No pós operatório, os animais receberam cloridrato de tramadol 20mg/Kg (Cronidor 2%, Agener União[®], Apucarana, PR, Brasil) e flunixin meglumina 2mg/kg (Aplonal 1%, König[®], Buenos Aires, Argentina) a cada 12 horas durante dois dias, via intramuscular.



Figura 5 – Produção das membranas de agregados plaquetários para preenchimento dos defeitos ósseos. A – Matriz de agregado plaquetário em dispositivo compressor; B – Matriz de agregado plaquetário após alguns minutos de compressão; C e D – Secção da membrana de agregado plaquetário produzida; E – Parte da membrana contendo porção próxima à camada de células vermelhas sendo picotada; F – Seringa adaptada para padronização do volume de agregado plaquetário a ser utilizado no preenchimento dos defeitos ósseos.



Figura 6 – Colocação das membranas de agregados plaquetários nos defeitos ósseos. A – Volume padronizado de agregado plaquetário sendo levado ao defeito ósseo; B – Acomodação do agregado plaquetário no defeito ósseo; C – Defeito ósseo preenchido com agregado plaquetário picotado e na forma de membrana; D – Sutura do retalho total com pontos interrompidos simples.

3.8 Eutanásia

Todos os animais foram submetidos à eutanásia 35 dias após a cirurgia. A eutanásia foi realizada pela administração de Ketamina 10% (80mg/kg) e Xilazina 2% (10mg/kg) para anestesia, com posterior finalização em câmara de CO₂ com fluxo controlado. A área do defeito cirúrgico original e dos tecidos circunjacentes na calvária dos animais foram removidos em bloco com disco diamantado e depositados em frascos com formaldeído 10% para fixação por 24 horas. Em seguida, foram lavados em água corrente por mais 24 horas, e, então, identificados e armazenados em cassetes dentro de frascos com álcool 70°.

3.9 Análise com microtomografia computadorizada por transmissão de raios X (micro-CT)

Espécimes não-desmineralizados das calvárias foram analisados por um sistema de micro-CT cone-beam SkyScan 1172 (SkyScan N.V., Kontich, Bélgica), gerando imagens em três dimensões (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 em cada VOI, foi utilizada uma escala de cinza (0-255), adotando-se o intervalo (*threshold*) entre 80 (mínimo) e 170 (máximo) de forma que somente o tecido ósseo trabecular presente na calvária ficasse demarcado.

Utilizando o software CT-Analyzer® v.1.13.5.1+ (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA), os seguintes parâmetros estruturais foram avaliados em cada VOI por um examinador calibrado (L.M.P.S):

(1) Volume ósseo (VO) – percentual do VOI preenchido por tecido ósseo;

(2) Porosidade (PO) – percentual de porosidade presente no tecido ósseo determinado no VOI;

(3) Número de trabéculas (Tb.N) – número (mm-1) de trabéculas ósseas presentes no VOI;

(4) Espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) – total de espaços (mm) entre as trabéculas ósseas presentes no VOI;

(5) Espessura das trabéculas (Tb.Th) – espessura (mm) médias das trabéculas ósseas presentes no VOI.

Reconstruções renderizadas das secções microtomográficas das calvárias foram também obtidas.

3.10 Análise Histomorfométrica

As peças fixadas em formol e armazenadas em álcool 70° foram descalcificadas em solução de EDTA a 4%. Após descalcificação, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se as marcações de amálgama como referência (Figura 7A). Cada uma dessas marcações foi feita a 2 mm da margem do defeito cirúrgico. Cortes transversais foram, então, realizados tangenciando cada uma das duas marcações de amálgama (Figura 7B). Dessa forma, foi possível determinar os limites do defeito cirúrgico e cada uma das peças ficou com tamanho de 9 mm na direção longitudinal. Após um período adicional de descalcificação, as peças foram, então, processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais com 4 μ m de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Dois cortes de cada animal foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina para análises com microscopia de luz. Em cada corte foram analisadas as características histopatológicas do tecido ósseo neoformado.



Figura 7 – Representação esquemática da redução dos espécimes de calvária. **A** – Corte longitudinal (linha tracejada em vermelho) de cada espécime em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usandose as marcações de amálgama como referência. **B** – Corte transversal (linha tracejada em verde), tangenciando as marcações de amálgama. **C** - Bloco com 9 mm de extensão longitudinal pronto para ser incluído em parafina.

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 (LAS EZ versão 4.1.0, Leica Mycrosystems GmbH, Wetzlar, Heidelberg, Alemanha). Foi selecionado 1 corte histológico da área central do defeito cirúrgico de cada espécime. Cada corte histológico foi fotografado por um microscópio trinocular para campo claro e fluorescência (modelo DMLB, Leica Mycrosystems GmbH, Wetzlar, Heidelberg, Alemanha) com objetiva de 1,6x acoplado a uma câmera (DFC300FX, Leica Mycrosystems GmbH, Wetzlar, Heidelberg, Alemanha). 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 8). 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 acopladas à mesma câmera utilizadas na análise histométrica.



Figura 8 – 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) é representada pela média aritmética simples obtida a partir das alturas das bordas ósseas remanescentes anterior (CD) e posterior (CE) ao defeito criado. A largura da AT é de 5 mm, correspondente à largura do defeito original. Aumento = 1,6x. **B** - aproximação do retângulo AT representado em A. A Área de Osso Neoformado (AON) foi calculada como o percentual de osso neoformado (circulado em preto) em relação à AT.

3.11 Variáveis de resultado

Foi definida como variável primária deste estudo as diferenças entre os grupos obtidas na análise microtomográfica (VO). Os demais parâmetros microtomográficos de microarquitetura óssea e histomorfométricos foram definidos como variáveis secundárias.

3.12 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 e histomorfométricas foram realizadas por examinadores calibrados. Para calibração dos examinadores, um terço da amostra foi avaliada em dois períodos de tempo 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 VO e AON. Valores de CCI maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração dos examinadores.

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

Resultados

Resultados

4.1 Animais

Os animais se mantiveram saudáveis ao longo de todo período experimental, sem mudanças de comportamento ou perda significativa de peso. Não houve sinais de infecção após a intervenção.

4.2 Caracterização das matrizes de PRF

Os gráficos com os resultados de número e distribuição de leucócitos e de plaquetas estão representados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. O número de leucócitos (Figura 9A) na L-PRF estava mais concentrado na camada 5, que representa a porção de *buffy coat*. Aproximadamente 40% dos leucócitos do tubo estavam concentrados nessa camada (Figura 10A), a qual apresentava quantidade de leucócitos 5 vezes maior do que aquela observada na amostra controle (A0). Não foram observados leucócitos nas quatro primeiras camadas. Por outro lado, na A-PRF, os leucócitos ficaram mais homogeneamente distribuídos pelo tubo, ainda que mais concentrados na camada de *buffy coat*. Em relação à amostra controle (A0), houve uma concentração 3 vezes maior de leucócitos na camada 5, e duas vezes maior na camada 8. Não foram encontrados leucócitos nas duas primeiras camadas do tubo.

Em relação às plaquetas (Figura 9B), na L-PRF ficaram concentradas na camada 5, havendo um aumento de oito vezes em relação à amostra controle. Isso significa que aproximadamente 60% do total de plaquetas do tubo estava concentrado nessa camada (Figura 10B). Diferentemente dos leucócitos, foram encontradas plaquetas por todo o tubo, ainda que em número bem reduzido nas quatro camadas iniciais e nas quatro camadas finais. Na A-PRF, as plaquetas se encontraram distribuídas por todo o tubo, ainda que concentradas nas camadas 4 e 5. Na L-PRF, o número de plaquetas era 2 vezes menor na camada de *buffy coat* (A5) comparativamente à A-PRF. Por outro lado, na A-PRF houve um número 70 vezes maior de plaquetas na camada A4 em relação à L-PRF. Juntas, a quarta e quinta camadas abrigaram 55% do total de plaquetas do tubo de A-PRF.

Foram encontradas plaquetas por todo o tubo, em número expressivamente maior em relação às mesmas camadas na L-PRF, o que indica uma distribuição mais homogênea das plaquetas pelo tubo na A-PRF.



Figura 9 – Número de Leucócitos (A) e Plaquetas (B) na amostra de sangue não centrifugado (amostra controle - A0) e após centrifugação (camadas A1 a A10). A5 = amostra correspondente à camada de buffy coat.



Figura 10 – Gráficos representando a distribuição percentual de Leucócitos (A) e Plaquetas (B) em todas as camadas (A1-A10) após centrifugação do sangue para preparo de L-PRF e A-PRF. A5 = amostra correspondente à camada de buffy coat.

A-PRF

L-PRF

4.3 Análise microtomográfica

Na Figura 11, podem ser visualizadas as reconstruções renderizadas das calvárias.

O grupo L-PRF apresentou valores de VO (p<0,05), Tb.N (p<0,05) e Tb.Th (p<0,05) significativamente maiores que aqueles do grupo C, bem como valores significativamente menores de PO (p<0,05). Não houve diferença estatisticamente significante para a variável Tb.Sp (p>0,05). O grupo A-PRF também apresentou valores de VO (p<0,05), Tb.N (p<0,01) e Tb.Th (p<0,05) significativamente maiores que aqueles do grupo C, bem como valores significativamente menores de PO (p<0,05) e Tb.Sp (p<0,05). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos A-PRF e L-PRF para todos os parâmetros microtomográficos avaliados (p>0,05). Os gráficos das variáveis estudadas estão representados na Figura 12.



Figura 11 – Reconstruções renderizadas das calvárias dos grupos Controle (A), L-PRF (B) e A-PRF (C). Tamanho do pixel = 15,9µm. O círculo azul representa os limites do DTC.



Figura 12 – Gráficos representando medianas, intervalo interquartil e valores mínimos e máximos de VO, PO, Tb.N, Tb.Sp e Tb.Th na análise microtomográfica. Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para cada variável analisada (p < .05).

4.4 Análise histomorfométrica

4.4.1 Análise histométrica

As médias e desvios-padrão de AT e AON, bem como o resultado das comparações intergrupos, estão representadas na Figura 13. Os Grupos L-PRF e A-PRF apresentaram valores de AON significativamente maiores do que os valores do Grupo C (p<0,05 e p<0,01, respectivamente). Apesar de os valores de AON serem superiores na A-PRF, não foi observada diferença significativa entre os Grupos L-PRF e A-PRF (p>0,05). Na análise dos valores de AT, não foi observada diferença significativa entre os grupos (p>0,05), o que demonstra a fidelidade da metodologia utilizada para delimitação histológica da área do defeito cirúrgico originalmente criado.



Figura 13 – Médias e desvios-padrão para AT (1) e AON (2) para os grupos C, L-PRF e A-PRF, com os resultados das comparações entre os grupos. * indica diferença estatisticamente significante entre os grupos (p < 0,05).

4.4.2 Análise histopatológica

Grupo Controle

Praticamente toda a extensão do defeito cirúrgico estava ocupada por tecido conjuntivo composto por fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida

(Figura 14A). Em todos os espécimes, a espessura deste tecido conjuntivo era bem inferior à do tecido ósseo original da calota. Observou-se pequena quantidade de tecido ósseo neoformado junto às margens do defeito cirúrgico, exibindo pequeno número de osteoblastos em suas bordas (Figura 15A, B). O infiltrado inflamatório geralmente era leve, e encontrava-se distribuído ao longo do defeito.

Grupo L-PRF

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 14B). Em alguns espécimes, também se observou neoformação óssea ao longo do defeito, formando ilhotas (Figura 15B, C), assim como zonas de matriz osteóide. 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. Observou-se significativa presença de vasos sanguíneos ao longo de toda sua extensão.

Grupo A-PRF

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 e do Grupo L-PRF (Figura 14C e 15E, F). O tecido ósseo neoformado exibia pequeno número de osteoblastos em suas bordas. Alguns espécimes também apresentaram zonas de matriz osteóide ao longo do defeito. 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. Observou-se significativa presença de vasos sanguíneos ao longo de toda a extensão do defeito ósseo.



Figura 14 – Imagem panorâmica dos cortes histológicos. A – Grupo controle; B – Grupo L-PRF; C – Grupo A-PRF. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original: 1.6x.



Figura 15 – Imagens representativas de cortes histológicos; Grupos C (A, B); L-PRF (C, D); A-PRF (E, F). ON = osso neoformado; cabeça de seta preenchida em cor preta = vasos sanguíneos; seta não preenchida = matriz osteóide; seta preenchida em cor preta = margens do defeito cirúrgico original; *As imagens C, D e F representam porções distantes das margens do defeito cirúrgico. Coloração: Hematoxicilina e Eosina. Aumento original: 10x (A, C, E); 20x (B, D, F).

Discussão

Discussão

A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é um biomaterial autólogo, minimamente invasivo e aplicável clinicamente, além de ter resultados relevantes em neoformação óssea, sendo assim, um biomaterial importante quando se trata de regeneração óssea (ACAR *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2012; MIRON *et al.*, 2017; PADILHA *et al.*, 2018). A PRF de centrifugação lenta, ou PRF avançada (A-PRF) também tem mostrado resultados promissores na literatura *in vitro* (EL BAGDADI *et al.*, 2019; FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017; KOBAYASHI *et al.*, 2016; MIRON; XU; *et al.*, 2020). O presente estudo é o primeiro a comparar os efeitos da A-PRF e L-PRF na neoformação óssea em DTC criados em ratos. No presente estudo, tanto a L-PRF quanto a A-PRF mostraram-se alternativas terapêuticas promissoras na regeneração óssea dos defeitos cirúrgicos e aumentaram a qualidade do osso neoformado, tornando-o mais denso.

No presente estudo, foi utilizado um modelo experimental capaz de garantir um bom preparo das matrizes de L-PRF e A-PRF, bem como um local de teste capaz de evidenciar seu real potencial na neoformação óssea. No que se refere ao protocolo de coleta de sangue, é possível coletar até 15% do volume total do sangue de um rato sem causar sofrimento ao animal (HARKNESS; WAGNER, 2010; HOFF, 2000). Considerando que o volume sanguíneo total de um roedor equivale a 6 a 8% de seu peso, e que a média de peso dos animais do presente estudo foi 403g (dados não mostrados), a coleta de 3 mL de sangue dos animais estava dentro dos limites fisiológicos aceitáveis. A coleta sanguínea em ratos pode ser obtida de diversos locais anatômicos, como das veias da cauda, femoral e jugular. Esse procedimento é considerado seguro para os ratos com recuperação relativamente rápida (HOFF, 2000). No entanto, esses locais não permitem coleta de quantidade suficiente de sangue em tempo hábil para a técnica de PRF, uma vez que o tempo entre a coleta e a centrifugação deve ser de no máximo 90 segundos, sob o risco de comprometer a qualidade da membrana (MIRON; DHAM; et al., 2019). A preocupação com a rapidez da coleta também tem como objetivo evitar a coagulação precoce no tubo, uma vez que esta técnica não usa anticoagulantes (DOHAN

EHRENFEST *et al.*, 2010; MIRON; DHAM; *et al.*, 2019). A técnica de punção cardíaca, utilizada no presente estudo, por sua vez, possibilitou a coleta de uma quantidade significativa de sangue em um tempo satisfatório. Dessa forma, foi possível, inclusive, o preparo e a avaliação de membranas autógenas de agregados plaquetários, à semelhança do protocolo clínico utilizado em humanos, uma vez que o uso de sangue de animais doadores ou de outra espécie animal poderia desencadear reações imunológicas e possíveis vieses nos resultados obtidos (GHANAATI *et al.*, 2018).

Ainda considerando o modelo experimental desse estudo, é importante salientar que a influência dos diferentes protocolos de PRF na cicatrização óssea foi avaliada em defeitos de tamanho crítico. Os DTC são considerados ideais para avaliação da influência de um material na cicatrização óssea, pois um fechamento completo da ferida somente é possível através de um material osteocondutor, osteogênico e osteoindutor (BOSCH; MELSEN; VANGERVIK, 1998). Confirmou-se o caráter crítico do defeito neste estudo pela discreta formação óssea, limitada às margens do defeito, em todos os espécimes do grupo controle, e fechamento incompleto dos defeitos. Uma vez que os defeitos ósseos dos grupos L-PRF e A-PRF foram preenchidos somente com L-PRF e A-PRF, respectivamente, e que DTC foram usados, pode-se concluir que o aumento significativo da neoformação óssea observado nesses grupos foi devido às propriedades biológicas desses biomateriais. Possivelmente, esse aumento da neoformação óssea ocorreu devido à apresentação imediata de células necessárias à cicatrização, como plaquetas e neutrófilos, além do fornecimento de FC naturais que são de extrema importância na regeneração óssea (CHOUKROUN et al., 2006a; DOHAN et al., 2006a; DOHAN EHRENFEST et al., 2010; KANG et al., 2011). Estudos prévios já demonstraram que o uso de L-PRF pode potencializar a cicatrização de DTC em calvárias de coelhos saudáveis (ACAR et al., 2015; PRIPATNANONT et al., 2013), em DTC de ratos saudáveis (SINDEL et al., 2017) e também em DTC de ratos com osteoporose (ENGLER-PINTO et al., 2019). É importante ressaltar que a estrutura de PRF age como um bioesqueleto natural e pode diminuir a infiltração de tecido conjuntivo fibroso. Neste estudo, após preenchimento do DTC dos grupos L-PRF e A-PRF com matrizes picotadas, matrizes intactas de PRF foram colocadas sobre os defeitos criados, a fim de evitar o deslocamento do material colocado no interior do defeito, uma vez que nenhuma membrana para regeneração óssea guiada (ROG) foi utilizada. Cabe aqui enfatizar que as matrizes de PRF não possuem a capacidade de manter espaços por tempo suficiente e impedir a invaginação de células do epitélio e do tecido conjuntivo para o interior de defeitos agindo como uma verdadeira barreira para a ROG devido à sua rápida degradação (ISOBE *et al.*, 2017; KAWASE *et al.*, 2015).

No presente estudo, verificou-se uma concentração maior tanto de leucócitos quanto de plaquetas na camada de buffy coat do tubo de L-PRF, enquanto houve uma maior distribuição dessas células ao longo do tubo de A-PRF, o que corrobora os achados de estudos prévios que caracterizaram matrizes de PRF produzidas de acordo com o protocolo de baixas velocidades de centrifugação (EL BAGDADI et al., 2019; MIRON; CHAI; et al., 2019; SATO et al., 2020). Então, no presente estudo, as matrizes de L-PRF e A-PRF apresentaram quantidades e distribuição de células diferentes, seguindo os padrões observados em matrizes produzidas com esses protocolos a partir de sangue humano. Embora os níveis de fatores de crescimento presentes em ambas as matrizes não tenham sido avaliados, pode-se inferir que diferenças entre elas neste quesito devem ter ocorrido, uma vez que há uma relação entre a quantidade de células presentes nos agregados plaquetários e os níveis de fatores de crescimento presentes (ACAR et al., 2015; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que protocolos de baixa velocidade de centrifugação favorecem um aumento na liberação de fatores de crescimento nos coágulos de PRF quando comparados aos protocolos de alta velocidade de centrifugação (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; KOBAYASHI et al., 2016).

Este estudo de prova de conceito não demonstrou diferenças significativas na quantidade de neoformação óssea entre os grupos L-PRF e A-PRF (análises de VO e AON). Embora o potencial de agregados plaquetários no processo de neoformação óssea tenha ficado bastante evidente (os defeitos tratados com ambas as matrizes apresentaram maior VO e AON quando comparados aos defeitos controle), variações nos protocolos de produção de matrizes de PRF parecem não ter impactado os resultados biológicos. Inúmeras vantagens advindas de redução da velocidade de centrifugação para o preparo de matrizes de PRF foram ressaltadas em diversos estudos *in vitro* (EL BAGDADI *et al.*, 2019; FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017; GHANAATI *et al.*, 2014; KOBAYASHI *et al.*, 2016). Apenas um estudo *in vivo* comparou o potencial regenerativo de matrizes de PRF produzidas em tecidos subcutâneos de ratos (KUBESCH *et al.*, 2019). Os resultados deste estudo (KUBESCH *et al.*, 2019) demonstraram que matrizes de PRF
produzidas com protocolos de alta centrifugação tinham uma estrutura de fibrina densa e estável que evitou a penetração do tecido hospedeiro. Por outro lado, a PRF produzida em protocolo de baixa velocidade de centrifugação era mais porosa e apresentou maior taxa de vascularização quando implantada em tecido subcutâneo de rato. Essas descobertas destacaram a possibilidade de se alterar o potencial regenerativo de matrizes de PRF modificando sua estrutura e composição. O presente estudo é o primeiro a comparar o potencial de matrizes de PRF produzidas por meio de protocolos de alta e de baixa velocidades de centrifugação na neoformação óssea.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na quantidade de neoformação óssea entre os grupos L-PRF e A-PRF, é importante ressaltar alguns aspectos observados na análise histológica qualitativa e na análise da microarquitetura óssea dos grupos experimentais. Quando comparados aos defeitos tratados com L-PRF, os defeitos tratados com A-PRF apresentaram maior quantidade de matriz osteóide e um menor espaçamento entre as trabéculas ósseas. Estudos com tempos maiores de acompanhamento e análises imunohistoquímicas seriam úteis para melhor explicar os resultados obtidos e evidenciarem os possíveis impactos moleculares decorrentes de modificações na composição de matrizes de PRF.

É importante considerar que, no presente estudo, as matrizes de PRF foram utilizadas isoladamente, diferentemente das diversas situações clínicas nas quais a mesma é associada a enxertos ósseos e biomateriais (ACAR *et al.*, 2015; CLARK *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2015; SINDEL *et al.*, 2017). Engler-Pinto et al. (2019) demonstraram menos volume ósseo nos defeitos preenchidos com L-PRF sozinho do que em defeitos preenchidos apenas com enxerto ósseo xenógeno. Os autores argumentaram que esse resultado poderia ser explicado considerando a taxa de degradação de coágulos de L-PRF. Enquanto o coágulo de L-PRF pode ser rapidamente degradado, as partículas de Bio-Oss[®] são lentamente reabsorvidas e podem atuar como um andaime para a migração de células e formação de novos vasos sanguíneos, que é um passo fundamental para uma regeneração óssea previsível e eficiente (ENGLER-PINTO *et al.*, 2019). Dessa forma, novos estudos comparando matrizes de A-PRF e L-PRF associadas a enxertos ósseos e biomateriais são importantes. Testes em animais de escala filogenética superior também devem ser realizados, assim como testes em animais com comprometimentos sistêmicos e períodos mais longos de acompanhamento. Análises imunohistoquímicas podem ser

importantes para conclusões a respeito da velocidade de neoformação óssea e o potencial futuro dos tecidos presentes para a formação de novo osso.

Conclusão

Conclusão

Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que i) ambas L-PRF e A-PRF potencializaram a neoformação óssea de DTC em calvária de ratos; ii) ambos os protocolos de L-PRF e A-PRF não produziram matrizes com impactos biológicos diferentes na quantidade de novo osso formado.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ACAR, A. H. *et al.* Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 606–614, abr. 2015.

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 trail. **Acta Odontologica Scandinavica**, Stockholm, v. 74, n. 1, p. 36–43, jan. 2016.

ALI, S.; BAKRY, S. A.; ABD-ELHAKAM, H. Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Augmentation: A Systematic Review. Journal of Oral Implantology, Abington, v. 41, n. 6, p. 746–753, dez. 2015.

ALZAHRANI, A. A.; MURRIKY, A.; SHAFIK, S. Influence of platelet rich fibrin on post-extraction socket healing: A clinical and radiographic study. **The Saudi Dental Journal**, Riyadh, v. 29, n. 4, p. 149–155, out. 2017.

ASAKA, T. *et al.* Platelet-rich fibrin may reduce the risk of delayed recovery in tooth-extracted patients undergoing oral bisphosphonate therapy: a trial study. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 21, n. 7, p. 2165–2172, set. 2017.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VANGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **The Journal of Craniofacial Surgery**, Burlington, v. 9, n. 4, p. 310–316, jul. 1998.

CANELLAS, J. V. d. S. *et al.* Platelet-rich fibrin in oral surgical procedures: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New York, v. 48, n. 3, p. 395–414, mar. 2019.

CANO-DURAN, J. *et al.* The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). Journal of Clinical and Experimental Dentistry, Spain, v. 9, n. 8, p. e1051–e1059, ago. 2017.

CHOUKROUN, J. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology,** St. Louis, v. 101, n. 3, p. e56–e60, mar. 2006a.

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

CHOUKROUN, J. *et al.* Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. **Implantodontie**, Megève, v. 42, p. 55–62, jan. 2001.

CLARK, D. *et al.* Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 89, n. 4, p. 379–387, abr. 2018.

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

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

DOHAN, D. M. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 101, n. 3, p. e51–e55, mar. 2006c.

DOHAN EHRENFEST, D. M. *et al.* Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 81, n. 4, p. 546–555, abr. 2010.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSON, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 158–167, mar. 2009.

EL BAGDADI, K. *et al.* Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, Munich, v. 45, n. 3, p. 467–479, jun. 2019.

ELGENDY, E.; ABO SHADY, T. Clinical and radiographic evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite with or without platelet-rich fibrin membrane in the treatment of periodontal intrabony defects. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Mumbai, v. 19, n. 1, p. 61, fev. 2015.

ENGLER-PINTO, A. *et al.* 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. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 30, n. 10, p. 962–976, out. 2019.

EREN, G.; ATILLA, G. Platelet-rich fibrin in the treatment of localized gingival recessions: a splitmouth randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 18, n. 8, p. 1941–1948, nov. 2014.

ESHGHPOUR, M. *et al.* Effect of Platelet-Rich Fibrin on Frequency of Alveolar Osteitis Following Mandibular Third Molar Surgery: A Double-Blinded Randomized Clinical Trial. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 72, n. 8, p. 1463–1467, ago. 2014.

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

GHANAATI, S. *et al.* A Proof of the Low Speed Centrifugation Concept in Rodents: New Perspectives for *In Vivo* Research. **Tissue Engineering Part C: Methods**, New Rochelle, v. 24, n. 11, p. 659–670, nov. 2018.

GHANAATI, S. *et al.* Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. **Journal of Oral Implantology**, Abington, v. 40, n. 6, p. 679–689, 1 dez. 2014.

HABESOGLU, M. *et al.* Platelet-Rich Fibrin Plays a Role on Healing of Acute-Traumatic Ear Drum Perforation. Journal of Craniofacial Surgery, Burlington, v. 25, n. 6, p. 2056–2058, nov. 2014.

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

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

HE, L. *et al.* 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 Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 108, n. 5, p. 707–713, nov. 2009.

HIREMATH, H. *et al.* Use of second-generation platelet concentrate (platelet-rich fibrin) and hydroxyapatite in the management of large periapical inflammatory lesion: A computed tomography scan analysis. **Indian Journal of Dental Research**, Ahmedabad, v. 25, n. 4, p. 517–20, ago. 2014.

HOAGLIN, D. R.; LINES, G. K. Prevention of Localized Osteitis in Mandibular Third-Molar Sites Using Platelet-Rich Fibrin. International Journal of Dentistry, Cairo, v. 2013, p. 1–4, abr. 2013.

HOFF, J. Methods of Blood Collection in the Mouse. Lab Animal, New York, v. 29, n. 10, p. 47–53, nov. 2000.

ISOBE, K. *et al.* Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). **International Journal of Implant Dentistry**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 17, dez. 2017.

JAYALAKSHMI, K. B. *et al.* Platelet-Rich Fibrin with β -Tricalcium Phosphate — A Noval Approach for Bone Augmentation in Chronic Periapical Lesion: A Case Report. **Case Reports in Dentistry**, Cairo, v. 2012, p. 1–6, 2012.

JENNE, C. N.; URRUTIA, R.; KUBES, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 254–261, jun. 2013.

JOHNS, D. *et al.* Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion. **Journal of Conservative Dentistry**, Amritsar, v. 16, n. 3, p. 261, 2013.

KANAYAMA, T. *et al.* Crestal Approach to Sinus Floor Elevation for Atrophic Maxilla Using Platelet-Rich Fibrin as the Only Grafting Material: A 1-Year Prospective Study. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 25, n. 1, p. 32–38, fev. 2016.

KANG, Y.-H. *et al.* Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. **Tissue Engineering Part A**, New Rochelle, v. 17, n. 3–4, p. 349–359, fev. 2011.

KANORIYA, D. *et al.* Mandibular Degree II Furcation Defects Treatment With Platelet-Rich Fibrin and 1% Alendronate Gel Combination: A Randomized Controlled Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 88, n. 3, p. 250–258, mar. 2017.

KARDE, P. *et al.* Comparative evaluation of platelet count and antimicrobial efficacy of injectable platelet-rich fibrin with other platelet concentrates: An in vitro study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Mumbai, v. 21, n. 2, p. 97–101, abr. 2017.

KAWASE, T. *et al.* The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied biomaterials**, Hoboken, v. 103, n. 4, p. 825–31, maio 2015.

KOBAYASHI, E. *et al.* Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 20, n. 9, p. 2353–2360, dez. 2016.

KOUR, P. *et al.* Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of platelet-rich plasma, plateletrich fibrin, and injectable platelet-rich fibrin on the standard strains of Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans. **Contemporary Clinical Dentistry**, Mumbai, v. 9, n. Suppl 2, p. S325–S330, set. 2018.

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

KUMAR, N. *et al.* Evaluation of Treatment Outcome After Impacted Mandibular Third Molar Surgery With the Use of Autologous Platelet-Rich Fibrin: A Randomized Controlled Clinical Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 73, n. 6, p. 1042–1049, jun. 2015.

LANDESBERG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risks of using platelet rich plasma gel. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Philadelphia, v. 56, n. 9, p. 1116–1117, set. 1998.

LANDESBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Philadelphia, v. 58, n. 3, p. 297–300, mar. 2000.

LEE, J.-W. *et al.* Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, St. Louis, v. 113, n. 4, p. 459–463, abr. 2012.

LEKOVIC, V. *et al.* Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects: Xenograft and platelet-rich fibrin in intrabony defects. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 47, n. 4, p. 409–417, ago. 2012.

M. DOHAN EHRENFEST, D.; BIELECKI, T.; JIMBO, R.; *et al.* Do the Fibrin Architecture and Leukocyte Content Influence the Growth Factor Release of Platelet Concentrates? An Evidencebased Answer Comparing a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) Gel and a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF). **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 13, n. 7, p. 1145–1152, jun. 2012.

M. DOHAN EHRENFEST, D.; BIELECKI, T.; MISHRA, A.; *et al.* In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 13, n. 7, p. 1131–1137, jun. 2012.

MADURANTAKAM, P.; YOGANARASIMHA, S.; HASAN, F. K. Characterization of Leukocyteplatelet Rich Fibrin, A Novel Biomaterial. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, n. 103, p. 53221, set. 2015.

MARX, R. *et al.* Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 85, n. 6, p. 638–46, jun. 1998.

MATHUR, A. *et al.* Evaluation of intrabony defects treated with platelet-rich fibrin or autogenous bone graft: A comparative analysis. **European Journal of Dentistry**, Ankara, v. 9, n. 1, p. 100–108, mar. 2015.

MAZOR, Z. *et al.* Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A Radiologic and Histologic Study at 6 Months. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 80, n. 12, p. 2056–2064, dez. 2009.

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

MIRON, R. J.; CHAI, J.; *et al.* A novel method for harvesting concentrated platelet-rich fibrin (C-PRF) with a 10-fold increase in platelet and leukocyte yields. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 24, n. 8, p. 2819–2828, ago. 2020.

MIRON, R. J.; XU, H.; *et al.* Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 24, n. 3, p. 1171–1182, mar. 2020.

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

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

MIRON, R. J.; CHOUKROUN, J. (Org.). **Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/9781119406792. Acesso em: 2 abr. 2020.

MOURÃO *et al.* Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [*S. l.*], v. 42, n. 6, p. 421–423, dez. 2015.

MOURÃO, C. F. A. B. *et al.* The use of leukocyte- and platelet-rich fibrin in the management of soft tissue healing and pain in post-extraction sockets: A randomized clinical trial. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, Stuttgart, v. 48, n. 4, p. 452–457, abr. 2020.

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 44, n. 5, p. 649–655, maio 2015.

ÖNCÜ, E. The use of platelet-rich fibrin versus subepithelial connective tissue graft in treatment of multiple gingival recessions: a randomized clinical trial. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 265–271, abr. 2017.

ÖNCÜ, E.; ALAADDINOĞLU, E. The Effect of Platelet-Rich Fibrin on Implant Stability. **The** International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 578–582, maio 2015.

ÖNCÜ, E.; ERBEYOĞLU, A. Enhancement of Immediate Implant Stability and Recovery Using Platelet-Rich Fibrin. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, [*S. l.*], v. 39, n. 2, p. e58–e63, fev. 2019.

ÖNCÜ, E.; KAYMAZ, E. Assessment of the effectiveness of platelet rich fibrin in the treatment of Schneiderian membrane perforation. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 19, n. 6, p. 1009–1014, dez. 2017.

PADILHA, W. *et al.* Histologic Evaluation of Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin in the Inflammatory Process and Repair of Noncritical Bone Defects in the Calvaria of Rats. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 33, n. 6, p. 1206–1212, nov. 2018.

PANDA, S.; DORAISWAMY, J.; *et al.* Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, Richmond, v. 7, n. 1, p. 13–26, fev. 2016.

PANDA, S.; SANKARI, M.; *et al.* Adjunctive Effect of Autologus Platelet-Rich Fibrin to Barrier Membrane in the Treatment of Periodontal Intrabony Defects: **Journal of Craniofacial Surgery**, Burlington, v. 27, n. 3, p. 691–696, maio 2016.

PRIPATNANONT, P. *et al.* The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, Stuttgart, v. 41, n. 8, p. e191–e200, dez. 2013.

ROSS, R. *et al.* A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [*S. l.*], v. 71, n. 4, p. 1207–1210, 1 abr. 1974.

SÁNCHEZ, M. *et al.* Comparison of Surgically Repaired Achilles Tendon Tears Using Platelet-Rich Fibrin Matrices. **The American Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v. 35, n. 2, p. 245–251, fev. 2007.

SATO, A. *et al.* Distribution and quantification of activated platelets in platelet-rich fibrin matrices. **Platelets**, Edinburgh, , p. 1–6, dez. 2020.

SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Autologous Platelet-Rich Fibrin in the Treatment of Mandibular Degree II Furcation Defects: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 82, n. 10, p. 1396–1403, out. 2011a.

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. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 82, n. 12, p. 1705–1712, dez. 2011b.

SIMONPIERI, A. *et al.* Simultaneous Sinus-Lift and Implantation Using Microthreaded Implants and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material: A Six-Year Experience: **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 20, n. 1, p. 2–12, fev. 2011.

SINDEL, A. *et al.* Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. **Journal of Craniofacial Surgery**, Burlington, v. 28, n. 7, p. 1865–1868, out. 2017.

SOMANI, A.; RAI, R. Comparison of efficacy of autologous platelet-rich fibrin versus saline dressing in chronic venous leg ulcers: A randomised controlled trial. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, Mumbai, v. 10, n. 1, p. 8–12, mar. 2017.

TATULLO, M. *et al.* Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in Reconstructive Surgery of Atrophied Maxillary Bones: Clinical and Histological Evaluations. **International Journal of Medical Sciences**, Australia, v. 9, n. 10, p. 872–880, nov. 2012.

TEMMERMAN, A. *et al.* The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 43, n. 11, p. 990–999, nov. 2016.

TO, M. *et al.* Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. **Anatomical Science International**, Carlton, v. 94, n. 3, p. 238–244, jun. 2019.

TOFFLER, M. *et al.* Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. **The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry**, Saint James, v. 1, n. 6, p. 21–31, set. 2009.

TUNALI, M. *et al.* Clinical Evaluation of Autologous Platelet-Rich Fibrin in the Treatment of Multiple Adjacent Gingival Recession Defects: A 12-Month Study. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Chicago, v. 35, n. 1, p. 105–114, jan. 2015.

WHITMAN, H.; BERRY, L.; GREEN, M. Platelet Gel: An Autologous Alternative to Fibrin Glue With Applications in Oral and Maxillofacial Surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 55, n. 11, p. 1294–9, nov. 1997.

YAJAMANYA, S. *et al.* Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Mumbai, v. 20, n. 2, p. 151–6, abr. 2016.

ZHANG, Y. *et al.* 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. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, Stuttgart, v. 40, n. 4, p. 321–328, jun. 2012.

ZUMSTEIN, M. A. *et al.* Increased vascularization during early healing after biologic augmentation in repair of chronic rotator cuff tears using autologous leukocyte- and plateletrich fibrin (L-PRF): a prospective randomized controlled pilot trial. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, St. Louis, v. 23, n. 1, p. 3–12, jan. 2014.



AND a

Anexos

Anexo A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA - FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da neoformação óssea da fibrina rica em plaquetas avançadas (A-PRF) em defeitos críticos de calvárias em ratos", Protocolo nº 2019.1.752.58.4, 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 20/11/2019.

Vigência do Projeto	20/11/2019 a 20/04/2021	
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Wistar Hannover	
Nº de animais	22	-
Peso/Idade	350g - 400g / 3 meses	
Sexo	Macho	_
Origem	Biotério Central – PUSP-RP	

Ribeirão Preto, 20 de novembro de 2019.

Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA- FORF/USF

CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled "Evaluation of osseous neoformation of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) in critical sized calvarial defects in rats" Protocol n° 2019.1.752.58.4 under the responsibility of do Prof. Dr. Michel Reis Messora – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 20/11/2019.

Duration of the Project	20/11/2019 a 20/04/2021
Species/Lineage	Heterogenic Rats / Wistar Hannover
N ^e of animals	22
Weight / age	350g - 400g / 3 months-old
Gender	Male
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo

Ribeirão Preto, November 20th, 2019,

JAPOLY

Profa. Dra: Ándiara De Rossi Daldegan Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA- FORP/USP

Anexo B - Artigo científico para submissão no periódico Platelets.

Comparison of the effects of platelet aggregates produced by high and low-speed centrifugation protocols on the healing of critical-size defects in rat calvaria: A microtomographic and histomorphometric study

Lucia Moitrel Pequeno da Silva¹, Débora de Souza Ferreira Sávio², Felipe Correa de Ávila², Raphael Martini Vicente³, Gabriel Guerra David Reis¹, Ricardo Junior Denardi¹, Natacha Malu Miranda da Costa¹, Pedro Henrique Felix Silva¹, Carlos Fernando de Almeida Barros Mourão⁴, Richard J. Miron⁵, Michel Reis Messora¹*

1 Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontology – DCTBMF, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; 2 Department of Morphology, Physiology, and Basic Pathology – DMFPB, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP; 3 Department of Orthopedics and Anesthesiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; 4 Department of Sciences Integrated Surgical and Diagnostic at University of Genoa, Genova, Italy; 5 Department of Periodontology, University of Bern, Bern, Switzerland.

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

The current study evaluated the healing of critical-size defects (CSD) created in rat calvaria treated with platelet aggregates produced by high-speed (Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin - L-PRF) and low-speed (Advanced Platelet-Rich Fibrin - A-PRF) protocols of centrifugation. Twenty-four rats were divided into 3 groups: Control (C), L-PRF, and A-PRF. Five mm diameter CSD were created on the animals' calvaria. The defects of the L-PRF and A-PRF groups were filled with 0.01 ml of L-PRF and A-PRF,

respectively. The C group defects were filled with a blood clot only. All animals were euthanized on the 35th postoperative day. Histomorphometric and microtomographic analysis were then performed. The L-PRF and A-PRF groups had significantly higher bone volume and neoformed bone area than those of the C group, as well as lower bone porosity values (p<0.05). No significant differences were observed between A-PRF and L-PRF groups for the analyzed parameters. It can be concluded that i) L-PRF and A-PRF potentiated the healing of CSD in rat calvaria; ii) high and low-speed centrifugation protocols did not produce PRF matrices with different biological impacts on the amount of bone neoformation.

Keywords: platelet-rich fibrin; blood platelet, bone regeneration, fibrin

Introduction

In the early 2000s, Choukroun introduced the second generation of platelet aggregates terming them: platelet-rich fibrin (PRF).¹ In this platelet aggregate, the fibrinogen initially concentrates in the upper part of the tube, until the circulating thrombin transforms it into fibrin, forming a three-dimensional fibrin clot, rich in platelets and leukocytes, which stays concentrated in this network. The original Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) matrix was considered a natural biomaterial that includes all cells and cytokines essential for ideal healing. It also favors the microvascularization of the site and able to guide epithelial cell migration to its surface. From a clinical point of view, this biomaterial accelerates physiological healing, due to the presence of these molecules and its three-dimensional tetramolecular architecture.^{2,3}

L-PRF is used clinically in several fields of regenerative dentistry, such as postextraction socket filling,^{4,8} regeneration of periapical defects,^{9,11} maxillary sinus lifting,^{12,17} treatment of gingival recessions,^{18,20} treatment of intraosseous periodontal defects,^{21,22} and even in the management of bone osteonecrosis related to the use of bisphosphonates.^{23,24} The technique is considered an easy, short, low cost, and minimally invasive protocol which has demonstrated promising results. In this technique, the patient's peripheral blood is collected in specific tubes without anticoagulants and immediately centrifuged for 12 minutes at 2700 rotations per minute (rpm; ~700 RCFmax).¹

In some histological analyzes of L-PRF, it was possible to attest that most platelets were concentrated in the lower part of the matrix, close to the of red cell zone, with studies demonstrating that this lower portion of the PRF matrix is clinically more important than its upper counterpart.²⁵ This distribution pattern is due to the high centrifugation speed, which "pushed" platelets and leukocytes downward.²⁶ Aiming to standardize this distribution of platelets and leukocytes, the concept of "low-speed centrifugation" was created. Several new protocols emerged with this new concept in mind, including Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF).²⁶

For production of A-PRF, the technique is very similar to L-PRF, however the centrifugation speed is reduced to 1500 rpm (~208g) with a time period of 14 minutes.²⁶ This results in a solid matrix that, despite being smaller than L-PRF, has a more

homogeneous distribution of leukocytes throughout its matrix.^{27,28} Furthermore, more platelets and neutrophilic granulocytes are found in the distal portion of A-PRF, which can influence the differentiation of host macrophages and also matrix macrophages following its implantation.²⁶ In addition, it has a more porous structure with a larger interfibrous space, compared to L-PRF, which significantly facilitates cell penetration into the fibrin matrix, showing a significantly greater vascularization when compared to L-PRF ten days after its subcutaneous implantation in rats.^{26,28,30}

Engler-Pinto et al.³¹ demonstrated that L-PRF increased the amount of neoformed bone in critical-size defects (CSD) in rats with induced osteoporosis by ovariectomy and the osteoconductive potential of bovine bone grafts. To date, no study has evaluated whether platelet aggregates produced with lower centrifugation speeds, such as A-PRF, would be more beneficial for bone healing when compared to standard L-PRF. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the healing of CSD created in rat calvaria and treated with L-PRF or A-PRF.

Methods

Sample

The research was conducted only after the approval of the Ethics Committee on Animal Use of the School of Dentistry of Ribeirão Preto (FORP) of the University of São Paulo (USP) (Protocol nº 2019.1.752.58.4).

A power of 80% was adopted to detect a significant difference of 20% between groups with a confidence interval of 95% (α =0.05) and a standard deviation of 15%,³² considering changes in the means of neoformed bone as the primary variable. Thus, a sample size of 8 animals per group was adopted.

Experimental Model

Twenty-four 14-week old rats (Rattus norvegicus albinus, Wistar), weighing 350-450g (Central Animal Facility, FORP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil), were used. The animals were kept in a room with a 12-hr light/dark cycle and temperature between 22-24°C. They were fed with selected solid diet and water ad libitum. They were randomly divided into 3 experimental groups (n=8): Control (C), L-PRF, A-PRF. All analyses were performed by calibrated and blinders examiners.

To perform the experimental procedures (blood collection for the preparation of the platelet aggregates and creation of the CSD), the animals were initially induced in a chamber with 4% Isoflurane (Instituto Biochimico Ind. Farm. Ltda, Itatiaia, RJ, Brazil) and kept in inhalation anesthesia by mask with the same anesthetic at 1.5-3%. After anesthetic induction, morphine sulfate (Dimorf, Cristália® Prod. Quim. Farm. Ltd., Itapira, SP, Brazil; 8 mg/kg) and penicillin G-benzathine (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Animal Health®, Campinas, SP, Brasil; 24.000 UI/Kg) were administered intramuscularly. Subcutaneous injection of Flunixin Meglumine (Aplonal 1%, König®, Buenos Aires, Argentina; 2 mg/kg) was also administered.

Preparation of platelet aggregate matrices

Three mL of blood from each animal were collected through cardiac puncture (Figure 1A), using a 5 mL disposable syringe (Descarpack®, São Paulo, SP, Brazil). The blood drawn was transfered to a 5-mL silica-coated plastic tube (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and immediately processed to prepare L-PRF or A-PRF (Figure 1B).

The preparation of L-PRF and A-PRF were carried out according to the protocol proposed by Choukroun et al.²⁶ In the L-PRF group, the collected blood was centrifuged at 2700 rpm for 12 minutes (relative centrifugal force maximum – RCF-max = 701 g) in the Intra-SpinTM centrifuge (33° rotor angulation, 55 mm radius at the clot, 86 mm at the maximum, Intra-Lock® International, Inc, Boca Raton, FL, USA). In the A-PRF group, the sample was centrifuged at 1500 rpm for 14 minutes (RCF-max = 216 g). After centrifugation, it was possible to observe three different layers (Figure 1C): one more superficial, corresponding to the acellular plasma; a lower layer, corresponding to red blood cells; and an intermediate one, corresponding to the PRF matrix. The PRF clot was

then collected with specific instruments (Tissue Regeneration Kit and Xpression[™] Box, Intra-Lock[®] International, Inc, Boca Raton, FL, USA) for application in the CSD of the animals in their respective groups (Figure 1D, H).

Creation of CSD

After trichotomy and aseptic preparation, a semilunar incision was made in the scalp in the anterior region of the calvaria, and a full-thickness flap was folded back in the posterior direction (Figure 1E). A 5-mm diameter circular CSD was created in the right parietal bone of each animal with a trephine drill (Neodent®, Curitiba, PR, Brazil) coupled to a low-speed contra-angle under continuous irrigation with sterile saline (Figure 1F). The full-thickness bone segment was gently removed, maintaining the integrity of the dura mater and the encephalon (Figure 1G).

Two circular marks, 2 mm anterior and 2 mm posterior to the margins of the surgical defect, tangent to the longitudinal axis of the CSD, were made with a diamond drill (#1014, KG Sorensen®, Cotia, SP, Brazil) in a high-speed handpiece, under continuous irrigation with sterile saline and aspiration. These marks were filled with amalgam (Amalgam gs-80, SDI Limited, Bayswater, Australia) and will be useful for identifying the site of the original surgical defect during histological laboratory processing.

In the C group, the surgical defect was left empty to be filled only with blood clot. In the L-PRF group, it was filled with L-PRF, and in the A-PRF group, with A-PRF. The membranes obtained after compression were divided in half (Figure 1I). To fill the defect, the half closest to the red cells was used, which was cut into small pieces to better adapt to the surgical site (Figure 1J). The volumes of L-PRF and A-PRF were standardized (0.01 mL) for all animals using an adapted syringe (Figure 1K). After inserting the biomaterial into the CSD (Figure 1L), the other half of the membrane was used to cover the defect and prevent material extravasation (Figure 1M). Then, the soft tissues were repositioned and sutured (Figure 1N) in a simple stitch with 4-0 silk suture (Ethicon, Johnson & Johnson®, New Jersey, USA). In the post-operatory, the animals received tramadol hydrochloride (Cronidor 2%, Agener União®, Apucarana, PR, Brazil; 20mg/kg) and flunixin meglumine (Aplonal 1%, König®, Buenos Aires, Argentina; 2mg/kg) every 12 hours for two days, intramuscularly.

Characterization of platelet aggregate matrices

An adaptation of the work of Miron et al.³³ was performed with the aim of investigating the precise location of the cells within L-PRF and A-PRF tubes from rat blood. Four mL of blood was collected from animals that were not used in the experimental groups of this study in a tube containing ethylenediaminetetraacetic acid solution (EDTA; 5%) as an anticoagulant. Then, 500µL of this initial sample was pipetted, which was considered a control (A0).

After centrifugation, following the protocols of the L-PRF and A-PRF techniques (as described above), sequential layers were pipetted at 350µL intervals, totalizing 10 samples per tube (from the most superficial layer to the bottom of the tube - A1/A10). These samples were stored in eppendorf and sent for hematological analysis (Figure 2). The amount of platelets, leukocytes and red blood cells in each layer pipetted into each eppendorf was calculated. Importantly, one of these samples was collected between the plasma/buffy coat layers and the red cell layer, and this was tagged to represent the location of the buffy coat in the tube.

Euthanasia

All animals were euthanized 35 days after surgery by intramuscular injections of Ketamine 10% (80mg/kg) and Xylazine 2% (10mg/kg) for anesthesia, with subsequent completion in a CO2 chamber with controlled flow. The area of the original surgical defect and surrounding tissues were removed in blocks and placed in cups with 10% formaldehyde for fixation for 24 hours.

Microtomographic Analysis

Nondemineralized specimens of calvaria were scanned by a cone-beam microcomputed tomography (micro-CT) system (SkyScan 1172, Bruker, Kontich, Belgium), generating images in three dimensions (3D). For image acquisition, a spatial resolution of 10 μ m was adopted and the x-ray generator operated with an acceleration potential of 60kV, with a current of 165 μ A.

Using the DataViewer v.1.4.3 software (SkyScan NV, Kontich, Belgium), the generated 3D image was rotated into a standard position for analysis, and then, a region of interest (ROI) of 5 mm of diameter and a cylindrical volume of interest (VOI) of 0.5x5x5 mm, corresponding to the size of the defect and thickness of the calvaria (0.5 mm), was determined. To assess the trabecular bone tissue in each VOI, a gray scale (0-255) was used, adopting the interval (threshold) between 80 (minimum) and 170 (maximum) to assess the trabecular bone tissue present.

Using the CT-Analyzer® v.1.13.5.1+ software (Bruker, Kontich, Belgium) the following structural parameters were evaluated at each VOI by a calibrated examiner (LMPS): (1) Bone volume (BV) – percentage of VOI filled with bone tissue; (2) Porosity (PO) – percentage of porosity present in the bone tissue determined in the VOI; (3) Number of trabeculae (Tb.N) – number (mm-1) of bone trabeculae present in the VOI; (4) Spacing between trabeculae (Tb.Sp) – total spacing (mm) between bone trabeculae present in the VOI; (5) Thickness of the trabeculae (Tb.Th) – mean thickness (mm) of the bone trabeculae present in the VOI.

Rendered reconstructions of the microtomographic sections of the calvaria were also obtained.

Histomorphometric analysis

The pieces fixed in formalin were rinsed in running water and stored in 70° alcohol. Then, they were decalcified in a 4% EDTA solution. After decalcification, each piece was divided longitudinally into two blocks, exactly along the center of the original surgical defect, using the amalgam marks as a reference (Figure 3A). Cross sections were made tangent to each of the two amalgam marks (Figure 3B). In this way, it was possible to determine the limits of the surgical defect. Thus, each one of the pieces had a size of 9

mm in the longitudinal direction (Figure 3C). After an additional period of decalcification, the pieces were then processed and embedded in paraffin. Serial longitudinal 4 μ m-thick sections were performed, starting from the center of the original surgical defect. Two sections of each animal were stained with Hematoxylin and Eosin technique for analysis with light microscopy. In each section, the histopathological characteristics of the neoformed bone tissue were analyzed.

Histometric analysis was performed by a calibrated examiner (D.S.F.S.) using an appropriate software (LAS EZ v. 4.1.0, Leica Microsystems® GmbH, Wetzlar, Heidelberg, Germany). One histological section of the central area of the surgical defect of each specimen was selected. Each histological section was photographed by a brightfield fluorescence microscope with trinocular head (DMLB model, Leica Microsystems® GmbH, Wetzlar, Heidelberg, Germany) with 1.6x objective lens connected to a camera (DFC300FX, Leica Mycrosystems® GmbH, Wetzlar, Heidelberg, Germany). In each image, a delimitation of the analyzed area was performed, which corresponded to the region of the originally created defect, called Total Area (TA). Within the TA, the Area of Newly Formed 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 AT (Figure 4).

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

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using GraphPad Prism software (v. 5.01, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA). The animal was considered the statistical unit. A significance level of 5% (p < 0.05) was adopted for all tests. Data distribution was verified by the Shapiro-Wilk test. The significance of the differences between groups for microtomographic (BV, PO, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th) and histometric (ANB) variables was determined by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test.

Results

Characterization of PRF matrices

The graphs with the results of the number and percentage of leukocytes and platelets are shown in Figure 5. The number of leukocytes (Figure 5A) in the L-PRF was more concentrated in layer 5, which represents the buffy coat. Approximately 40% of the leukocytes in the tube were concentrated in this layer (Figure 5C), which had a quantity of leukocytes 5 times greater than that observed in the control sample (A0). Leukocytes were not observed in the first four layers. In A-PRF, leukocytes were more homogeneously distributed throughout the tube, although more concentrated in the buffy coat layer. Compared to the control sample (A0), there was a three times higher concentration of leukocytes in layer 5, and twice as high in layer 8. No leukocytes were found in the first two layers of the tube.

In L-PRF, platelets were concentrated in layer 5, with an eight-fold increase compared to the control sample (Figure 5B). Thus, approximately 60% of the total platelet in the tube were concentrated in this layer (Figure 5D). Unlike leukocytes, platelets were found throughout the tube, although in very small quantities in the initial four layers and in the final four layers. In A-PRF, platelets were found more evenly distributed throughout the tube, although once again concentrated in layers 4 and 5 near the buffy coat zone. In L-PRF, the number of platelets was twice as low in the buffy coat layer (A5) compared to A-PRF. On the other hand, in A-PRF there was a 70-fold increase of platelets in the A4 layer compared to L-PRF. Together, the fourth and fifth layers contained 55% of the total platelets in the A-PRF tube. Platelets were found throughout the tube in significantly greater numbers compared to the same layers in L-PRF, which indicates a more homogeneous distribution of platelets throughout the tube in A-PRF.

Microtomographic analysis

Figure 6 represents the three-dimensional reconstructions of the calvaria.

The A-PRF and L-PRF groups presented BV, Tb.N and Tb.Th values significantly higher than those of the C group, as well as lower PO values. Only the A-PRF group showed significantly lower Tb.Sp values than those of the C group. No significant differences were observed between the A-PRF and L-PRF groups for all microtomographic parameters evaluated. The graphs of the studied variables are shown in Figure 7.

Histometric analysis

The L-PRF and A-PRF groups had ANB values significantly higher than the values of the C group. Although the ANB values were higher in the A-PRF, no significant difference was observed between the L-PRF and A- PRF groups.

Histopathologic analysis

Control group

Almost the entire extent of the surgical defect was filled with connective tissue composed of collagen fibers oriented parallel to the wound surface (Figure 8A). In all specimens, the central part of this connective tissue was much thinner than the original calvaria. A small amount of neoformed bone tissue was observed along the margins of the surgical defect, showing a small number of osteoblasts on its edges (Figure 8A, B). The inflammatory infiltrate was usually mild, and was found throughout the defect.

L-PRF group

Most specimens had a greater amount of neoformed bone tissue along the margins of the surgical defect when compared to specimens in the C Group. In some specimens, bone neoformation was also observed along the defect, forming islets (Figure 8C, D), as well as osteoid matrix zones. The neoformed bone tissue had a small number of osteoblasts at its edges. The connective tissue, without bone differentiation, had numerous bundles of collagen fibers arranged parallel to the wound surface, more organized and thicker than those observed in specimens from the C Group, although still inferior to the thickness of the surgical defect margin. It was observed a significant presence of blood vessels along its entire length.

A-PRF group

Most specimens had a greater amount of neoformed bone tissue near the margins of the surgical defect when compared to specimens from the C and L-PRF groups (Figure 8E, F). The neoformed bone tissue had a small number of osteoblasts at its edges. Some specimens also showed zones of osteoid matrix along the defect. The connective tissue, without bone differentiation, presented numerous bundles of collagen fibers parallel to the wound surface, but more organized and with greater thickness than those observed in specimens from the C group. It was observed a significant presence of blood vessels along the entire extension of the bone defect.

Discussion

The current study is the first to evaluate the results of bone neoformation of A-PRF in CSD in rats compared to L-PRF. In the present study, both L-PRF and A-PRF proved to be promising therapeutic alternatives in bone regeneration of CSD created in healthy rat calvaria. Both potentialized the bone neoformation of surgical defects, increased the quality of the formed bone, making it denser.

In the present study, an experimental model capable of guaranteeing a good preparation of L-PRF and A-PRF matrices was used, as well as a test site capable of demonstrating its real potential in bone neoformation. Regarding the blood collection protocol, it is possible to collect up to 15% of the total blood volume of a rat without causing suffering to the animal.^{34,35} Considering that the total blood volume of a rodent is equivalent to 6 to 8% of its weight, and that the average weight of the animals in this investigation was 403g (data not shown), harvesting 3 mL of blood from the animals was within the acceptable physiological limits. Blood collection in rats can be obtained from several anatomical sites, such as the tail, femoral and jugular veins. This procedure is considered safe for rats and relatively quick to recover.³⁵ However, these locations do not

allow for the collection of a sufficient amount of blood in a timely manner for the PRF technique, since the time between collection and centrifugation must be a maximum of 90 seconds, at the risk of compromising the quality of the membrane³⁶, and for preventing early clotting in the tube, since this technique does not use anticoagulants.^{36,37} The cardiac puncture technique used in the present study enabled the collection of a significant amount of blood in a satisfactory time. Thus, it was even possible to prepare and evaluate autogenous membranes of platelet aggregates, similarly to the clinical protocol used in humans, since the use of blood from animal donors or other animal species could trigger immunological reactions and possible biases in the results obtained.³⁸

Still considering the experimental model of this study, it is important to emphasize that the influence of different PRF protocols on bone healing was evaluated in defects considered to be critical in size. CSD are considered ideal for evaluating the influence of a material on bone healing, as a complete wound closure is only possible using an osteoconductive, osteogenic and osteoinductive material.³⁹ The critical character of the defect was confirmed in this study by the slight bone formation, limited to the margins of the defect, in specimens from the control group. In addition, all specimens showed incomplete wound closure. Since the bone defects of the PRF groups were filled only with PRF and that CSD were used, it can be concluded that the significant increase in bone neoformation observed in the L-PRF and A-PRF groups was due to the biological properties of these biomaterials, although by definition PRF is not osteogenic nor osteoinductive. Possibly, this increase in bone neoformation occurred due to the immediate presentation of cells necessary for healing, such as platelets and neutrophils, in addition to the supply of natural growth factors that are extremely important in bone regeneration.^{3,25,37,40} Previous studies have already demonstrated that the use of L-PRF can enhance the healing of CSD in healthy rabbit calvaria,^{41,42} in CSD of healthy rats⁴³ and osteoporotic rats.³¹ It is important to highlight that the matrix structure of PRF acts as a natural bioskeleton and can decrease the infiltration of fibrous connective tissue. Thus, it is important to highlight that in this study, after filling the CSD of the L-PRF and A-PRF groups with fragmented matrices, intact PRF matrices were placed over the created defects, in order to avoid the displacement of the material placed inside the defect, as no membrane for guided bone regeneration (GBR) was used. It is worth emphasizing that PRF matrices do not have the ability to maintain spaces long enough to prevent the

invagination of epithelial cells and connective tissue into defects, thus not acting as a true barrier to GBR, due to its rapid degradation.^{44,45}

In the present study, there was a higher concentration of both leukocytes and platelets in the buffy coat layer of the L-PRF tube, while there was a greater distribution of these cells along the A-PRF tube, which corroborates the findings from previous studies that characterized PRF matrices produced according to the low centrifugation protocol.^{27,33,46} So, in this study, the L-PRF and A-PRF matrices presented different amounts and distribution of cells, following the patterns observed in matrices produced with these protocols from human blood. Although the levels of growth factors present in both matrices have not been evaluated, it can be inferred that differences between them must have occurred, since there is a relationship between the amount of cells present in the platelet aggregates and the levels of growth factors.^{29,41} Furthermore, it has been shown that low-speed centrifugation protocols favor an increase in the release of growth factors in PRF clots when compared to high-speed centrifugation protocols.^{29,47}

This proof-of-concept study did not demonstrate significant differences in the amount of bone neoformation between the L-PRF and A-PRF groups (BV and ANB analyses). Although the potential of platelet aggregates in the bone neoformation process has been quite evident (defects treated with both matrices had higher BV and ANB when compared to control defects), variations in the production protocols of PRF matrices do not seem to have impacted the biological results. Several advantages arising from reduced centrifugation speed for the preparation of PRF matrices have been highlighted in several in vitro studies.^{26,27,29,47} Only one in vivo study compared the regenerative potential of PRF matrices produced in high and low speed centrifugation protocols from their implantation in subcutaneous tissues of rats.³⁰ The results of this study³⁰ demonstrated that PRF matrices produced with high centrifugation protocols had a dense and stable fibrin structure that prevented host tissue penetration. On the other hand, the PRF produced in a low-speed centrifugation protocol was more porous and presented a higher vascularization rate when implanted in the subcutaneous tissue of rats. These findings highlighted the possibility of altering the regenerative potential of PRF matrices by modifying their structure and composition.

The present study is the first to compare the potential of PRF matrices produced through high- and low-speed centrifugation protocols in bone neoformation. Although no

significant differences were observed in the amount of bone neoformation between the L-PRF and A-PRF groups, it is important to emphasize some aspects observed in the qualitative histological analysis and in the analysis of bone microarchitecture of the experimental groups. When compared to defects treated with L-PRF, defects treated with A-PRF had a greater amount of osteoid matrix and a smaller spacing between bone trabeculae. Studies with longer follow-up times and immunohistochemical analyzes would be useful to better explain the results obtained and highlight the possible molecular impacts arising from changes in the composition of PRF matrices.

It is important to consider that, in the present study, the PRF matrices were used alone, unlike the various clinical situations in which it is associated with bone grafts and biomaterials.^{41,43,48,49} Engler-Pinto et al.³¹ demonstrated less bone volume in defects filled with L-PRF alone than in defects filled only with xenogenous bone graft. The authors argued that this result could be explained considering the rate of degradation of L-PRF clots. While the L-PRF clot can be rapidly degraded, Bio-Oss® particles exhibit slow resorption and can act as a scaffold for cell migration and new blood vessel formation, which is a key step for a predictable and efficient bone regeneration⁴³. Thus, new studies comparing A-PRF and L-PRF matrices associated with bone grafts and biomaterials are important. Tests on animals of a higher phylogenetic scale should also be performed, as well as tests on animals with systemic impairments and longer follow-up periods. Immunohistochemical analyses may be important for conclusions regarding the rate of bone neoformation and the future potential of present tissues for neoformed bone.

Conclusion

Within the limits of this study, it can be concluded that i) platelet aggregates produced with high and low centrifugation speeds potentiated the healing of CSD in rat calvaria; ii) high and low-speed centrifugation protocols did not produce PRF matrices with different biological impacts on the amount of bone neoformation.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES - process #00.889.834/0001-08; scholarship for L.M.P.S.)

Declaration of interest statement

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

References

1. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paroimplantologie: le PRF. Implantodontie. 2001;42:55–62.

2. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2006;101:299–303. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.012.

Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL,
 Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation
 platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. Oral Surgery, Oral
 Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2006;101:e56–e60. doi:
 10.1016/j.tripleo.2005.07.011.

4. Alzahrani AA, Murriky A, Shafik S. Influence of platelet rich fibrin on postextraction socket healing: A clinical and radiographic study. The Saudi Dental Journal. 2017;29:149–155. doi: 10.1016/j.sdentj.2017.07.003.

5. Hauser F, Gaydarov N, Badoud I, Vazquez L, Bernard J-P, Ammann P. Clinical and histological evaluation of post-extraction platelet-rich fibrin socket filling: A

prospective randomized controlled study. Bone. 2012;50:S113. doi: 10.1016/j.bone.2012.02.348.

6. Kumar N, Prasad K, Ramanujam L, K R, Dexith J, Chauhan A. Evaluation of Treatment Outcome After Impacted Mandibular Third Molar Surgery With the Use of Autologous Platelet-Rich Fibrin: A Randomized Controlled Clinical Study. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2015;73:1042–1049. doi: 10.1016/j.joms.2014.11.013.

7. Mourão CFAB, de Mello-Machado RC, Javid K, Moraschini V. The use of leukocyte- and platelet-rich fibrin in the management of soft tissue healing and pain in post-extraction sockets: A randomized clinical trial. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2020;48:452–457. doi: 10.1016/j.jcms.2020.02.020.

8. Temmerman A, Vandessel J, Castro A, Jacobs R, Teughels W, Pinto N, Quirynen M. The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. J Clin Periodontol. 2016;43:990–999. doi: 10.1111/jcpe.12612.

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

Jayalakshmi KB, Agarwal S, Singh MP, Vishwanath BT, Krishna A, Agrawal R.
 Platelet-Rich Fibrin with β-Tricalcium Phosphate — A Noval Approach for Bone
 Augmentation in Chronic Periapical Lesion: A Case Report. Case Reports in Dentistry.
 2012;2012:1–6. doi: 10.1155/2012/902858.

11. Johns D, Vidyanath S, Sam G, Shivashankar V. Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion. J Conserv Dent. 2013;16:261. doi: 10.4103/0972-0707.111329.

 Ali S, Bakry SA, Abd-Elhakam H. Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Augmentation: A Systematic Review. Journal of Oral Implantology. 2015;41:746–753. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-14-00167. Kanayama T, Horii K, Senga Y, Shibuya Y. Crestal Approach to Sinus Floor Elevation for Atrophic Maxilla Using Platelet-Rich Fibrin as the Only Grafting Material: A 1-Year Prospective Study. Implant Dentistry. 2016;25:32–38. doi: 10.1097/ID.000000000000327.

 Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan Ehrenfest DM. Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A Radiologic and Histologic Study at 6 Months. Journal of Periodontology. 2009;80:2056–2064. doi: 10.1902/jop.2009.090252.

 Simonpieri A, Choukroun J, Corso MD, Sammartino G, Ehrenfest DMD.
 Simultaneous Sinus-Lift and Implantation Using Microthreaded Implants and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin as Sole Grafting Material: A Six-Year Experience: Implant Dentistry. 2011;20:2–12. doi: 10.1097/ID.0b013e3181faa8af.

Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, Dipalma G, Pacifici L, Inchingolo F. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in Reconstructive Surgery of Atrophied Maxillary Bones: Clinical and Histological Evaluations. Int J Med Sci. 2012;9:872–880. doi: 10.7150/ijms.5119.

 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. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2012;40:321–328. doi: 10.1016/j.jcms.2011.04.020.

 Eren G, Atilla G. Platelet-rich fibrin in the treatment of localized gingival recessions: a split-mouth randomized clinical trial. Clin Oral Invest. 2014;18:1941– 1948. doi: 10.1007/s00784-013-1170-5.

19. Öncü E. The use of platelet-rich fibrin versus subepithelial connective tissue graft in treatment of multiple gingival recessions: a randomized clinical trial. Int J Periodontics Restorative Dent. 2017;37:265–271.

20. Tunali M, Ozdemir H, Arabaci 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;35:105–114. doi: 10.11607/prd.1826.

21. Panda S, Doraiswamy J, Malaiappan S, Varghese SS, Del Fabbro M. Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. J Invest Clin Dent. 2016;7:13–26. doi: 10.1111/jicd.12117.

22. Sharma A, Pradeep AR. Treatment of 3-Wall Intrabony Defects in Patients With Chronic Periodontitis With Autologous Platelet-Rich Fibrin: A Randomized Controlled Clinical Trial. Journal of Periodontology. 2011;82:1705–1712. doi: 10.1902/jop.2011.110075.

23. Asaka T, Ohga N, Yamazaki Y, Sato J, Satoh C, Kitagawa Y. Platelet-rich fibrin may reduce the risk of delayed recovery in tooth-extracted patients undergoing oral bisphosphonate therapy: a trial study. Clin Oral Invest. 2017;21:2165–2172. doi: 10.1007/s00784-016-2004-z.

24. Cano-Duran J, Pena-Cardelles J, Ortega-Concepcion D, Paredes-Rodriguez V, Garcia-Riart M, Lopez-Quiles J. The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). J Clin Exp Dent. 2017;0–0. doi: 10.4317/jced.54154.

25. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Gogly B.
Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I:
Technological concepts and evolution. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology,
Oral Radiology, and Endodontology. 2006;101:e37–e44. doi:
10.1016/j.tripleo.2005.07.008.

26. 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. Journal of Oral Implantology. 2014;40:679–689. doi: 10.1563/aaid-joi-D-14-00138.

27. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orlowska 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;45:467–479. doi: 10.1007/s00068-017-0785-7.

28. Miron RJ, Xu H, Chai J, Wang J, Zheng S, Feng M, Zhang X, Wei Y, Chen Y, Mourão CF de AB, et al. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. Clin Oral Invest. 2020;24:1171–1182. doi: 10.1007/s00784-019-02981-2.

29. 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. Journal of Periodontology. 2017;88:112–121. doi: 10.1902/jop.2016.160443.

30. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, Orlowska A, Booms PF, Sader RA, Miron RJ, Kirkpatrick CharlesJ, 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. 2019;30:329–340. doi: 10.1080/09537104.2018.1445835.

31. Engler-Pinto A, Siéssere S, Calefi A, Oliveira L, Ervolino E, Souza S, Furlaneto F, Messora MR. 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;30:962–976. doi: 10.1111/clr.13503.

32. Nagata MJ, Messora M, Pola N, Campos N, Vieira R, Esper LA, 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. 2010;28:468–473. doi: 10.1002/jor.21027.

33. 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. 2019;107:2257–2271. doi: 10.1002/jbm.a.36734.

34. Harkness JE, Wagner JE. Clinical procedures. The biology and medicine of rabbits and rodents. 5a. Philadelphia, PA: Williams & Wilkings; 2010. p. 107–194.

35. Hoff J. Methods of Blood Collection in the Mouse. Lab Animal. 2000;29:47–53.

36. Miron RJ, Dham A, Dham U, Zhang Y, Pikos MA, Sculean A. The effect of age, gender, and time between blood draw and start of centrifugation on the size outcomes of platelet-rich fibrin (PRF) membranes. Clin Oral Invest. 2019;23:2179–2185. doi: 10.1007/s00784-018-2673-x.

 Dohan Ehrenfest DM, 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. Journal of Periodontology. 2010;81:546–555. doi: 10.1902/jop.2009.090531.

38. Ghanaati S, Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C, Alves GG, Calasans-Maia MD, Sader R, Kirkpatrick CJ, Choukroun J, Bonig H, Mourão CF de AB. A Proof of the Low Speed Centrifugation Concept in Rodents: New Perspectives for In Vivo Research. Tissue Engineering Part C: Methods. 2018;24:659–670. doi: 10.1089/ten.tec.2018.0236.

 Bosch C, Melsen B, Vangervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. The Journal of Craniofacial Surgery. 1998;9:310– 316.

40. Kang Y-H, Jeon SH, Park J-Y, Chung J-H, Choung Y-H, Choung H-W, Kim E-S, Choung P-H. Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. Tissue Eng Part A. 2011;17:349–359. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0327.

41. Acar AH, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem NF, Altundag Kahraman S. Microcomputed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. Archives of Oral Biology. 2015;60:606–614. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.09.017.

42. 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.
Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2013;41:e191–e200. doi: 10.1016/j.jcms.2013.01.018.

43. Sindel A, Dereci Ö, Toru HS, Tozoğlu S. Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. Journal of Craniofacial Surgery. 2017;28:1865–1868. doi: 10.1097/SCS.00000000003588.

44. Isobe K, Watanebe T, Kawabata H, Kitamura Y, Okudera T, Okudera H, Uematsu K, Okuda K, Nakata K, Tanaka T, et al. Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). Int J Implant Dent. 2017;3:17. doi: 10.1186/s40729-017-0081-7.

45. Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff L, Yoshie H. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015;103:825–831. doi: 0.1002/jbm.b.33262.

46. Sato A, Kawabata H, Aizawa H, Tsujino T, Isobe K, Watanabe T, Kitamura Y, Miron RJ, Kawase T. Distribution and quantification of activated platelets in plateletrich fibrin matrices. Platelets. 2020;1–6. doi: 10.1080/09537104.2020.1856359.

47. 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;20:2353–2360. doi: 10.1007/s00784-016-1719-1.

48. Oliveira MR, deC. Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2015;44:649–655. doi: 10.1016/j.ijom.2014.12.005.

49. Clark D, Rajendran Y, Paydar S, Ho S, Cox D, Ryder M, Dollard J, Kao RT.
Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. J Periodontol. 2018;89:379–387. doi: 10.1002/JPER.17-0466.



Figure 1 – Experimental procedures performed. A – Blood collection using cardiac puncture technique; B – Insertion of the tube with the blood collected in the centrifuge; C - Tube after centrifugation - blood separated into layers; D – Platelet aggregate matrix removed from the tube. E – Semilunar incision in the animal's calvaria; F – Creation of the bone defect with a 5 mm trephine drill; G – Bone defect concluded and bone segment

being separated; H – Platelet aggregate matrix in compressor device; I – Section of the platelet aggregate membrane produced; J – Portion of the membrane close to the red cell layer being perforated; K – Syringe adapted to standardize the volume of platelet aggregate to be used in filling the bone defects; L – Standardized volume of platelet aggregate being taken to the bone defect; M – Bone defect filled with perforated platelet aggregate and in the form of a membrane; N – Suture of the total flap with simple interrupted stitches.



Figure 2 - Characterization of platelet aggregate matrices produced in high and low-speed centrifugation protocols. A – Pipetting of 500uL of non-centrifuged blood (A0) and sequential layers at 350 ul intervals from centrifuged blood (A1-A10). B – Samples stored in eppendorf tubes for hematological analysis. Black arrows represent the buffy coat layer.



Figure 3 – Schematic representation of the reduction of calvaria specimens. A – Longitudinal section (dashed line in red) of each specimen in two blocks, exactly along the center of the original surgical defect, using the amalgam marks as a reference. B – Cross section (dashed line in green) tangent to the amalgam marks. C - Block with 9 mm of longitudinal extension ready to be embedded in paraffin.



Figure 4 – Histometric Analysis. A - The Total Area (TA) is delimited by the blue line and corresponds to the area of the calvaria where the surgical defect was originally created. TA height (X) is represented by the simple arithmetic mean obtained from the heights of the remaining bone edges anterior (AE) and posterior (PE) to the created defect. The TA width is 5 mm, corresponding to the width of the original defect. Original magnification= 1.6x. B - approximation of the TA rectangle represented in A. The Area of Newly Formed Bone (ANB) was calculated as the percentage of neoformed bone (circled in black) in relation to the TA. Means and standard deviations for TA (1) and ANB (2) for C, L-PRF, and A-PRF groups, with the results of the comparisons between groups. * indicates a statistically significant difference between groups (p < 0.05).



Figure 5 – Number of Leukocytes (A) and Platelets (B) in the non-centrifuged blood sample (control sample - A0) and after centrifugation (layers A1 to A10). In C and D, the percentage distribution of leukocytes and platelets in all layers (A1-A10) after blood centrifugation to prepare L-PRF and A-PRF can be observed. A5 = sample corresponding to the buffy coat layer.



Figure 6 – Microtomographic analysis. Rendered reconstructions of the Control (A), L-PRF (B), and A-PRF (C) groups calvaria. Pixel size = 15.9μ m. The blue circle represents the CSD limits. Graphs representing medians, interquartile range, and minimum and maximum values of BV (1), PO (2), Tb.N (3), Tb.Sp (4) and Tb.Th (5) in the microtomographic analysis.



Figure 7 – Representative images of histological sections; C (A, B); L-PRF (C, D); A-PRF (E, F) groups. NFB = newly formed bone; arrowhead filled in black color = blood vessels; unfilled arrow = osteoid matrix; arrow filled in black = margins of the original surgical defect; *Images C, D, and F represent distant portions of the surgical defect margins. Coloration: Hematoxicillin and Eosin. Original magnification: 10x (A, C, E); 20x (B, D, F).

Figure legends

Figure 1. Photographs representing the preparation of the PRF matrices. A – Blood collection using cardiac puncture technique; B – Insertion of the tube with the collected blood in the centrifuge; C – Tube after centrifugation – blood separated into layers; D – Pinching of the PRF matrix; E – Separation of the PRF matrix from the red cell-rich band with scissors; F – Platelet aggregate matrix removed from the tube. All procedures are identical for both groups A-PRF and L-PRF, except the centrifugation protocol.

Figure 2. Characterization of platelet aggregate matrices produced in high and low-speed centrifugation protocols. A – Pipetting of 500 μ L of non-centrifuged blood (A0) and of sequential layers at 350 μ l intervals from centrifuged blood (A1-A10). B – Samples stored in eppendorf tubes for hematological analysis. Black arrows represent the buffy coat layer.

Figure 3. Creation of the CSD. A – Semilunar incision in the animal's calvaria; B – Fullthickness flap; C – Creation of the bone defect with a 5 mm trephine drill; D – Concluded bone defect cut; E – Bone segment being removed; F – Concluded bone defect and intact dura mater.

Figure 4. Amalgam marks. A – Creation of the marks with a spherical diamond drill; B – Marks positioned 2 mm from the margin of the CSD, tangent to its midline. C – Concluded amalgam marks.

Figure 5. Production of platelet aggregate membranes to fill bone defects. A – Platelet aggregate matrix in compressor device; B – Platelet aggregate matrix after a few minutes of compression; C and D – Section of the platelet aggregate membrane produced; E – Part of the membrane containing a portion close to the red cell layer being perforated; F – Syringe adapted to standardize the volume of platelet aggregate to be used to fill the bone defects.

Figure 6. Placement of platelet aggregate membranes in bone defects. A – Standardized volume of platelet aggregate being taken to the bone defect; B – Accommodation of the platelet aggregate in the bone defect; C – Bone defect filled with perforated platelet aggregate and in the form of a membrane; D – Suture of the total flap with simple interrupted stitches.

Figure 7. Schematic representation of the reduction of calvaria specimens. A – Longitudinal section (dashed line in red) of each specimen in two blocks, exactly along the center of the original surgical defect, using the amalgam marks as a reference. B – Cross-section (dashed line in green), tangent to the amalgam marks. C - Block with 9 mm of longitudinal extension ready to be embedded in paraffin.

Figure 8. Images captured from histological sections to illustrate the Histometric Analysis. A - The Total Area (TA) is delimited by the blue line and corresponds to the area of the calvaria where the surgical defect was originally created. The TA height (X) is represented by the simple arithmetic mean obtained from the heights of the remaining bone edges anterior (AE) and posterior (PE) to the created defect. The AT width is 5 mm, corresponding to the width of the original defect. Original Magnification = 1.6x. B - approximation of the AT rectangle represented in A. The Area of Newly Formed Bone (NBA) was calculated as the percentage of newly formed bone (circled in black) in relation to the TA.

Figure 9. Number of Leukocytes (A) and Platelets (B) in the non-centrifuged blood sample (control sample - A0) and after centrifugation (layers A1 to A10). A5 = sample corresponding to the buffy coat layer.

Figure 10. Graphs representing the percentage distribution of Leukocytes (A) and Platelets (B) in all layers (A1-A10) after blood centrifugation to prepare L-PRF and A-PRF. A5 = sample corresponding to the buffy coat layer.

Figure 11. Rendered reconstructions of the calvaria of the Control (A), L-PRF (B), and A-PRF (C) groups. Pixel size = 15.9μ m. The blue circle represents the CSD limits.

Figure 12. Graphs representing medians, interquartile range, and minimum and maximum values of BV, PO, Tb.N, Tb.Sp and Tb.Th in microtomographic analysis.

Figure 13. Means and standard deviations for TA (1) and NBA (2) for groups C, L-PRF, and A-PRF, with the results of comparisons between groups. * indicates a statistically significant difference between groups (p < 0.05).

Figure 14. Panoramic image of the histological sections. A – Control group; B – L-PRF Group; C – Group A-PRF. Coloration: Hematoxylin and Eosin. Original magnification: 1.6x.

Figure 15 – Representative images of histological sections; C (A, B); L-PRF (C, D); A-PRF (E, F) groups. NFB = newly formed bone; arrowhead filled in black color = blood vessels; unfilled arrow = osteoid matrix; arrow filled in black = margins of the original surgical defect; *Images C, D, and F represent distant portions of the surgical defect margins. Coloration: Hematoxicillin and Eosin. Original magnification: 10x (A, C, E); 20x (B, D, F).



Figure 1





Figure 3



Figure 4

<u>Anexos</u> | 125



Figure 5



Figure 6









Figure 9

<u>Anexos</u> | 129







Figure 11







Figure 13





Figure 15