



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

ROBERTO FERNANDES PACHECO

Influência da força centrífuga na cinética de liberação de fatores de crescimento em rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos em humanos hígidos

Influence of centrifugal force on the release kinetics of growth factors in platelet-rich and leukocyte-rich fibrin network in healthy humans

**MARINGÁ
2022**

ROBERTO FERNANDES PACHECO

Influência da força centrífuga na cinética de liberação de fatores de crescimento em rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos em humanos hígidos

Influence of centrifugal force on the release kinetics of growth factors in platelet-rich and leukocyte-rich fibrin network in healthy humans

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Luis Neto Custódio

MARINGÁ
2022

Pacheco, Roberto Fernandes

Cinética da liberação de mediadores imunológicos e de fatores de crescimento em rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos de humanos hígidos: influência da velocidade e da força centrífuga./ Roberto Fernandes Pacheco. -- Maringá, 2022.

000 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Centro Universitário Ingá Uningá, ano de defesa.

Orientador: José Ricardo de Albergaria
Barbosa

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da UFMG
Protocolo nº: 2.381.598
Data: 14.12.2017

ROBERTO FERNANDES PACHECO

Influência da força centrífuga na cinética de liberação de fatores de crescimento em rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos em humanos hígidos

Influence of centrifugal force on the release kinetics of growth factors in platelet-rich and leukocyte-rich fibrin network in healthy humans

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia.

Maringá, 22 de Março 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ricardo De Albergaria_Barbosa
UNINGÁ

Prof. Dr. Luiz Paulo Carvalho Rocha
UFMG

Prof. Dr. Ricardo César Goobi de Oliveira
UNINGÁ

DEDICATÓRIA

Em minha evolução profissional tive percalços naturais da transformação de qualquer ser humano em detrimento do conhecimento. Naturais na estrada de todos nós. Porém minha dedicatória deste trabalho quero fazer á instituição que me acolheu tão positivamente, pensando na evolução da ciência, já não é de hoje. Trazendo, formando e transformando profissionais e pessoas que ajudam no transbordamento da ciência. O meu mais elevado obrigado á UNINGÁ. Dedico com afinco meu trabalho a esta instituição de ensino superior ilibada e promissora.

AGRADECIMENTOS

Em 2016, ainda incentivado por minha segunda especialidade, a implantodontia, procurei um curso de capacitação e habilitação em PRF em minha cidade, Belo Horizonte. Incentivado por meu amigo José Bernardes das Neves, que estava trazendo para ministrar um curso sobre este tema, fiz minha inscrição. Este curso foi ministrado pelo Dr. Fabricio Le Draper. Foi este colega quem me apresentou aos concentrados sanguíneos. Um curso mais prático, com ênfase na aplicabilidade clínica de enxertia óssea guiada que influenciou sobremaneira minha atuação de regeneração guiada de meus pacientes da época. Resultados surpreendentes de aceleração cicatricial e indução formadora tecidual. Assim sendo fiz a aquisição de minha primeira centrífuga que proporcionasse a estratificação seletiva dos elementos sanguíneos. Como ainda se tratava de uma novidade no âmbito da odontologia nacional, fui induzido a comprar uma máquina que não teria as características ideais para captação de um material de qualidade operacional. Neste momento, tentando falar com o professor que ministrou o curso (Dr. Fabrício Le Draper) para pedir uma opinião sobre a centrífuga comprada por mim, não obtive uma resposta ao tempo que precisava para começar a trabalhar em meus casos clínicos, muito provavelmente pela agenda deste professor, que certamente se encontrava cheia de compromissos devido á demanda que este tema à época, e, me atrevo a dizer, até hoje, vinha se ampliando pelos quatro cantos do país. Tive então a idéia de procurar o então comentado em aula pelo Dr. Fabrício, como sendo uma das maiores referências em PRF no Brasil: Dr. Leonel Oliveira. Mas “como encontrar o contato deste colega? Se nem com meu professor do tema eu conseguia contatar?”. Na era das redes sociais, tive a idéia de procurar pelo FACEBOOK, e, para minha surpresa, encontrei o perfil do Dr. Leonel. Já era o primeiro passo. Fui no Messenger e enviei uma mensagem meio descrente de ter uma resposta de Dr. Leonel. Para minha segunda surpresa, ele me respondeu muito rapidamente e me alertou sobre a péssima qualidade da centrífuga que eu havia adquirido. Que ela não seria interessante para os padrões e requisitos necessários de captação do PRF. Tudo isso me foi passado pelo Messenger com a preocupação de não se associar algo comercial de indicação, por exemplo, de outra máquina. Mas sim do ponto de vista científico. Isso me impressionou positivamente neste colega, que mesmo não tendo sido ele o meu professor, mesmo eu não tendo feito nenhum curso com ele, o mesmo teve o cuidado

de me instruir em conversa via rede social demonstrando, ao meu ver, todo o carinho, toda dedicação, todo o amor que ele tem por esta matéria: os agregados leucoplaquetários. A partir daí o meu respeito e admiração por Dr. Leonel Oliveira só aumentaram. Conheci nomes por ele indicados que também se tornaram grandes referencias nacionais e internacionais nos concentrados sanguíneos. Nomes como Dra. Moira Leão, Dr. Eduardo Rego Barros e tantos outros que passei a acompanhar, admirar e respeitar pelo trabalho apresentado em congressos e publicações. Passei a estudar mais e mais sobre os concentrados sanguíneos e, com minha decisão de direcionar minha carreira clínica e acadêmica enfatizando a Harmonização Orofacial, guiei este foco em função desta área de atuação. Minha amizade com estes colegas foi só aumentando. E com o momento de eu defender minha dissertação senti a necessidade e a obrigação científica de fazer mais um curso com, para mim, a maior referencia em PRF do Brasil, Dr. Leonel Oliveira. Este curso teve a data de 27/11/2021. A parte fisiológica, clínica, microbiológica, etiológica, enfim, científica foi passada de uma maneira absoluta. Não poderia eu deixar de dedicar este trabalho a todos estes colegas aqui citados e, em especial, ao meu amigo, colega, minha referencia, Dr. Leonel Oliveira. Muito obrigado!

Agradecer também à minha esposa Carolina Pacheco e à minha filha Valentina de Oliveira Pacheco por terem entendido os motivos de minha ausência em nosso lar neste período do mestrado e em tantos outros que em missão da ciência viajei para levar e elevar a nossa amada área de atuação, a Harmonização Orofacial. Agradecer também a minha amada mãe, que nos idos dos seus 78 anos entendeu minha ausência neste período de evolução científica e espiritual. Obrigado também ao meu orientador, Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa, aos meus coorientadores Dr. Antônio Custódio, Dr. Gustavo Menezes, Dra. Maisa Antunes, à minha professora Dra. Célia Rizzatti, pelo empenho em transformar este trabalho em algo que possa ajudar não somente a odontologia mas à sociedade científica e aos principais interessados que são os pacientes. O meu mais sincero muito obrigado!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser , mas Graças a Deus , não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

A Odontologia está cada dia mais avançada no uso de biomateriais com a aplicação em várias áreas de atuação. A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um exemplo desse avanço, mas apesar disso ainda existem muitas lacunas a cerca de todo o potencial biológico desse material. A questão crucial para a qualidade, aplicabilidade e função do PRF está ligada à forma de obtenção desse material. Alterações no processo de centrifugação podem alterar a composição desse biomaterial e também a sua forma de ativação dos tecidos. Alguns estudos já avaliaram o papel da alteração da força de centrifugação na obtenção do PRF, e outros estudos já avaliaram a dinâmica de liberação desses fatores ao longo do tempo, mas são escassos os trabalhos que avaliaram a influência das alterações na centrifugação no processamento do produto. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência da velocidade e força centrífuga na cinética de liberação de cinco fatores de crescimento pela PRF humana:

-IGF-1:(FATOR DO CRESCIMENTO TIPO INSULINA 1:AÇÕES AUTÓCRINAS , PARÁCRINAS E ENDÓCRINAS PROLIFERAÇÃO ,CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR)

-TGF alpha : (FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE alpha) PROLIFERAÇÃO CELULAR EPITELIAL

-FGF-3:(FATOR DE CRESCIMENTO DO FIBROBLASTO)

-EGF:(FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL)

-VEGF a :(VASCULAR ENDOTELIAL GROWTH FACTOR)]

1. Para isso esse estudo utilizou amostras de sangue periférico de 6 pacientes saudáveis. Indivíduos adultos de 20 a 50 anos, não usuários de álcool, drogas alucinógenas e/ou fumantes , não usuários de aspirina ou qualquer outra medicação de efeito anticoagulante. E as coletas foram feitas antes da pandemia de 2020. Não portadores de doenças vasculares e submeteu esse material a três protocolos com forças de centrifugação diferentes: 400g, 800g e 200g. Os PRFs obtidos foram cultivados em meio estéril de cultura de células e avaliados nos tempos: 15 minutos, 1 dia, 3 dias e 7 dias. Os fatores de crescimento foram detectados pela método ELISA e quantificados em todos os protocolos. Dos resultados obtidos foi visto que apenas o fator de crescimento EGF apresentou diferenças significativas ($p=0,044$) nas alterações da força centrífuga nos tempos avaliados. Os outros fatores apresentaram mudanças na detecção ao longo dos dias. Com esses resultados podemos concluir que essas variações no protocolo não interferem na detecção da maioria dos

fatores de crescimento, o que traz segurança ao profissional na obtenção do potencial do material mesmo com pequenas variações em sua forma de processamento. O número N foi de 6 pacientes para que , como plano piloto pudéssemos averiguar se a quantificação das cotocinas teria realmente uma adequada metodologia com a leitura dos teste ELISA direto sanduiche. Á partir dai podermos aumentar o N certificados do padrão , metodologia e eficácia deste estudo, podendo também direcionarmos para estudos não somente em placas com sobrenadantes mas em seres humanos em um futuro próximo .

Palavras-chave: Fibrina Rica em Plaquetas, PRF, Centrifugação, Fatores de Crescimento, EGF, Necrose, Ferida, Escara

ABSTRACT

Influence of centrifugal force on the release kinetics of growth factors in platelet-rich and leukocyte-rich fibrin network in healthy humans

Current Dentistry is increasingly advanced in terms of the use of biomaterials with application in various areas of activity. Platelet-rich fibrin (PRF) is an example of this advance, but despite this, there are still many gaps around the full biological potential of this material. The crucial issue for the quality, applicability, and function of PRF is linked to the way to obtain this material. Changes in the centrifugation process can change the composition of this biomaterial and also in its activation. Some studies have already evaluated the role of changes in centrifugation force in obtaining PRF, and other studies have evaluated the dynamics of the release of these factors over time, but few studies have evaluated the influence of changes in centrifugation on the release process. . Therefore, this study aimed to evaluate the influence of velocity and centrifugal force on the kinetics of growth factor release by human PRF. For this, this study used peripheral blood samples from 6 healthy patients and submitted this material to three protocols with different centrifugation forces: 400g, 800g, and 200g. The PRFs obtained were grown in a sterile cell culture medium and evaluated at times: 15 minutes, 1 day, 3 days, and 7 days. Growth factors were detected by the ELISA method and quantified in all protocols. From the results obtained, it was seen that only EGF showed significant differences ($p=0,044$) in changes in centrifugal force at the times evaluated. The other factors showed changes in detection over the days. With these results, we can conclude that these variations in the protocol do not interfere in the detection of most growth factors, which brings security to the professional in obtaining the potential of the material even with small variations.

Keywords: Platelet Rich Fibrin, PRF, Centrifugation, Growth Factors, EGF

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Benefícios do uso do PRP.	24
Figura 2 Processo de obtenção de PRP	25
Figura 3 Representação esquemática da estrutura da matrix e de células nos diferentes concentrados plaquetários.....	27
Figura 4 Processo de obtenção de PRF.	29
Figura 5 Obtenção de PRF.....	30
Figura 6 Centrífuga e forças relacionadas	34
Figura 7 Captação das membranas dentro da capela de fluxo laminar.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características das quatro categorias de concentrados plaquetários. PPP, plasma pobre em plaquetas; BC, buffy coat; RBC, red blood cels.	26
Tabela 2 Medidas – resumo dos fatores de crescimento por tempo de incubação, segundo força de centrifugação	41
Tabela 3 Medidas – resumo dos fatores de crescimento por força de centrifugação, segundo tempo de incubação	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Média (DP) de EGF (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.....	42
Gráfico 2 Média (DP) de FGF (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.....	42
Gráfico 3 Média (DP) de IGF1 (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.....	43
Gráfico 4 Média (DP) de TGFa (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.....	43
Gráfico 5 Média (DP) de VEGF (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.....	44
Gráfico 6 Média de EGF (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação.....	45
Gráfico 7 Média de FGF (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação.....	46
Gráfico 8 Média de IGF1 (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação.....	46
Gráfico 9 Média de TGFa (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação.....	47
Gráfico 10 Média de VEGF (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação.....	47

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

et al	et alia
PRP	Platelet-Rich Plasma
PRF	Platelet-Rich Fibrin
P-PRP	Pure Platelet-Rich Plasm
L-PRP	Leucocyte- and Platelet-Rich Plasm
P-PRF	Pure Platelet-Rich Fibrin
L-PRF	Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin
HSCs	Hematopoietic Stem Cells
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
TGF β	Transforming Growth Factor Beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
RCF	Relative Centrifugal Force
G	Gravitacional
PPP	Platelet Poor Plasma
BC	Buffy coat
rpm	Rotações por minuto
min	Minuto
ml	Mililitro
3D	Três Dimensões
cm	Centímetro
A-PRF	Advanced Platelet-Rich Fibrin
g	Gravidade
IGF	Insulin-like Growth Factor
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factors
IL-6	Interleukin 6
DNA	Deoxyribonucleic Acid
T	Thymus
LSCC	Low Speed Centrifugation Concept
ICB	Instituto de Ciencias Biológicas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
pg/mL Picograma/Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Concentrados plaquetários	23
2.2 Fibrina rica em plaquetas (PRF)	28
2.4 Protocolos e centrifugação: relação da cinética e a liberação de mediadores inflamatórios	33
3. OBJETIVO.....	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Obtenção de amostras de coágulo de PRF	37
4.2 Quantificação de Proteínas com ELISA.....	38
4.3 Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS	39
5.1 Características demográficas das amostras avaliadas.....	39
5.2 Comparação da variação de tempo de incubação nos diferentes RCF, por fator de crescimento avaliado	39
5.3 Comparação da liberação dos fatores de crescimento nas variações de tempo de incubação entre os diferentes RCF	44
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO.....	51
8. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA A SOCIEDADE	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE	56
ANEXO.....	59

1. INTRODUÇÃO

A expressão “engenharia de tecidos”, ou “engenharia tecidual”, surgiu, originalmente, com a construção laboratorial de dispositivos que continham células e mediadores, numa matriz biológica ou sintética, utilizada em pacientes com o intuito de facilitar a regeneração de determinados tecidos (LANGER & VACANTI, 2016). Esses dispositivos utilizados na engenharia tecidual são conhecidos como biomateriais e possuem uma ampla aplicabilidade nas áreas da saúde. Geralmente, os biomateriais combinam três elementos-chave: *scaffolds* (estruturas tridimensionais que servem de suporte ao crescimento celular), moléculas de sinalização (como os fatores de crescimento) e células (osteoblastos, fibroblastos, ou outras populações adequadas à regeneração do tecido lesado) (JAHANBANI et al., 2020). Um dos principais objetivos da pesquisa com biomateriais, no campo da engenharia de tecidos, é promover uma reação tecidual induzida por um determinado material, que leva à regeneração e uma cicatrização eficaz do tecido lesionado. Assim, um biomaterial deve servir como uma barreira temporária para revestir defeitos e promover a regeneração dos tecidos, sendo compatível com o tecido e, mais importante ainda, ser aplicável clinicamente. No campo da regeneração, a vascularização desempenha um papel crucial, uma vez que assegura um fornecimento contínuo de nutrientes. Além disso, favorece a remoção de resíduos de produtos celulares a partir do suporte da região enxertada.

Entre os grandes desafios apresentados pela pesquisa clínica está o desenvolvimento de aditivos cirúrgicos bioativos, visando a regulação da inflamação e uma melhora cicatricial. De fato, após cada intervenção, ocorrem fenômenos complexos na remodelação dos tecidos, o que resulta na sobrevivência e cicatrização dos mesmos. A regeneração de tecidos é mediada por uma grande variedade de eventos, intra e extracelulares, que são regulados por biossinalizadores e por um processo complexo que depende de uma sequência de eventos que incluem: fixação, migração e proliferação celular (WU et al., 2012).

O desenvolvimento de tecnologias a base de concentrado de plaquetas tem sido aprimorado, afim de otimizar a cicatrização tecidual. O objetivo de todas estas tecnologias é extrair, através de centrifugação e métodos de manipulação, todos os elementos que poderiam ser usados para melhorar a cicatrização e promover a

regeneração de tecidos a partir de uma amostra de sangue. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi a primeira geração de derivados de amostras de sangue humano, utilizados com este propósito. Estudos comparativos mostraram que o PRP tem um efeito positivo no processo de cicatrização de feridas e na regeneração tecidual (EHRENFEST; RASMUSSEN, et al., 2009). No entanto, a adição de anticoagulantes e de trombina bovina limita a aplicação clínica do PRP e apela a estratégias alternativas, clinicamente viáveis.

Devido a restrições legais sobre a manipulação de sangue, surgiu na França uma nova família de concentrado de plaquetas, diferente de cola de fibrina ou um concentrado de plaquetas clássico. Este novo biomaterial, chamado de *platelet rich fibrin* (PRF), ou fibrina rica em plaqueta, é similar a uma matriz cicatricial autóloga (CHOUKROUN et al., 2006). Ao contrário dos outros concentrados de plaquetas usados até então, trata-se de uma técnica em que é necessária somente a centrifugação de sangue do paciente, sem outros aditivos. Esta, pretende mimetizar o processo natural de coagulação, e produzir uma membrana bioativa simples e econômica que funciona como uma rede de fibrina. Com isso, resulta tanto na migração e na proliferação celulares de forma mais eficiente. Em particular, esse biomaterial é composto por plaquetas (ricas em fatores de crescimento), rede de fibrina (servindo como uma matriz de suporte) e, em alguns casos, rica em células (principalmente as várias populações de leucócitos) (BIELECKI; EHRENFEST, 2012; EHRENFEST; DEL CORSO, et al., 2010).

Estão disponíveis várias técnicas para a preparação dos concentrados plaquetários atualmente. Todavia, as suas diferentes indicações podem parecer confusas, uma vez que cada método de manipulação origina diferentes produtos, biologicamente diferentes e com aplicações diversificadas (EHRENFEST, RASMUSSEN, et al., 2009). A classificação proposta por (EHRENFEST et al., 2012) divide os concentrados plaquetários em quatro categorias, dependendo do seu conteúdo de leucócitos e fibrina:

- P-PRP: Plasma rico em plaquetas puro;
- L-PRP: Plasma rico em plaquetas e leucócitos;
- P-PRF: Fibrina rica em plaquetas puro;
- L-PRF: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos.

O desenvolvimento da fibrina rica em plaquetas (PRF) simplificou drasticamente o procedimento de preparação de concentrados de plaquetas e facilitou

sua aplicação clínica. A eficácia clínica da PRF tem sido demonstrada em estudos pré-clínicos e clínicos, com interessantes resultados *in vitro* (EHRENFEST; DOGLIOLI, et al., 2010; EHRENFEST; RASMUSSEN, et al., 2009) com várias possibilidades de aplicações clínicas na cirurgia bucal, principalmente na cirurgia de implante com levantamento do seio maxilar e em cirurgia periodontal (BASTAMI; KHOJASTEH, 2016).

Os efeitos biológicos desta matriz de fibrina podem ser divididos em quatro aspectos da cicatrização: angiogênese, controle imunitário, recrutamento das células precursoras circundantes e proteção. A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes. Para isso, é necessária a presença de uma matriz extracelular para permitir a migração, divisão e a alteração fenotípica das células endoteliais e também a ação das plaquetas presentes neste biomaterial. A sua ativação é fundamental para iniciar a hemostasia. Contudo, a sua degranulação implica também na liberação de citocinas capazes de estimular a migração celular e a proliferação na matriz de fibrina (CHOUKROUN et al., 2006).

A propriedade de angiogênese deste substrato é explicada pela estrutura tridimensional e pela ação simultânea das citocinas que se encontram aprisionadas na estrutura da matriz. A matriz de fibrina contém diversas populações do sistema imunológico, bem como todos os elementos celulares e moleculares que permitem uma cicatrização eficaz. As capacidades de defesa contra infecções parecem ser significativas, devido às suas propriedades quimiotáticas, assim como à sua capacidade de facilitar o acesso das citocinas ao local da lesão (GHANAATI et al., 2014).

Desenvolvimentos recentes na biologia celular e molecular, frutos de pesquisa contínua (REDDY et al., 2020), aumentaram a compreensão dos processos de cicatrização e regeneração de feridas. Assim, o papel crucial dos leucócitos e seus subgrupos como principais protagonistas para modular as várias fases durante a cicatrização de feridas foram esclarecidos. Além disso, as plaquetas, bem como a rede de fibrina são conhecidos por desempenhar um papel importante no processo de cicatrização de feridas (LITVINOV; WEISEL, 2016). Os leucócitos participam na angiogênese e linfogênese, enquanto que a rede de fibrina é um fator chave nos estágios iniciais da cicatrização de feridas, tornando seus efeitos sinérgicos com as plaquetas e sua função como um reservatório de citocinas.

O processo de regeneração ou reparação do tecido requer uma reação harmoniosa de vários tipos de células, incluindo células de resposta imune (neutrófilos, macrófagos, linfócitos), células epiteliais e fibroblastos bem como outras células relevantes para o tecido em questão. O conceito de *scaffold* de PRF parece ser uma fonte ideal de componentes para o processo de cicatrização. Esta rede autóloga derivada do sangue pode ser uma fonte única de células estaminais hematopoiéticas (HSCs), que são de grande importância na medicina regenerativa, segundo revisão recente por (OGAWA et al., 2013). Contudo, ainda é controverso se os fatores de crescimento estão significativamente concentrados em preparações de PRF para facilitar a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos (MASUKI et al., 2016).

Neste método de livre acesso, uma amostra de sangue é obtida sem anticoagulante e centrifugada imediatamente durante 12 minutos. Uma grande vantagem da presente metodologia é a sua simplicidade de preparação: o processo de centrifugação ativa a coagulação e, como resultado, ocorre a formação de um coágulo. Este coágulo é constituído por uma rede de fibrina tridimensional em que as plaquetas e outras células do sangue são aprisionadas. Há uma liberação gradual e rápida de fatores de crescimento da PRF. No fim do processo, um coágulo de L-PRF pode ser recolhido no meio do tubo. Este coágulo reúne quase todas as plaquetas e metade dos leucócitos da coleta de sangue inicial (com maioria de linfócitos) (EHRENFEST, DOGLIOLI, et al., 2010). A fibrina apresenta uma dupla função: reservatório de citocinas e matriz de cicatrização celular aptos a serem liberados (EHRENFEST et al., 2012). E é uma fonte de fatores de crescimento ativos que são, entre outros, o *platelet derived growth factor* (PDGF), ou fator de crescimento derivado de plaquetas, o *transforming growth factor beta* (TGF β), fator de crescimento transformador beta, e o *vascular endothelial growth factor* (VEGF), fator de crescimento endotelial vascular. Este coágulo pode então ser utilizado diretamente como material de preenchimento ou associados com materiais de enxertia óssea, ou pode ser comprimida, transformando-se em uma membrana de fibrina L-PRF bem resistente (PECK et al., 2016). A liberação destes fatores começa de 5 a 10 minutos após a coagulação e continua durante dias (SCHÄR et al., 2015a).

Embora o “Protocolo de Choukroun” tenha sido claramente delineado, várias publicações não seguiam os métodos prescritos (PECK et al., 2016). A chave para

essas diferenças pode ter sido a utilização de centrífugas distintas ou uma força centrífuga relativa (RCF) específica (400 G).

Centrífugas são equipamentos que aplicam uma força centrífuga relativa para separar as partículas de uma solução. A RCF, também conhecida como força G (força gravitacional), é gerada quando uma determinada massa é submetida a um movimento circular, tal como ocorre no processo de centrifugação de amostras biológicas, que é o processo no qual ocorre a separação de soro, plasma e outros fluídos biológicos.

Recentes estudos demonstraram que modificações na velocidade de centrifugação e no tempo de centrifugação podem favorecer um aumento na liberação do fator de crescimento da PRF que por sua vez podem influenciar diretamente a regeneração de tecidos aumentando a migração de fibroblastos, surgindo o conceito de baixa velocidade (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; GHANAATI et al., 2014).

Embora os estudos mencionados acima evidenciem o potencial considerável de PRF em termos de regeneração de tecidos e aplicação clínica, ainda não está claro como as células são distribuídas neste tipo de arcabouço de fibrina, e como essa distribuição pode ser afetada de acordo com as variações de tempo, velocidade da centrifugação e alterações na RCF. Assim, estudos pré-clínicos e clínicos adicionais são necessários para avaliar este novo conceito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Concentrados plaquetários

Hematologistas, na década de 70, observaram que um produto do sangue processado possuía características especiais, devido à maior quantidade de plaquetas, e o chamaram PRP. Esse produto era resultado da separação de componentes do sangue, que produzia no plasma um agregado ou concentrado. Esse concentrado plaquetário era usado em tratamentos de pacientes com trombocitopenia nos processos de transfusão sanguínea (KAWASE et al., 2020).

O produto era usado em ferimentos e lesões, e possibilitava uma melhor cicatrização. O PRP era obtido a partir de sangue autólogo processado e possuía inúmeras qualidades, dentre elas o baixo risco de rejeição e a diminuição do tempo de recuperação (AMABLE et al., 2013). Isso permitiu que esse produto fosse usado em várias ocorrências médicas e, na década de 80, foi amplamente empregado na área da cirurgia maxilofacial. Nesse período observou-se que o PRP trazia vantagens em relação à ação anti-inflamatória e proliferação celular, o que resultava em um melhor processo de cicatrização e regeneração (BIELECKI; EHRENFEST, 2012).

Nos anos seguintes, o PRP foi muito aproveitado na área desportiva musculoesquelética, na recuperação de lesões de atletas profissionais. Essas lesões, muitas vezes, envolviam tendões, que particularmente possuem um maior grau de dificuldade de regeneração por ser um tecido pobre em células e irrigação vascular (MORAES et al., 2014; BAVA; BARBER, 2011; MEI-DAN et al., 2010).

Com o sucesso dos tratamentos, surgiu grande interesse comercial no potencial do PRP e, como consequência, este foi difundido para outras áreas da saúde como odontologia, ortopedia, cardiologia, pediatria, urologia, ginecologia e mais recentemente a dermatologia (KAWASE et al., 2020; MORAES et al., 2014).

Em definição, o PRP é um biomaterial obtido a partir da centrifugação do sangue, que resulta em uma porção de plasma com quantidades maiores de plaquetas que o material inicial, antes da centrifugação. Como consequência da centrifugação, existe no PRP não somente plaquetas, mas também células, fatores de coagulação, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e outras proteínas plasmáticas (EHRENFEST; RASMUSSEN et al., 2009).

O uso do PRP em intercorrências, lesões, cirurgias e áreas cirúrgicas em processo de recuperação, traz muitos benefícios ao paciente. Esses benefícios vão

desde de uma melhor hemostasia até um potencial regenerativo em cirurgias reconstrutivas. Todas essas qualidades advêm de mecanismos biológicos latentes nos componentes do PRP, que são concentrados e aplicados diretamente sobre o local desejado (LE et al., 2019; ANDIA; ABATE, 2013). Um resumo dos mecanismos biológicos e sua correlação clínica podem ser observados na Figura 1.

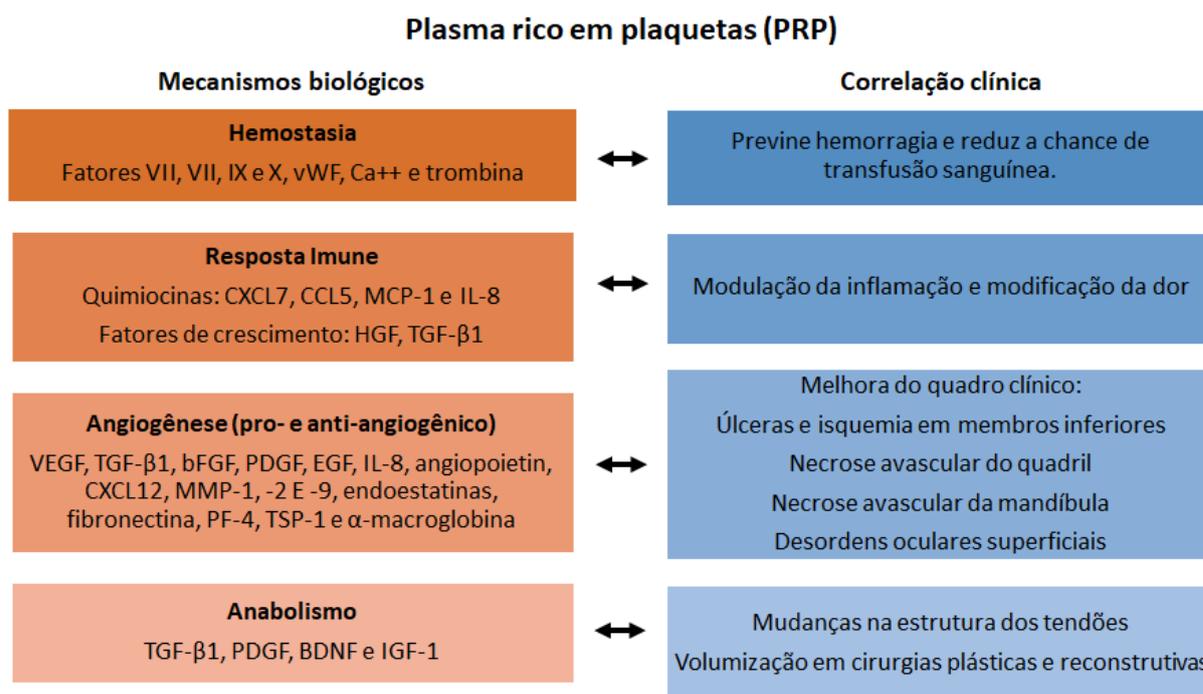


Figura 1 Benefícios do uso do PRP. Correlação entre os mecanismos biológicos e condições clínicas. Baseado em Andia e Abate, 2013.

O sangue periférico autólogo é o material base para a obtenção do PRP e é adquirido por meio de venopunção durante o ato cirúrgico. O sangue é classificado como um tipo especial de tecido conjuntivo e possui componentes figurados (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e outras moléculas) e o plasma, que confere as propriedades líquidas a este tecido (BIELECKI; EHRENFEST, 2012; EHRENFEST; RASMUSSEN, 2009). Apesar de parecer homogêneo e estável, o sangue pode ser facilmente estratificado e separado por diversos processos físicos e/ou químicos, e a centrifugação é o mais comumente usado.

Cada componente do sangue possui um gradiente de densidade, estrutura e volume diferentes, e isso é determinante no processo de precipitação. Esse fator é importante pois estabelece a concentração de cada componente após a

centrifugação, bem como a sua biofuncionalidade (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017).

Outro fator importante na composição do PRP é o grau de preservação e ativação desses componentes, sendo células ou moléculas. Deste modo, o protocolo de centrifugação caracteriza o tipo de PRP obtido e os fins para os quais será destinado (EHRENFEST; DEL CORSO et al., 2010; FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; MASUKI et al., 2016).

Devido à enorme possibilidade de modificações na composição e qualidade do PRP, a partir de variações no protocolo de obtenção e centrifugação, muitos protocolos surgiram a fim de suprir as demandas emergentes.

Mas, independentemente do protocolo, o padrão de obtenção se baseia na separação, ou estratificação, e posterior concentração dos componentes (CAO et al., 2021; MIJIRITSKY et al., 2021). De maneira geral, primeiro obtém-se o sangue do paciente, que é coletado por um tubo contendo anticoagulantes, e este passa por uma centrifugação com o intuito de separar os componentes em estratos. Em seguida, formam-se três camadas: a mais profunda composta por hemácias; a mais superficial composta predominantemente por plasma, e proteínas de baixo peso molecular, pobre em plaquetas (PPP); e entre as duas, uma camada chamada de papa leucocitária ou “buffy coat” (BC), correspondente a camada rica em leucócitos e plaquetas. Posteriormente, deste tubo são recolhidas as camadas mais superficiais, PPP e BC, e transferidas a um novo tubo sem anticoagulantes. Nessa etapa, faz-se uma nova centrifugação e a concentração dos componentes (Figura 2).

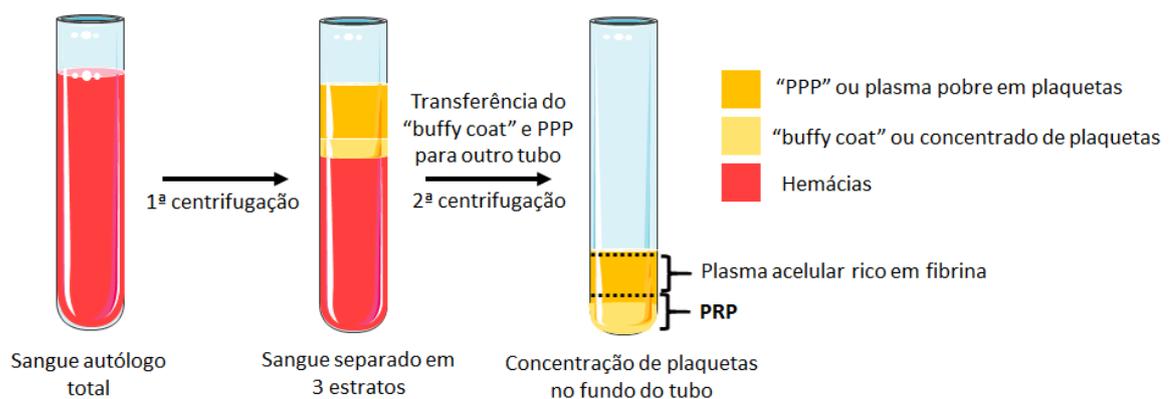


Figura 2 Processo de obtenção de PRP, protocolo clássico de dois passos. Baseado em Dohan et al, 2006.

Após esse processo, o concentrado de plaquetas pode ser diretamente aplicado no sítio operatório, ou ser ativado com a adição de trombina ou cloridrato de cálcio. A adição desses reagentes estimula a degranulação plaquetária e a liberação de fatores de diferenciação e crescimento (GHANAATI et al., 2014). Essa liberação ocorre de forma gradual tendo, aproximadamente, 70% dos fatores de crescimento liberados em 10 minutos, e próximo de 100% desses, liberados após uma hora da ativação. A liberação de frações menores pode ser detectada em até 8-10 dias da ativação inicial (SCHÄR et al., 2015a).

No processo de obtenção de PRP são usados componentes extrínsecos como os anticoagulantes, na fase de coleta do sangue, e os coagulantes na fase posterior quando uma maior ativação plaquetária é desejada. A adição desses compostos pode influenciar no potencial desses agregados plaquetários e alterar a biodisponibilidade das moléculas sinalizadoras no processo inflamatório. Ademais, esses procedimentos deixam o processo mais complexo e exigem maior capacidade técnica e maior tempo de trabalho (DAVIS et al., 2014; EHRENFEST; DOGLIOLI et al., 2010).

Existem três principais parâmetros usados para classificar os tipos de concentrados plaquetários, bem como a sua aplicabilidade. Esses parâmetros se relacionam com os *kits* de preparação e tipo de centrifuga utilizados, com o conteúdo do concentrado e com a formação de rede de fibrina que suporta as plaquetas e os leucócitos. Com base nisso são classificados, atualmente, quatro grandes categorias: plasma rico em plaquetas puro (P-PRP); plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP); fibrina rica em plaquetas puro (P-PRF); e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) (EHRENFEST et al., 2012; EHRENFEST; RASMUSSEN et al., 2009). As características de cada categoria pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 Características das quatro categorias de concentrados plaquetários. PPP, plasma pobre em plaquetas; BC, *buffy coat*; RBC, *red blood cells*.

Concentrado plaquetário	Definição	Variação do protocolo
P-PRP	Concentrado de plaquetas pobre em células e rede de fibrina.	Uso de anticoagulantes e coagulantes. Centrifugação curta e leve (1), centrifugação longa e pesada (2). No segundo passo são transferidos apenas o PPP e parte superficial do BC, e são recolhidas as porções finais do concentrado. A maior parte dos leucócitos não é recolhido.
L-PRP	Concentrado de plaquetas rico em leucócitos e pobre em rede de fibrina.	Uso de anticoagulantes e coagulantes. Centrifugação curta e leve (1), centrifugação longa e pesada (2). No segundo passo são transferidos o PPP, o BC e parte do RBC. São recolhidos as porções finais do concentrado com todo o BC.

P-PRF	Rede de fibrina rica em plaquetas e pobre em leucócitos.	Pode ou não ter o uso de anticoagulantes e coagulantes (não trombina bovina). Centrifugação curta (1) e longa (2) em alta velocidade. São coletas apenas PPP e BC.
L-PRF	Rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos.	Sem uso de anticoagulantes e coagulantes. Centrifugação única com ativação natural e imediata das plaquetas e da formação da rede de fibrina. É coletado apenas o coágulo formado no centro do tubo.

Fonte: PACHECO, ROBERTO.

Como pode ser notado, a presença de leucócitos e rede de fibrina são fundamentais para a classificação dos concentrado e, conseqüentemente, para a seleção do protocolo e finalidade do produto obtido. Os leucócitos apresentam função antiinfeciosa e de regulação imunoinflamatória, além de produzirem fatores estimulantes de angiogênese. Já a presença da rede de fibrina pode aprisionar mais leucócitos no concentrado, além de fornecer um arcabouço de matriz extracelular para participar do processo de reparação (EHRENFEST; RASMUSSEN et al., 2009).

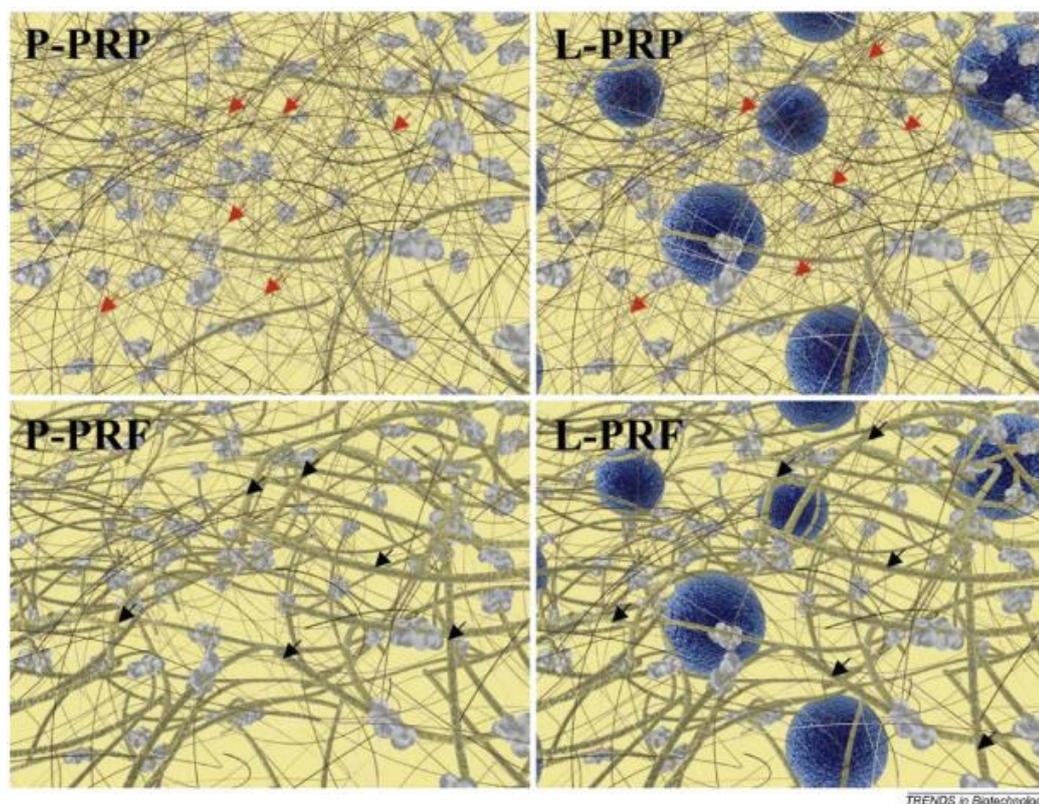


Figura 3 Representação esquemática da estrutura da matrix e de células nos diferentes concentrados plaquetários. As linhas finas amareladas representam a rede de fibrina imatura e de menor diâmetro (setas vermelhas). Essas fibras estão em maior número nos protocolos de PRP e se dissolvem rapidamente. Já as linhas grossas amarronzadas representam as redes de fibrina maduras e formam um arcabouço (setas pretas). Essas fibras são mais comuns em protocolos de PRF e se mantêm por maior período de tempo. Os círculos azuis representam os leucócitos e as formas cinzas representam as plaquetas. (EHRENFEST, RASMUSSEN et al., 2009).

Tendo em vista esses benefícios, o a PRF tem sido o biomaterial de escolha em muitos processos de cicatrização e regeneração por apresentar um maior potencial biológico de cicatrização.

2.2 Fibrina rica em plaquetas (PRF)

O uso de anticoagulantes, no ato da coleta do sangue periférico, resultava em efeitos negativos no processo de cicatrização do sítio operado. A presença desses anticoagulantes impediam, em parte, a formação do coágulo e a liberação de fatores plaquetários e celulares *in vivo*. Isso poderia prejudicar, ou ao menos atrasar, a recuperação da área cirúrgica (PECK et al., 2016; WU et al., 2012). Além disso, restrições legais no manuseio do sangue levou à limitação do uso de reagentes extrínsecos e aplicação desses em pacientes. Com isso em mente, pesquisadores buscaram desenvolver uma segunda geração de concentrados plaquetários em que não se utilizasse anticoagulantes e geleificantes (CHOUKROUN et al., 2006).

Choukroun et al (2001) desenvolveram um protocolo em que não se utilizava anticoagulantes no processo de coleta, o que resultava em geleificação natural do sangue, e o produto obtido foi nomeado de fibrina rica em plaquetas (PRF). Nesse novo protocolo, os processos celulares de cicatrização transcorrem de forma mais natural, sem interferência ou interrupções. Dohan et al (2006) descreveram a PRF, bem como a técnica de obtenção, e a caracterizaram como um biomaterial com características de matriz, ou *scaffold*. O biomaterial foi assim caracterizado por apresentar uma estrutura 3D, como um arcabouço de fibrina, onde células e citocinas recém liberadas poderiam ficar “aprisionadas”. Essas qualidades tornava a PRF o biomaterial da classe dos concentrados plaquetários que melhor mimetizava a composição, estrutura e função observadas em um processo cicatricial natural.

Nesse protocolo são coletados cerca de 9 ml de sangue periférico em tubo de plástico revestido de vidro estéril sem tratamento com anticoagulantes. O tubo é então centrifugado imediatamente a 3000 rpm, por 10 min. A ativação das plaquetas e da cascata de coagulação acontece de forma rápida, através do contato com as paredes de vidro com carga negativa. Durante o processo ocorre a ativação do fibrinogênio, concentrado na parte superior do tubo, pela trombina circulante, que se polimeriza em fibrina. A polimerização da fibrina ocorre em cadeia e um coágulo se forma no centro do tubo, entre as hemácias, ao fundo, e o plasma acelular no topo (CHOUKROUN; GHANAATI, 2018; DOHAN et al., 2006b) (Figura 4). Após a centrifugação, retira-se o

coágulo formado e separa-se a parte amarela da parte vermelha inferior com o auxílio de uma tesoura. Em uma superfície estéril, comprime-se o a PRF para remover os fluidos, e então obtém-se uma membrana de fibrina autóloga bem resistente e elástica, com cerca de 3 cm x 1.5 cm (DOHAN et al., 2006b) (Figura 5).

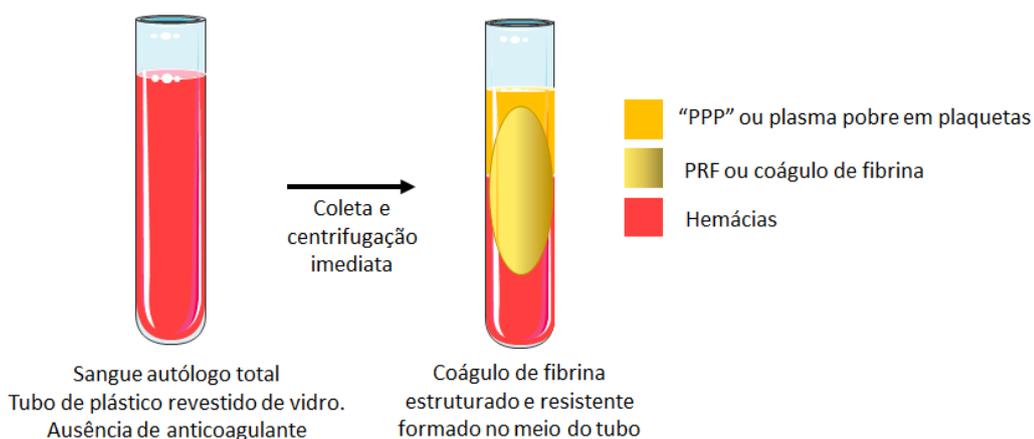


Figura 4 Processo de obtenção de PRF. Baseado em *Choukroun & Ghanaati, 2018*.

A rapidez com que se manuseia o sangue recém coletado, é fundamental para o sucesso da técnica. Deve-se centrifugar o material coletado imediatamente, caso contrário apenas um coágulo pequeno irá se formar devido a polimerização difusa da fibrina. O objetivo da técnica bem aplicada é concentrar a polimerização da rede de fibrina, iniciada naturalmente, e isso só é possível com o rápido manuseio. Apesar de exigir maior atenção quanto a velocidade do emprego da técnica, o protocolo de PRF é bem simples por não fazer uso de reagentes extrínsecos e necessitar somente de um passo de centrifugação.

Alguns estudos demonstraram que o aumento no tempo de centrifugação somado à diminuição da velocidade produzia um produto PRF com características e propriedades um pouco diferentes. Essa técnica modificada permitia que mais leucócitos ficassem retidos no concentrado plaquetário, e esta foi nomeada de fibrina rica em plaquetas avançada (A-PRF) (GHANAATI et al., 2014). O A-PRF foi muito utilizado em áreas cirúrgicas de terceiros molares e demonstrou significativa redução de dor pós-operatória e redução de uso de analgésico (USTAOĞLU et al., 2020). A ação dos leucócitos derivados do A-PRF em áreas pós-operatórias pode ajudar no processo de limpeza e proteção, evitando a infecção e contaminação do sítio operado. Além disso, podem agilizar o processo cicatricial inicial e melhorar as condições pós cirúrgicas (ZUMSTEIN et al., 2012).

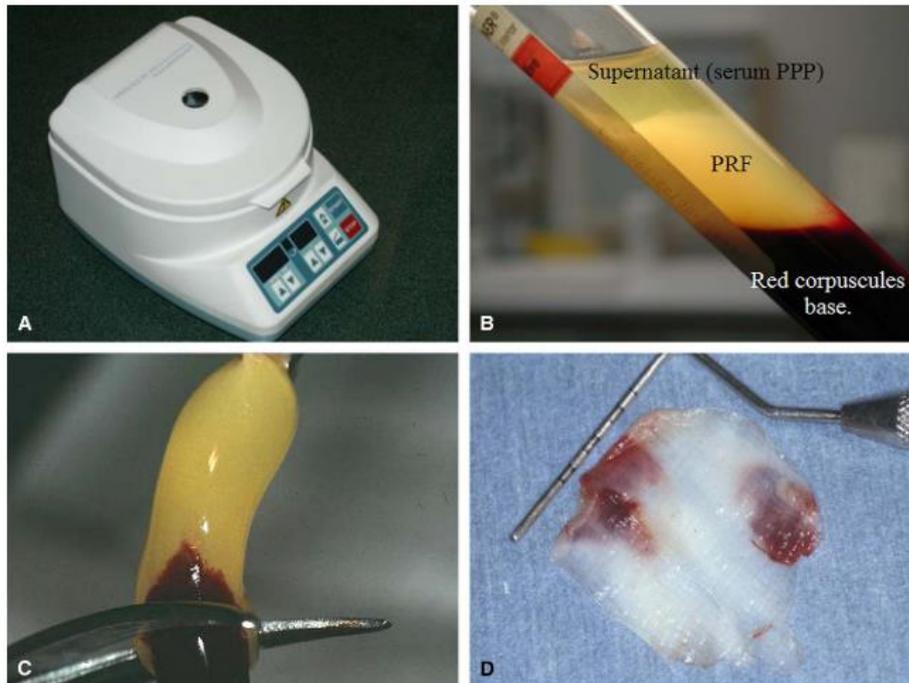


Figura 5 Obtenção de PRF. (A) Centrífuga utilizada para processamento do sangue a 3000 rpm por 10 min. (B) Coágulo de fibrina obtido entre o sobrenadante PPP e as hemácias. (C) Coleta e manuseio do da PRF. (D) Membrana obtida após a remoção dos fluidos do da PRF. Figura retirada do artigo Fonte: (Dohan et al., 2006a).

2.3 L-PRF: fatores de crescimento.

Nas fases iniciais do processo de cicatrização, as plaquetas interagem com o fibrinogênio circulante para polimerizar redes de fibrina, e juntos formarem um tampão hemostático. Essa conjunção resulta em um arcabouço temporário que consegue capturar citocinas e servir de suporte celular, além de estimular a migração e proliferação celular. Esse ambiente biológico ajuda a tornar mais propícia a restauração da homeostase tecidual, com o fornecimento de fatores de crescimento e citocinas que promovem a regulação da inflamação, angiogênese, síntese e remodelação de um novo tecido (PALLUA et al., 2010).

Esse é o mesmo cenário biológico que o uso de PRF objetiva mimetizar e potencializar, para melhorar e agilizar o processo de cura. Cada componente da PRF (plaquetas, leucócitos e fibrina) possui um papel no processo de cicatrização e regeneração e, as alterações na liberação e concentração dos mediadores inflamatórios devem ser observados nos diferentes protocolos de aquisição do material (DAVIS et al., 2014).

As plaquetas são componentes do sangue, derivados de megacariócitos, que possuem função importante na obliteração vascular e facilitação da formação do

coágulo de fibrina. Elas são capazes de estimular a proliferação e ativação de células envolvidas em cicatrização de feridas, incluindo fibroblastos, neutrófilos, macrófagos e células-tronco mesenquimais através da liberação e ativação de biomoléculas importantes (LE et al., 2019). Já os leucócitos caracterizam um grupo grande de células sanguíneas que desempenham diversas funções importantes na ação antimicrobiana e inflamatória. Os tipos mais comuns encontrados na rede de fibrina do PRF são os neutrófilos, macrófagos e em sua maioria linfócitos. Esses tipos celulares são capazes de manter a liberação de biomoléculas por um maior período de tempo, quando estimulados (ZUMSTEIN et al., 2012).

A trama tridimensional de fibrina, por sua vez, confere um suporte que consegue capturar as moléculas produzidas, concentrando-as no local e impedindo sua rápida degradação. A fibrina, fibronectina e fatores de crescimento são essenciais para modular expressão de integrina, proliferação de fibroblastos e sua migração dentro da ferida (EHRENFEST; DEL CORSO et al., 2010). A confluência da ação desses componentes desempenha um papel crucial no benefício molecular mais característico da L-PRF: a rápida e prolongada liberação de fatores de crescimento (SCHÄR et al., 2015^a; EHRENFEST; de PEPPPO, et al., 2009).

Fatores de crescimento são as moléculas que promovem a comunicação celular e influenciam a inflamação, angiogênese, migração de células-tronco e proliferação. As biomoléculas fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF- β 1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1) são encontradas na PRF e têm sido alvo de estudos de liberação e atividade molecular dos concentrados plaquetários (MASUKI et al., 2016).

O TGF- β 1 é um polipeptídeo da família dos fatores de transformação *beta* (β) produzido por plaquetas e leucócitos. Possui ação anti-proliferativa, portanto regulatória, dependendo do tipo celular, sendo a molécula mais comum na regulação da atividade intercelular. Ele ainda pode ter função na diferenciação, senescência e apoptose celular. Já os seus efeitos nas moléculas de matriz o tornam a citocina com o maior poder de fibrose, quando produzido por osteoblastos e fibroblastos. A grande atividade de TGF- β 1 pode favorecer uma cicatrização fibrótica (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2017; QIAO et al., 2017).

VEGF é uma proteína, secretada por células e plaquetas, que serve como sinalizadora para a angiogênese. É um homodímero ligado por dissulfeto que compartilha estrutura homóloga ao PDGF, e é um fator mitogênico específico de células endoteliais. Ele regula positivamente a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células endoteliais e também age como um quimiotático para monócitos e mastócitos. Citocinas como o EGF, TGF- β e IL-6 aumentam a expressão de VEGF, e este possui a característica de aumentar a permeabilidade vascular até mais que a histamina (QIAO et al. 2017; SALGADO et al. 2001).

EGF é um peptídeo liberado por plaquetas e macrófagos e possui função principal de estimular a proliferação de células epiteliais. Outras funções desempenhadas pelo EGF são o aumento da síntese proteica, estímulo para a síntese de DNA, crescimento e maturação celular e quimiotaxia (ARIZON et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2016a).

Finalmente, o IGF-1 é uma proteína com estrutura molecular similar a insulina que é produzida em maior parte pelo fígado. Os leucócitos também são capazes de produzi-lo e no ambiente inflamatório tem o papel de participar da ativação de células T e promover a sobrevivência de células T e fibroblastos. Possui um papel muito importante nas fases mais avançadas da cicatrização pelas propriedades anti-apoptóticas e anabólicas, através do estímulo para a produção de matriz extracelular. A produção local de IGF-1 e TGF- β 1 são responsáveis pela manutenção e síntese de fibras colágeno na neoformação tecidual (DOHAN et al., 2006b; SCHÄR et al., 2015a).

A importância dos fatores de crescimento no potencial biológico dos concentrados plaquetários têm sido avaliada em vários trabalhos e tem se mostrado como uma das peças chaves no benefício do uso de PRF. As variações entre as técnicas e também entre os indivíduos podem contribuir na variação das quantidades de fatores de crescimento encontradas. Os parâmetros de velocidade, período de tempo e concentração de liberação desses componentes são comumente usados nos trabalhos para a avaliação desse processo biológico.

Schär et al., (2015) avaliaram a concentração e cinética dos fatores de crescimento liberados derivados do da L-PRF, L-PRP e coágulo sanguíneo natural em uma cultura *in vitro*, em um período de 28 dias. Foi visto que maiores quantidades de TGF- β 1 foram liberadas no na L-PRF, enquanto mais VEGF foi liberado em coágulo natural. Além disso, foi visto que a liberação de IGF-1 durou até o primeiro dia, no L-PRP e coágulo natural, mas permaneceu até o terceiro dia na L-PRF. Nesse trabalho

também foi observado que as células mesenquimais e endoteliais demonstraram maior migração celular em resposta a cultura de L-PRF e coágulo natural, em comparação ao à L-PRP.

Kobayashi et al., (2016) apresentaram um trabalho no qual compararam a liberação de fatores de crescimento ao longo do tempo em três tipos de concentrados: PRP, PRF e A-PRF. Foram avaliadas a liberação desses fatores nos tempos 15 min, 60 min, 8 h, 1 dia, 3 dias, e 10 dias. Foi visto que o PRP liberou as maiores quantidades de fatores nos primeiros 15-60 min. Essa marca foi ultrapassada em todos os outros tempos avaliados e se manteve assim até o décimo dia pelo pela A-PRF. O A-PRF manteve uma liberação de fatores contínua e superior ao à PRP.

Outros trabalhos foram publicados e confirmaram a superioridade na liberação de fatores de crescimento pela categoria das PRFs. Mas existem ainda na literatura lacunas sobre a influência do protocolo e equipamentos utilizados na aquisição dos concentrados. Uma dessas lacunas é referente a influência da força centrífuga na concentração, preservação e liberação desses fatores biológicos ao longo do tempo.

2.4 Protocolos e centrifugação: relação da cinética e a liberação de mediadores inflamatórios

A ideia inicial do protocolo de Choukroun (2001) para a obtenção de PRF era de ser um método simples e de fácil reprodutibilidade. Nesse método era especificado o uso de uma centrífuga do modelo PC-02 e o uso de um kit de coleta da Process® (49 Rue Gioffredo, Nice, França).

O sangue era centrifugado a 3000 rpm, o que resultaria em um RCF de 400g (KOBAYASHI et al., 2016a). Os trabalhos que se seguiram com a avaliação da PRF variavam o protocolo original pela não utilização do mesmo modelo de centrífuga e kit de coleta. Nesses trabalhos eram utilizadas as mesmas velocidades, de 3000 rpm, mas não eram informados o RCF. Além disso, outros modelos de centrífuga poderiam estar sendo usados na prática clínica e poderiam não reproduzir os benefícios relatados nos trabalhos (PECK et al., 2016).

Normalmente, o uso de centrífugas e dos protocolos de obtenção de concentrados plaquetários se atém a descrição e aplicação dos valores de rpm, que nos informa somente a velocidade da centrifugação. A melhor expressão das forças geradas pela centrífuga, ou força G, é a RCF que é calculada considerando a velocidade de rotação, ou rpm, e o raio, ou r , do centro da centrífuga. O resultado é

expresso em número de vezes de gravidade, ou g . As características gerais dos vetores e forças exercidos no processo de obtenção de PRF podem ser vistas na Figura 6.

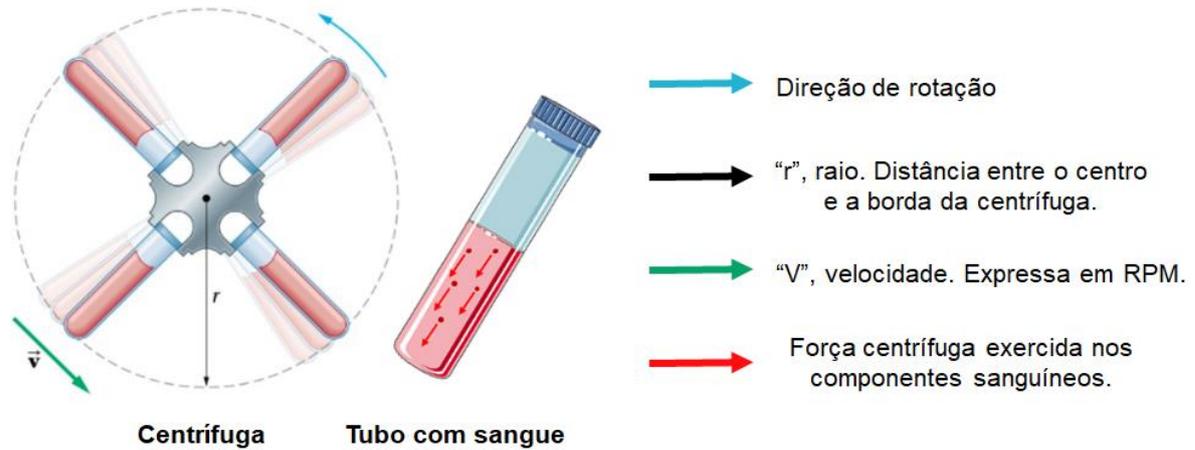


Figura 6 Centrífuga e forças relacionadas. Desenho esquemático representando o rotor de uma centrífuga com os tubos de sangue em rotação e um tubo de coleta sob influência da força centrífuga. A linha azul representa a direção de rotação; a linha preta, comprimento do raio do rotor; a linha verde, a velocidade de rotação, dada em rpm; e a linha vermelha, força resultante que atua nos componentes sanguíneos, representados pelos círculos vermelhos. Fonte: PACHECO, ROBERTO

O funcionamento das centrífugas baseia-se em colocar amostras em rotação em torno de um eixo fixo. A essas amostras é aplicada uma força de aceleração perpendicular ao eixo. As unidades para indicar os parâmetros de uma centrifugação são rpm e RCF:

- rpm é a velocidade de rotação. Ex.: Se a rotação de uma centrífuga é de 200 rpm, significa que o objeto está fazendo 200 rotações por minuto em torno de um eixo fixo.
- RCF ou força G é a força exercida durante a centrifugação. Ex.: Se a RCF é de 500 $x g$, significa que a força centrífuga que está sendo aplicada é 500 vezes maior que a força gravitacional da Terra. A relação entre essas unidades é determinada pela seguinte equação: $RCF \text{ ou } \text{força } G = 1,12 \times R \times (\text{rpm}/1000)^2$, onde, R é o raio do rotor em milímetros. Obs.: O valor do raio (R) pode ser medido de três formas: até a tampa do tubo (R_{min}), até o meio do tubo (R_{av}) ou até o fundo do tubo (R_{max}). Assim, para centrífugas diferentes, o protocolo deverá ser adaptado ao tamanho de raio específico da mesma. Pode-se lançar mão de uma ferramenta que possibilite uma conversão rápida das rotações por minuto (rpm) para força G ou vice-versa.

Ao contrário, estudos realizados por Dohan *et al*, 2017, relatam que o a A-PRF obtida ao se reduzir a velocidade de centrifugação, teve um desempenho inferior

ao à L-PRF convencional, no que tange à liberação de citocinas, sendo também completamente dissolvida no terceiro dia de cultura.

A liberação do fator de crescimento e o número total de leucócitos e plaquetas foram analisados em relação à variação sistemática da exposição à RCF ou força G, que é a força exercida durante a centrifugação, estudo publicado por Choukroun & Ghanaati (2018). Os resultados demonstraram que a redução do RCF de um intervalo elevado para um espectro baixo dentro de matrizes autólogas com PRF conduz a um aumento significativo do número de leucócitos e plaquetas, bem como à concentração do fator de crescimento (VEGF e TGF- β 1), no período testado de 1 e 24 horas. Com base em seus resultados, os autores postulam o conceito de centrifugação à baixa velocidade, ou *low speed centrifugation concept* (LSCC), que aumenta o potencial de regeneração de matrizes de fluidos PRF. Consequentemente, a redução de RCF por aplicação de LSCC abre novas vias para matrizes de PRF avançadas, nas quais a comunicação célula-célula entre plaquetas e leucócitos e a destas células dentro do tecido receptor pode resultar melhorar a em regeneração tecidual melhorada.

Entretanto, mediante a literatura pesquisada, não se encontrou uma correlação adequada entre a velocidade e força centrífuga na cinética de liberação de citocinas e fatores de crescimento pela PRF humana; considerando ainda neste aspecto, a variação da exposição à RCF ou força G, a concentração dos fatores de crescimento liberados de leucócitos e plaquetas (L-PRF) durante a cultura in vitro em diferentes tempos.

Assim sendo o objetivo do trabalho encontra-se descrito a seguir.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência força centrífuga na cinética de fatores de crescimento pela fibrina rica em plaquetas (PRF) humana.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a liberação quantitativa dos fatores de crescimento em relação à variação da exposição à RCF ou força G.

- b) Analisar a concentração dos fatores de crescimento liberados de leucócitos e plaquetas (L-PRF) durante a cultura in vitro em diferentes tempos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de amostras de coágulo de PRF

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFMG com o Número do Parecer : 2.381.598. Foram utilizados seis voluntários saudáveis oriundos do Center for Gastrointestinal Biology do ICB – UFMG (faixa etária 20-45 anos, ASA 1), não fumantes, sem história recente de ingestão de álcool, aspirina ou qualquer medicação nem doenças correlacionadas com o processo de coagulação. Todas as coletas de sangue foram realizadas e processadas por bioquímicos ou biomédicos treinados, oriundos do *Center for Gastrointestinal Biology* do ICB – UFMG.

Previamente, na semana dos testes, todos os pacientes foram submetidos a uma coleta de amostra de sangue para verificação dos níveis normais das células vermelhas, leucócitos e plaquetas. Para cada voluntário, dois tubos de sangue (tubos de plástico revestidos com vidro, 10ml, sem anticoagulante) foram obtidos a partir da veia antecubital, recolhidos utilizando-se sistemas de coletas a vácuo equipados com agulhas 21 G, para cada protocolo testado, totalizando seis tubos por paciente.

O sangue foi coletado de forma rápida (menos de 25 segundos por tubo) e a centrifugação para cada protocolo começou após o último tubo de cada grupo ter sido recolhido ao longo de um tempo total de 2-3 minutos máximo. Para neutralizar o parâmetro relativo à qualidade da centrífuga, foi utilizada a mesma centrífuga científica, para todos os protocolos testados. Isso resultou em três tempos de coletas para cada paciente.

As membranas de PRF foram preparadas de acordo com um protocolo original (DOHAN, 2006) e para também com duas alterações na RCF. Essa alteração resultou em um protocolo com o dobro da RCF original e outro protocolo com metade da RCF original. Em todos os protocolos testados o tempo de centrifugação foi constante.



Figura 7: Captação das membranas dentro da capela de fluxo laminar

Os protocolos utilizados foram:

- 1) **L-PRF:** PRF padrão (protocolo original, DOHAN, 2006) - Tubo de plástico revestido de vidro estéril (10 mL; Força de 400g, durante 12 min);
- 2) **APRF+:** PRF- RCF alto. Tubo de plástico revestido de vidro estéril (10 ml, Força de 800 g; durante 12 min);
- 3) **A-PRF:** PRF- RCF baixo. Tubo de plástico revestido de vidro estéril (10 ml, Força de 200 g; durante 12 min).

Após centrifugação, os coágulos/membranas foram cuidadosamente recuperados a partir dos tubos. A fração de células vermelhas do sangue foi removida de tal modo que a parte do coágulo rico em fibrina não seja fosse danificada. Esta técnica é descrita detalhadamente no protocolo desenvolvido por Dohan, 2006.

4.2 Quantificação de Proteínas com ELISA

Para determinar a quantidade de fatores de crescimento libertados a partir de L-PRF, APRF+ e A-PRF aos 15 min, 1 dia, 3 dias e 7 dias, as amostras foram colocadas num agitador incubadora a 36°C para permitir a libertação do fator de crescimento no meio de cultura. Em cada ponto de tempo, os 5 ml de meio de cultura foram recolhidos, congelados e substituídos por 5 ml de meios de cultura adicionais. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o método ELISA.

Nos pontos de tempo desejados, FGF (DY252, gama = 16,38-4000 pg/ml), TGF-p1 (DY240, gama = 31,20-2000 pg / ml), VEGF (DY293B, gama = 15,6-1000 pg / ml), EGF (DY236, gama = 3,91- 250 pg / ml) e IGF-1 (DY291 , Intervalo = 31,20-2000 pg / ml) foram quantificados utilizando um kit ELISA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

4.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando Prism Versão 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, La Jolla, EUA). Inicialmente os dados foram analisados descritivamente. Para as variáveis categóricas foram apresentadas frequências absolutas e relativas e para as variáveis numéricas, medidas-resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) .

As comparações de médias foram realizadas utilizando-se o teste não paramétrico de Friedman. Em se verificando diferenças de médias, os grupos de médias distintos foram identificados via comparações múltiplas de Dunn-Bonferroni para se manter o nível de significância global.

Para todos os testes estatísticos foram utilizados um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SPSS 20.0 e STATA 17 .

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas das amostras avaliadas

Foram avaliadas as informações de 6 pacientes, cuja média das idades foi de 36,8 anos (DP= 7,1 anos), sendo observada uma idade mínima de 27 anos e máxima de 45 anos. Desses pacientes, 66,7% eram do sexo feminino. Todos os indivíduos incluídos nesse estudos eram sistemicamente saudáveis.

5.2 Comparação da variação de tempo de incubação nos diferentes RCF, por fator de crescimento avaliado

Conforme tabela 1 e gráficos 1 a 5, verificaram-se diferenças de médias entre tempos de incubação para EGF submetidas às forças 200G ($p=0,042$), 400G ($p=0,011$), 800G ($p=0,029$); TGF α submetidas às forças 200G ($p<0,001$), 400G ($p=0,001$), 800G ($p<0,001$) e VEGF submetidas às forças 200G ($p=0,001$), 400G ($p<0,001$), 800G ($p=0,001$). Já para FGF e IGF1, não se verificaram diferenças de médias entre tempos de incubação independentemente das forças de centrifugação. Dessa forma, tem-se que:

- EGF – Sob a centrifugação a 200G, verificou-se que a média a 15 minutos foi inferior ao de 1 dia e 7 dias, similares entre si. Já para as centrifugações a 400G e 800G, observou-se que a média aos 15 minutos foi inferior ao de 7 dias, não se verificando diferenças de médias entre demais momentos de incubação;

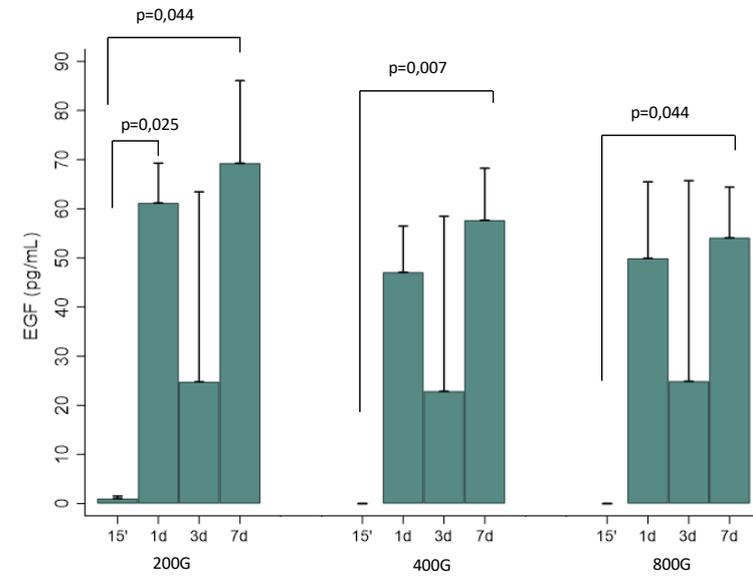
- TGFa – Sob a centrifugação a 200G e 800G, observou-se que as médias a 15 minutos foram inferiores ao de 3 dias e 7 dias. Além disso, verificou-se que a média de 1 dia foi inferior ao de 7 dias. Já na condição de 400G, nota-se somente que a média de 15 minutos foi inferior ao de 7 dias;

- VEGF – Sob a centrifugação a 200G e 400G, observou-se que as médias a 15 minutos foram inferiores ao de 3 dias e 7 dias, não se verificando diferenças de médias entre esses dois momentos. Já na condição de 800G, nota-se que a média de 15 minutos foi inferior ao de 7 dias. Adicionalmente, para 400G e 800G, as médias de 1 dia foram inferiores aos de 7 dias.

Tabela 2 Medidas – resumo dos fatores de crescimento por tempo de incubação, segundo força de centrifugação

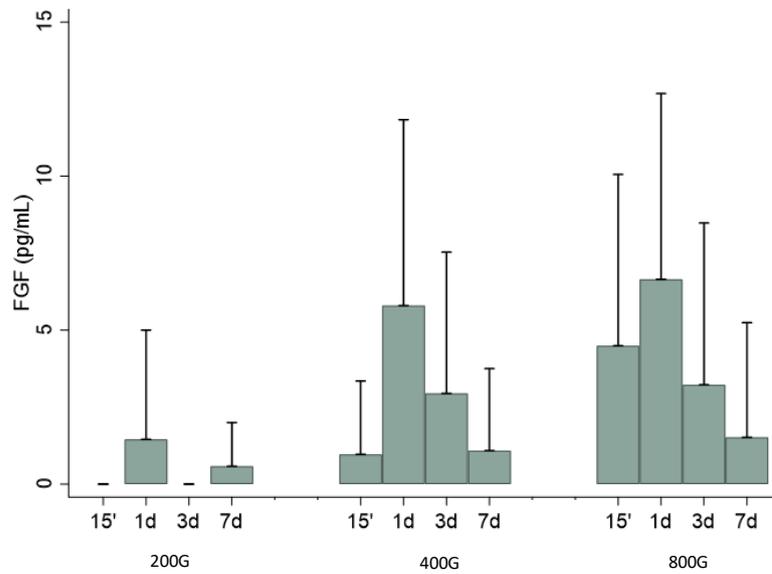
	Tempo de incubação				p [§]	p [†]						
	15'	1 dia	3 dias	7 dias		15' x 1 dia	15' x 3 dias	15' x 7 dias	1 dia x 3 dias	1 dia x 7 dias	3 dias x 7 dias	
EGF (pg/mL)												
200G	1,05 ± 0,50	61,16 ± 8,11	24,80 ± 38,61	69,28 ± 16,77	0,042	0,025	1,000	0,044	0,265	1,000	0,442	
400G	0,00 ± 0,00	47,08 ± 9,41	22,86 ± 35,59	57,65 ± 10,59	0,011	0,344	0,705	0,007	1,000	1,000	0,561	
800G	0,00 ± 0,00	49,94 ± 15,55	24,90 ± 40,79	54,09 ± 10,29	0,029	0,152	1,000	0,044	1,000	1,000	1,000	
FGF (pg/mL)												
200G	0,00 ± 0,00	1,45 ± 3,55	0,00 ± 0,00	0,58 ± 1,42	0,572	-	-	-	-	-	-	
400G	0,97 ± 2,38	5,80 ± 6,03	2,95 ± 4,58	1,09 ± 2,66	0,434	-	-	-	-	-	-	
800G	4,49 ± 5,56	6,65 ± 6,03	3,22 ± 5,26	1,52 ± 3,72	0,158	-	-	-	-	-	-	
IGF1 (pg/mL)												
200G	0,87 ± 1,01	1,04 ± 0,92	0,82 ± 1,01	0,21 ± 0,50	0,233	-	-	-	-	-	-	
400G	0,66 ± 0,94	1,06 ± 1,25	0,96 ± 1,26	0,48 ± 1,17	0,372	-	-	-	-	-	-	
800G	1,33 ± 1,56	1,45 ± 1,70	1,17 ± 1,75	0,39 ± 0,43	0,756	-	-	-	-	-	-	
TGFa (pg/mL)												
200G	0,47 ± 1,16	4,19 ± 3,48	11,99 ± 7,29	24,89 ± 10,41	<0,001	1,000	0,044	<0,001	1,000	0,044	1,000	
400G	0,64 ± 1,58	5,37 ± 2,63	10,61 ± 4,14	22,71 ± 6,75	0,001	0,705	0,083	<0,001	1,000	0,083	0,705	
800G	0,89 ± 2,19	8,24 ± 5,03	16,44 ± 9,15	31,19 ± 12,20	<0,001	1,000	0,044	<0,001	1,000	0,044	1,000	
VEGF (pg/mL)												
200G	2,98 ± 7,30	80,16 ± 44,45	160,18 ± 63,44	259,65 ± 95,91	0,001	0,705	0,044	0,001	1,000	0,152	1,000	
400G	5,47 ± 9,61	71,11 ± 34,96	145,05 ± 69,72	262,22 ± 160,41	<0,001	1,000	0,044	<0,001	1,000	0,044	1,000	
800G	13,22 ± 16,93	76,96 ± 39,27	198,37 ± 105,04	337,50 ± 186,96	0,001	1,000	0,083	0,001	0,705	0,022	1,000	

p[§] - nível descritivo do teste de Friedman.p[†] - nível descritivo das comparações múltiplas de Dunn-Bonferro



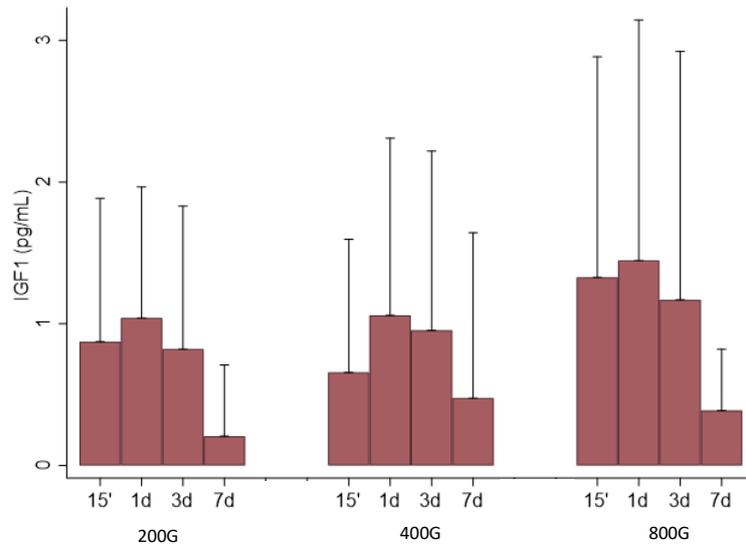
Teste para efeito de tempo de incubação: 200 G: p=0,042; 400G: p=0,011; 400G: p=0,029.

Gráfico 1 Média (DP) de EGF (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.



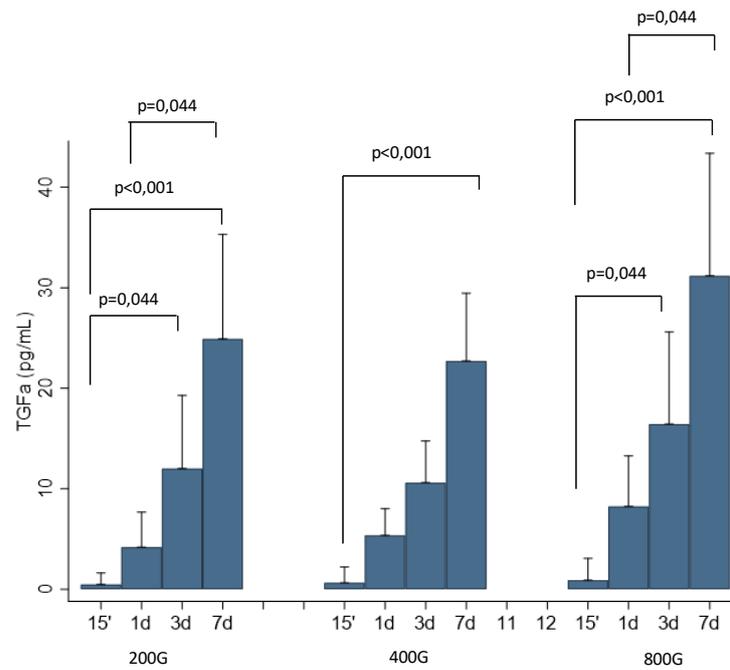
Teste para efeito de tempo de incubação: 200 G: p=0,572; 400G: p=0,434; 400G: p=0,158.

Gráfico 2 Média (DP) de FGF (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação



Teste para efeito de tempo de incubação: 200 G: $p=0,233$; 400G: $p=0,372$; 800G: $p=0,756$.

Gráfico 3 Média (DP) de IGF1 (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.



Teste para efeito de tempo de incubação: 200 G: $p<0,001$; 400G: $p=0,001$; 800G: $p<0,001$.

Gráfico 4 Média (DP) de TGFa (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação

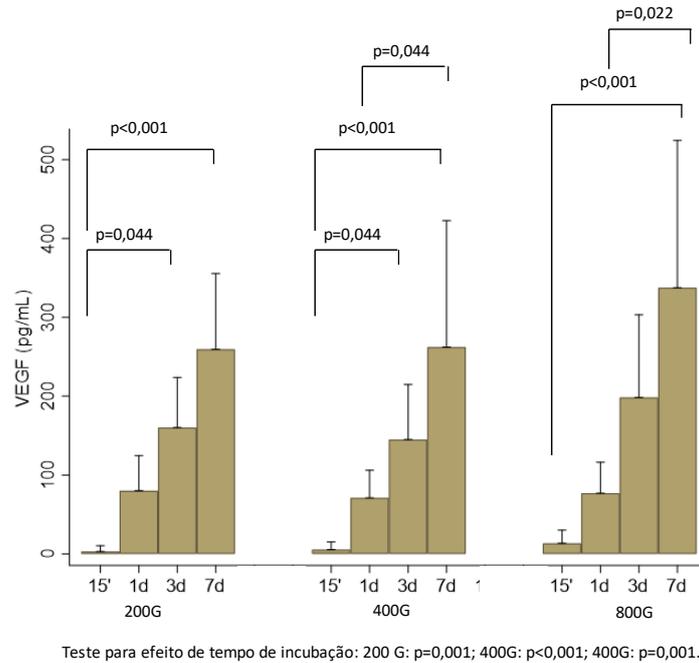


Gráfico 5 Média (DP) de VEGF (pg/mL) por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.

5.3 Comparação da liberação dos fatores de crescimento nas variações de tempo de incubação entre os diferentes RCF

Conforme Tabela 3 e Gráficos 6 a 10, verificaram-se diferenças de médias entre forças de centrifugação para EGF aos 15 minutos ($p=0,002$), 1 dia ($p=0,042$) e 7 dias ($p=0,009$) de incubação e para VEGF aos 15 minutos ($p=0,009$). Já para FGF, IGF1 e TGFa não se observaram diferenças de médias entre forças de centrifugação em todos os tempos de incubação. Dessa forma:

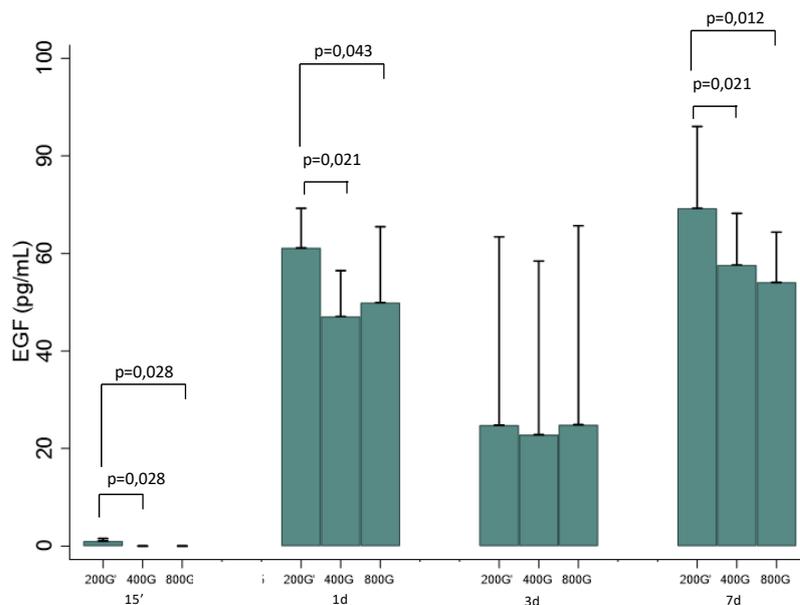
- EGF – Aos 15 minutos, 1 dia e 7 dias, verificou-se que as médias dessa citocina submetida a 200G foi superior aos de 400G e 800G, similares entre si;
- VEGF – Verificou-se diferenças de médias entre forças apenas aos 15 minutos – a média da citocina aos 200G foi inferior ao de 800G.

Tabela 3 Medidas – resumo dos fatores de crescimento por força de centrifugação, segundo tempo de incubação

	Força da Centrifugação			p ^s	p ^t		
	200	400	800		200 x 400	200 x 800	400 x 800
EGF (pg/mL)							
15'	1,05 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,002	0,028	0,028	1,000
1 dia	61,16 ± 8,11	47,08 ± 9,41	49,94 ± 15,55	0,042	0,021	0,043	1,000
3 dias	24,80 ± 38,61	22,86 ± 35,59	24,90 ± 40,79	0,368	-	-	-
7 dias	69,28 ± 16,77	57,65 ± 10,59	54,09 ± 10,29	0,009	0,021	0,012	1,000
FGF (pg/mL)							
15'	0,00 ± 0,00	0,97 ± 2,38	4,49 ± 5,56	0,061	-	-	-
1 dia	1,45 ± 3,55	5,80 ± 6,03	6,65 ± 6,03	0,179	-	-	-
3 dias	0,00 ± 0,00	2,95 ± 4,58	3,22 ± 5,26	0,273	-	-	-
7 dias	0,58 ± 1,42	1,09 ± 2,66	1,52 ± 3,72	0,867	-	-	-
IGF1 (pg/mL)							
15'	0,87 ± 1,01	0,66 ± 0,94	1,33 ± 1,56	0,311	-	-	-
1 dia	1,04 ± 0,92	1,06 ± 1,25	1,45 ± 1,70	0,174	-	-	-
3 dias	0,82 ± 1,01	0,96 ± 1,26	1,17 ± 1,75	0,717	-	-	-
7 dias	0,21 ± 0,50	0,48 ± 1,17	0,39 ± 0,43	0,761	-	-	-
TGFa (pg/mL)							
15'	0,47 ± 1,16	0,64 ± 1,58	0,89 ± 2,19	0,368	-	-	-
1 dia	4,19 ± 3,48	5,37 ± 2,63	8,24 ± 5,03	0,069	-	-	-
3 dias	11,99 ± 7,29	10,61 ± 4,14	16,44 ± 9,15	0,115	-	-	-
7 dias	24,89 ± 10,41	22,71 ± 6,75	31,19 ± 12,20	0,135	-	-	-
VEGF (pg/mL)							
15'	2,98 ± 7,30	5,47 ± 9,61	13,22 ± 16,93	0,009	1,000	0,028	0,250
1 dia	80,16 ± 44,45	71,11 ± 34,96	76,96 ± 39,27	0,607	-	-	-
3 dias	160,18 ± 63,44	145,05 ± 69,72	198,37 ± 105,04	0,513	-	-	-
7 dias	259,65 ± 95,91	262,22 ± 160,41	337,50 ± 186,96	0,846	-	-	-

p^s - nível descritivo do teste de Friedman.

p^t - nível descritivo das comparações múltiplas de Dunn-Bonferroni.



Teste para efeito de força: 15': p=0,002; 1d: p=0,042; 3d: p=0,368; 7d: p=0,009.

Gráfico 6 Média de EGF (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação

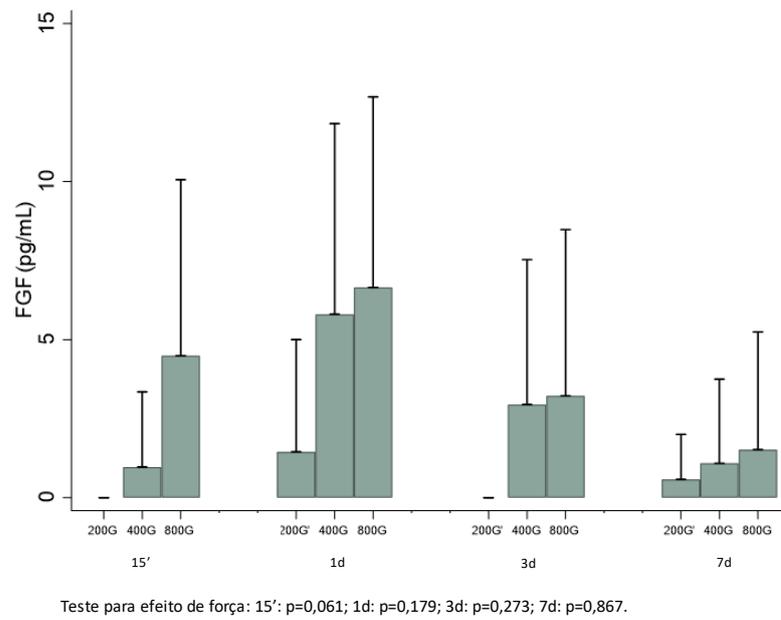


Gráfico 7 Média de FGF (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação

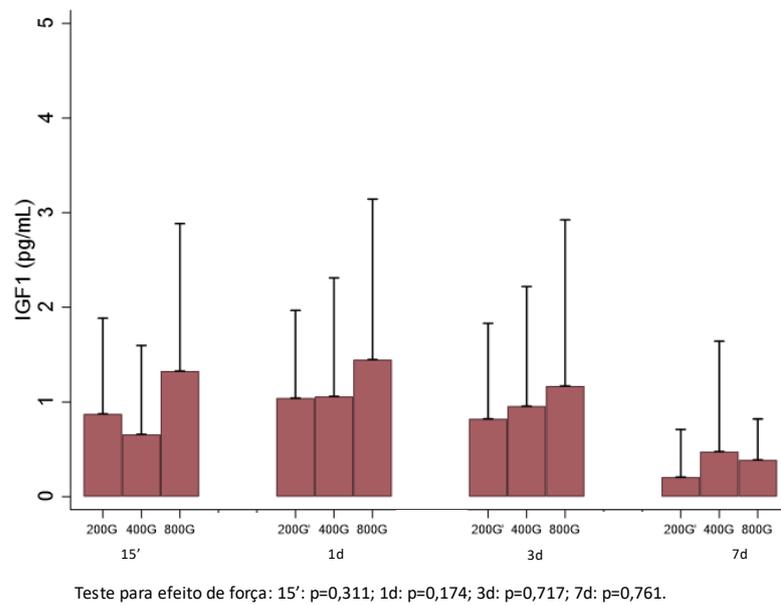
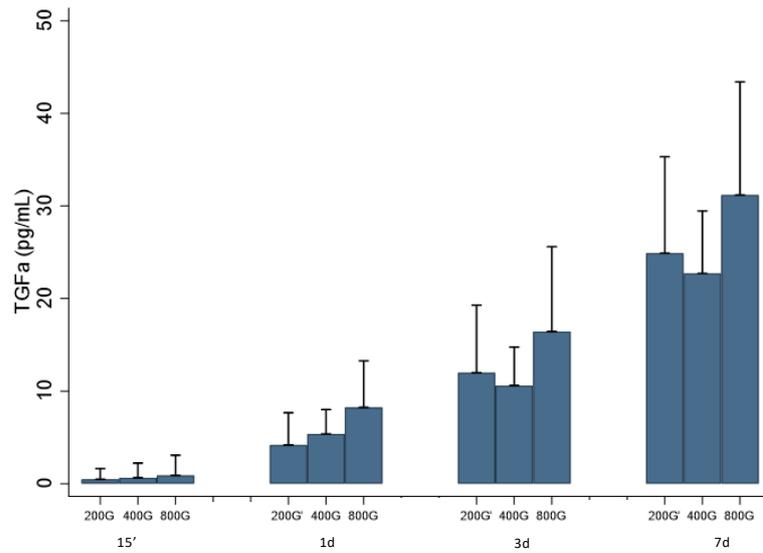
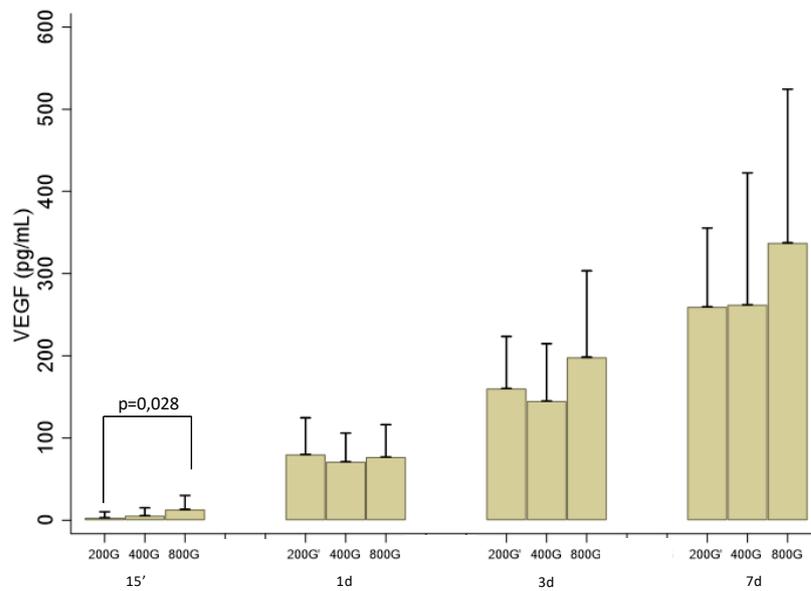


Gráfico 8 Média de IGF1 (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação



Teste para efeito de força: 15': $p=0,368$; 1d: $p=0,069$; 3d: $p=0,115$; 7d: $p=0,135$.

Gráfico 9 Média de TGFa (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação



Teste para efeito de força: 15': $p=0,009$; 1d: $p=0,607$; 3d: $p=0,513$; 7d: $p=0,846$.

Gráfico 10 Média de VEGF (pg/mL) por forças de centrifugação, segundo tempo de incubação

6. DISCUSSÃO

As aplicações dos concentrados de plaquetas nas diversas áreas da Odontologia tornou-se uma prática comum devido ao seu potencial biológico quando se pretende melhorar os processos de reparação e regeneração tecidual. Essas aplicabilidades são dependentes das propriedades biológicas desse concentrado que, devido as variações na composição celular e na liberação de fatores, conseguem alcançar diferentes objetivos (MIRON et al., 2017).

Isso é possível porque o componente celular obtido pode responder de maneira diferente sob estímulos diferentes, como por exemplo a variação de RCF a que é submetido. Sendo assim, forças mecânicas podem alterar mecanismos de produção molecular intracelular, aumentando ou diminuindo a liberação de moléculas. Esse processo é conhecido como mecanotransdução e descreve as alterações intracelulares que ocorrem em uma célula quando submetida a estímulos físicos (JANOTA et al., 2020). Tendo isso em mente, os estudos de obtenção do PRF têm sugerido modificações nos protocolos originais a fim de extrair os diferentes potenciais biológicos que esse material tem a oferecer (EHRENFEST et al., 2018).

O presente trabalho teve o objetivo de verificar as mudanças nesse potencial com a alteração RCF do protocolo original, e assim avaliar a eficácia dessa alteração na liberação de fatores de crescimento e se isso tem impacto durante a primeira semana após a aplicação do protocolo de obtenção do material.

Nesse estudo foi visto que todos os fatores de crescimento foram detectados nos diferentes dias e variações de RCF e alguns apresentaram diferenças entre as condições experimentadas.

O EGF é um fator com ação reepitelizante devido a estimulação de queratinócitos e também acelera a formação de tecido de granulação saudável, além de promover a substituição de tecido lesionado por tecido saudável (ZENG; HARRIS, 2014). Nesse trabalho foi observada uma diferença na liberação do EGF entre os tempos avaliados. A diferença ocorreu entre os primeiros 15 minutos e o sétimo dia em todas as variações de RCF, sendo observado um aumento durante o tempo, com o maior pico de liberação no último dia. Além disso, foi visto uma diferença entre os RCFs avaliados sendo o RCF baixo com maior detecção nos tempos 15 minutos, 1 dia e 7 dias.

O aumento do EGF ao longo do tempo também foi observado por Kobayashi et al. (2016b) com os maiores picos em 8 horas e um dia, entre os dez dias avaliados. Nesse trabalho também foi visto maior liberação de EGF na aplicação do protocolo A-PRF quando comparado a PRF e PRP. Esses achados indicaram que uma menor velocidade poderia ser mais vantajosa em relação a liberação de EGF, que ocorreria ao longo do tempo. Isso corrobora com os dados desse trabalho que indicam uma maior liberação de EGF em RCF baixo e com isso uma alta liberação do fator até o sétimo dia.

O FGF tem papel em diversos mecanismos celulares e está muito relacionado a ação dos fibroblastos. Ele estimula a migração, proliferação e sobrevivência das células no ferimento além de estimular a produção de matriz extracelular (XIE et al., 2020). No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas entre as condições experimentadas, mas observa-se uma tendência maior de liberação do fator quando se utiliza o RCF alto. Chatterjee e Debnath (2019) também não observaram diferenças estatísticas de liberação do FGF nos primeiros sete dias. Uma detecção significativamente maior só foi observada após o sétimo dia, se estendendo até o vigésimo terceiro dia. Provavelmente, a não observação de diferença nesse presente estudo seja devido a quantidade de dias analisados que não contemplaram os maiores valores de liberação.

Já o IGF é um fator que estimula o desenvolvimento tecidual por regular o sistema metabólico e mitogênico celular. Além disso, o IGF também estimula o crescimento e amadurecimento celular o que é benéfico para acelerar os processos de reparação (TAKAHASHI, 2019). Nesse trabalho não foram observadas diferenças significativas na detecção de IGF. Apesar disso é interessante salientar que, diferentemente dos outros fatores avaliados, o IGF apresenta uma alta detecção logo nos primeiros 15 minutos. Isso é observado até o sétimo dia, que apresenta uma redução em todos os protocolos. Esse perfil também foi observado por Schär et al. (2015b) onde o IGF teve o maior pico de detecção no primeiro momento de avaliação, 8 horas, e teve uma redução considerável no sétimo dia.

O TGF α é um fator de crescimento que se liga ao receptor de EGF e possui ação sinérgica com TGF β na migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos e na ativação dos macrófagos (SCHULTZ et al., 1991). O VEGF por sua vez é um fator de crescimento ligado a angiogênese que aumenta a oxigenação e nutrição local (APTE et al., 2019). Esses dois fatores apresentaram resultados similares nas

condições aplicadas. Ambos não foram influenciados pela alteração de RCF mas apresentaram diferenças significativas na detecção ao longo do tempo progressivamente. O aumento progressivo na detecção desses fatores até o sétimo dia também foi observada por Schär et al. (2015b), com uma redução nos dias seguintes.

Com esses resultados podemos inferir que as variações na RCF aplicadas nesse trabalho não alteraram de forma significativa a maioria dos fatores avaliados, com exceção do EGF. O EGF é um fator importante nas fases de reepitelização do tecido e conseqüentemente no processo de maturação, reparação e proteção da ferida. Com RCF mais baixo conseguimos obter maiores valores de EGF nas fases finais da cicatrização, sete dias, e isso pode ser muito vantajoso dependendo da localização, extensão e intensidade do ferimento. A maior disponibilidade de EGF poderia reduzir o tempo de cicatrização e reduzir a comorbidade do paciente, mas mais estudos são necessários para comprovar essa questão (GOODARZI et al., 2018).

Um outro ponto que podemos salientar é que existe uma vantagem no fato de não acontecer grandes variações nos outros fatores estudados. Com indicação precisa, podemos alterar o RCF para beneficiar a liberação de EGF sem que isso prejudique ou altere a liberação dos outros fatores de crescimento. Com isso podemos ajustar a aplicação desse concentrado com a liberação de EGF potencializada em situações nas quais a função desse fator é mais requisitada.

Os benefícios do uso de EGF em processos de cicatrização e reparo já foram descritos por alguns autores. Um desses exemplos foi a cicatrização de feridas por corte na pele, acelerada e associada a diminuição de comorbidades em pacientes com aplicação tópica de EGF. Outro exemplo interessante foi a aceleração do tratamento em pacientes com úlceras gástricas, o que mostra o seu potente papel na reepitelização (SCHULTZ et al., 1991). Nesse panorama, a engenharia tecidual tem usado substitutos de pele, compostos por matriz extracelular e células, que são enriquecidos com EGF para potencializar a epitelização de ferimentos em pacientes que sofreram queimaduras ou outros traumas na pele (HARDWICKE et al., 2008).

A melhora na cicatrização de membranas também foi observada em membranas timpânicas. Nesse tipo de membrana, além da cicatrização a regeneração morfológica é necessária para restabelecer a função, e isso foi visto quando se utilizou aplicação de EGF em membranas danificadas (LOU, 2021).

No caso de cicatrização de feridas crônicas, não foi observada uma melhora significativa em um estudo randomizado. Foi visto uma melhora nos parâmetros de cicatrização mas sem diferenças entre o grupo testado e o grupo controle em um estudo randomizado (OLIVEIRA, 2018).

Esses achados nos evidenciam que o EGF pode ser um aliado importante nessas situações nas quais uma epitelização acelerada é desejada, tais como vedamento de perfurações da membrana do seio maxilar, fechamentos de cirurgias de enxertos livres gengivais, tratamentos de feridas necróticas em complicações de preenchimentos faciais, feridas de pé de diabético, escaras, mas que são necessários novos estudos para comprovar sua efetividade.

7. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos nesse trabalho podemos concluir que a variação da RCF para uma força G mais baixa, 200G, favorece a liberação de EGF. Além disso, o uso de 200G favorece a maior liberação de EGF em 15 minutos, 1 dia e 7 dias quando comparados ao protocolo padrão e de maior RCF. Podemos concluir também que essas variações não alteraram de forma significativa a liberação dos outros fatores de crescimento.

8. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA A SOCIEDADE

O avanço da tecnologia traz benefícios para toda a sociedade quando bem aplicada para determinados objetivos. Isso se torna ainda mais importante quando se trabalha com biomateriais que serão incorporados ao organismo do paciente e se espera um resultado satisfatório. Sendo assim, o conhecimento a cerca dos fatores que influenciam a obtenção do PRF e se esses fatores modificam o potencial biológico do material é de extrema importância para refinar suas aplicações e indicações.

REFERÊNCIAS

- A. Zumstein, M., Berger, S., Schober, M., Boileau, P., W. Nyffeler, R., Horn, M., & A. Dahinden, C. (2012). Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) for Long-Term Delivery of Growth Factor in Rotator Cuff Repair: Review, Preliminary Results and Future Directions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(7), 1196–1206. <https://doi.org/10.2174/138920112800624337>
- Amable, P. R., Carias, R. B. V., Teixeira, M. V. T., Da Cruz Pacheco, Í., Corrêa Do Amaral, R. J. F., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. (2013). Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research and Therapy*, *4*(3). <https://doi.org/10.1186/scrt218>
- Andia, I., & Abate, M. (2013). Platelet-rich plasma: Underlying biology and clinical correlates. *Regenerative Medicine*, *8*(5), 645–658. <https://doi.org/10.2217/RME.13.59/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG>
- Apte, R. S., Chen, D. S., & Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, *176*(6), 1248–1264. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.01.021>
- Arizon, M., Nudel, I., Segev, H., Mizraji, G., Elnekave, M., Furmanov, K., Eli-Berchoer, L., Clausen, B. E., Shapira, L., Wilensky, A., & Hovav, A.-H. (2012). Langerhans cells down-regulate inflammation-driven alveolar bone loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(18), 7043–7048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116770109>
- Bastami, F., & Khojasteh, A. (2016). Use of Leukocyte-and Platelet-Rich Fibrin for Bone Regeneration: A Systematic Review. *Regeneration, Reconstruction & Restoration*, *1*, 47. <https://doi.org/10.7508/rrr.2016.02.001>
- Bava, E. D., & Barber, F. A. (2011). Platelet-rich plasma products in sports medicine. In *The Physician and sportsmedicine* (Vol. 39, Issue 3, pp. 94–99). <https://doi.org/10.3810/psm.2011.09.1925>
- Bielecki, T., & M. Dohan Ehrenfest, D. (2012). Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): Surgical Adjuvants, Preparations for In Situ Regenerative Medicine and Tools for Tissue Engineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(7), 1121–1130. <https://doi.org/10.2174/138920112800624292>
- Cao, Y., Zhu, X., Zhou, R., He, Y., Wu, Z., & Chen, Y. (2021). A narrative review of the research progress and clinical application of platelet-rich plasma. *Annals of Palliative Medicine*, *10*(4), 4823–4829. <https://doi.org/10.21037/apm-20-2223>
- Chatterjee, A., & Debnath, K. (2019). Comparative evaluation of growth factors from platelet concentrates: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, *23*(4), 322–328. https://doi.org/10.4103/JISP.JISP_678_18
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M. O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Dohan, D. M. (2006). 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*, *101*(3). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011>
- Choukroun, J., & Ghanaati, S. (2018). Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, *44*(1), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0767-9>

- Davis, V. L., Abukabda, A. B., Radio, N. M., Witt-Enderby, P. A., Clafshenkel, W. P., Cairone, J. V., & Rutkowski, J. L. (2014). Platelet-rich preparations to improve healing. Part II: Platelet activation and enrichment, leukocyte inclusion, and other selection criteria. In *Journal of Oral Implantology* (Vol. 40, Issue 4, pp. 511–521). Allen Press. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-12-00106>
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). 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*, *101*(3). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). 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*, *101*(3), e45–e50. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009>
- Dohan Ehrenfest, D. M., de Peppo, G. M., Doglioli, P., & Sammartino, G. (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): A gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, *27*(1), 63–69. <https://doi.org/10.1080/08977190802636713>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J., & Charrier, J.-B. (2010). Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*, *81*(4), 546–555. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090531>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Doglioli, P., de Peppo, G. M., Del Corso, M., & Charrier, J. B. (2010). Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Archives of Oral Biology*, *55*(3), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.01.004>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Pinto, N. R., Pereda, A., Jiménez, P., Corso, M. del, Kang, B. S., Nally, M., Lanata, N., Wang, H. L., & Quirynen, M. (2018). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, *29*(2), 171–184. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). In *Trends in Biotechnology* (Vol. 27, Issue 3, pp. 158–167). Trends Biotechnol. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
- Fujioka-Kobayashi, M., Miron, R. J., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y., & Choukroun, J. (2017). Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *Journal of Periodontology*, *88*(1), 112–121. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160443>
- Ghanaati, S., Booms, P., Orłowska, A., Kubesch, A., Lorenz, J., Rutkowski, J., Les, C., Sader, R., Kirkpatrick, C. J., & Choukroun, J. (2014). Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell- Based tissue engineering by means of inflammatory cells. *Journal of Oral Implantology*, *40*(6), 679–689. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00138>
- Goodarzi, P., Falahzadeh, K., Nematizadeh, M., Farazandeh, P., Payab, M., Larijani, B., Tayanloo Beik, A., & Arjmand, B. (2018). Tissue Engineered Skin Substitutes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1107*, 143–188. https://doi.org/10.1007/5584_2018_226

- Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D., & Thomas, D. (2008). Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. *The Surgeon : Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*, 6(3), 172–177. [https://doi.org/10.1016/S1479-666X\(08\)80114-X](https://doi.org/10.1016/S1479-666X(08)80114-X)
- Jahanbani, Y., Davaran, S., Ghahremani-Nasab, M., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2020). Scaffold-based tissue engineering approaches in treating infertility. *Life Sciences*, 240. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.117066>
- Janota, C. S., Calero-Cuenca, F. J., & Gomes, E. R. (2020). The role of the cell nucleus in mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 204–211. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2020.03.001>
- Kawase, T., Mubarak, S., & Mourão, C. F. (2020). The platelet concentrates therapy: From the biased past to the anticipated future. In *Bioengineering* (Vol. 7, Issue 3, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030082>
- Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., & Miron, R. J. (2016a). Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical Oral Investigations*, 20(9), 2353–2360. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1719-1>
- Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., & Miron, R. J. (2016b). Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical Oral Investigations*, 20(9), 2353–2360. <https://doi.org/10.1007/S00784-016-1719-1>
- Langer, R., & Vacanti, J. (2016). Advances in tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery*, 51(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/J.JPESURG.2015.10.022>
- Le, A. D. K., Enweze, L., DeBaun, M. R., & Dragoo, J. L. (2019). Platelet-Rich Plasma. In *Clinics in Sports Medicine* (Vol. 38, Issue 1, pp. 17–44). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2018.08.001>
- Litvinov, R. I., & Weisel, J. W. (2016). What Is the Biological and Clinical Relevance of Fibrin? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(4), 333–343. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571342>
- Lou, Z. (2021). Efeito do fator de crescimento epidérmico na pseudocicatrização de perfurações traumáticas da membrana timpânica. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 87(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.BJORL.2019.06.011>
- M. Dohan Ehrenfest, D., Bielecki, T., Mishra, A., Borzini, P., Inchingolo, F., Sammartino, G., Rasmusson, L., & A. Evert, P. (2012). 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*, 13(7), 1131–1137. <https://doi.org/10.2174/138920112800624328>
- Masuki, H., Okudera, T., Watanebe, T., Suzuki, M., Nishiyama, K., Okudera, H., Nakata, K., Uematsu, K., Su, C.-Y., & Kawase, T. (2016). Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International Journal of Implant Dentistry*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s40729-016-0052-4>
- Mei-Dan, O., Lippi, G., Sánchez, M., Andia, I., & Maffulli, N. (2010). Autologous platelet-rich plasma: A revolution in soft tissue sports injury management? In *Physician and Sportsmedicine* (Vol. 38, Issue 4, pp. 127–135). <https://doi.org/10.3810/psm.2010.12.1835>
- Mijiritsky, E., Assaf, H. D., Peleg, O., Shacham, M., Cerroni, L., & Mangani, L. (2021). Use of PRP, PRF and CGF in periodontal regeneration and facial rejuvenation-a narrative review. *Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biology10040317>

- Miron, R. J., Zucchelli, G., Pikos, M. A., Salama, M., Lee, S., Guillemette, V., Fujioka-Kobayashi, M., Bishara, M., Zhang, Y., Wang, H. L., Chandad, F., Nacopoulos, C., Simonpieri, A., Aalam, A. A., Felice, P., Sammartino, G., Ghanaati, S., Hernandez, M. A., & Choukroun, J. (2017). Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, *21*(6), 1913–1927. <https://doi.org/10.1007/S00784-017-2133-Z>
- Moraes, V. Y., Lenza, M., Tamaoki, M. J., Faloppa, F., & Belloti, J. C. (2014). Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2014, Issue 4). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010071.pub3>
- Ogawa, M., LaRue, A. C., & Mehrotra, M. (2013). Hematopoietic stem cells are pluripotent and not just “hematopoietic.” *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *51*(1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.01.008>
- Pallua, N., Wolter, T., & Markowicz, M. (2010). Platelet-rich plasma in burns. In *Burns* (Vol. 36, Issue 1, pp. 4–8). <https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.05.002>
- Peck, M., Hiss, D., & Stephen, L. (2016). Factors affecting the preparation, constituents, and clinical efficacy of leukocyte- and platelet- rich fibrin (L-PRF). *SADJ: Journal of the South African Dental Association = Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging*, *71*, 298–302.
- Qiao, J., An, N., & Ouyang, X. (2017). Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets*, *28*(8), 774–778. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1267338>
- Reddy, L. V. K., Murugan, D., Mullick, M., Begum Moghal, E. T., & Sen, D. (2020). Recent Approaches for Angiogenesis in Search of Successful Tissue Engineering and Regeneration. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *15*(2), 111–134. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666191104151928>
- Salgado, R., Benoy, I., Bogers, J., Weytjens, R., Vermeulen, P., Dirix, L., & Van Marck, E. (2001). Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): A morphological and functional study. *Angiogenesis*, *4*(1), 37–43. <https://doi.org/10.1023/A:1016611230747>
- Schär, M. O., Diaz-Romero, J., Kohl, S., Zumstein, M. A., & Nestic, D. (2015a). Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *473*(5), 1635–1643. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4192-2>
- Schär, M. O., Diaz-Romero, J., Kohl, S., Zumstein, M. A., & Nestic, D. (2015b). Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *473*(5), 1635. <https://doi.org/10.1007/S11999-015-4192-2>
- Schultz, G., Clark, W., & Rotatori, D. S. (1991). EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *Journal of Cellular Biochemistry*, *45*(4), 346–352. <https://doi.org/10.1002/JCB.240450407>
- Takahashi, S. I. (2019). IGF research 2016-2018. *Growth Hormone & IGF Research : Official Journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, *48–49*, 65–69. <https://doi.org/10.1016/J.GHIR.2019.10.004>
- Ustaoğlu, G., Göller Bulut, D., & Gümüş, K. (2020). Evaluation of different platelet-rich concentrates effects on early soft tissue healing and socket preservation after tooth extraction. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, *121*(5), 539–544. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.09.005>
- Wu, C. L., Lee, S. S., Tsai, C. H., Lu, K. H., Zhao, J. H., & Chang, Y. C. (2012). Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal*, *57*(2), 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01686.x>

- Xie, Y., Su, N., Yang, J., Tan, Q., Huang, S., Jin, M., Ni, Z., Zhang, B., Zhang, D., Luo, F., Chen, H., Sun, X., Feng, J. Q., Qi, H., & Chen, L. (2020). FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
<https://doi.org/10.1038/S41392-020-00222-7>
- Zeng, F., & Harris, R. C. (2014). Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28, 2–11.
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2014.01.011>

APÊNDICE

Tabela 4 Medida-resumo dos fatores de crescimento por força de centrifugação e tempo de incubação

	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	N
EGF						
200G - 15'	1,05	0,50	0,90	0,73	2,05	6
200G - 1 dia	61,16	8,11	58,93	52,89	72,10	6
200G - 3 dias	24,80	38,61	0,01	0,00	80,59	6
200G - 7 dias	69,28	16,77	63,23	54,34	96,71	6
400G - 15'	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6
400G - 1 dia	47,08	9,41	46,57	32,52	61,85	6
400G - 3 dias	22,86	35,59	0,01	0,00	74,31	6
400G - 7 dias	57,65	10,59	55,57	46,81	72,69	6
800G - 15'	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6
800G - 1 dia	49,94	15,55	48,56	33,94	73,41	6
800G - 3 dias	24,90	40,79	0,00	0,00	95,69	6
800G - 7 dias	54,09	10,29	51,62	44,17	70,40	6
FGF						
200G - 15'	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6
200G - 1 dia	1,45	3,55	0,00	0,00	8,70	6
200G - 3 dias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6
200G - 7 dias	0,58	1,42	0,00	0,00	3,48	6
400G - 15'	0,97	2,38	0,00	0,00	5,82	6
400G - 1 dia	5,80	6,03	4,94	0,00	15,95	6
400G - 3 dias	2,95	4,58	0,00	0,00	9,53	6
400G - 7 dias	1,09	2,66	0,00	0,00	6,52	6
800G - 15'	4,49	5,56	3,20	0,00	13,71	6
800G - 1 dia	6,65	6,03	6,83	0,00	15,27	6
800G - 3 dias	3,22	5,26	0,00	0,00	12,28	6
800G - 7 dias	1,52	3,72	0,00	0,00	9,12	6
IGF1						
200G - 15'	0,87	1,01	0,61	0,00	2,24	6
200G - 1 dia	1,04	0,92	1,12	0,00	2,34	6
200G - 3 dias	0,82	1,01	0,58	0,00	2,47	6
200G - 7 dias	0,21	0,50	0,00	0,00	1,24	6
400G - 15'	0,66	0,94	0,31	0,00	2,40	6

400G - 1 dia	1,06	1,25	0,78	0,00	3,35	6
400G - 3 dias	0,96	1,26	0,53	0,00	3,18	6
400G - 7 dias	0,48	1,17	0,00	0,00	2,86	6
800G - 15'	1,33	1,56	1,07	0,00	4,23	6
800G - 1 dia	1,45	1,70	1,05	0,00	4,53	6
800G - 3 dias	1,17	1,75	0,30	0,00	4,36	6
800G - 7 dias	0,39	0,43	0,35	0,00	0,93	6
TGFa						
200G - 15'	0,47	1,16	0,00	0,00	2,83	6
200G - 1 dia	4,19	3,48	3,14	1,68	11,08	6
200G - 3 dias	11,99	7,29	10,94	4,81	25,48	6
200G - 7 dias	24,89	10,41	27,96	11,24	34,88	6
400G - 15'	0,64	1,58	0,00	0,00	3,86	6
400G - 1 dia	5,37	2,63	6,02	1,74	8,13	6
400G - 3 dias	10,61	4,14	9,91	4,50	16,64	6
400G - 7 dias	22,71	6,75	22,10	13,10	32,78	6
800G - 15'	0,89	2,19	0,00	0,00	5,35	6
800G - 1 dia	8,24	5,03	6,46	2,95	15,78	6
800G - 3 dias	16,44	9,15	15,06	7,77	30,66	6
800G - 7 dias	31,19	12,20	31,68	14,62	49,42	6
VEGF						
200G - 15'	2,98	7,30	0,00	0,00	17,89	6
200G - 1 dia	80,16	44,45	70,56	26,05	158,89	6
200G - 3 dias	160,18	63,44	139,87	92,33	276,48	6
200G - 7 dias	259,65	95,91	270,12	85,03	362,94	6
400G - 15'	5,47	9,61	1,60	0,00	24,62	6
400G - 1 dia	71,11	34,96	69,60	33,47	111,60	6
400G - 3 dias	145,05	69,72	112,81	84,33	251,78	6
400G - 7 dias	262,22	160,41	183,59	123,85	534,26	6
800G - 15'	13,22	16,93	7,33	0,00	45,23	6
800G - 1 dia	76,96	39,27	92,51	10,62	115,40	6
800G - 3 dias	198,37	105,04	190,12	94,95	386,32	6
800G - 7 dias	337,50	186,96	332,11	99,13	662,26	6

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Cinética da liberação de diversos mediadores imunológicos e de fatores de crescimento em rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos de humanos hígidos: Influência da velocidade e da força centrífuga.

Pesquisador: Antonio Luis Neto Custódio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71411217.0.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.381.598

Apresentação do Projeto:

O presente projeto constitui um projeto de pesquisa básica, baseado na obtenção de membranas de biomateriais utilizando-se metodologia relativamente simples, porém com variáveis rigorosamente controladas, ou seja, centrifugação de sangue periférico para obtenção de rede de fibrina, com elementos acelulares e celulares. Não obstante, o presente projeto apresenta grande perspectiva de aplicabilidade clínica futura, especialmente na regeneração e cicatrização eficazes de tecidos em situações de lesão e cirurgias.

Segundo os autores do presente Projeto, "A regeneração de tecidos é mediada por uma grande variedade de eventos intra e extracelulares que são regulados por proteínas de sinalização e por um processo complexo que depende de uma sequência de eventos que incluem: adesão, migração e proliferação celular, segundo Wu et al, 2012. O desenvolvimento de tecnologias a base de concentrado de plaquetas tem sido pesquisado, visando otimizar a cicatrização tecidual. O objetivo de todas estas tecnologias é extrair (através de centrifugação e de diversos métodos de manipulação), a partir de uma amostra de sangue, os elementos que poderiam ser usados para melhorar a cicatrização e promover a regeneração de tecidos."

Destacam ainda que "Este novo biomaterial, chamado de fibrina rica em plaquetas (PRF), parece uma matriz cicatricial autóloga, DOHAN et al, 2006. Ao contrário dos outros concentrados de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.381.598

plaquetas usados até então, trata-se de uma técnica em que é necessária somente a centrifugação de sangue do paciente, sem outros aditivos. Esta pretende mimetizar o processo natural de coagulação, e obter uma membrana bioativa simples e econômica, que funciona como uma rede de fibrina que leva tanto à migração e à proliferação celulares, de forma mais eficientes e, em alguns casos, rica em células (principalmente as várias populações de leucócitos) conforme DOHAN et al, 2010 e BIELECKI e DOHAN, 2012. A eficácia clínica do PRF tem sido demonstrada em estudos pré-clínicos e clínicos, com interessantes resultados in vitro, DOHAN et al, 2009 e 2010 e com várias possibilidades de aplicações clínicas na cirurgia bucal, principalmente na cirurgia de implante com levantamento do seio maxilar e em cirurgia periodontal, BASTAMI & KHOJASTEH, 2016.

Os autores ressaltam que "O processo de regeneração ou reparação do tecido requer uma reação harmoniosa de vários tipos de células, incluindo células de resposta imune (neutrófilos, macrófagos, linfócitos), células epiteliais, fibroblastos e células estaminais, bem como outras células relevantes para o tecido em questão. O conceito de scaffold de PRF parece ser uma fonte ideal de componentes para o processo de cicatrização. Esta rede autóloga derivada do sangue pode ser uma fonte única de células estaminais hematopoiéticas (HSCs), que são de grande importância na medicina regenerativa, segundo revisão recente por Ogawa et al, 2013. Contudo, ainda é controverso se os fatores de crescimento estão significativamente concentrados em preparações de PRF para facilitar a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos, segundo MASUKI et al, 2016."

Finalmente, os autores destacam, que "Embora os estudos mencionados acima evidenciem o potencial considerável de PRF em termos de regeneração de tecidos e aplicação clínica, ainda não está claro como as células são distribuídas neste tipo de arcabouço de fibrina, e como essa distribuição pode ser afetada de acordo com as variações de tempo, velocidade da centrifugação e alterações na Força Centrífuga Relativa (RCF). Assim, estudos pré-clínicos e clínicos adicionais são necessários para avaliar este novo conceito."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar estratégias de otimização da capacidade de liberação de mediadores imunológicos dos diferentes tipos de coágulo de fibrina pela obtenção de amostras de coágulo de Fibrina Rico em Plaquetas (PRF), de voluntários saudáveis.

-Analisar a concentração e a cinética dos fatores de crescimento liberados de leucócitos e plaquetas (em amostras de coágulo de Fibrina Rico em Plaquetas rico em leucócitos ou L-PRF)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.381.598

durante a cultura in vitro; -Avaliar a presença de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) no coágulo de L-PRF;

- Avaliar a influência da adição de diferentes mediadores no meio de cultura (ex. Citocinas antiinflamatórias e fatores de crescimento) na capacidade biosintética do coágulo;

- Avaliar a liberação dos fatores de crescimento em relação à variação da exposição à Força Centrífuga Relativa (RCF);

- Avaliar a estrutura, distribuição e o comportamento das células e suas moléculas na rede de fibrina utilizando microscopia Confocal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos do parecer 2.223.236

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma resposta de pendências elaboradas pela CONEP que foram devidamente atendidas pelo pesquisador responsável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados novos documentos segundo solicitação da CONEP; Declaração; ficha anamnese, TCLE CONEP.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis pela aprovação do projeto de pesquisa sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Antonio Luis Neto Custódio, intitulado: Cinética da liberação de diversos mediadores imunológicos e de fatores de crescimento em rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos de humanos hígidos: Influência da velocidade e da força centrífuga.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.381.598

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_925392.pdf	21/10/2017 10:06:21		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao.pdf	21/10/2017 10:05:22	Antonio Luis Neto Custódio	Aceito
Outros	FichaAnamnesePesquisa.pdf	21/10/2017 10:00:24	Antonio Luis Neto Custódio	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoCGB.pdf	21/10/2017 09:58:47	Antonio Luis Neto Custódio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPRFCONEP.pdf	21/10/2017 09:58:28	Antonio Luis Neto Custódio	Aceito
Outros	714112170parecerassinado.pdf	16/08/2017 16:40:28	Vivian Resende	Aceito
Outros	714112170aprovacaoassinada.pdf	16/08/2017 16:40:21	Vivian Resende	Aceito
Outros	ParecerPRFAntonio.pdf	09/07/2017 19:56:06	Antonio Luis Neto Custódio	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PRFprojetoPosDocRevisado.pdf	09/07/2017 19:54:30	Antonio Luis Neto Custódio	Aceito
Folha de Rosto	FolharostoPRF.pdf	09/07/2017 19:52:16	Antonio Luis Neto Custódio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 14 de Novembro de 2017

Assinado por:

Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad. Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br