

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 31/01/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS COM
SANGUE DE GATOS DA RAÇA MAINE COON**

MAÍRA SALES CASTILHO

Botucatu – SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS COM
SANGUE DE GATOS DA RAÇA MAINE COON**

MAÍRA SALES CASTILHO

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Titular Sheila Canevese
Rahal

Co-orientadoras: Prof.^a Camila Contin Diniz de
Almeida Francia

Dra. Luciane dos Reis Mesquita

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Castilho, Maíra Sales.

Preparo e caracterização de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos com sangue de gatos da raça Maine Coon / Maíra Sales Castilho. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sheila Canevese Rahal

Coorientador: Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Coorientador: Luciane dos Reis Mesquita

Capes: 50501003

1. Gato. 2. Sangue. 3. Imuno-histoquímica. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Fibrina rica em plaquetas.

Palavras-chave: Concentrado plaquetário; Fibrina rica em plaqueta e leucócitos; L-PRF; Membrana de fibrina.

Nome do autor: Máira Sales Castilho

TÍTULO: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS COM SANGUE DE GATOS DA RAÇA MAINE COON

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal
Presidente da banca e orientadora
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Cláudia Valeria Seullner Brandão
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dra. Isabela Cristina de Souza Marques
Membro
Departamento de Patologia e Medicina Legal - FMRP
USP Ribeirão Preto

Prof. Dr. Victor José Vieira Rosseto
Membro
Departamento Cirurgia de Pequenos Animais
FAEF- Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral

Agradecimentos

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de Doutorado e pela reserva, sem ela não seria possível a comprar a centrífuga e a caixa (Fibrin box®,) para realização do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Primeiramente agradeço a Deus, sem ele eu não estaria aqui.

Agradeço à minha família, pais e irmãos, amigos por todo o apoio e carinho.

Ao meu marido, Ramiro das Neves Dias Neto pelo amor, apoio incondicional, compreensão e companheirismo.

Agradeço também aos tutores que me ajudaram, e permitiram que seus gatos participassem do projeto.

À Prof. Dr. Sheila Canevese Rahal, por aceitar ser minha orientadora pela segunda vez, pela oportunidade, pela confiança e por toda a compreensão.

À Professora Camila Contin Diniz de Almeida, Carlos Eduardo Fonseca Alves, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues e o Técnico Gelson pela ajuda com o projeto, pelas conversas, sempre muito solícitos e prontos a ajudar.

À Ana Cristina, que dividiu todo seu conhecimento comigo sobre L-PRF, sempre tirando minhas dúvidas, sempre atenciosa, e um exemplo de profissional a ser seguido.

Também gostaria de agradecer à Luciane dos Reis Mesquita e ao Washington Takashi Kano, primeiramente pela amizade, por sempre estarem dispostos a me ajudar, não importando a situação.

Agradeço também aos Médicos Veterinários Carina, Rosana, Luís Henrique, Juan Medeiros e Keylla Pacifico, no auxílio na coleta dos dados.

E finalmente agradeço a todas as pessoas que de algum jeito me ajudaram nesse trabalho, as vezes esquecemos nomes devido a correria do dia a dia, mas por mais pequena que seja a participação, sem ajuda, o projeto não teria acontecido.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELA.....	viii
Resumo	ix
Abstract	x
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Coagulação sanguínea.....	4
2.1.1 Hemostasia primária.....	4
2.1.2 Hemostasia secundária.....	5
2.2 Concentrados de plaquetas.....	6
2.3 Técnicas.....	7
2.4 Concentrado de PRF.....	8
2.5 Emprego da PRF em pequenos animais.....	14
3 REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 2	20
Trabalho científico: Preparação de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) com sangue de gatos da raça Maine Coon	21
ANEXOS	42

Lista de Figuras

- Figura 1** (a) Centrífuga especializada para produção da L-PRF (FibrinFUGE). (b) Tubo após a centrifugação de sangue felino, no qual se observa três camadas: células vermelhas, coágulo de fibrina (seta vermelha e plasma pobre em plaquetas)..... 25
- Figura 2** Note a malha perfurada e tampa da Fibrin box® (a), bem com os demais acessórios utilizados na produção da membrana de L-PRF (b)..... 25
- Figura 3** Membranas de L-PRF produzidas com sangue felino sobre a malha perfurada..... 26
- Figura 4** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Note a intensa rede de fibrina acidofílica acelular (seta amarela). Observe a área do “buffy coat”, na qual é identificada a maior concentração celular, constituída predominantemente de leucócitos (seta branca). Na porção vermelha da membrana são visualizadas as hemácias coradas em rosa/vermelho interpostas com alguns leucócitos (seta vermelha) (HE, 200X)..... 29
- Figura 5** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Observe a arquitetura da rede de fibrina mais densa (seta espessa) próximo ao “buffy coat” e rede mais delgada (seta fina) na porção distante do “buffy coat”. (HE, 100X)..... 30
- Figura 6** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Detalhe da área do “buffy coat” e porção vermelha da membrana. Note a grande concentração celular constituída principalmente por neutrófilos segmentados (seta cheia) e linfócitos (cabeça de seta). Observe o aglomerado plaquetário (seta vazia). (HE, 1.000X)..... 30
- Figura 7** Coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em membrana de L-PRF felina. Observe a alta expressão de PDGF, com componente celular classificado em escore 2 (células positivas de 26% até 50%) (detalhe)..... 32
- Figura 8** Coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em membrana de L-PRF felina. Note a classificação em escore 4 (acima de 75% das células positivas) da expressão de VEGF na membrana (detalhe). Há expressão positiva no componente celular e matriz da membrana. Verifique a expressão negativas nas hemáceas (asterisco)..... 33

Figura 9 Imagem na microscopia eletrônica de varredura de membrana de L-PRF felina. (a) Note a parte branca da membrana caracterizada exclusivamente pela rede de fibrina (2400x). (b) Área do “buffy coat, na qual se observa uma alta concentração celular, seguida por densa rede de fibrina (600x). (c) Detalhe das células da área do “buffy coat, na qual é possível observar as células entremeadas na rede de fibrina (5000x). (d) Note a porção de célula vermelha da membrana com aglomerado de hemácias junto à rede de fibrina. (10000x)..... 34

Figura 10 Imagem na microscopia eletrônica de varredura de membrana de L-PRF felina. Note a rede de fibrina como um arcabouço para plaquetas (seta vermelha), leucócitos (seta branca) e hemácias (seta azul) (10000x)..... 35

Lista de Tabela

Tabela 1 – Escores semiquantitativos da coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em 12 membranas de L-PRF felina.....	31
---	----

CASTILHO, M.S. Preparo e caracterização de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos com sangue de gatos da raça Maine Coon. Botucatu, 2020. 54p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do estudo foi preparar e caracterizar, por meio de análise histológica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) produzida com sangue de gatos da raça Maine Coon. Foram utilizados 13 gatos adultos saudáveis, conforme critério de inclusão, com peso variando entre 3,1 kg e 7,5 kg, dos quais foi coletado sangue da veia jugular externa com escalpe 21G e tubo plástico siliconizado à vácuo. Dois tubos com 3 mL de sangue cada um foram centrifugados imediatamente à coleta, empregando centrífuga especializada para esta aplicação, 650 g por 12 minutos. O coágulo de L-PRF foi retirado do tubo utilizando uma pinça e com uma espátula foi cuidadosamente escarificado para retirar o máximo de células vermelhas, preservando a região do “buffy coat” (camada celular). Na sequência o coágulo de L-PRF foi posicionado sobre a malha metálica perfurada e comprimido com a tampa, por 30 a 60 segundos, obtendo-se a membrana de L-PRF. Pela análise histológica com a coloração Hematoxilina e Eosina foi possível distinguir as três porções que compunham a membrana: parte branca, “buffy coat” e parte vermelha. A área do “buffy coat” continha a maior concentração de leucócitos. A análise imuno-histoquímica demonstrou a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular e do fator de crescimento derivado de plaquetas. Pela MEV verificou-se a arquitetura tridimensional da rede de fibrina. Na área do “buffy coat” a morfologia das células estava preservada, sendo composta principalmente de leucócitos e plaquetas. Como conclusão, a metodologia empregada permitiu caracterizar a composição da membrana de L-PRF em gatos Maine Coon, que apresenta tipos celulares e arquitetura de rede de fibrina similares ao descrito para a espécie humana.

Palavras-chave: Concentrado plaquetário; Membrana de fibrina; L-PRF; Fibrina rica em plaqueta e leucócitos.

CASTILHO, M.S. Preparation and characterization of leukocyte- and platelet-rich fibrin membrane with blood from Maine Coon cats. Botucatu, 2020. 54p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

SUMMARY

This study aimed to prepare and characterize by using histological analysis, immunohistochemical, and Scanning Electron Microscopy (SEM) a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin membrane (L-PRF) produced with blood from Maine Coon cats. Based on inclusion criteria, 13 client-owned healthy adult cats weighing from 3.1 kg to 7.5 kg were enrolled. The blood samples were collected from the external jugular vein using a butterfly catheter (21G) and vacuum plastic tube without additives. Two tubes with 3 mL of blood per tube were immediately centrifuged at 650g for 12 minutes using a centrifuge specifically designed for this application. The L-PRF clot was removed from the tube with tweezers and a spatula which was used to separate it from the red blood cell base layer leaving the buffy coat intact. After this, the L-PRF clot was compressed by specialized metal plate for 30 and 60 sec, and L-PRF membrane was obtained. Light microscopy examination of the membranes stained with hematoxylin-eosin showed three distinct layers: white part, buffy coat and red part. The buffy coat contained a high density of leukocytes. Immunohistochemical analysis demonstrated expression of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor. The SEM revealed the three-dimensional architecture of the fibrin network. The cells of buffy coat showed adequate cellular morphology, being composed mainly of white blood cells and platelets. In conclusion, the method used allowed the characterization of the L-PRF membrane composition in Maine Coon cats, which presented cell types and fibrin network architecture similar to that described for the human species.

Key words: Platelet concentrates; Fibrin membrane; L-PRF; Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A L-PRF consiste de biomaterial natural, composto principalmente de fibrina, plaquetas, fatores de crescimento, leucócitos e células-tronco, formado por sedimentação sob força g ou força centrífuga relativa (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a; OLIVEIRA et al., 2017). Entre os concentrados plaquetários, a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) tem sido cada vez mais utilizada, em virtude da simplicidade e rapidez da preparação, facilidade de uso e maleabilidade, e provável custo-efetividade (SIMONPIERI et al., 2012; MADURANTAKAM et al., 2015; ALIZADE et al., 2016; ZUMARÁN et al., 2018).

A técnica para produção da L-PRF consiste em centrifugar o sangue venoso imediatamente após a coleta em tubo sem anticoagulante (EHRENFEST et al., 2009; MADURANTAKAM et al., 2015). Durante a centrifugação em baixa velocidade, há a ativação sanguínea com a formação de um coágulo de plaqueta-fibrina, que permanece no meio do tubo de centrifugação (EHRENFEST et al., 2009; MADURANTAKAM et al., 2015; ALIZADE et al., 2016).

O coágulo pode ser aplicado diretamente na área de interesse, ou pode ser transformado em uma membrana, pela compressão entre gazes ou com equipamento específico, ou mesmo como plugue (KOBAYASHI et al., 2012; (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a; UPADHAYAYA et al., 2017; ZUMARÁN et al., 2018). Contudo, a despeito da simplicidade desta segunda geração de concentrado plaquetário, vários detalhes técnicos podem influenciar na qualidade do biomaterial obtido (PINTO et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018). As características da centrífuga utilizada bem como os protocolos de centrifugação são fatores a serem considerados em termos de qualidade de células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina (PINTO et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018).

Vale referir que os felinos apresentam várias afecções de caráter cirúrgico, tanto na área de tecidos moles quanto na área de ortopedia e

traumatologia (MONTAVON et al., 2009; LANGLEY-HOBBS et al., 2014), que fundamentariam o emprego deste biomaterial. Visto os poucos relatos da aplicação de PRFs em pequenos animais (VISSER et al., 2010; VISSER et al., 2011; SOARES et al., 2018), o presente estudo teve por objetivo avaliar e caracterizar a membrana de L-PRF produzida a partir de sangue de gatos da raça Maine Coon.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Coagulação sanguínea*

A hemostasia é um mecanismo responsável pela regulação e controle do sangue no interior do espaço vascular (GARCIA-NAVARRO, 2005). É um processo natural e vital, desencadeado mediante alguma lesão no organismo (SMITH e BROOKS, 2010).

Mediante à uma injúria, haverá dois tipos de hemostasia: primária, também conhecida como tampão plaquetário ou coágulo branco, em que ocorre por meio da ação das plaquetas, estancando o sangramento; secundária, conhecida como cascata de coagulação ou coágulo vermelho, na qual existe a formação do coágulo de fibrina, evitando o sangramento (GARCIA-NAVARRO, 2005; MISCHKE, 2012).

2.1.1 *Hemostasia primária*

Esse tipo de hemostasia ocorre no primeiro momento após a danificação do endotélio (MISCHKE, 2012). A lesão expõe a matriz endotelial vascular, principalmente o colágeno (GARCIA-NAVARRO, 2005). As glicoproteínas da membrana das plaquetas fazem adesão ao colágeno (SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011). Assim, o Fator de Von Willbrand (armazenado dentro de plaquetas ou livres no plasma), forma uma ponte, fazendo uma ligação, unindo seus receptores localizados nas plaquetas ao colágeno, resultando em uma adesão definitiva ao local da lesão (STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

Após aderidas, as plaquetas são ativadas, sendo mediadas pelos agonistas plaquetários: colágeno, trombina e epinefrina, e produzindo tromboxane A₂, que tem por objetivo gerar maior estimulação e agregação plaquetária (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Após, ocorre a degranulação das mesmas, e há liberação de proteínas de adesão plaquetária, serotonina (responsável pela vasoconstrição) e de fosfolípidios plaquetários (importante na

hemostasia secundária) (STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012). O fibrinogênio circulante se liga as glicoproteínas específicas, conectando as plaquetas entre si (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

2.1.2 Hemostasia secundária

Consiste na ativação sequencial de pró-enzimas em enzimas, resultando na fibrina (GARCIA-NAVARRO, 2005). É composta primeiramente pela via intrínseca, via extrínseca e, logo após, a duas se unem formando uma via comum (GARCIA-NAVARRO, 2005; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

Na Via intrínseca o sangue é exposto a uma superfície negativa (colágeno), resultando na liberação de cininogênio de alto peso molecular, que é responsável pelo início da cascata de coagulação, gerando efeito em cadeia dos fatores (SMITH e BROOKS, 2010). O cininogênio irá ativar o fator XII, formando o Fator XIIa, que por sua vez irá ativar o Fator XI, resultando no Fator XIa (GARCIA-NAVARRO, 2005; SMITH e BROOKS, 2010). Este por sua vez transformará o Fator IX em XIa, que é responsável por ativar o Fator X, que juntamente com cálcio, fosfolípido plaquetário (hemostasia primária) e fator VIIIa, originarão o Fator Xa. Com o Fator Xa, a via intrínseca e a via extrínseca se tornam uma via em comum (GARCIA-NAVARRO, 2005; SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

A Via extrínseca se origina a partir do contato do sangue com o fator tecidual ou tromboplastina (GARCIA-NAVARRO, 2005; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012). O Fator tecidual converte o Fator VII em Fator VIIa que, juntamente com cálcio e fosfolípido plaquetário, transforma o Fator X em Fator Xa (SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

Na Via comum o Fator Xa, mediante a presença de cálcio, fosfolípido e o Fator Va, converte o Fator II (protrombina) em Trombina, que em seguida converte fibrinogênio em fibrina, os quais em conjunto formam a rede de fibrina (GARCIA-NAVARRO, 2005; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012). A trombina também estimula a conversão do Fator XIII em XIIIa, que ajuda

na estabilização da rede de fibrina, evitando novo sangramento (SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

2.2 Concentrados de plaquetas

Os concentrados de plaquetas podem ser classificados com base na presença de leucócitos e na arquitetura da rede de fibrina em: - plasma rico em plaquetas puro (PRP puro ou P-PRP), material líquido suspenso sem leucócitos antes da ativação; - plasma rico em plaquetas em leucócitos (PRP rico em leucócitos ou L-PRP), líquido suspenso com leucócitos antes da ativação; - fibrina rica em plaqueta pura (PRF pura ou P-PRF), material de fibrina sólida sem leucócitos; - fibrina rica em plaquetas e leucócitos (PRF rico em leucócitos ou L-PRF), material de fibrina sólido ou líquido, com leucócitos e fatores de crescimento (EHRENFEST et al., 2009; ZUMARÁN et al., 2018). Em cada classificação, o concentrado pode ser produzido por diferentes processos, seja em configuração totalmente automatizada ou por protocolos manuais (EHRENFEST et al., 2009).

Atualmente o L-PRF está recebendo alta consideração, em virtude da simplicidade e rapidez da preparação, facilidade de uso e maleabilidade, e provável custo-efetividade, uma vez que a partir do momento da aquisição da centrífuga e “box”, o valor da produção da membrana é mínimo, resultando em um material de excelente qualidade e fácil manuseio (GIANNINI et al., 2015; MADURANTAKAM et al., 2015; ZUMARÁN et al., 2018; MUÑOZ e HAIDAR, 2018). A concentração fisiológica de trombina na PRF permite a formação de uma rede flexível, que é apropriada para o armazenamento de citocinas, além de formar um arcabouço para migração celular, e devido a flexibilidade pode ser usado como membrana biológica para regeneração tecidual guiada (ALIZADE et al., 2016). A fração de células mononucleares, tais como células-tronco em baixa concentração e fatores de crescimento leucocitários agregam um arsenal biológico à PRF (OLIVEIRA et al., 2017).

Caruana et al. (2019) citaram que as propriedades biológicas do concentrado de plaquetas exploram a função das plaquetas na homeostase do

organismo, ou seja, coagulação de fibrina e regeneração tecidual. Esse potencial é devido a fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de crescimento transformante β 1), EGF (fator de crescimento epidermal), IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina) e HGF (fator de crescimento do hepatócito). Após a centrifugação, todos esses fatores contribuem para regeneração de tecidos moles e duros, bem como a cicatrização de feridas após lesão tecidual.

Segundo Zumarán et al. (2018), as preparações de PRF tendem a funcionar mais como biomateriais biologicamente ativos e arcabouços para células autólogas, fatores de crescimento e citocinas, particularmente em procedimentos cirúrgicos orais. Assim, as PRFs devem ser consideradas como uma preparação de “tecido vivo”, para a regeneração tecidual guiada natural, e não simplesmente um adjuvante cirúrgico “rico em fator de crescimento”.

2.3 Técnicas

De acordo com Ehrenfest et al. (2009), no concentrado P-PRF o sangue é colocado em tubo com citrato tri-sódio, como anticoagulante, e um geral separador, sendo centrifugado por 6 minutos em alta velocidade. As camadas de “buffy coat” e plasma pobre em plaqueta são transferidas a um segundo tubo contendo CaCl_2 e o processo de coagulação é desencadeado. O tubo é imediatamente centrifugado por 15 minutos, após o qual um coágulo estável de matriz de fibrina rica em plaqueta pode ser coletado.

O concentrado L-PRF, também denominado PRF de Choukroun, pode ser considerado com concentrado de plaqueta de segunda geração, já que é produzido sem qualquer anticoagulante ou agente gelificante (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a; EHRENFEST et al., 2009). Após o sangue venoso ser colhido em tubo de vidro seco, este é centrifugado em baixa velocidade, sendo formada três camadas, ou seja, uma camada de base com células vermelhas, o coágulo de PRF no meio e o plasma acelular na camada de topo (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a; EHRENFEST et al., 2009;

MADURANTAKAM et al., 2015). A ausência do anticoagulantes, conforme Giannini et al. (2015), permite a ativação das plaquetas em contato com o tubo, desencadeando o processo de coagulação. O fibrinogênio é inicialmente concentrada na parte superior do tubo e, após o contato com a trombina, o mesmo é convertido em fibrina, sendo as plaquetas retidas na malha de fibrina.

2.4 Concentrado de PRF

A L-PRF consiste em um coágulo natural formado por sedimentação sob força g ou força centrífuga relativa, que deve ser de baixa magnitude (OLIVEIRA et al., 2017). Dependendo da força g e da duração da centrifugação a resultante construção de fibrina rica em plaqueta pode variar em consistência, desde uma substância como gel até uma membrana de fibrina densa (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). O coágulo de PRF a olho nu é composto de duas partes, ou seja, uma porção amarela de fibrina (corpo principal) e uma porção vermelha localizada na extremidade do coágulo (lotada de células vermelhas), sendo que entre estas duas áreas há uma camada esbranquiçada denominada “buffy coat” (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a).

Segundo Ehrenfest et al. (2010), o “buffy coat” é definido como uma área entre a camada de células vermelhas e a camada da densa rede de fibrina, na qual é possível observar em aspecto macroscópico uma densa celularidade. Análises histológicas e de microscopia eletrônica mostraram que o “buffy coat” é composto principalmente por plaquetas e células de defesa envoltas pela rede de fibrina.

O sucesso da técnica é dependente da rapidez da coleta do sangue e sua transferência para a centrífuga, ou seja, dentro de dois minutos (ALIZADE et al., 2016; HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b). Se houver demora, o fibrinogênio não pode ser concentrado na parte superior e média do tubo, já que é necessário concentrar o fibrinogênio antes da trombina convertê-lo em fibrina (ALIZADE et al., 2016). Se ocorrer falha na preparação pode haver uma polimerização difusa da fibrina, que não é ideal para cicatrização tecidual (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b). Oliveira et al. (2017) citaram que a

malha de fibrina deve ser formada apenas durante a centrifugação e na ausência de hemácias. A falha metodológica pode ser identificada pela presença de coágulos diminutos e impregnação de hemácias. Além disso, segundo Hartshorne e Gluckman (2016b), as características da centrífuga e protocolos influenciam nas células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina seja de um coágulo ou membrana de PRF.

Hartshorne e Gluckman (2016a) descreveram o PRF como um biomaterial natural composto de fibrina, plaquetas, fatores de crescimento e vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células-tronco. Pela análise bioquímica da PRF obtida do sangue coletado em tubo plástico recoberto de vidro e imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, Dohan et al. (2006) concluíram que o biomaterial consiste de citocinas, cadeias glicanas e glicoproteínas estruturais enredadas dentro de uma rede de fibrina polimerizada vagarosamente.

Aparentemente a membrana de PRF permanece intacta, de acordo com estudos *in vitro*, por pelo menos 7 dias e libera continuamente grandes quantidades de fatores de crescimento (fator de crescimento transformante $\beta 1$ [TGF $\beta 1$], fator de crescimento derivado de plaquetas AB [PDGF-AB], fator de crescimento endotelial vascular [VEGF]), e proteínas da matriz ou citocinas (trombospondina-1, fibronectina, vitronectina, osteocalcina, osteonectina) (Hartshorne e Gluckman, 2016a).

Para a produção da L-PRF, Zumarán et al. (2018) recomendaram a coleta de sangue venoso em tubo de vácuo de plástico revestido de vidro, que deve ser centrifugado por 10-20 minutos a 2700-3000 rpm, usando centrífuga de mesa. Das três porções individualizadas, a porção média (coágulo de fibrina amarelado) deve ser coletada ao redor de 2 mm abaixo da linha divisória com a porção inferior. O coágulo pode ser usado diretamente com material de preenchimento; misturado a enxerto ósseo – plugues e blocos; comprimido (usando a caixa cirúrgica para evitar danos e recolhe cola cirúrgica de fibrina no reservatório) para formar uma membrana. Segundo os autores, com centrifugação mais vagarosa (menos que 1500 rpm) por 6-8 minutos resultará em preparação com mais alta quantidade células brancas, denominada Avançada PRF (A-PRF).

De acordo com Hartshorne e Gluckman (2016b), o uso de equipamento específico, tal como a caixa de PRF, permite uma preparação padronizada e homogênea da membrana de PRF, com mais elevado conteúdo de fator de crescimento, evita a desidratação ou morte de leucócitos e previne o encolhimento da arquitetura da matriz de fibrina. Neste caso o coágulo de PRF é colocado no “BoX grid” ou “Xpression Kit” e coberto com a tampa, sendo que a pressão gentil previne a expulsão de todo o plasma contido no coágulo original. Se o coágulo for comprimido com muita força ou por muito tempo ocorre encolhimento de rede de fibrina, liberação de fatores de crescimento, desidratação e dano de leucócitos.

Para avaliar se a preservação das plaquetas e conteúdo do plasma dependem do método de compressão, Kobayashi et al. (2012) comprimiram coágulos de PRF recém-preparados para formar uma membrana fina com o auxílio de um dispositivo de compressão, composto por duas peças em formato de colher com pequenos orifícios no fundo. Foi notada uma maior preservação do conteúdo plasmático, da malha tridimensional de fibrina e plaquetas com o compressor quando comparado pela membrana formada por meio de gaze seca (grupo controle). De acordo com os autores, a região mais próxima a fração de células vermelhas de ser aplicada no tecido alvo. Além disso, para estabelecer a preservação de fatores de crescimento bioativos, ambos tipos de membranas foram testadas em bioensaio usando células Gin-1 e análise de matriz de anticorpos. Entre os fatores de crescimento testados, a membrana preparada pelo compressor continha isoformas de PDGF em níveis mais altos e estimulou significativamente a proliferação e neovascularização celular (KOBAYASHI et al., 2012).

Ehrenfest et al. (2010) determinaram a composição celular e organização tridimensional do L-PRF e avaliaram a influência de dois tipos de coleta (vidro seco ou tubo plástico recoberto com vidro) e procedimentos de compressão (forçado – compressão com uma colher de metal; ou suave – liberação vagarosa do soro durante 20 minutos em copo) na arquitetura final da membrana, empregando sangue de 10 homens saudáveis. O coágulo de PRF concentrou 97% das plaquetas e mais de 50% dos leucócitos, com distribuição tridimensional, dependendo da centrifugação. As plaquetas e fibrina formaram

aglomerados nos primeiros milímetros da membrana, além da base de células vermelhas. A rede de fibrina foi madura e densa. Não houve diferença na arquitetura da PRF usando diferentes tubos de coleta e técnicas de compressão.

Segundo Oliveira et al. (2017), para que a metodologia de obtenção de agregados plaquetários seja reprodutível faz-se necessário descrever o FCR ou Força g [$1,12 \times r \times (\text{RPM}/1000)^2$] por intervalo de tempo. Com ajuste de cálculo a mesma FCR pode ser produzida em equipamentos distintos. Desta forma, quando o objetivo é a preservação das propriedades biológicas dos agregados sanguíneos, são considerados fundamentais o nível de vibração e aquecimento produzido pela centrifuga. Além disso, as dimensões do coágulo de fibrina sofrem influência das angulações do rotor da centrífuga.

Madurantakam et al. (2015) avaliaram a membrana de L-PRF, produzida de sangue humanos. A centrifugação foi a 400g por 12 minutos. A camada de plasma pobre em plaqueta foi aspirada e a L-PRF foi retirada do tubo, usando uma pinça, e colocada em uma malha metálica. Com bisturi a porção da camada de células vermelhas foi removida, deixando a camada leucoplaquetária intacta. Gentilmente o coágulo de L-PRF foi comprimido, usando uma placa metálica de aproximadamente 225 g, por 30 segundos, fazendo que o plasma pobre em plaqueta fosse removido. Após a remoção da placa, a membrana estava finalmente pronta. Pela microscopia eletrônica o coágulo de L-PRF mostrou a porção de topo composta predominantemente de rede de fibrina com nenhuma célula, a camada do meio enriquecida com plaquetas e a camada inferior com uma mistura de leucócitos e células sanguíneas vermelhas aprisionadas dentro de uma matriz de fibrina. As propriedades mecânicas mostraram comportamento viscoelástico, sendo resistente e deformável no teste de retenção de sutura.

A P-PRP e a L-PRF são opostas em termos de arquitetura de fibrina e conteúdo de leucócitos (EHRENFEST et al., 2012). Enquanto a P-PRF apresenta uma rede de fibrina delgada e imatura, sem a presença de leucócitos; a L-PRF proporciona uma rede de fibrina grossa e resistente, com presença de leucócitos (EHRENFEST et al., 2009). Em ambos concentrados, a vitronectina é a única molécula a ser liberada completamente após 4 horas de cultura,

sugerindo que esta molécula não está presa na matriz de fibrina e não é produzida pelos leucócitos (EHRENFEST et al., 2012).

A gel membrana de P-PRP, segundo Ehrenfest et al. (2012), se dissolve completamente na cultura em torno de 5 dias e a de L-PRF permanece intacta após 7 dias. A população de leucócitos tem forte influência na liberação de alguns fatores de crescimento, em especial o TGF- β 1 (fator de crescimento transformante β 1). Além disto, a técnica de L-PRF é considerada muito mais simples e menos custosa, ao passo que a produção do P-PRP requer mais passos e tempo.

Schär et al. (2015) analisaram a concentração e cinética de fatores de crescimento liberados de L-PRF, L-PRP e coágulo natural durante a cultura *in vitro*, a migração de células tronco mesenquimais e células endoteliais em resposta aos fatores liberados, bem como as correlações entre fatores de crescimento com a contagem de leucócitos/plaquetas iniciais ou a migração celular induzida. Para preparação dos concentrados e coágulo foi utilizado sangue de 11 homens saudáveis. Foi concluído que em comparação ao L-PRP, a L-PRF teve as maiores quantidades liberadas de TGF- β 1, um liberar a longo tempo de fatores de crescimento e indução mais forte de migração celular.

Pinto et al. (2014) avaliaram o impacto das características da centrífuga (intensidade da vibração) na arquitetura da fibrina e célula, tanto do coágulo como da membrana de L-PRF. Foram usadas a centrífuga Intra-Spin (aprovada pelas agências internacionais, CE- European conformity e pela FDA - Food and Drug Administration para a preparação de L-PRF) e três outras centrífugas de laboratório (não aprovadas pela CE e pela FDA para a preparação de L-PRF), ou seja, A-PRF 12, LW - UPD8 e Salvin 1310. O método usado foi com o emprego de tubos plásticos revestidos de vidro e força de 400 g por 12 minutos. A mais baixa temperatura dos tubos foi observada com a centrífuga Intra-Spin, ao passo que a A-PRF e a Salvin promoveram aumento significativo da temperatura. A Intra-Spin e Salvin apresentaram coágulo e membrana de tamanhos similares. Na microscopia de luz as características da L-PRF (concentração de corpos celulares na primeira metade da malha de fibrina) foram similares entre as centrífugas, porém na microscopia eletrônica com a Intra-Spin foi detectada matriz de fibrina espessa altamente polimerizada, todas as células

pareciam vivas com formato normal, incluindo o aspecto superficial texturizado de linfócitos ativados. Nas demais centrífugas, as membranas apresentavam um gel de fibrina levemente polimerizado e todos os corpos celulares visíveis estavam destruídos.

Quatro diferentes centrífugas comerciais para produzir L-PRF, foram avaliadas por Ehrenfest et al. (2018), seguindo o protocolo original (tubos de plástico com revestimento de vidro, 400 g de força, 12 minutos). Na velocidade clássica de produção do L-PRF, o nível de vibração indesejável na centrífuga L-PRF original (Intra-Spin) é 4,5 a 6 vezes menor do que com outras centrífugas. O coágulo L-PRF original (Intra-Spin) parecia completamente distorcido ao usar centrífugas com um nível de vibração mais alto. Segundo os autores, as características da centrífuga e protocolos de centrifugação têm um impacto significativo na célula, fatores de crescimento e arquitetura de fibrina da membrana e coágulo de L-PRF.

Sam et al. (2015) avaliaram as propriedades mecânicas da membrana de PRF, produzida do sangue de um homem de 25 anos, e compararam com membranas comerciais (colágeno de bovino; colágeno peixe), que são empregadas na regeneração óssea guiada. O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante e centrifugado em uma centrífuga de mesa, em 3000 rpm por 10 minutos. A membrana de PRF foi preparada por pressionar a PRF gel entre duas gazes cirúrgicas. De acordo com os autores, a membrana de PRF não apresentou as propriedades mecânicas desejadas quando comparada as membranas de colágenos, sendo que a falta de rigidez e mais rápida degradação podem limitar seu emprego na regeneração óssea guiada.

Segundo Hartshorne e Gluckman (2016a), outras modificações da PRF são o A-PRF (tipo avançado enriquecido de leucócitos) e o i-PRF (PRF injetável), que são produzidos pela redução da velocidade da centrífuga e pela minimização da infiltração de leucócitos dentro da fração de células vermelhas. Há também o CGF (fatores de crescimento concentrado), em que as diferentes velocidades da centrífuga permitem o isolamento da matriz de fibrina que é mais larga, mais densa e mais rica em fatores de crescimento comparada ao PRF.

Ghanaati et al. (2014) compararam PRF (2700 rpm, 12 minutos) com A-PRF (1500 rpm, 14 minutos). Pela imuno-histoquímica, os linfócitos T

(Anti-CD3), linfócitos B (Anti-CD20cy), células-tronco (Anti-CD34 class II) e monócitos (Anti-CD68) foram verificados nos dois grupos, dentro de 25-30% da parte proximal do coágulo, sem diferenças estatísticas em termos de distribuição das células. As plaquetas (Anti-CD61 platelet glycoprotein IIIa) foram detectadas ao longo do coágulo nos dois grupos, embora no A-PRF mais plaquetas foram encontradas na parte distal, afastadas do “buffy coat”. No A-PRF ocorreu aumento de granulócitos neutrofílicos (Anti-CD15) na parte distal do coágulo. Desta forma, tipos celulares específicos se distribuem de forma diferente dependendo da força da centrifuga.

Um estudo, efetuado por Kobayashi et al. (2016), comparou os fatores de crescimento liberados do PRP, PRF e A-PRF produzidos do sangue de seis doadores humanos, por meio da técnica de ELISA. A maior liberação foi de PDGF-AA, seguido por PDGF-BB, TGFB1, VEGF e PDGF-AB. No entanto, ocorreram diferenças na cinética de liberação entre os concentrados, A-PRF liberou quantidades totais significativamente maiores de fatores de crescimento quando comparado ao PRF tradicional.

2.5 Emprego da PRF em pequenos animais

Visser et al. (2010) compararam a concentração de TGF- β 1 eluído de uma matriz de PRF, membrana de PRF e coágulo sanguíneo, no decorrer do tempo, assim como os efeitos mitogênicos dos eluentes de cada construção em células de tendão canino. Para o estudo foi empregado sangue de 4 cães adultos da raça Beagle. A membrana de PRF foi preparada de 18 mL de sangue inteiro, colocado em dois tubos de 9 mL, cada qual contendo citrato tri-sódio e gel separador. Os tubos foram centrifugados a 1.100 X g por 6 minutos, criando o sobrenadante de PRP, que foi transferido a um frasco de vidro contendo cloreto de cálcio. A garrafa foi então centrifugada a 4.500 X g por 25 minutos resultando em membrana circular e plana. A matriz de PRF foi preparada de 9 mL de sangue inteiro colocado em tubo contendo citrato tri-sódio tamponado, que após centrifugação a 1.100 X g por 6 minutos foi separada em componente de células sanguíneas vermelhas e brancas e um componente PRP. O sobrenadante (PRP)

foi transferido a um tubo cilíndrico contendo cloreto de cálcio, que após uma segunda centrifugação (1.450 X g por 15 minutos) resultou em matriz de PRF de formato cilíndrico. Tanto a matriz de PRF como a membrana de PRF foram compostas de arcabouço de fibrina densa, que continham concentrações aumentadas de TGF- β 1 e foram capazes de aumentar a proliferação de células tendíneas, quando comparadas com o coágulo sanguíneo.

O efeito de uma membrana de PRF em defeito induzido no terço médio do tendão patelar de ambos os membros, em oito cães da raça Beagle, foi avaliado por Visser et al. (2011). Suturas em padrão U horizontal foram colocadas através do remanescente do tendão e a membrana de PRF autóloga foi enrolada para formar um tubo, colocada no defeito e suturada no remanescente do tendão. O defeito contralateral foi deixado vazio. Para produção da membrana foi coletado 18 mL de sangue da veia jugular externa com cateter e colocado em 2 tubos de 9 mL, contendo citrato tri-sódio e um separador de gel. Os tubos foram centrifugados a 1.100 X g por 6 minutos. O sobrenadante do PRP de ambos os tubos foram transferidos com agulha calibre 18 e seringa de 20 ml para um frasco de vidro que continha 1.0 M de cloreto de cálcio. O frasco foi imediatamente centrifugado a 4.500 X g por 25 minutos, resultando em uma membrana de fibrina, circular, plana e densa. Tanto o defeito tratado como o controle estavam preenchido por tecido de reparação por 4 semanas. Segundo os autores, a membrana não aumentou a qualidade ou a taxa de cicatrização do defeito tendíneo.

Soares et al. (2018) descreveu o caso de um gato de 13 anos de idade com fístula oronasal, que havia sido submetido a dois procedimentos cirúrgicos prévios sem sucesso e foi tratado por uma nova abordagem. Esta incluía a aplicação de uma malha de policaprolactona impressa tridimensional e adaptada ao tamanho e forma da fístula, em combinação com PRF autólogo e aspirado de medula óssea coletado do úmero, que foram recobertos por um retalho pedicular mucogengival. Para a produção da PRF o sangue foi centrifugado por 3000 rpm por 10 minutos e, antes da aplicação, a fração de hemácia foi desprezada. Uma tomografia 75 dias após a cirurgia mostrou a formação do novo tecido no defeito, porém o implante não foi observado e havia evidência limitada da consolidação óssea.

3 REFERÊNCIAS

ALIZADE, F.L.; KAZEMI, M.; IRANI, S.; SOHRABI, M. Biologic characteristics of platelet rich plasma and platelet rich fibrin: A review. *Int. J. Contemp. Dent. Med. Rev.*, v.2016, p.1-4, 2016.

ARNOCZKY, S.P.; SHEIBANI-RAD, S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Med. Arthrosc. Rev.*, v.21, n.4, p.180-185, 2013.

CARUANA, A.; SAVINA, D.; MACEDO, J.P.; SOARES, S.C. From platelet-rich plasma to advanced platelet-rich fibrin: biological achievements and clinical advances in modern surgery. *Eur. J. Dent.*, v.13, n.2, p.280-286, 2019.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.101, p.E37-44, 2006.

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

EHRENFEST, D.M.D.; DEL CORSO, M.; DISS, A.; MOUHYI, J.; CHARRIER, J.B. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J. Periodontol.*, v.81, n.4, p.546-555, 2010.

EHRENFEST, D.M.D.; BIELECKI, T.; JIMBO, R.; BARBÉ, G.; DEL CORSO, M.; INCHINGOLO, F.; SAMMARTINO, G. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.13, n.7, p.1145-1152, 2012.

EHRENFEST, D.M.D.; PINTO, N.R.; PEREDA, A.; JIMÉNEZ, P.; DEL CORSO, M.; KANG, B.S.; NALLY, M.; LANATA, N.; WANG, H-L.; QUIRYNEN, M. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, v.29, n.2, p.171-184, 2018.

- GARCIA-NAVARRO, C.E.K. Hemostasia: coagulação do sangue e fibrinólise. In: *Manual da hematologia veterinária*. 2ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005. p.109–123
- GHANAATI, S.; BOOMS, P.; ORLOWSKA, A.; KUBESCH, A.; LORENZ, J.; RUTKOWSKI, J.; LANDES, C.; SADER, R.; KIRKPATRICK, C.J.; CHOUKROUN, J. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J. Oral Implantol.*, v.40, n.6, p.679–689, 2014.
- GIANNINI, S.; CIELO, A.; BONANOME, L.; RASTELLI, C.; DERLA, C.; CORPACI, F.; FALISI, G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, v.19, p.927-930, 2015.
- HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part 1: Definition, development, biological characteristics and function. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.14-24, 2016a.
- HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part II: Preparation, optimization, handling and application, benefits and limitations of PRF. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.34-48, 2016b.
- KOBAYASHI, M.; KAWASE, T.; HORIMIZU, M.; OKUDA, K.; WOLFF, L.F.; YOSHIE, H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*, v.40, n.5, p.323-329, 2012.
- KOBAYASHI, E.; FLÜCKIGER, L.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; SAWADA, K.; SCULEAN, A.; SCHALLER, B.; MIRON, R.J. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin. Oral Investig.*, v.20, n.9, p.2353-2360, 2016.
- LANGLEY-HOBBS, S.J.; DEMETRIOU, J.L.; LADLOW, J.F. *Feline soft tissue and general surgery*. Saunders Elsevier: China, 2014. 768p.
- MADURANTAKAM, P.; YOGANARASIMHA, S.; HASAN, F.K. Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, a novel biomaterial. *J. Vis. Exp.*, n.103, p.1-8, 2015.

- MISCHKE, R. Overview of hemostasis. In: DAY, M.J.; KOHN, B. *BSVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. 2 ed. Gloucester: BSAVA, 2012. p.182-188.
- MONTAVON, P.M.; VOSS, K.; LANGLEY-HOBBS, S.J. *Feline orthopedic surgery and musculoskeletal disease*. Saunders Elsevier: China, 2009. 582p.
- MUÑOZ, F.T.; HAIDAR, Z.S. L-PRF for use in oro-maxillo-facial surgeries: What do we know? *J. Oral Res.*, v.7, n.3, p.88-90, 2018.
- OLIVEIRA, L.A.; PONTUAL, M.A.B.; BARROS, E.R.; LEO, M.P. Do L-PRF ao Stick Bone – opções terapêuticas na Implantodontia usando concentrados plaquetários. *ImplantNewsPerio Internat. J.*, v.10, p.1-20, 2017.
- PINTO, N.R.; PEREDA, A.; JIMÉNEZ, P.; CORSO, M.D.; KANG, B-S.; WANG, H-L.; QUIRYNEN, M.; EHRENFEST, D.M.D. 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. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and Scanning Electron Microscopy analysis of 4 kinds of L-PRF clots and membranes. *POSEIDO J.* v.2, n.2, p.141-154, 2014.
- SAM, G.; VADAKKEKUTTICAL, R.J.; AMOL, N.V. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. *J. Indian Soc. Periodontol.*, v.19, n.1, p.32-36, 2015.
- SCHÄR, M.O.; DIAZ-ROMERO, J.; KOHL, S.; ZUMSTEIN, M.A.; NESIC, D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration *in vitro*. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.473, n.5, p.1635-1643, 2015.
- SIMONPIERI, A.; DEL CORSO, M.; VERVELLE, A.; JIMBO, R.; INCHINGOLO, F.; SAMMARTINO, G.; DOHAN EHRENFEST, D.M. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.13, n.7, p.1231-1256, 2012.
- SMITH, S.A.; BROOKS, B.B. Hemostasis: overview of hemostasis. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p.635-653.

SOARES, C.S.; BARROS, L.C.; SARAIVA, V.; GOMEZ-FLORIT, M.; BABO, P.S.; DIAS, I.R.; REIS, R.L.; CARVALHO, P.P.; GOMES, M.E. Bioengineered surgical repair of a chronic oronasal fistula in a cat using autologous platelet-rich fibrin and bone marrow with a tailored 3D printed implant. *J. Feline Med. Surg.*, v.20, n.9, p.835-843, 2018.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Hemostasia. In:____. *Fundamentos da patologia clínica veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.213 – 262, 2011.

UPADHAYAYA, V.; AMAN ARORA, A.; GOYAL, A. Bioactive platelet aggregates: Prp, Prgf, Prf, Cgf and Sticky bone. *IOSR J. Dent. Med. Sci.*, v.16, n.5, p.5-11, 2017.

VISSER, L.C.; ARNOCZKY, S.P.; CABALLERO, O.; EGERBACHER, M. Platelet-rich fibrin constructs elute higher concentrations of transforming growth factor- β 1 and increase tendon cell proliferation over time when compared to blood clots: a comparative *in vitro* analysis. *Vet. Surg.*, v.39, n.7, p.811-817, 2010.

VISSER, L.C.; ARNOCZKY, S.P.; CABALLERO, O.; GARDNER, K.L. Evaluation of the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane to enhance tendon healing in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.72, n.5, p.699-705, 2011.

ZUMARÁN, C.C.; PARRA, M.V.; OLATE, S.A.; FERNÁNDEZ, E.G.; MUÑOZ, F.T.; HAIDAR, Z.S. The 3 R's for platelet-rich fibrin: a "super" tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided oro-maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration. *Materials (Basel.)*, v.11, n.8, p.1-15, 2018.