

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

**AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA,  
BIOMECÂNICA E DE MOLHABILIDADE DA MEMBRANA  
DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS DE  
CÃES**

**JOSIANE CLARA APARECIDA DE OLIVEIRA RATO GRACIANI**

**Botucatu – SP**

**2021**



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

**AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA,  
BIOMECÂNICA E DE MOLHABILIDADE DA MEMBRANA  
DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS DE  
CÃES**

**JOSIANE CLARA APARECIDA DE OLIVEIRA RATO GRACIANI**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Titular Sheila Canevese Rahal

**Botucatu – SP**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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 8/5691

Graciani, Josiane Clara Aparecida de Oliveira Rato.

Avaliações histológica, imuno-histoquímica, biomecânica e de molhabilidade da membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos de cães / Josiane Clara Aparecida de Oliveira Rato Graciani. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Sheila Canavese Rahal

Capes: 50501003

1. Cães. 2. Fibrina rica em plaquetas. 3. Biomecânica. 4. Centrifugação. 5. Imuno-histoquímica.

Palavras-chave: Animal; Centrifugação; Concentrado plaquetário; Sangue.

Nome da autora: Josiane Clara Aparecida de Oliveira Rato Graciani

**TÍTULO: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA,  
BIOMECÂNICA E DE MOLHABILIDADE DA MEMBRANA DE  
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS DE CÃES**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Isabela Cristina de Souza Marques  
Doutora em Cirurgia e Pós doutora em Patologia  
Faculdade Fatesa/ Coordenadora Geral Fatesa vet  
Faculdade FATESA

---

Profa. Dra. Natalie Bertelis Merlini  
Universidade Paranaense UNIPAR  
UNIPAR – Paraná

## DEDICATÓRIA

Deus em sua imensidão e bondade criou seus filhos, e com imenso orgulho de pertencer ao seu rebanho agradeço primeiramente a ti pai, por voltar os olhos para sua filha. Sou seu instrumento e estou aqui para o que precisar, para perpetuar seus ensinamentos, sou humana, portanto falha, mais sou imensamente grata por tudo.

Ao meu colega de trabalho, amigo e irmão, Dr. Joshua Polanco Stuart por sua parceria, sua ajuda e incentivo que foram fundamentais para este grande feito, e que venham novos desafios.

A você minha irmã do coração, presente de Deus Salene Angelini Colombo, que sempre esteve ao meu lado me ajudando em cada detalhe, me consolando e animando nos momentos de crise, nossa parceria e amizade são eternas, obrigada por tudo.

A cada um dos meus anjos de quatro patas, Brenda, Lia, Baby, Pipoca, Valentina, Toby e Nina. Vocês são minha dose diária de amor e perseverança, minha alegria de viver e minha vontade constante de ser melhor!

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Capes 33004064086P1.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu) pela oportunidade.

À Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal por ter me aceito para este desafio, e embora o caminho tenha sido tortuoso o mesmo nos fortaleceu provando que nunca devemos desistir por mais difícil que as coisas sejam. Meu muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. William de Melo Silva do Material Science and Engineering Laboratory - IBTEC, São Paulo State University (Unesp), pela oportunidade e generosidade da realização dos testes mecânico e de molhabilidade. Os caminhos a nos determinados por Deus são muitas vezes difíceis de entender. Vamos sentir muito sua falta.

Ao técnico Ivan Moroz do Laboratory of Solid Residues and Composites - RESIDUALL UNESP, São Paulo State University, pelo auxílio na finalização e interpretação dos testes mecânico e de molhabilidade. Sua contribuição foi fundamental para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, pela pronta ajuda na leitura e interpretação dos exames histológicos e imuno-histoquímicos, os quais foram muito importantes para a o desenvolvimento de trabalho.

Ao Dr. Washington Takashi Kano e ao Laboratório Health Care Botucatu SP, por nos ceder os exames e todo o material de triagem de todos os animais da pesquisa, sua parceria foi fundamental para a realização deste projeto

Aos tutores dos cães participantes do projeto, que prontamente me ajudavam quando necessário, principalmente com as novas coletas que tiveram que ser refeitas devido a tragédia ocorrida com o professor Willian, o meu muito obrigada de coração.

*O melhor resultado para nossos pacientes sempre  
estará aliado ao trabalho árduo, a busca pelo  
conhecimento e ao trabalho em equipe, provando  
assim que unidos somos mais fortes.  
Obrigada*



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	X
LISTA DE SIGLAS .....	XI
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIII
CAPÍTULO 1 .....	14
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 Concentrados plaquetários e PRF .....	17
2.2 Uso do PRF .....	21
2.3 Histologia e imuno-histoquímica dos agregados plaquetários .....	23
2.4 Propriedades mecânicas das membranas de PRF .....	25
3 REFERÊNCIAS .....	30
CAPÍTULO 2 .....	35
TRABALHO CIENTÍFICO .....	36
1 INTRODUÇÃO .....	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
2.1 Animais e Ambiente de Experimentação .....	38
2.2 Coleta de sangue e preparação das membranas da L-PRF .....	40
2.3 Processamento histológico e análise das membranas da L-PRF .....	43
2.4 Imuno-histoquímica .....	44
2.5 Teste mecânico .....	44
2.6 Teste de molhabilidade .....	46
2.7 Análise estatística .....	47
3 RESULTADOS .....	48
3.1 Histologia e imuno-histoquímica .....	48
3.2 Molhabilidade das membranas da L-PRF .....	53
4 DISCUSSÃO .....	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
6 REFERÊNCIAS .....	59
ANEXO 1 .....	63

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fase Pré-coleta e Coleta de sangue .....	39
<b>Figura 2.</b> Centrifugação .....	39
<b>Figura 3.</b> Padronização .....	39
<b>Figura 4.</b> Separação .....	40
<b>Figura 5.</b> Tubo com sangue e tubo com água posicionados em sentido oposto para calibragem da centrífuga especializada e ao lado direito o Estojo metálico Fibrin box®.....	41
<b>Figura 6.</b> Coágulo da L-PRF sendo removido do tubo de centrifugação, no qual se observa a porção da fibrina de coloração amarela no topo e a porção de hemácias na base. ....	41
<b>Figura 7.</b> Estojo Fibrin box® na qual se observa a malha metálica perfurada e membranas da L-PRF antes (a) e após (b) a remoção da tampa de compressão.....	42
<b>Figura 8.</b> Forma de secção da membrana da L-PRF em três porções, incluindo a malha de fibrina, 'buffy coat" e área das hemácias. ....	43
<b>Figura 9.</b> Ensaio de tração da membrana da L-PRF. ....	45
<b>Figura 10.</b> Ensaio de molhabilidade em membrana da L-PRF com instrumento de medição de ângulo de contato óptico, baseado em captação por vídeo câmera de alta resolução.....	47
<b>Figura 11.</b> Detalhe do ensaio de molhabilidade da membrana da L-PRF. ....	47
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografias de membrana da L-PRF canina. (a) Observe as três porções da membrana, na base nota-se a porção composta pela maior presença de eritrócitos (1), seguida da porção do "buffy coat" com alta concentração celular (2) e a rede de fibrina (3).....	49
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografias da imuno-histoquímica das membranas da L-PRF canina, evidenciando as marcações positivas para PDGF (a) e VEGF (b). ....	50
<b>Figura 14.</b> Ensaio de tração realizados em quatro membranas da L-PRF, 30 minutos após a produção.....	51
<b>Figura 15.</b> Ensaio de tração realizados em quatro membranas da L-PRF, 3 horas após a produção. ....	52

<b>Figura 16.</b> Teste de absorção de água da membrana da L-PRF após trinta minutos de produção.....	53
<b>Figura 17.</b> Teste de absorção de água da membrana da L-PRF após 3 horas de produção. ....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Medidas dimensionais das membranas da L-PRF. ....	46
<b>Tabela 2.</b> Escores semiquantitativos da imuno-histoquímica para os anticorpos anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e anti-PDGF (fator de crescimento derivados da plaqueta) nas respectivas membranas da L-PRF. .	51
<b>Tabela 3.</b> Tensão máxima suportada no ensaio de tração das membranas da L-PRF avaliadas 30 minutos após a produção. ....	52

## LISTA DE SIGLAS

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

P-PRP - Plasma rico em plaquetas Puro

PRF – Fibrina Rica em Plaquetas

P-PRF - Fibrina Rica em Plaquetas - Pura

PRGF - Preparação rica em fator de crescimento

PPTF - Coágulos de fibrina derivada de plasma pobre em plaquetas

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas.

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

L-PRF - Fibrina Rica em Plaquetas - Rica em leucócitos

LP-PRP - Plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos

L-PRP - Plasma rico em plaquetas e leucócitos

Ly-PRF - Fibrina rica em plaquetas liofilizada

A-PRF –Fibrina Rica em Plaquetas - Avançada

i-PRF - Fibrina Rica em Plaquetas Injetável

CGF - Coágulo Fibrina

G – Gravidade

Rpm – Rotação por minuto

ML - mililitros

µl - Microlitro

MM - milímetro

**GRACIANI, J.C.A.O.R. Avaliações histológica, imuno-histoquímica, biomecânica e de molhabilidade da membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos de cães.** Botucatu, 2021. 63p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

O objetivo do estudo foi realizar análises histológica, imuno-histoquímica, biomecânica e de molhabilidade de membranas de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), obtidas do sangue de 10 cães hípidos da raça labrador retriever. Coletou-se amostra sanguínea da veia jugular externa com uso de tubo à vácuo sem anticoagulante, que foi imediatamente centrifugado no protocolo de 400g por 12 minutos, empregando centrífuga especializada. Removeu-se o coágulo da L-PRF do tubo e com auxílio de espátula foi raspado o coágulo de hemácias resguardando o “buffy coat”. A membrana da L-PRF foi produzida usando caixa de PRF. Na análise histológica as três porções da membrana foram identificadas, sendo a primeira composta principalmente por eritrócitos, com baixa densidade de leucócitos interpostos entre os mesmos; a segunda formada por leucócitos, predominantemente neutrófilos; e a terceira camada, de aspecto acidofílico, composta pela rede de fibrina. Na imuno-histoquímica todas as amostras apresentaram marcação positiva para VEGF e PDGF, tanto no componente celular, como na malha de fibrina, porém com diferentes intensidades. As avaliações biomecânicas e de molhabilidade foram efetuadas em dois momentos. As membranas L-PRF de 30 minutos suportaram o dobro da tensão máxima em tração quando comparadas com as de 3 horas. A molhabilidade das membranas de 30 minutos foi estatisticamente maior que as de 3 horas. Conclui-se que o protocolo de centrifugação empregado permitiu o desenvolvimento da membrana da L-PRF em cães, comprovado pelas análises histológicas e imuno-histoquímicas, mostrando que o tempo pode influenciar na resistência mecânica e de molhabilidade.

**Palavras-chave:** Concentrado plaquetário; Sangue; Centrifugação; Animal.

**GRACIANI, J.C.A.O.R. Histological, immunohistochemical, biomechanical and wettability evaluations of the Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin membranes derived from dog's blood.** Botucatu, 2021. 63p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

This study aimed to perform histological, immunohistochemical, biomechanical, and wettability assessments of Leukocyte- and Platelet-Rich fibrin (L-PRF) membranes, obtained from the blood of healthy dogs. Ten client-owned Labrador retriever dogs were enrolled. Blood samples were obtained from the external jugular vein with a vacuum tube without anticoagulant, which was immediately centrifuged at 400 g for 12 minutes in a dedicated centrifuge. The L-PRF clot was removed from the tube and the red clot was released from the buffy coat with a spatula. The membrane was produced using a PRF box. Histological examination identified the three portions of the L-PRF membranes. The first portion was composed mainly of red blood cells with the presence of a low number of leukocytes among them. The second portion was composed of white blood cells, mainly neutrophils. The third portion composed of the fibrin network was characterized by an acidophilic stain. The immunohistochemical analysis showed that VEGF and PDGF were expressed in all samples at different intensities, both in cellular components and fibrin mesh. The biomechanical and wettability assessments were done in membranes 30 minutes and three hours after production. The 30-minute L-PRF membranes supported two times the maximum stress in tension testing compared to 3-hour L-PRF membranes. The wettability of the 30-minute sample membranes was statistically higher than the 3-hour sample membranes. In conclusion, the centrifugation protocol allowed producing L-PRF membrane in dogs, based on histological and immunohistochemical analysis; the mechanical resistance and wettability of the L-PRF membrane suffered the influence of the time.

**Key words:** Platelet concentrate; Blood; Centrifugation; Animal.

## **CAPÍTULO 1**



## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) requer uma série de cuidados para a sua obtenção, incluindo a coleta do sangue na presença de um anticoagulante, necessidade de centrifugação em um ou dois estágios, uso de trombina ou cloreto de cálcio para a ativação das plaquetas e polimerização da fibrina, entre outros (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). Com o intuito de simplificar este protocolo e eliminar xenofatores foi desenvolvida na França, por Joseph Choukroun nos anos 2000, a fibrina rica em plaquetas (PRF), que é considerada a segunda geração de concentrados plaquetários (DOHAN EHRENFEST et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015). Trata-se de um biomaterial autólogo composto por fibrina, plaquetas, fatores de crescimento e vários outros tipos celulares (DOHAN EHRENFEST et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016).

O protocolo para preparação do L-PRF (Fibrina rica em plaquetas e leucócitos) é muito simples, o sangue é imediatamente centrifugado após a coleta para evitar a cascata de coagulação, desde que não se utiliza anticoagulantes, podendo ser empregado protocolos de 3000rpm por 10 minutos ou 2700rpm por 12 minutos, dependendo do tipo da centrifuga (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; ALIZADE et al., 2016; FEIGIN e SHOPE, 2019). O coágulo da PRF precisa ser removido após a centrifugação e condensado para obter um cilindro ou membrana, que pode ser feito com uma caixa de preparação específica, ou entre duas gazes estéreis no caso da membrana (DOHAN EHRENFEST et al., 2014; BORIE et al., 2015; FEIGIN e SHOPE, 2019).

Entre as vantagens da produção do PRF podem ser citados o baixo custo, a facilidade de produção e a ausência de produtos químicos, o que favorece o seu uso na rotina (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; DOHANEHRENFEST et al., 2014).

A composição do PRF consiste de uma combinação de citocinas, cadeias glicânicas e glicoproteínas estruturais dentro de uma rede de fibrina homogênea e tridimensional (DOHAN et al., 2006b; FEIGIN e SHOPE, 2019). Entre as citocinas e fatores de crescimento identificados na PRF podem ser

citados as interleucinas (IL- $\beta$ , IL-4), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento derivados da plaqueta (PDGF) alfa e beta, fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (FEIGIN e SHOPE, 2019).

O PRF pode ser classificado em PRF puro (P-PRF), que consiste em preparação sem leucócito e com a rede de fibrina de alta densidade, e PRF rico em leucócitos (L-PRF), que se trata de preparação com leucócitos e uma rede de fibrina de alta densidade (DOHAN EHRENFEST et al., 2014; FEIGIN e SHOPE, 2019).

Embora a produção e uso da membrana da L-PRF em pacientes humanos esteja bem caracterizada (CHOUKROUN et al., 2006; DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; DOHAN EHRENFEST et al., 2014; SAM et al., 2015; DOHAN EHRENFEST et al., 2018; RAVI e SANTHANAKRISHNAN, 2020), em cães a produção deste tipo de membrana está relacionada principalmente ao uso experimental (ZHOU et al., 2017; LEE et al., 2019). Neste sentido, o presente estudo avaliou um protocolo efetuado com sangue de cães saudáveis de uma única raça, visando a futura aplicação clínica em casos ortopédicos. Para o desenvolvimento do assunto determinou-se o capítulo 1 com apresentação da Introdução e Revisão da Literatura, seguido do capítulo com o Artigo Científico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Concentrados plaquetários e PRP

Os concentrados de plaquetários constituem-se de uma suspensão concentrada de fatores de crescimento encontrados nas plaquetas, que foram introduzidos no final da década dos anos 90, com o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) em pacientes humanos (BORIE et al., 2015; MIRON et al., 2017). O PRP é considerado como uma matriz de fibrina, na qual as citocinas, fatores de crescimento e células são aprisionadas (ALIZADE et al., 2016).

A preparação do PRP requer uma série de cuidados, que dificultam a sua obtenção, tais como: coleta do sangue realizada na presença de um anticoagulante; centrifugação em um, dois ou até mesmo 3 estágios dependendo do produto final requerido, e de forma a aumentar a concentração de plaquetas sem ocorrer a incorporação dos leucócitos, há a necessidade do emprego de trombina ou cloreto de cálcio para a ativação das plaquetas e polimerização da fibrina, embora a necessidade seja controversa (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; ARNO CZKY e SHEBANI-RAD, 2013). Além disso, o produto final é líquido e possui efeito de curto prazo (FEIGIN e SHOPE, 2019).

Segundo Prakash e Thakur (2011), o sangue tem em sua composição células vermelhas (hemácias), células brancas (leucócitos), plaquetas e o plasma, referida como porção líquida do sangue, contendo em si fatores de coagulação, proteínas e íons. Também é considerado rico em plaquetas, as quais contêm diversos fatores de crescimento, que aceleram a cicatrização. As plaquetas possuem grânulos alfa, ricos em TGF- $\beta$  (fator transformador do crescimento) entre outros componentes atuantes na cicatrização, essenciais nas etapas de recuperação dos tecidos. O PRP (plasma rico em plaquetas) é um produto derivado do sangue, autólogo, com baixos riscos de rejeição. Este é obtido por meio de um protocolo previamente estabelecido, sendo o mesmo submetido a centrifugação, no qual a porção líquida rica em fatores de crescimento cujo peso molecular é maior encontra-se na porção acima das células sanguíneas (PRP mais concentrado), é separado das hemácias e

subsequentemente centrifugado em algumas etapas (dependendo do tipo de protocolo estabelecido), é dependente de trombina bovina /ou citrato cálcio evitando assim a cascata de coagulação, para o processo de formação do PRP. O tempo de centrifugação e sua velocidade interferem drasticamente na concentração final de plaquetas que atuam nas etapas do processo de hemostasia, cicatrização de feridas e epitelização, estimulando assim a angiogênese (VENDRAMIN et al., 2006).

O PRP mostrou-se extremamente eficaz na aceleração e reparação dos tecidos; no entanto, devido algumas possíveis contaminantes quanto à sua produção, como as devido a manipulação e separação das frações do plasma, entre outras variáveis de processamento, viu-se a necessidade do aprimoramento da técnica (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; DOHAN EHRENFEST et al., 2014; FEIGIN e SHOPE, 2019).

Levando em consideração todos os fatores de biossegurança a bioengenharia tecidual desenvolveu a segunda geração de concentrados plaquetários, denominados de fibrina rica em plaquetas (PRF), os quais são totalmente autólogos sem necessidade de anticoagulantes ou agentes gelificantes, mimetizando assim o processo natural da cascata de coagulação, sendo mais simples, econômico e muito seguro, levando ao desenvolvimento de novas tecnologias para obtenção dos concentrados plaquetários (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; DOHAN EHRENFEST et al., 2014; FEIGIN e SHOPE, 2019).

As plaquetas e leucócitos estão presentes em uma matriz de fibrina (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; DOHAN EHRENFEST et al., 2014; FEIGIN e SHOPE, 2019). A técnica inicial foi desenvolvida nos anos 2000, na França, por Choukroun (DOHAN EHRENFEST et al., 2012).

O fibrinogênio é concentrado na porção superior do tubo de coleta durante a centrifugação até que a trombina circulante o transforme em fibrina (DOHAN et al., 2006a). O resultante coágulo de fibrina rico em plaquetas fica posicionado entre o sobrenadante (camada de plasma acelular) e a base formada pelos eritrócitos (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; ALIZADE et al., 2016). As plaquetas se acumulam na porção inferior do coágulo de fibrina, na junção entre o trombo vermelho e o coágulo de PRF propriamente dito (DOHAN et al., 2006b). O coágulo de PRF precisa ser removido após a

centrifugação e condensado para obter um cilindro ou membrana (DOHAN EHRENFEST et al., 2014; BORIE et al., 2015; FEIGIN e SHOPE, 2019). São consideradas vantagens do PRF o baixo custo, a facilidade de produção e a ausência de produtos químicos (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; DOHAN EHRENFEST et al., 2014).

Os concentrados plaquetários são classificados em categorias, tais como, PRP puro ou pobre em leucócitos (P-PRP); PRP com leucócitos (L-PRP); coágulo de fibrina rico em plaquetas puro, ou puro PRF (P-PRF); e coágulo de fibrina rico em plaquetas e leucócitos, ou PRF rico em leucócitos (L-PRF) (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; DOHAN EHRENFEST et al., 2012; ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). Estes concentrados podem ser produzidos por meio de protocolos manuais ou de forma totalmente automatizada (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a). Uma outra modalidade é a fibrina rica em plaqueta avançada (A-PRF), produzida com velocidade e força de gravidade menores que a usada para produção da L-PRF (DOHAN EHRENFEST et al., 2018). Além disso, existe a fibrina rica em plaqueta injetável (i-PRF), que consiste na camada líquida superior do sangue sem anticoagulante centrifugado a 700 rpm por 3 minutos (60x g) (MIRON et al., 2017c).

A composição da PRF consiste de uma combinação de propriedades como citocinas, cadeias glicânicas e glicoproteínas estruturais dentro de uma rede de fibrina (DOHAN et al., 2006b; FEIGIN e SHOPE, 2019). A PRF pode também servir como veículo para o transporte células envolvidas na regeneração de tecidos, com liberação de fatores de crescimento por um período entre uma e quatro semanas (BORIE et al., 2015). O coágulo da L-PRF tem em sua estrutura plaquetas e mais de 50% de leucócitos correspondentes a coleta inicial do sangue, com uma forte arquitetura de fibrina e distribuição tridimensional das plaquetas e leucócitos (DOHAN EHRENFEST et al., 2012). As plaquetas se acumulam principalmente na junção entre as hemácias e o coágulo da PRF propriamente dito, e as citocinas permanecem na malha de fibrina (FEIGIN e SHOPE, 2019).

A L-PRF Possui grande potencial antimicrobiano, além disso, é capaz de aumentar a fixação dos osteoblastos, a proliferação e, simultaneamente, a regulação da produção de proteína relacionada ao colágeno, tudo o que

efetivamente promove a regeneração óssea e também pelo grande potencial antimicrobiano na regeneração tecidual (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a; ALIZADE et al., 2016; FEIGIN e SHOPE, 2019).

Um estudo efetuado por Dohan Ehrenfest et al. (2010) com sangue de homens saudáveis demonstrou que o uso de tubo de vidro ou de plástico recoberto com vidro, assim como o tipo compressão (forçada – efetuada com uma colher de metal; ou suave – liberação vagarosa do soro em copo de metal) não influenciaram na arquitetura final da membrana de PRF. Esta macroscopicamente continha um corpo principal (porção de fibrina com coloração amarela), uma porção no final do coágulo de coloração vermelha (hemácias), entre as duas áreas o “buffycoat” de coloração esbranquiçada. Histologicamente pela coloração de hemalum e eosina, a matriz de fibrina mostrou-se homogênea e os agregados de plaquetas apresentaram-se de coloração azul escura; contudo, o citoplasma dos leucócitos e hemácias não foram facilmente identificadas. No tricrômico de Masson as hemácias mostraram-se coradas de vermelho brilhante e facilmente distinguíveis, porém os leucócitos foram de difícil identificação dentro do agregado plaquetário.

A membrana da PRF é considerada flexível, elástica e muito forte, o que reflete a organização tridimensional da matriz de fibrina (DOHAN EHRENFEST et al., 2009a). Além disso, a membrana é considerada uma matriz que contém todos os elementos celulares e moleculares para uma cicatrização adequada, ou seja, plaquetas, leucócitos, citocinas e presença de células tronco circulantes (CHOUKROUN et al., 2006).

Um estudo *in vitro* que colocou membrana da L-PRF em meio de cultura, mostrou que a membrana permaneceu sólida e intacta por 7 dias e liberou de forma contínua os fatores de crescimento, produzidos em parte significativa pela população celular da membrana (DOHAN EHRENFEST et al., 2014). Outro estudo que comparou a liberação dos fatores de crescimento, quantificados pelo método ELISA, mostrou que o PRP apresentou maior liberação nos momentos iniciais, a PRF exibiu liberação contínua por um período de 10 dias, e o A-PRP liberou quantidades totais de fatores de crescimento significativamente maiores comparadas a PRF tradicional (KOBAYASHI et al., 2016).

Dohan Ehrenfest et al. (2018) analisaram a influência de quatro centrífugas disponíveis comercialmente (Intra-Spin, A-PRF 12, Salvin 1310 e LW - UPD8) para a produção da L-PRF, usando o protocolo de 400g de força por 12 minutos, com o sangue colocado em tubos de plástico revestidos de vidro. Foram observadas diferenças de vibrações em relação à centrífuga L-PRF original (Intra-Spin), sendo que se as vibrações radiais sobem acima de 1 pode haver danos significativos no conteúdo de células sanguíneas. Desta forma, os autores concluíram que as características da centrífuga podem influenciar na produção de células, fatores de crescimento e arquitetura de fibrina.

Para comparar três diferentes centrífugas comercialmente disponíveis, sendo duas de ângulo fixo (Intra-Spin e Duo Quattro) e uma centrífuga horizontal (Eppendorf 5702), e protocolos líquidos e sólidos da PRF obtidos de sangue humano, Miron et al. (2019) propuseram um método de quantificar as células, por meio de pipetagem sequencial (1 mL) de camadas da porção superior para a inferior, totalizando 10 mL. O protocolo da L-PRF (2700 rpm x 12 minutos) produziu um coágulo com a maioria das plaquetas e leucócitos concentrados dentro do “buffycoat”, com nenhuma célula encontrada nos primeiros 4mL da pipetagem. No protocolo da A-PRF (1300 rpm x 8 minutos) foi notado que as plaquetas se distribuíam uniformemente em toda a PRF. A i-PRF promoveu a concentração mais alta de leucócitos/plaquetas, porém o número total foi inferior. Por sua vez, a centrifugação horizontal produziu significativo aumento em número e concentração de plaquetas e leucócitos (até 3,5 x superior tanto para PRF sólido como o líquido).

## **2.2 Uso do PRF**

Uma revisão sistemática, realizada por Miron et al. (2017a), revelou que o uso da PRF em odontologia em pacientes humanos apresentou resultados promissores para reparo periodontal de defeitos intraósseos e de furca, bem como na cobertura radicular de recessões gengivais, além de ser capaz de diminuir a infecção após extração dentária. Em outro estudo sistemático foi também observado que o PRF foi capaz de melhorar a cicatrização do tecido mole em vários modelos animais, associado principalmente ao aumento da

angiogênese (MIRON et al., 2017b). Além disso, estudos em animais incluem regeneração e consolidação óssea, bem como preservação do rebordo alveolar (FEIGIN e SHOPE, 2019). Algumas aplicações também têm sido realizadas na medicina do esporte e na área ortopédica em pacientes humanos (DOHAN EHRENFEST et al., 2014). Segundo Feigin e Shope (2019), o uso clínico em casos clínicos em pequenos animais é ainda limitado, porém transpondo o utilizado em pacientes humanos existem várias possibilidades para o seu uso em cirurgia oral. Alguns exemplos da utilização experimental em cães serão apresentados a seguir.

A membrana de fibrina rica em plaqueta autóloga foi empregada, por Visser et al. (2011), em defeitos induzidos no terço central do tendão patelar de cães beagles, porém não ocorreu diferença significativa na qualidade histológica comparado ao controle sem tratamento. Para confecção de membrana, sangue foi coletado em tubo com citrato de sódio, que foi centrifugado a 1.100 X g por 6 minutos para criar um sobrenadante, o qual foi colocado em vidro que continha cloreto de cálcio. Este foi então centrifugado a 4.500 X g por 25 minutos para criar a membrana.

Feridas incisionais de 10 cm em ambas os lados da coluna vertebral de 15 cães sem raça definida, foram induzidas por Alishahi et al. (2013), sendo que em um dos lados foi aplicado coágulo da PRF (3000 rpm por 10 minutos com centrífuga de mesa), antes da aplicação de sutura. Os resultados mostraram que histologicamente ocorreu uma aceleração na epitelização com o uso do coágulo da PRF.

Zhou et al. (2017) avaliaram o uso de membrana da PRF no tratamento endodôntico regenerativo em lesões induzidas em beagles, tendo sido promovido três grupos, ou seja, controle, coágulo, coágulo com a PRF. Para produzir a membrana, o coágulo de PRF foi comprimido com gazes estéreis e cortado em pedaços de 1 X 1 mm<sup>2</sup> e no momento da aplicação fragmento de PRF foi colocado dentro do canal misturado com sangue. O coágulo e o coágulo com a PRF promoveram melhora na cicatrização periapical, induziram o desenvolvimento da raiz e reforçaram a estrutura dentária, porém não houve benefício adicional com o acréscimo da PRF.

Para avaliar o efeito da membrana da L-PRF, produzida com 10mL de sangue centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos utilizando a centrífuga



Medifug, no aumento alveolar residual lateral, Lee et al. (2019) utilizaram oito cães sem raça definida, que tiveram os pré-molares inferiores extraídos seguido de três defeitos induzidos na crista lateral. Na segunda etapa do experimento, quando foram aplicadas membranas, tanto as reabsorvíveis como as da L-PRF foram suturadas com poliglactina 910 (4-0) foi concluído ser a L-PRF uma excelente membrana de barreira.

### **2.3 Histologia e imuno-histoquímica dos agregados plaquetários**

Dohan Ehrenfest et al. (2009b) mostraram por estudo *in vitro* que membranas da PRF produzidas com sangue de dois homens e duas mulheres, liberam altas quantidade de fatores de crescimento (TGF  $\beta$ -1, PDGF-AB, VEGF) e glicoproteínas, matriz celular (trombospondina-1, TSP-1) durante sete dias, por meio de quantificação por Elisa. O liberar de TSP-1 pode ser um indicativo do emprego da membrana como agente anti-hemorrágico em sítio cirúrgico.

Em estudo de Ghanaati et al. (2014) relativo ao coágulo da PRF (2700 rpm por 12 minutos) e avançado PRF (A-PRF) (1500 rpm por 14 minutos), produzidos com sangue humano, foi observado no histoquímico (HE, Mason-Goldner, Giemsa) que a PRF continha fibrina densa com mínimo espaço interfibroso e presença de células ao longo do coágulo, as quais diminuía em direção as porções mais distais, ao passo que na A-PRF foi identificada estrutura mais frouxa com mais espaço interfibroso e células uniformemente distribuídas ao longo do coágulo. No exame imuno-histoquímico, os monócitos, linfócitos T e B, e células-tronco (CD34) foram observadas em ambos e localizados nas proximidades do “buffycoat”. Embora as plaquetas tenham sido detectadas em todo o coágulo e ambos preparados, na A-PRF estas foram observadas principalmente na porção distal, longe do “buffycoat”.

Nishimoto et al. (2015) produziram a PRF com sangue de homens saudáveis, sendo que os tubos foram deixados em repouso por 0, 15, 30 e 60 minutos antes da centrifugação a 400 g por 10 minutos. Foi observado que quanto mais tempo de repouso, antes da centrifugação, menor a PRF obtida. A quantidade de fatores de crescimento foi mais alta que no sangue periférico quando o sangue foi imediatamente centrifugado, porém não houve diferenças

nos outros tempos. Além disso, a concentração dos fatores de crescimento (PDGF e TGF $\beta$ ) pela imuno-histoquímica foi mais alta na porção inferior da PRF. No exame histológico com a coloração com Giemsa, as plaquetas apresentaram-se densas na interface entre a parte amarela e vermelha do gel, mas não foi possível distinguir a presença de ativação. As células mononucleadas foram verificadas nas mesmas áreas das plaquetas, com as quais se misturavam, ao passo que as células polinucleadas foram identificadas na porção vermelha.

Yajamanya et al. (2016) avaliaram histologicamente (método de citologia de bloco celular com coloração de hematoxilina e eosina) coágulos da PRF produzidos em três grupos etários de voluntários humanos: G1 - 20 a 39 anos, G2 – 40 a 59 anos, G3 – 60 anos e acima. Independente da faixa etária, foi identificada uma camada mais externa de hemácias, seguida pela densa camada de rede de fibrina com presença de um número alto de plaquetas e leucócitos, e na sequência havia uma rede de fibrina frouxa com aprisionamento reduzido de plaquetas e leucócitos. Com o aumento da idade ocorreu uma diminuição da rede de fibrina densa e aumento da fibrina do tipo frouxo. Além disso, foi observada variação no número de plaquetas e leucócitos aprisionados na rede de fibrina em relação à idade.

Um estudo realizado por Bai et al. (2017), com gel da PRF produzido com sangue de coelhos (3000 rpm por 10 minutos), demonstrou que pela histologia (colorações de Hematoxilina eosina e tricrômico de Mason) e microscopia eletrônica a rede de fibrina mais próxima da camada de hemácias possuía pequenos poros e estrutura ultra compactada com muitas plaquetas incorporadas, ao passo que a mais próxima da camada do plasma continha poros mais largos e estrutura menos compacta. Adicionalmente foi verificado que a extremidade das hemácias do gel de fibrina possuía maior concentração de plaquetas e citocinas.

As propriedades imuno-histológicas da PRF liofilizada (Ly-PRF) foram comparadas a da PRF fresco, ambas produzidas com sangue de dois voluntários humanos, por Zhang et al. (2017). Na microscopia de luz ambos tinham uma rede de fibrina, que foi mais intensa na camada mais externa e com presença de leucócitos (núcleo em azul). Na análise imuno-histoquímica as lâminas de ambos preparados não mostraram diferenças em PDGF-BB,

TGF- $\beta$ 1, IL-1, e na expressão de TNF, porém a expressão da IL-4 foi significativamente maior na Ly-PRF.

Fujioka-Kobayashi et al. (2020) avaliaram coágulos da PRF obtidos com sangue de voluntários humanos, que foram produzidos com centrífuga de ângulo fixo (2700 rpm por 12 minutos) ou centrífuga horizontal (700 g por 8 minutos), sendo que esta última requer um tempo 2/3 da centrifugação de ângulo fixo. Macroscopicamente o coágulo (L-PRF) produzido na centrífuga de ângulo fixo apresentou uma separação inclinada do plasma e da camada de hemácias, com pontos vermelhos verificados na superfície distal do tubo. Por sua vez, na centrífuga horizontal foi notada uma separação clara e distinta das camadas (H-PRF). Histologicamente a maior parte das células foi localizada na superfície distal na preparação protocolo da L-PRF, ao passo que as células foram distribuídas mais uniformemente na preparação da H-PRF. Em ambos os protocolos, um maior número de plaquetas e especialmente leucócitos foram localizados dentro da região do “buffy coat”. Os autores concluíram que a centrifugação horizontal resultou em uma separação mais uniforme das células sanguíneas de coágulos da PRF.

Membranas da L-PRF produzidas com sangue de felino doméstico foram analisadas por Castilho et al. (2021). A centrifugação foi a 650 g por 12 minutos, sendo a membrana produzida com caixa metálica apropriada. A análise imuno-histoquímica demonstrou expressão do VEGF e PDGF. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que a arquitetura tridimensional da rede de fibrina era mais compacta na área próxima à camada leucocitária.

#### **2.4 Propriedades mecânicas das membranas de PRF**

Teste de tração uniaxial foi realizado em seis membranas de L-PRF em formato de “osso de cão” produzidas de sangue humano, com velocidade 10 mm/minuto, por Madurantakam et al. (2015). Os resultados demonstraram o comportamento viscoelástico da L-PRF, que embora tenha mostrado módulo de elasticidade baixo (0,47 MPa), mostrou-se resistente (energia para quebra, 5N mm) e capaz de sofrer deformações significativas. No teste de resistência de retenção de sutura, um indicador da capacidade da membrana de ser

suturada aos tecidos, sugeriram um material significativamente resistente e deformável.

Sam et al. (2015) compararam as propriedades mecânicas de membranas da PRF produzida com o sangue de um homem de 26 anos, com membranas disponíveis no mercado para a regeneração óssea guiada. As membranas foram cortadas em tiras (10 mm x 5 mm) e hidratada com solução tampão de fosfato (pH = 7,4) antes de serem submetidas aos testes mecânicos. O módulo de elasticidade e rigidez das diferentes membranas foram efetuados com teste de endentação de superfície (Triboindenter T1 950), com carga menor que 1um. Foram determinadas cinco leituras de diferentes locais para cada membrana e o valor médio calculado. Os módulos de elasticidade de Young foram 0,35 GPa, 2,74 GPa e 1,92 GPa, e os valores de rigidez foram 10,67 Mpa, 110,7 MPa e 90,5 Mpa, respectivamente, para as membranas da PRF, colágeno bovino e colágeno de peixe. Desta forma, a membrana da PRF não atingiu as propriedades desejadas, quando comparada com as membranas de colágeno.

Khorshidi et al. (2016) compararam as propriedades mecânicas de membranas da L-PRF e PRGF (preparação rica em fator de crescimento)/ Endoret confeccionadas a partir de sangue homens saudáveis. A PRGF/ Endoret desenvolvida por uso de ativador de citrato de sódio. A força de tensão foi avaliada com emprego de máquina de teste universal, usando membrana confeccionadas em molde de “osso de cão”. A resistência à tração da L-PRF (valor médio de  $0,20 \pm 0,06$  MPa) foi significativamente maior do que a PRGF/Endoret (valor médio de  $0,14 \pm 0,07$  MPa), o que provavelmente terá implicação clínica quando da aplicação de sutura e suporte na regeneração periodontal.

A partir de amostras de sangue coletadas (9 mL) de quatro doadores humanos saudáveis, Isobe et al. (2017) comprimiram os coágulos da A-PRF e CGF (coágulo de fibrina) após a remoção da fração de hemácias para formar membranas de 1mm de espessura. Estas foram preservadas em gaze umedecida (solução fisiológica) por no máximo de 3 horas até o teste biomecânico ser efetuado. Por sua vez, coágulos de fibrina derivada de plasma pobre em plaquetas (P-PTF) foram preparados pela adição de trombina bovina, sendo então comprimidos e preservados em gaze umedecida até o teste

biomecânico. Um teste de tração foi realizado na velocidade de 1 mm/minuto, em máquina de ensaio universal (capacidade máxima da célula de carga de 500 N), em condições ambientais padrão de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . As amostras foram seguras em garras com proteção de borracha para evitar o deslizamento e o comprimento entre as garras foi mantido em 10mm. obtidos pelo módulo de Young, resistência máxima à tração e tensão até a ruptura. Os dois primeiros não demonstraram diferenças entre as membranas; contudo, a tensão na ruptura das membranas de P-PTF foi significativamente inferior às membranas de CGF, sendo considerada mecanicamente mais fraca que as demais.

Aggour et al. (2017) coletaram sangue de 10 pacientes humanos saudáveis (7 tubos de 9mL de cada voluntário) para produção da matriz fibrina em plaqueta (PRFM), com uso de cloreto de potássio, e da L-PRF. Para o desenvolvimento das membranas, os coágulos foram comprimidos entre duas gazes cirúrgicas. As membranas foram cortadas em espécimes de 10 mm x 5 mm e estocadas em solução salina estéril a  $4^\circ\text{C}$ , sendo testadas após cinco dias da preparação. Os testes foram executados com máquina de teste universal a  $25^\circ\text{C}$  de temperatura ambiente. Foi empregada carga de tração de 10N, na velocidade de 2 mm/minuto. A resistência à tração e a deformação máxima de tração do grupo L-PRF (Força de tensão: 0,11045 MPa, Módulo de elasticidade: 0,0764 MPa) foram significativamente maiores do que PRFM, porém a rigidez (modo de elasticidade) foi maior no PRFM (Força de tensão: 0,0852 MPa, Módulo de elasticidade: 0,1173 MPa).

Kardos et al. (2018) compararam as propriedades mecânicas e biológicas de membranas da PRF desenvolvidas em tubos de vidro (método tradicional) e com um sistema fechado de seringa (hypACTInject), empregando sangue de humanos saudáveis. O teste de tração foi realizado nas membranas frescas, congeladas ( $-20^\circ\text{C}$ ) e liofilizadas ( $-80^\circ\text{C}$ ), usando máquina de teste universal (velocidade de 10 mm/minuto). Para determinar a força de tração, as amostras com 10 mm de diâmetro e 25 mm de comprimento foram fixadas com grampos envoltos com borracha para evitar o deslizamento, mantendo a distância de 5mm. As membranas produzidas em seringa apresentaram melhores características de manipulação, sem compromisso das propriedades biológicas. Apenas as amostras congeladas da membranas produzidas em

seringas mostraram estatisticamente maior força de tração comparadas as membranas frescas.

Foram preparadas, por Rahman et al. (2019), 15 membranas da A-PRF com sangue de voluntários humanos saudáveis (1500 rpm por 14 minutos). Nove amostras foram tratadas com 0,1% de glutaraldeído por 10 minutos e as demais foram deixadas sem tratamento. Para confecção da membrana foi usado um molde em formato de osso de cão. Os testes foram em máquina de teste universal com capacidade de carga máxima de 500N, em condição ambiental padrão de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $50 \pm 25\%$ , com velocidade de 2 mm/minutos. As extremidades das membranas foram presas à máquina com cliques, com distância de 10mm. A força de tração e a resistência foram significativamente maiores, com valores respectivamente de  $0,16 \pm 0,20$  MPa e  $0,20 \pm 0,03$ , no uso da ligação cruzada pelo glutaraldeído, comparado as membranas sem tratamento, com valores respectivamente de  $0,07 \pm 0,01$  MPa e  $0,10 \pm 0,02$ .

Ravi e Santhanakrishnan (2020) empregaram amostras de sangue de cinco pacientes humanos saudáveis para a produção de membranas da A-PRF (1060 rpm por 14 minutos), L-PRF (1960 rpm por 12 minutos) e T-PRF (1960 rpm por 12 minutos em tubo de titânio), com o emprego de centrífuga de mesa. Foi desenvolvido um molde em formato de osso de cão para obter amostras uniformes (comprimento 31 mm, 2 mm espessura, 2 mm de largura na parte central e 6mm nas extremidades), na qual foi colocado o coágulo da PRF de cada tipo de centrifugação. Após 10 minutos da compressão com tampa, a membrana foi produzida para o teste de tração com máquina de teste universal. As extremidades foram presas nas garras da máquina sem tensão, sendo aplicada velocidade de carregamento 1 mm/minuto. Foi registrada a carga máxima na falha e a força de tração sendo calculada pela fórmula: [força máxima (N)/ unidade de área ( $\text{m}^2$ )]. O módulo de elasticidade foi obtido pela tensão/deformação e a área total da curva. A força de tração e módulo de elasticidade foram maiores na membrana da T-PRF, seguido pela membrana da A-PRF e por último a da L-PRF (força de tensão: 290.076 MPa, módulo de elasticidade: 98,01 MPa).

Aktaş et al. (2020) coletaram 5 a 7 ml de sangue de coelhos, que foi centrifugado a 3000rpm por 10 minutos formando três camadas. Para confecção da membrana, a camada média foi colocada em uma grade e compactada com a tampa da caixa por 10 minutos. Uma das amostras da PRF foi colocada em 20% ABS (Ankaferdblood stopper - extrato de ervas usado para hemostasia) e solução salina 80% por 5 minutos. As propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas em máquina universal com velocidade de 50 mm/minuto e com comprimento de 20 mm. A PRF combinada com ABS mostraram melhores propriedades físicas, sendo associado a rede adicional sobre a tela de fibrina. A força máxima da PRF foi  $294,19 \pm 255,54$  e a da PRF combinada com ABS  $254,01 \pm 145,20$ .

### 3 REFERÊNCIAS

AGGOUR, R.L.; SABRY, H.A.; HASSAN, G.S. In vitro evaluation of mechanical and structural properties of leukocyte-platelet-rich fibrin and platelet-rich fibrin matrix. *Egypt Dent. J.*, v.63, n.2, p.1531-1539, 2017.

AKTAS, A.; OZER, T.; SEN, M.; TURK, M.; KARABULUT, E. Comparison of the mechanical properties of platelet-rich fibrin and ankaferd blood stopper-loaded platelet-rich fibrin. *Niger J. Clin. Pract.*, v.21, n.9, p.1087-1092, 2018.

ALISHAHI, M.K.; KAZEMI, D.; MOHAJERI, D.; MOFIDPOOR, H.; GOLI, A.A.; ALISHAHI, M.A.K. Histopathological evaluation of the effect of platelet-rich fibrin on canine cutaneous incisional wound healing. *Iran. J. Vet. Sci. Technol.*, v.5, n.2, p.19-31, 2013.

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.030516, 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.

BAI, M.Y.; WANG, C.W.; WANG, J.Y.; LIN, M.F.; CHAN, W.P. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. *Clinics*, v.72, n.2, p.116-124, 2017.

BORIE, E.; OLIVÍ, D.G.; ORSI, I.A.; GARLET, K.; WEBER, B.; BELTRÁN, V.; FUENTES, R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, v.8, n.5, p.7922-7929, 2015.

CASTILHO, M.S.; RAHAL, S.C.; DIAS NETO, R.D.N.; PEREIRA, A.C.; FRANCA, C.C.D.A.; MESQUITA, L.D.R.; ANTUNES, C.B.; LAINETTI, P.F.; FONSECA-ALVES, C.E. Preparation and characterization of leukocyte- and platelet-rich fibrin membrane derived from cats' blood. *Microsc. Res. Tech.* v.84, n.8, p.1802-1808, 2021.

CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.; MOUHYI, J.; DOHAN, D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.101, n.3, p.e56-60, 2006.

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, n.3, p.e37-44, 2006a.



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 II: platelet-related biologic features. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.101, n.3, p.e45-50, 2006b.

DOHAN EHRENFEST, D.M.; 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, 2009a.

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

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

DOHAN EHRENFEST, D.M.; 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.

DOHAN EHRENFEST, D.M.; ANDIA, I.; ZUMSTEIN, M.A.; ZHANG, C.Q.; PINTO, N.R.; BIELECKI, T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.*, v.4, n.1, p.3-9, 2014.

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

FEIGIN, K.; SHOPE, B. Use of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in dentistry and oral surgery: Introduction and review of the literature. *J. Vet. Dent.*, v.36, n.2, p.109-123, 2019.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; KONO, M.; KATAGIRI, H.; SCHALLER, B.; ZHANG, Y.; SCULEAN, A.; MIRON, R.J. Histological comparison of Platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation. *Platelets*, v.18, p.1-7, 2020.

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.

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, 2016.

ISOBE, K.; WATANEBE, T.; KAWABATA, H.; KITAMURA, Y.; OKUDERA, T.; OKUDERA, H.; UEMATSU, K.; OKUDA, K.; NAKATA, K.; TANAKA, T.; KAWASE, T. Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). *Int. J. Implant. Dent.*, v.3, n.1, p.17, 2017.

KARDOS, D.; HORNYÁK, I.; SIMON, M.; HINSENKAMP, A.; MARSCHALL, B.; VÁRDAI, R.; KÁLLAY-MENYHÁRD, A.; PINKE, B.; MÉSZÁROS, L.; KUTEN, O.; NEHRER, S.; LACZA, Z. Biological and mechanical properties of platelet-rich fibrin membranes after thermal manipulation and preparation in a single-syringe closed system. *Int. J. Mol. Sci.*, v.19, n.11, p.1-14, 2018.

KHORSHIDI, H.; RAOOFI, S.; BAGHERI, R.; BANIHASHEMI, H. Comparison of the mechanical properties of early leukocyte- and platelet-rich fibrin versus PRGF/Endoret membranes. *Int. J. Dent.*, v.1849207, p.1-7, 2016.

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.

LEE, J.B.; LEE, J.T.; HWANG, S.; CHOI, J.Y.; RHYU, I.C.; YEO, I.L. Leukocyte- and platelet-rich fibrin is an effective membrane for lateral ridge augmentation: An in vivo study using a canine model with surgically created defects. *J. Periodontol.*, v.91, n.1, p.120-128, 2020.

MADURAN TAKAM, P.; YOGANARASIMHA, S.; HASAN, F.K. Characterization of leukocyte-platelet rich fibrin, a novel biomaterial. *J. Vis. Exp.*, v.29, n.103:53221, p.1-8, 2015.

MIRON, R.J.; ZUCHELLI, G.; PIKOS, M.A.; SALAMA, M.; LEE, S.; GUILLEMETTE, V.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; BISHARA, M.; ZHANG, Y.; WANG, H.L.; CHANDAD, F.; NACOPOULOS, C.; SIMONPIERI, A.; AALAM, A.A.; FELICE, P.; SAMMARTINO, G.; GHANAATI, S.; HERNANDEZ, M.A.; CHOUKROUN, J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin. Oral Investig.*, v.21, n.6, p.1913-1927, 2017a.

MIRON, R.J.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; BISHARA, M.; ZHANG, Y.; HERNANDEZ, M.; CHOUKROUN, J. Platelet-rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review. *Tissue Eng. Part B Rev.*, v.23, n.1, p.83-99, 2017b.

MIRON, R.J.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; HERNANDEZ, M.; KANDALAM, U.; ZHANG, Y.; GHANAATI, S.; CHOUKROUN, J. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin. Oral Investig.*, v.21, n.8, p.2619-2627, 2017c.

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

NISHIMOTO, S.; FUJITA, K.; SOTSUKA, Y.; KINOSHITA, M.; FUJIWARA, T.; KAWAI, K.; KAKIBUCHI, M. Growth factor measurement and histological analysis in platelet rich fibrin: a pilot study. *J. Maxillofac. Oral Surg.*, v.14, n.4, p.907-913, 2015.

PRAKASH, S.; THAKUR, A. (2011). Platelet concentrates: past, present and future. *J. Maxillofac. Oral. Surg.*, v.10, n.1, p.45-49, 2011.

RAHMAN, S.; GAYATHRI, G.V.; MEHTA, D.S. Comparative evaluation of advanced platelet rich fibrin membrane with and without glutaraldehyde crosslinking- a de novo in vitro trial. *EC Dental Science*, v.18, n.10, p.2328-2337, 2019.

RAVI, S.; SANTHANAKRISHNAN, M. Mechanical, chemical, structural analysis and comparative release of PDGF-AA from L-PRF, A-PRF and T-PRF - an in vitro study. *Biomater. Res.*, v.11, n.24, p.16, 2020.

RODRIGUES, G.; FABRIS, V.; MALLMANN, F.; RECH, C.A.; CARVALHO, R.V. Fibrinas ricas em plaquetas, uma alternativa para regeneração tecidual: revisão de literatura. *J. Oral Invest.*, v.4, n.2, p.57-62, 2015.

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.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRA, M.S.; FRANCO, T.R. 2006. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. *Revta. Col. Bras. Cir.*, v.33, n.1, p.24-28, 2006.

VISSER, L.C.; ARNOCKY, 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.

YAJAMANYA, S.R.; CHATTERJEE, A.; BABU, C.N.; KARUNANITHI, D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. *J. Indian Soc. Periodontol.*, v.20, n.2, p.151-156., 2016.

ZHANG, J.; QI, X.; LUO, X.; LI, D.; WANG, H.; LI, T. Clinical and immunohistochemical performance of lyophilized platelet-rich fibrin (Ly-PRF) on tissue regeneration. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.*, v.19, n.3, p.466-477, 2017.

ZHOU, R.; WANG, Y.; CHEN, Y.; CHEN, S.; LYU, H.; CAI, Z.; HUANG, X. Radiographic, histologic, and biomechanical evaluation of combined application of platelet-rich fibrin with blood clot in regenerative endodontics. *J. Endod.*, v.43, n.12, p.2034-2040, 2017.

## **CAPÍTULO 2**

## TRABALHO CIENTÍFICO

Será enviado para análise no periódico Journal of Veterinary Dentistry  
(<https://journals.sagepub.com/author-instructions/JOV>)

### **Avaliações histológica, imuno-histoquímica e biomecânica da membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos de cães**

#### **RESUMO**

O objetivo do estudo foi realizar análises histológica, imuno-histoquímica, biomecânica e de molhabilidade de membranas de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), obtidas do sangue de 10 cães hígidos da raça labrador retriever. Coletou-se amostra sanguínea da veia jugular externa com uso de tubo à vácuo sem anticoagulante, que foi imediatamente centrifugado no protocolo de 400g por 12 minutos, empregando centrífuga especializada. Removeu-se o coágulo da L-PRF do tubo e com auxílio de espátula foi raspado o coágulo de hemácias resguardando o “buffy coat”. A membrana da L-PRF foi produzida usando caixa especializada da PRF. Na análise histológica as três porções da membrana foram identificadas, sendo a primeira composta principalmente por eritrócitos, com baixa densidade de leucócitos interpostos entre os mesmos; a segunda formada por leucócitos, predominantemente neutrófilos; e a terceira camada, de aspecto acidofílico, composta pela rede de fibrina. Na imuno-histoquímica todas as amostras apresentaram marcação positiva para VEGF e PDGF, tanto no componente celular, como na malha de fibrina, porém com diferentes intensidades. As avaliações biomecânicas e de molhabilidade foram efetuadas em dois momentos. As membranas da L-PRF de 30 minutos suportaram o dobro da tensão máxima em tração quando comparadas com às de 3 horas. Os testes de molhabilidade das membranas de 30 minutos foram estatisticamente maior que as de 3 horas. Conclui-se que o protocolo de centrifugação empregado permitiu o desenvolvimento da membrana da L-PRF em cães, comprovado pelas análises histológicas e imuno-histoquímicas, e o tempo pode influenciar na resistência mecânica e de molhabilidade das membranas da L-PRF.

# 1 INTRODUÇÃO

A fibrina rica em plaquetas (PRF), considerada a segunda geração de concentrados plaquetários, trata-se de biomaterial autólogo produzido sem necessidade de anticoagulantes ou agentes gelificantes, onde as plaquetas e leucócitos estão presentes em uma matriz de fibrina (Dohan Ehrenfest et al., 2009; Dohan Ehrenfest et al., 2012; Dohan Ehrenfest et al., 2014; Feigin e Shope, 2019). Na preparação da PRF o sangue é imediatamente centrifugado após a coleta, para evitar a cascata de coagulação, desde que não se utiliza anticoagulantes (Dohan Ehrenfest et al., 2009; Alizade et al., 2016; Feigin e Shope, 2019). Entre as vantagens do método podem ser citados o baixo custo, a facilidade de produção e a ausência de produtos químicos, o que favorece o seu uso na rotina (Dohan Ehrenfest et al., 2009; Dohan Ehrenfest et al., 2014).

A composição da PRF consiste de uma combinação de citocinas, cadeias glicânicas e glicoproteínas estruturais dentro de uma rede de fibrina homogênea e tridimensional (Dohan et al., 2006; Feigin e Shope, 2019). Entre as citocinas e fatores de crescimento identificados na PRF podem ser citados as interleucinas (IL- $\beta$ , IL-4), o fator de necrose tumoral, fator de crescimento derivados da plaqueta (alfa e beta), fator de crescimento transformador, fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento endotelial vascular (Feigin e Shope, 2019).

A PRF tem apresentado resultados promissores em pacientes humanos para reparo periodontal de defeitos intraósseos e de furca, bem como na cobertura radicular de recessões gengivais, além de ser capaz de diminuir a infecção após extração dentária (Miron et al., 2017a). Algumas aplicações também têm sido efetuadas na medicina do esporte e na área ortopédica (Dohan Ehrenfest et al., 2014). O uso em casos clínicos em pequenos animais é ainda limitado (Soares et al., 2018), porém transpondo o utilizado em pacientes humanos há várias possibilidades para emprego em cirurgia oral (Feigin e Shope, 2019), bem como na área ortopédica.

Embora a membrana da PRF esteja bem caracterizada, quando produzida com sangue de pacientes humanos (Choukroun et al., 2006; Dohan Ehrenfest et al., 2009; Dohan Ehrenfest et al., 2014; Sam et al., 2015; Dohan

Ehrenfest et al., 2018; Ravi e Santhanakrishnan; 2020), os estudos relativos à produção de membrana com sangue de cães encontram-se no uso dos mesmos como modelo experimental, tais como no tratamento endodôntico regenerativo (Zhou et al., 2017), na regeneração óssea no aumento alveolar residual lateral (Lee et al., 2019), entre outros.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi realizar análises histológica, imuno-histoquímica, biomecânica e de molhabilidade das membranas de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), obtidas do sangue de cães hípidos de uma mesma raça.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais e Ambiente de Experimentação**

A metodologia adotada no presente foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, número 0002/2021-CEUA (Anexo 1). Os tutores dos cães assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

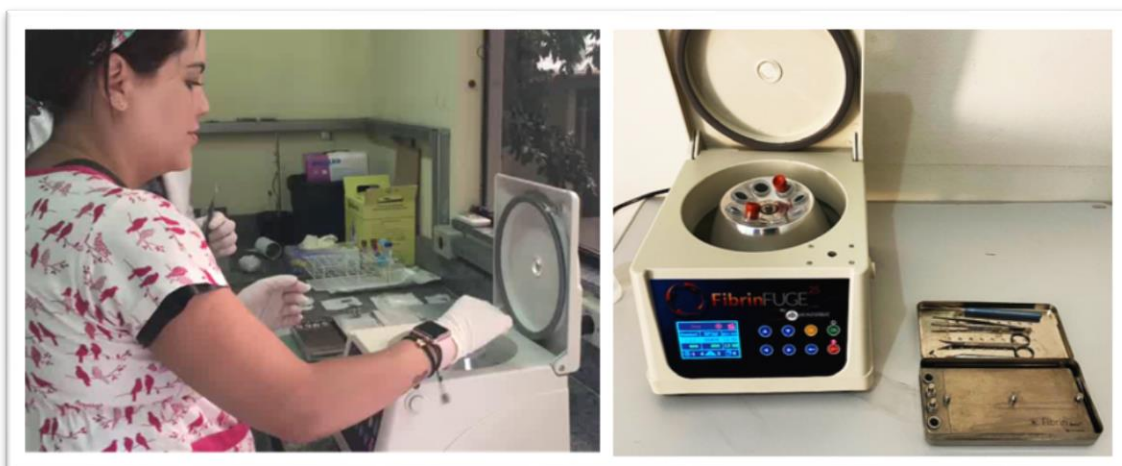
Foram utilizados 10 cães hípidos da raça labrador retriever, 6 machos e 4 fêmeas, com idade entre 4 e 12 anos (média de 6,7 anos e desvio padrão de 5,7), pesando entre 35 e 55 kg (média de 43,3kg e desvio padrão de 14,1). A comprovação da hígidez foi estabelecida pelo histórico clínico, exame físico, hemograma completo e análises bioquímicas (ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, glicose). Como critério de inclusão foram cães hípidos com idade acima de 2 anos. Como critérios de exclusão foram, uso recente ou crônico de medicações, ter realizado procedimentos cirúrgicos a pelo menos três meses, alterações no hemograma e/ou nas análises bioquímicas. As Figuras 1, 2, 3 e 4 ilustram alguns passos do estudo.

De todos os animais foi colhido sangue para produção de membranas para os estudos histológico e imuno-histoquímico. Aleatoriamente foi colhido sangue dos cães para produção de membranas destinadas para as análises biomecânica e de molhabilidade.





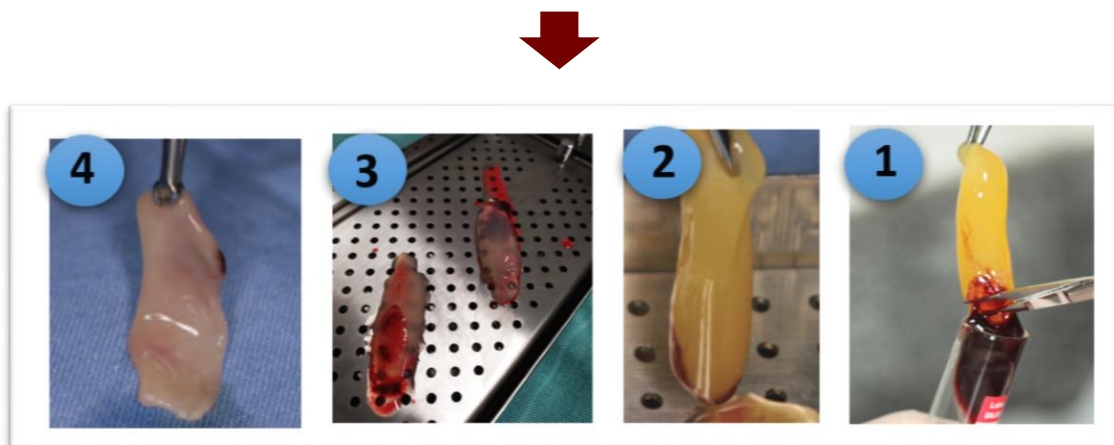
**Figura 1.** Fase Pré-coleta e Coleta de sangue



**Figura 2.** Centrifugação



**Figura 3.** Padronização

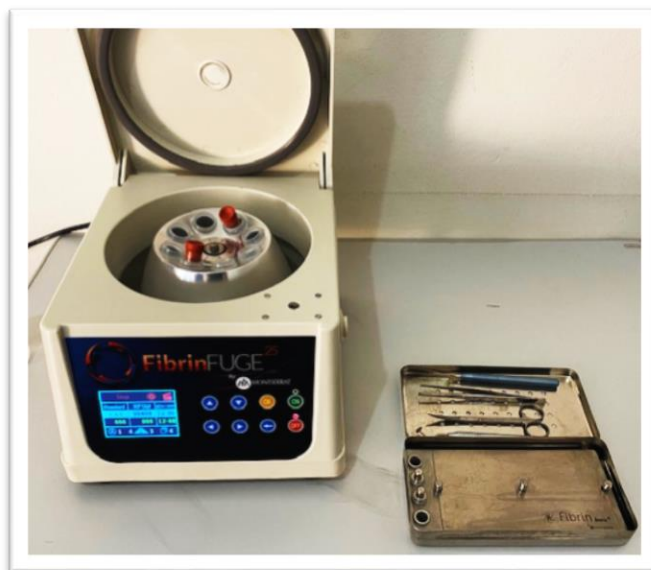


**Figura 4.** Separação

## 2.2 Coleta de sangue e preparação das membranas da L-PRF

Para a coleta das amostras sanguíneas pela veia jugular externa (8 mL), a região cervical foi submetida à tricotomia e antissepsia com clorexidine alcoólico. Foi utilizado Tubo à Vácuo Com Ativador de Coágulo de 10mL, produzido em politereftalato de etileno e recoberto com sílica (Global Medicare), e agulha múltipla vácuo para coleta de sangue 25 x 0,8mm (21GX1”) com adaptador.

Após a coleta, o tubo à vácuo foi imediatamente centrifugado com uso de centrífuga especializada (FibrinFUGE® - LC-04P-S/LCD; Montserrat Import & Export; São Bernardo do Campo, Brasil), no protocolo de 400g por 12 minutos. Para calibragem da centrífuga foi colocado outro tubo para coleta de sangue à vácuo contendo 8 mL de água, no sentido oposto ao tubo com sangue (Figura 5). Após a centrifugação, os tubos foram removidos da centrífuga para a identificação da camada de hemácias, o coágulo da fibrina (L-PRF) e o plasma pobre em plaquetas (PPP), respectivamente, no fundo, centro e topo do tubo. O “buffy coat” foi posicionado entre o coágulo de hemácias e o coágulo de fibrina.



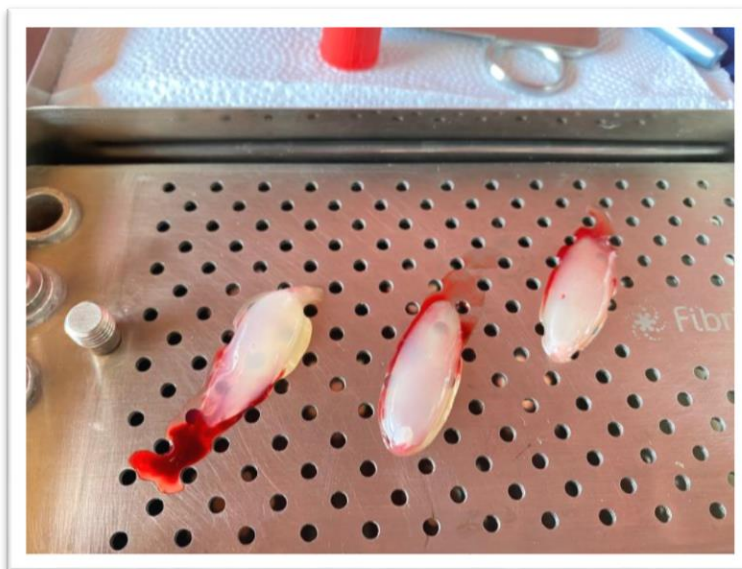
**Figura 5.** Tubo com sangue e tubo com água posicionados em sentido oposto para calibragem da centrífuga especializada e ao lado direito o Estojo metálico Fibrin box®.

Com todo o material devidamente esterilizado, empregou-se uma pinça dente de rato cirúrgica para remoção do coágulo da L-PRF do tubo de centrifugação (Figura 6).

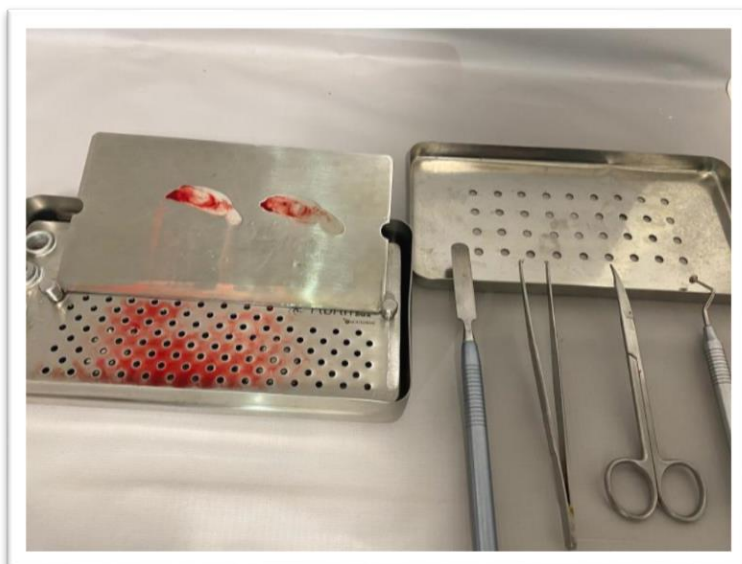


**Figura 6.** Coágulo da L-PRF sendo removido do tubo de centrifugação, no qual se observa a porção da fibrina de coloração amarela no topo e a porção de hemácias na base.

A fração de hemácias foi raspada com auxílio de espátula metálica, porém preservando o “buffy coat”. Na sequência, o coágulo da L-PRF foi colocado sobre a malha metálica perfurada (20cm x 10cm x 3cm) e comprimido com auxílio da tampa de metal com peso de 116 gramas (Fibrin box®; Montserrat; São Paulo, Brasil), por um período de 10 minutos (Figura 7). Finalizado este estágio, a tampa foi removida para a coleta da membrana da L-PRF, recém produzida.



(a)

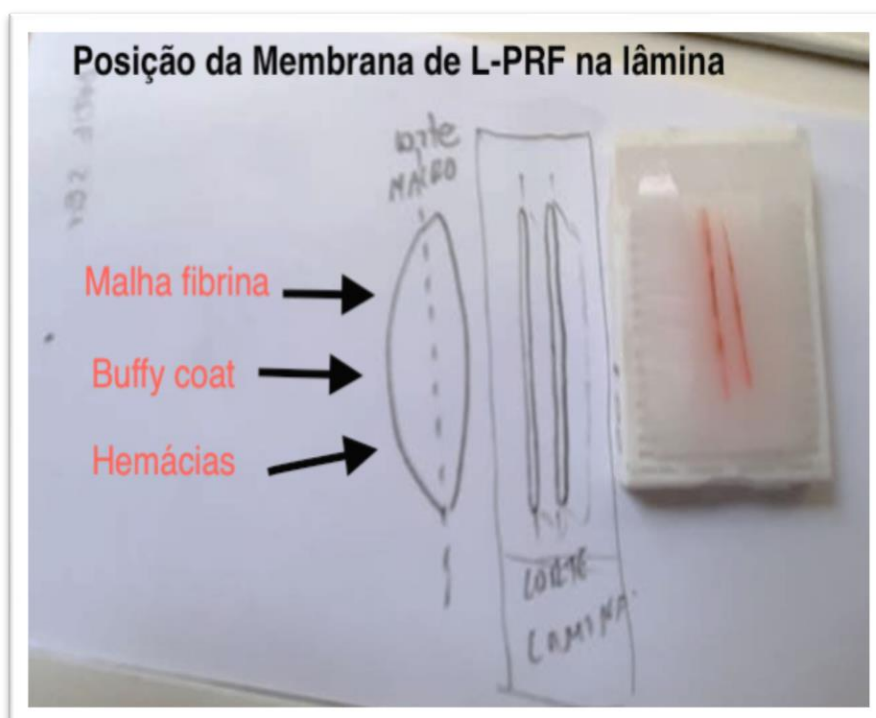


(b)

**Figura 7.** Estojo Fibrin box® na qual se observa a malha metálica perfurada e membranas da L-PRF antes (a) e após (b) a remoção da tampa de compressão.

### 2.3 Processamento histológico e análise das membranas da L-PRF

As membranas da L-PRF foram acondicionadas em cassetes devidamente identificados e fixadas em solução de formalina tamponado 10% por 24 horas. A membrana foi seccionada em três porções, dividindo-a em porção proximal, central e distal com cortes longitudinais (Figura 8). As amostras foram então processadas com emprego de equipamento automático para desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 4 $\mu$ m de espessura, os quais foram corados por hematoxilina e eosina (HE). Posteriormente as amostras foram avaliadas em microscópio óptico, nos aumentos de 5x, 10x, 20x e 40x. Foi realizada uma avaliação qualitativa, que incluiu a qualidade e o aspecto da rede de fibrina, bem com a identificação das células presentes nas diferentes porções de composição da membrana.



**Figura 8.** Forma de secção da membrana da L-PRF em três porções, incluindo a malha de fibrina, 'buffy coat' e área das hemácias.



## 2.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando a técnica da Horseradish peroxidase (HRP) e 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), como previamente descrito (CASTILHO et al., 2021). Brevemente, foram realizados novos cortes dos blocos de parafina e foram dispostos em lâminas com carga positiva (Knittel®, Alemanha) e desparafinizados. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica utilizando solução tampão de citrato pH 6.0 na panela de pressão (Pascal®, Dako, Carpinteria, EUA). O bloqueio de proteínas e peroxidase endógena foi realizado com solução comercial (Dako, Carpinteria, EUA), por 30 e 10 minutos, respectivamente. Posteriormente os anticorpos mouse monoclonal anti-VEGF-A (Cell signaling, Danvers, MA) e o anticorpo mouse monoclonal anti-PDGF (Cell signaling, Danvers, MA) foram utilizados na diluição de 1:50 e 1:100, respectivamente. Após incubação overnight com os anticorpos primários, foi aplicado o sistema de polímero como anticorpo secundário (Envision, (Dako, Carpinteria, EUA) por 1 hora e o DAB por 5 minutos (Dako, Carpinteria, EUA). Posteriormente as amostras foram contra coradas com hematoxilina de Harris.

A avaliação imuno-histoquímica foi efetuada por escores semi-quantitativos, conforme já previamente descrito (CASTILHO et al., 2021), sendo: 0 – amostra sem expressão, 1 – 1% até 25% das células foram positivas, 2 - 26% até 50% das células foram positivas, 3 - 51% até 75% das células positivas, 4 – acima de 75% das células foram positivas.

## 2.5 Teste mecânico

Baseando-se na norma ASTM D882-10, os testes de tração foram realizados em uma máquina universal de ensaios, modelo DL3000, marca EMIC, em temperatura ambiente (25° C), à taxa de deslocamento de 5 mm.min<sup>-1</sup>. Todas as membranas testadas foram mantidas em solução fisiológica até o momento de realização do ensaio, e realizaram-se quatro ensaios para uma das duas condições, ou seja, 3 horas e 30 minutos, respectivamente.

As extremidades de cada amostra foram fixadas por grampos adaptados com lixas antiderrapantes, como previamente descrito (Rahman et al., 2019) (Figura 9). A distância entre os grampos foi fixada em 20mm.



**Figura 9.** Ensaio de tração da membrana da L-PRF.

Todas as medidas dimensionais das membranas da L-PRF foram feitas utilizando-se paquímetro digital da marca Vonder. Uma vez que a medição das espessuras das membranas poderia causar danos às mesmas, realizaram-se cinco medidas de espessura em uma membrana representativa das demais, e o valor médio foi utilizado para todos os cálculos referentes à determinação da área da seção transversal dos corpos de prova ( $0,70 \pm 0,03$ ). As medidas de largura foram realizadas individualmente, uma vez que não apresenta o mesmo potencial dano à estrutura das membranas que a medida de espessura (Tabela 1).

A partir dos dados de carga obtidos durante os ensaios de tração, calcularam-se os valores de tensão e tração utilizando a fórmula:

$$\sigma \text{ (MPa)} = F \text{ (N)} / A \text{ (mm}^2\text{)}$$

Desta forma, definiram-se os valores de tensão máxima suportada para cada amostra.

**Tabela 1.** Medidas dimensionais das membranas da L-PRF.

<b>Amostra</b>	<b>Largura (mm)</b>	<b>Espessura (mm)</b>	<b>Área da seção transversal (mm<sup>2</sup>)</b>
3h – CP 1	12,72	0,70	8,88
3h – CP 2	13,48	0,70	9,41
3h – CP 3	12,89	0,70	9,00
3h – CP 4	12,63	0,70	8,82
30min – CP 1	13,38	0,70	9,34
30min – CP 2	12,57	0,70	8,77
30min – CP 3	10,76	0,70	7,51
30min – CP 4	12,80	0,70	8,93

## 2.6 Teste de molhabilidade

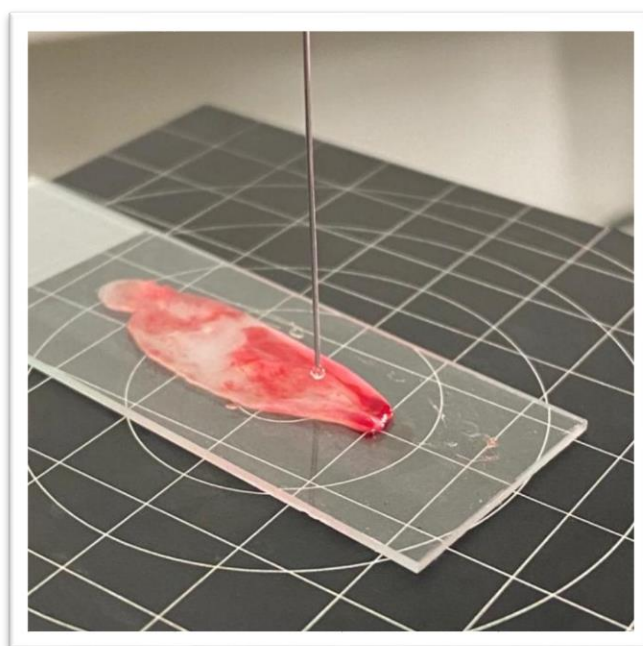
Foram avaliadas membranas com tempos distintos, 30 minutos (n= 4) e 3 horas de produção (n = 4), sendo estas últimas mantidas em solução fisiológica. A absorção da superfície foi avaliada usando um medidor de ângulo de contato em modo de rastreamento dinâmico utilizando água ultrapura (Figuras 10 e 11). Assim, foi utilizado instrumento de medição de ângulo de contato óptico baseado em captação por vídeo com câmera de alta resolução. Os parâmetros para os cálculos por meio da teoria de Laplace-Young foram:

Densidades de fase d'água: 0,9982 g/cm<sup>3</sup>, Fase ambiente - Ar: (0,0013 g/cm<sup>3</sup>), temperatura de sala: 25° C, aceleração da gravidade de 9,81 m/s<sup>2</sup> e taxa de dosagem de 0,1/s. O volume de cada gota foi ajustado em 1,0µl, onde para cada placa, seis gotas foram filmadas a uma taxa de 30 fps.





**Figura 10.** Ensaio de molhabilidade em membrana da L-PRF com instrumento de medição de ângulo de contato óptico, baseado em captação por vídeo câmera de alta resolução.



**Figura 11.** Detalhe do ensaio de molhabilidade da membrana da L-PRF.

## 2.7 Análise estatística

Foi utilizado Teste t de Student não pareado para verificar a tensão máxima suportada em tração e molhabilidade das membranas da L-PRF, entre os tempos de 30 minutos e 3 horas de produção. O intervalo de confiança foi

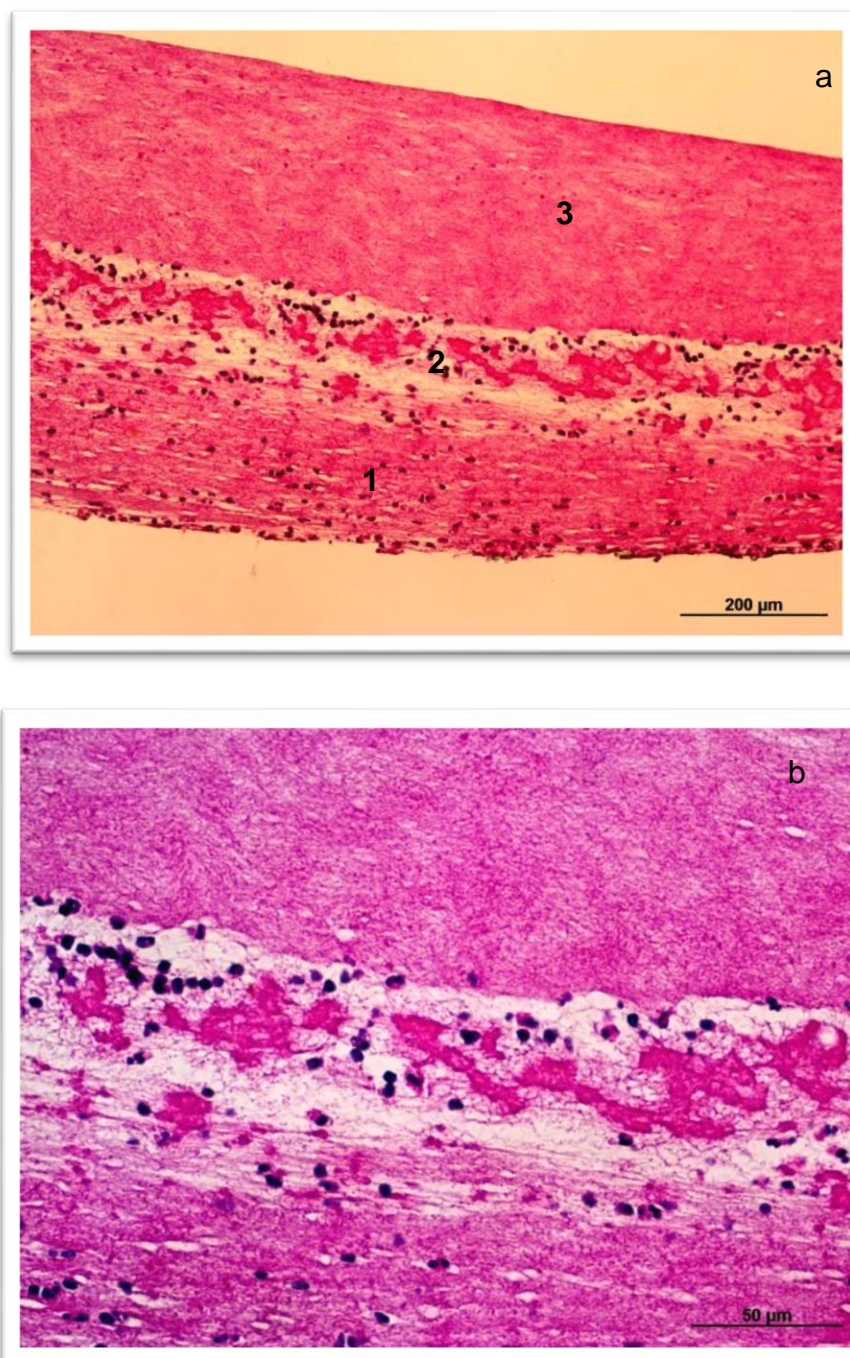
de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valor de  $p < 0,01$ .

### **3 RESULTADOS**

Macroscopicamente em todas as amostras coletadas de sangue, o coágulo da L-PRF mostrou uma separação inclinada das camadas no tubo de coleta após a centrifugação. As membranas da L-PRF formadas com o auxílio da tampa da “Fibrin box” foram todas de aspecto uniforme.

#### **3.1 Histologia e imuno-histoquímica**

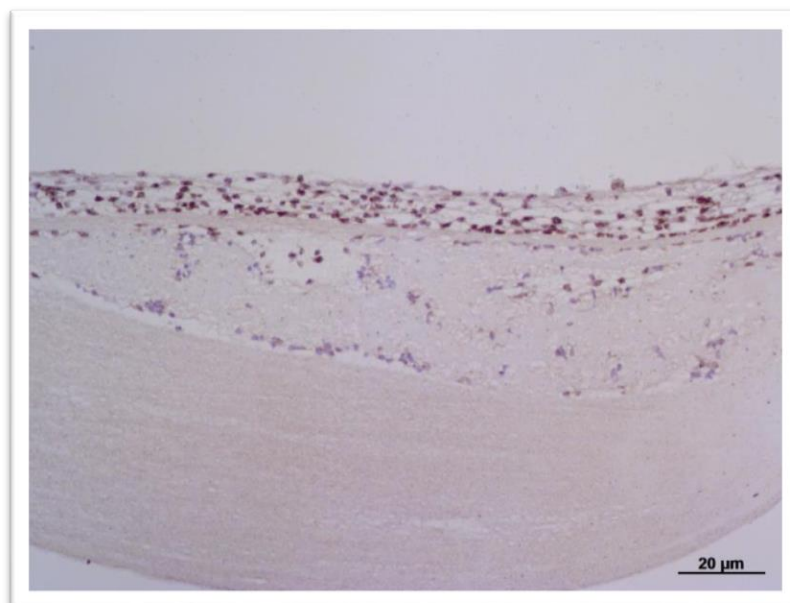
A membrana é composta por três porções (Figura 12), sendo a primeira de eritrócitos e caracterizada pela coloração rosa/vermelha. Nesta porção, observou-se baixa densidade de leucócitos interpostos entre os eritrócitos. A segunda porção (“buffy coat”) foi composta por leucócitos, sendo caracterizada pela coloração basofílica. Na área da camada leucocitária observou-se maior concentração de leucócitos, predominantemente neutrófilos, os quais foram identificados por suas características morfológicas, incluindo núcleo lobulado (segmentado) com 2 a 5 lobos e citoplasma acidofílico abundante. Linfócitos representados por grandes células esféricas com cromatina condensada e escasso citoplasma basofílico, e plaquetas caracterizadas por pequenas células anucleadas também foram identificados. A alta concentração de células nesta área impediu a identificação de todas as células. A terceira porção, de aspecto acidofílico, foi composta pela rede de fibrina. A camada de rede de fibrina era mais densa próximo à camada leucocitária devido ao aumento da concentração de células, formando uma estrutura na qual essas células foram embaladas.



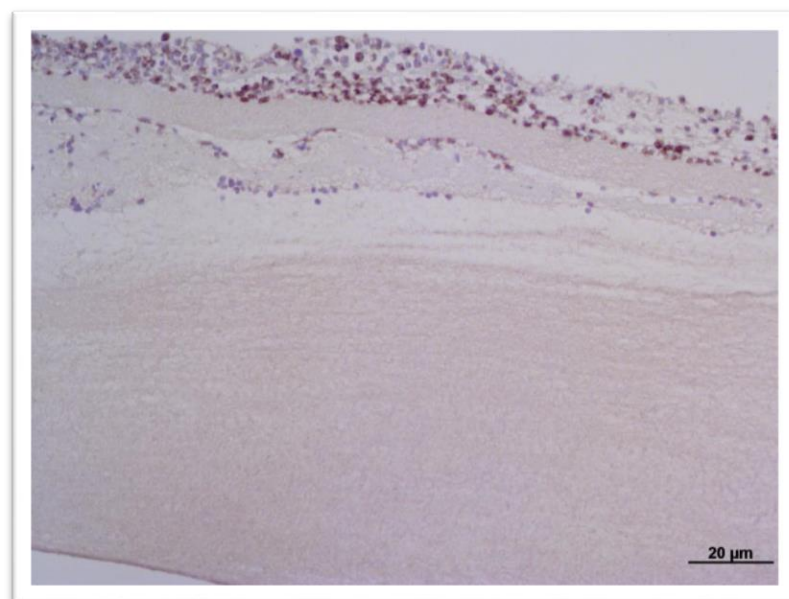
**Figura 12.** Fotomicrografias de membrana da L-PRF canina. (a) Observe as três porções da membrana, na base nota-se a porção composta pela maior presença de eritrócitos (1), seguida da porção do “buffy coat” com alta concentração celular (2) e a rede de fibrina (3).

Na imuno-histoquímica, todas as amostras apresentaram marcação positiva para VEGF e PDGF (Figura 13), tanto no componente celular, como na malha de fibrina em diferentes intensidades. Relativo ao VEGF 50% das membranas tinha escore 3, 30% escore 2 e 10% escore 1. Por sua vez, com

respeito ao PDGF, 50% das membranas tinha escore 1, 40% escore 2 e 10% escore 3.



(a)



(b)

**Figura 13.** Fotomicrografias da imuno-histoquímica das membranas da L-PRF canina, evidenciando as marcações positivas para PDGF (a) e VEGF (b).



Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Escores semiquantitativos da imuno-histoquímica para os anticorpos anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e anti-PDGF (fator de crescimento derivados da plaqueta) nas respectivas membranas da L-PRF.

Identificação	VEGF	PDGF
Membrana 1	3	2
Membrana 2	2	1
Membrana 3	3	1
Membrana 4	2	2
Membrana 5	1	1
Membrana 6	2	2
Membrana 7	3	1
Membrana 8	2	3
Membrana 9	2	1
Membrana 10	1	2

### 3.2. Propriedades mecânicas

As curvas de carga versus deslocamento e os resultados obtidos para as membranas das amostras de 30 minutos estão representadas na Figura 14 e Tabela 3, respectivamente.



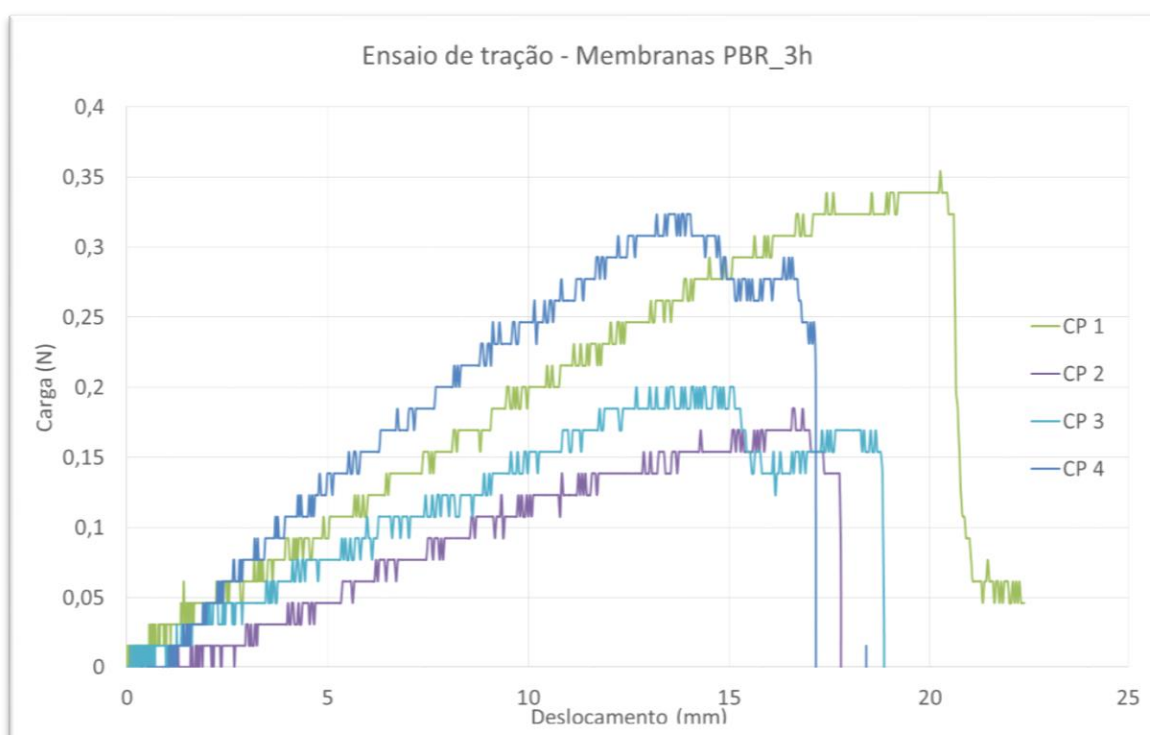
**Figura 14.** Ensaios de tração realizados em quatro membranas da L-PRF, 30 minutos após a produção.

**Tabela 3.** Tensão máxima suportada no ensaio de tração das membranas da L-PRF avaliadas 30 minutos após a produção.

Amostras	Tensão máxima suportada (MPa)
1	0,056
2	0,061
3	0,094
4	0,074
Média ± Desvio Padrão	0,072 ± 0,017

A média calculada de tensão máxima suportada para a membrana após trinta minutos foi de 0,072 MPa com desvio padrão de  $\pm 0,017$ .

As curvas de carga versus deslocamento e os resultados obtidos para as membranas das amostras de 3 horas estão representadas na Figura 15 e Tabela 4, respectivamente.



**Figura 15.** Ensaios de tração realizados em quatro membranas da L-PRF, 3 horas após a produção.

**Tabela 4.** Tensão máxima suportada no ensaio de tração das membranas da L-PRF avaliadas 3 horas após a produção.

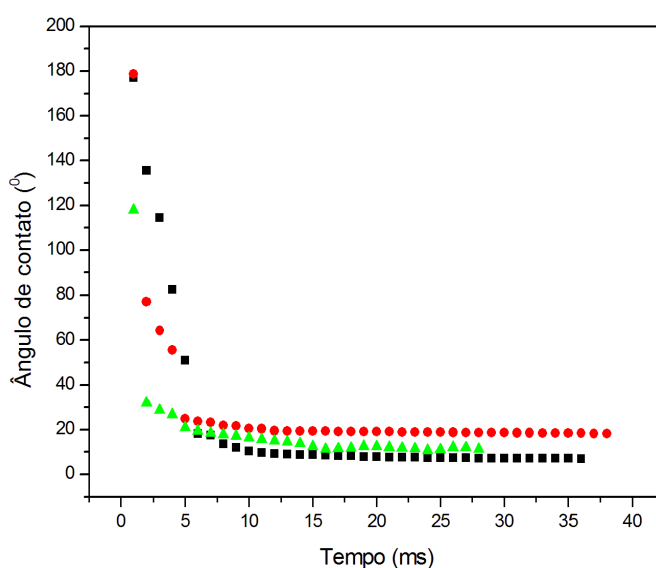
Amostras	Tensão máxima suportada (MPa)
1	0,040
2	0,020
3	0,022
4	0,037
Média ± Desvio Padrão	0,030 ± 0,010

A média calculada de tensão máxima suportada para a membrana após três horas foi de 0,030 MPa com desvio padrão de  $\pm 0,010$ .

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre as membranas da L-PRF, sendo que as testadas 30 minutos após a produção suportaram uma tensão maior em tração do que aquelas avaliadas 3 horas após a produção.

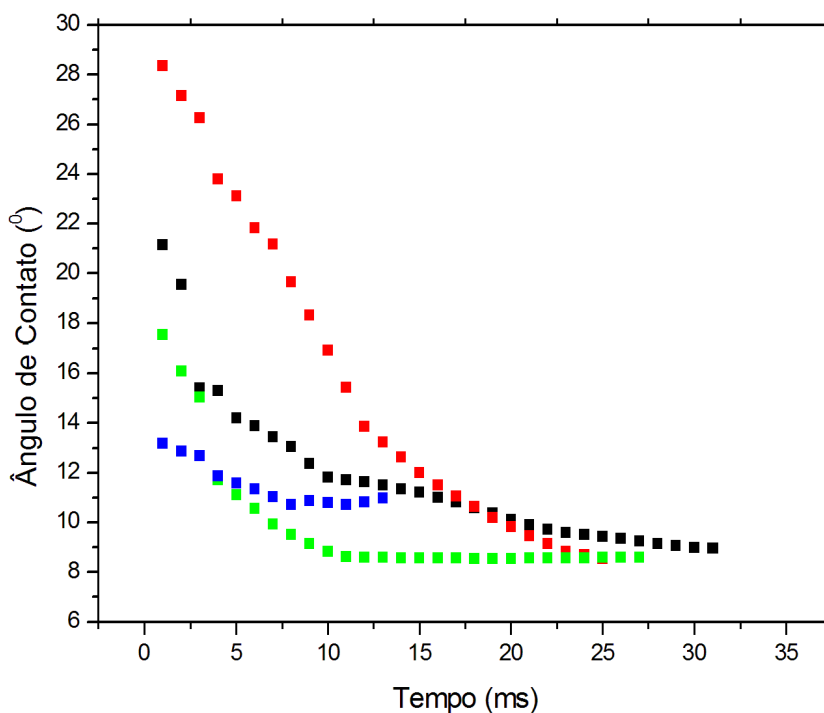
### 3.2 Molhabilidade das membranas da L-PRF

A média calculada para a absorção da água para a membrana da L-PRF após 30 minutos foi de 1,32  $\mu\text{L/s}$  com desvio padrão de  $\pm 0,07$  (Figura 16).



**Figura 16.** Teste de absorção de água da membrana da L-PRF após trinta minutos de produção.

A média calculada para a absorção da água para a membrana após três horas foi de 0,82  $\mu\text{L/s}$  com desvio padrão de  $\pm 0,19$  (Figura 17).



**Figura 17.** Teste de absorção de água da membrana da L-PRF após 3 horas de produção.

O teste de molhabilidade da membrana da L-PRF foi estatisticamente maior aos 30 minutos do que as 3 horas da produção.

## 4 DISCUSSÃO

A membrana produzida no atual estudo caracteriza-se dentro dos produtos L-PRF, ou seja, presença de leucócitos e uma rede de fibrina de alta densidade, que são os mais utilizados em pacientes humanos (DOHAN EHRENFEST et al., 2009; DOHAN EHRENFEST et al., 2014). Existe também a P-PRF, que são preparações sem leucócitos e com uma rede de fibrina de alta densidade, produzido por meio do Fibrinet PRFM kit (DOHAN EHRENFEST et al., 2014).

O tempo entre a coleta de sangue e a centrifugação foi realizada de forma imediata, como recomendado no protocolo para pacientes humanos (DOHAN



EHRENFEST et al., 2009; ALIZADE et al., 2016; FEIGIN e SHOPE, 2019). Um estudo com sangue de homens saudáveis mostrou que quanto mais tempo de espera antes da centrifugação menor foi o gel da PRF obtido (NISHIMOTO et al., 2015). Empregou-se o protocolo de 400 g por 12 minutos, com o uso de centrífuga específica para produção da PRF, a qual permitiu a adequada separação das frações. Isto diferiu de um estudo em gatos, no qual foi necessária centrifugação a 650 g por 12 minutos para a produção das membranas da L-PRF (CASTILHO et al., 2021), com a mesma centrífuga usada no atual estudo, mostrando a necessidade de padronização de acordo com a espécie. Em pacientes humanos têm sido indicadas centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos ou 2700 rpm (400 g) por 12 minutos, na dependência do tipo de centrífuga utilizada (DOHAN EHRENFEST et al., 2009; ALIZADE et al., 2016; FEIGIN e SHOPE, 2019). A escolha da centrífuga é importante, visto um estudo comparando quatro centrífugas disponíveis comercialmente para a produção da L-PRF mostrou que dependendo do tipo de vibração, pode ocorrer danos significativos no conteúdo de células sanguíneas e, conseqüentemente, na qualidade do concentrado plaquetário (DOHAN EHRENFEST et al., 2018).

Macroscopicamente o coágulo da L-PRF mostrou uma separação inclinada das camadas no tubo de coleta após a centrifugação, sendo compatível com a centrífuga de ângulo fixo, em geral, as mais utilizadas para produção da PRF (DOHAN EHRENFEST et al., 2014; DOHAN EHRENFEST et al., 2018). Contudo, um estudo com sangue humano demonstrou que o emprego da centrífuga horizontal (700 g por 8 minutos) promoveu uma separação mais uniforme das células sanguíneas de coágulos da PRF do que a centrífuga de ângulo fixo (2700 rpm por 12 minutos) (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2020).

A membrana foi preparada com uso de estojos metálicos especializados "Fibrin box", o que promoveu uniformidade nas membranas obtidas. Uma outra opção consiste na compressão com uso de gazes estéreis, ou mesmo com colheres (DOHAN EHRENFEST et al., 2010; BORIE et al., 2015; FEIGIN e SHOPE, 2019). No exame histológico foi possível verificar as diferentes porções da membrana, como já descrito em outras espécies (YAJAMANYA et al., 2016; CASTILHO et al., 2021). A maior porção correspondeu a rede de fibrina, que se mostrou mais densa próxima a camada leucocitária. A rede de

fibrina da membrana da L-PRF com sangue humano também se apresentou mais frouxa quanto mais distante da porção da camada de hemácias (YAJAMANYA et al., 2016). A respeito da membrana da L-PRF se caracterizar pela presença de leucócitos (DOHAN EHRENFEST et al., 2014; FEIGIN e SHOPE, 2019), a mais alta concentração ocorre especialmente na área do “buffy coat” (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2020), como também verificado no presente estudo. Embora o papel dos leucócitos seja controverso nos concentrados plaquetários, os que o defendem reforçam a importância pela ação anti-infecciosa e produção dos fatores de crescimento (DOHAN EHRENFEST et al., 2009).

No atual estudo foram avaliados os fatores de crescimento VEGF e PDGF, os quais estiveram presentes em todas as amostras. Os fatores de crescimento, tais como TGF $\beta$ , PDGF, VEGF, IL-1, têm sido detectados pela imuno-histoquímica da PRF obtido com sangue de pacientes humanos (NISHIMOTO et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

Em um estudo da L-PRF em gatos, o VEGF foi positivo em 69,23% das amostras com escore 4 e 30,77% com escore 3, e o PDGF foi positivo em 53,85% com escore 3 e 46,15% com escore 2. Comparativamente os escores do presente estudo foram menores, desde que o VEGF tinha escore 3 em 50% das membranas e escore 2 em 30%, ao passo que 50% das membranas tinha escore 1 e 40% escore 2 com respeito ao PDGF. O VEGF assim como o PDGF são considerados indutores da angiogênese (RIBATTI, 2004) e a intensidade de expressão destes fatores de crescimento precisam ser considerados na dependência do local de aplicação das membranas da L-PRF. Assim seria importante o desenvolvimento de outros estudos para avaliar a influência da raça e idade dos cães na expressão destes fatores. Um estudo com sangue humano observou variação no número de plaquetas e leucócitos aprisionados na rede de fibrina em relação à idade na avaliação de coágulos da PRF (YAJAMANYA et al., 2016).

Os valores obtidos no teste de tração das membranas da L-PRF não puderam ser comparados ao de outros estudos efetuados com sangue de paciente humanos, devido as diferenças de tamanho e formato das membranas e equipamentos de teste (MADURAN TAKAM et al., 2015; KHORSHIDI et al., 2016; ISOBE et al., 2017; AGGOUR et al., 2017; RAHMAN et al., 2019; RAVI e

SANTHANAKRISHNAN, 2020). Contudo, pelo gráfico da resistência em tração foi possível observar o comportamento viscoelástico da L-PRF, como referido em outros estudos (MADURAN TAKAM et al., 2015).

No atual estudo optou-se por avaliar a tensão máxima em dois momentos temporais, já que a determinação das características biomecânicas da membrana permite seu direcionamento de acordo com a aplicação desejada. Vale citar que a rigidez da membrana da PRF produzida com sangue humano tem se mostrado com valores inferiores as de membranas de colágeno comerciais, o que pode interferir no uso como membrana de barreira na regeneração periodontal (SAM et al., 2015). Da mesma forma, a membrana da L-PRF comparada a matriz de fibrina rica em plaquetas (PRFM) se mostrou menos rígida; porém, apresentou maior força de tensão, o que permite sua melhor adequação as superfícies irregulares (AGGOUR et al., 2017). No presente estudo pode-se afirmar que a membrana da L-PRF após trinta minutos de produção suporta uma tensão maior em tração, ou seja quase o dobro, quando comparado a amostra após 3 horas da sua produção. Sendo assim, o uso da membrana da L-PRF em locais que requeiram uma maior resistência, serão melhor conduzidos com as membranas recém-produzidas.

Superfícies hidrofílicas, nas quais se inclui a membrana da L-PRF, são importantes para o suporte de células e na ativação da cascata de coagulação (VOGLER, 1998). Em um estudo que avaliou a molhabilidade de superfícies de titânio usinadas e jateadas, foi detectado um aumento da molhabilidade quando foi incluído a aplicação do revestimento da PRF (BEVILACQUA et al., 2021). No presente estudo o teste de molhabilidade mostrou que a membrana da L-PRF após 30 minutos de produção absorveu água a uma taxa maior que a amostra testada após 3 horas da sua produção, o que deve ser considerado quando da aplicação da membrana. Vale ainda citar que este fato pode também ter influenciado as diferenças de resistência mecânica à tração entre os tempos de avaliação das membranas, considerando que para este teste as membranas testadas tardiamente foram mantidas em solução fisiológica 0,9%. Um estudo que analisou as propriedades mecânicas de membranas da PRF desenvolvidas em tubos de vidro (método tradicional) e com um sistema fechado de seringa (hypACT Inject), estando esta frescas, congeladas (-20oC) e liofilizadas (-80oC), foi observado que as amostras congeladas de

membranas produzidas em seringas mostraram estatisticamente maior força de tração comparadas às membranas frescas (KARDOS et al., 2018).

Foi também verificado que a força de tração e a resistência foram significativamente maiores em membranas da A-PRF tratadas com 0,1% de glutaraldeído por 10 minutos comparadas às membranas sem tratamento (RAHMAN et al., 2019).

Por sua vez, em coelhos membranas da PRF colocadas em 20% ABS (Ankaferd blood stopper - extrato de ervas usado para hemostasia) e solução salina 80% por 5 minutos mostraram melhores propriedades físicas do que as membranas sem tratamento (AKTAŞ et al., 2020). Desta forma, mais estudos precisam ser conduzidos para determinar a influência de diferentes soluções de hidratação ou formas de conservação na resistência mecânica das membranas.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Baseado nos resultados obtidos conclui-se que o protocolo de centrifugação empregado permitiu o desenvolvimento da membrana da L-PRF em cães, comprovado pelas análises histológicas e imuno-histoquímicas, e o tempo pode influenciar na resistência mecânica e de molhabilidade das membranas.

## 6 REFERÊNCIAS

Aggour RL, Sabry HA, Hassan GS. In vitro evaluation of mechanical and structural properties of leukocyte-platelet-rich fibrin and platelet-rich fibrin matrix. *Egypt Dent J.* 63(2):1531-1539, 2017.

Alizade F, Kazemi M, Irani S, Sohrabi M. Biologic characteristics of platelet rich plasma and platelet rich fibrin: A review. *Int J Contemp Dent Med Rev,* 030516:1-4, 2016.

Bevilacqua L, Faccioni F, Porrelli D, Faccioni P, Rusin F, Frassetto A, and Maglione M. Blood wettability of different dental implant surfaces after different pre-treatments: ultrasonic instrumentation, platelet-rich fibrin coating, and acid etching. An in vitro study. *Appl. Sci.* 11(1433):1-8, 2021.

Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V, Fuentes R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med.* 8(5):7922-7929, 2015.

Castilho MS, Rahal SC, Dias Neto RDN, Pereira AC, Francia CCDA, Mesquita LDR, Antunes CB, Lainetti PF, Fonseca-Alves CE. Preparation and characterization of leukocyte- and platelet-rich fibrin membrane derived from cats' blood. *Microsc Res Tech.* 84(8):1802-1808, 2021.

Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101(3):e56-60, 2006.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101(3):e45-50, 2006.

Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 4(1):3-9, 2014.

Dohan Ehrenfest DM, 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.* 13(7):1145-1152, 2012.

Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol.* 81(4):546-555, 2010.

Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS, Nally M, Lanata N, Wang HL, Quiryneen 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.* 29(2):171-184, 2018.

Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 27(3):158-167, 2009.

Feigin K, Shope B. Use of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in dentistry and oral surgery: Introduction and review of the literature. *J Vet Dent.* 36(2):109-123, 2019.

Fujioka-Kobayashi M, Kono M, Katagiri H, Schaller B, Zhang Y, Sculean A, Miron RJ. Histological comparison of Platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation. *Platelets.* 32(3):413-419, 2021.

Isoke K, Watanebe T, Kawabata H, Kitamura Y, Okudera T, Okudera H, Uematsu K, Okuda K, Nakata K, Tanaka T, Kawase T. Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). *Int J Implant Dent.* 3(1):17, 2017.

Kardos D, Hornyák I, Simon M, Hinsenkamp A, Marschall B, Várdai R, Kállay-Menyhárd A, Pinke B, Mészáros L, Kuten O, Nehrer S, Lacza Z. Biological and mechanical properties of platelet-rich fibrin membranes after thermal manipulation and preparation in a single-syringe closed system. *Int J Mol Sci.* 19(11):3433, 2018.

Khorshidi H, Raofi S, Bagheri R, Banihashemi H. Comparison of the mechanical properties of early Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin versus PRGF/Endoret Membranes. *Int J Dent.* 2016:1849207, 2016.

Lee JB, Lee JT, Hwang S, Choi JY, Rhyu IC, Yeo IL. Leukocyte- and platelet-rich fibrin is an effective membrane for lateral ridge augmentation: An in vivo

study using a canine model with surgically created defects. *J Periodontol.* 91(1):120-128, 2020.

Madurantakam P, Yoganarasimha S, Hasan FK. Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, A Novel Biomaterial. *J Vis Exp.* 29(103):53221, 2015.

Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Wang HL, Chandad F, Nacopoulos C, Simonpieri A, Aalam AA, Felice P, Sammartino G, Ghanaati S, Hernandez MA, Choukroun J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 21(6):1913-1927, 2017a.

Nishimoto S, Fujita K, Sotsuka Y, Kinoshita M, Fujiwara T, Kawai K, Kakibuchi M. Growth factor measurement and histological analysis in platelet rich fibrin: a pilot study. *J Maxillofac Oral Surg.* 14(4):907-913, 2015.

Rahman S, Gayathri GV, Mehta DS. Comparative evaluation of advanced platelet rich fibrin membrane with and without glutaraldehyde crosslinking- a de novo in vitro trial. *EC Dental Science.* 18(10):2328-2337, 2019.

Ravi S, Santhanakrishnan M. Mechanical, chemical, structural analysis and comparative release of PDGF-AA from L-PRF, A-PRF and T-PRF - an in vitro study. *Biomater Res.* 24(16):1-10, 2020.

Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol.* 128(3):303-309, 2005.

Sam G, Vadakkekuttikal RJ, Amol NV. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. *J Indian Soc Periodontol.* 19(1):32-36, 2015.

Soares CS, Barros LC, Saraiva V, Gomez-Florit M, Babo PS, Dias IR, Reis RL, Carvalho PP, Gomes ME. 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.* 20(9):835-843, 2018.

Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting – ASTM D882-10.

Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* 74:69-117, 1998.

Yajamanya SR, Chatterjee A, Babu CN, Karunanithi D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. *J Indian Soc Periodontol.* 20(2):151-156, 2016.

Zhang J, Qi X, Luo X, Li D, Wang H, Li T. Clinical and immunohistochemical performance of lyophilized platelet-rich fibrin (Ly-PRF) on tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 19(3):466-477, 2017.

Zhou R, Wang Y, Chen Y, Chen S, Lyu H, Cai Z, Huang X. Radiographic, histologic, and biomechanical evaluation of combined application of platelet-rich fibrin with blood clot in regenerative endodontics. *J Endod.* 43(12):2034-2040, 2017.



## ANEXO 1



## ATESTADO

**Atesto** que o Projeto "AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOMECÂNICA DA MEMBRANA DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS DE CÃES" **Protocolo CEUA 0002/2021**, a ser conduzido por Josiane Clara Aparecida de Oliveira Rato Graciani, responsável/orientador Sheila Canevese Rahal, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

<b>Finalidade</b>	PESQUISA CIENTÍFICA
<b>Vigência do projeto</b>	30/01/2021 a 06/04/2021
<b>Nome Comum / Espécie / Linhagem</b>	CANINA / CANIS LUPUS FAMILIARIS /
<b>Raça</b>	labrador
<b>Nº de animais machos</b>	7
<b>Nº de animais fêmeas</b>	8
<b>Nº de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Peso médio de animais machos</b>	45 kg
<b>Peso médio de animais fêmeas</b>	40 kg
<b>Peso médio de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Idade</b>	3 ano(s) e 5 mes(es) e 0 dia(s).
<b>Procedência</b>	Proprietários particulares

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 11/01/2021**

**JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO**

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Seção Técnica Acadêmica  
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n  
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681  
(14) 3880-2176 - [patrizia@fmvz.unesp.br](mailto:patrizia@fmvz.unesp.br) - [www.fmvz.unesp.br](http://www.fmvz.unesp.br)