

Cláudia Sofia Pinto e Silva Cardoso

**Coágulo A⁺-PRF convencional versus coágulo A⁺-PRF com protocolo PomPac:
Estudo comparativo do comprimento.**

**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2021**

Cláudia Sofia Pinto e Silva Cardoso

**Coágulo A⁺-PRF convencional versus coágulo A⁺-PRF com protocolo PomPac:
Estudo comparativo do comprimento.**

**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2021**

Cláudia Sofia Pinto e Silva Cardoso

**Coágulo A⁺-PRF convencional versus coágulo A⁺-PRF com protocolo PomPac:
Estudo comparativo do comprimento.**

*Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Medicina Dentária.*

(Cláudia Sofia Pinto e Silva Cardoso)

**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2021**

RESUMO

Objetivo:

Este estudo teve por objetivo compreender se a temperatura a que a colheita sanguínea é acondicionada no protocolo Advanced Plus-Platelet Rich Fibrin (A⁺-PRF), interfere nos resultados dimensionais dos coágulos.

Materiais e Métodos:

Dez voluntários, sem histórico de toma de anti-coagulantes e com intervenções cirúrgicas com tratamento com A⁺-PRF, foram submetidos a colheita de quatro tubos de sangue. Dois tubos colhidos sob protocolo convencional e outros dois sob protocolo PomPac. Após colheita procedeu-se à produção de coágulos segundo o protocolo de A⁺-PRF, previamente descrito na literatura (Ghanaati et al, 2014). Os coágulos (4x10 = 40) foram submetidos a registo de dimensões de comprimento. Posteriormente foi realizada análise estatística dos dados.

Resultados:

A dimensão média dos coágulos provenientes do protocolo A⁺-PRF convencional foi de 29,10 milímetros (mm) e os provenientes do protocolo com Pompac foi de 34,35 mm (p<0,001; n=20). Para a dimensão máxima registou-se para o protocolo A⁺-PRF o valor de 35 mm e para o Protocolo A⁺-PRF com Pompac 41mm (p<0,001; n=20).

Conclusão:

Este estudo permitiu concluir que o protocolo A⁺-PRF com Pompac permite obter coágulos com comprimento máximo e médio mais elevados que os obtidos com o protocolo A⁺-PRF convencional. Estes fatos fazem do protocolo A⁺-PRF com Pompac uma melhor escolha em detrimento do protocolo A⁺-PRF convencional no que respeita à quantidade de biomaterial disponível.

Palavras-Chave: A⁺-PRF; A-Platelet-rich fibrin; Blood collection; PomPac; Temperature

ABSTRACT

Purpose:

This study aimed to understand the temperature at which the blood collection is stored in the Advanced Plus-Platelet Rich Fibrin (A⁺-PRF) protocol, interferes with the dimensional results of clots.

Materials and Methods:

Ten volunteers, with no history of anticoagulants medication and undergoing surgical interventions with treatment with A⁺-PRF, underwent collection of four tubes of blood. Two tubes were collected under conventional protocol and another two under PomPac protocol. After collection, clots were produced according to the A⁺-PRF protocol, previously described in the literature (Ghanaati et al, 2014). The clots (4x10 = 40) were submitted to length dimension recording. Subsequently, statistical analysis of the data was performed.

Results:

The mean dimension of clots from the conventional A⁺-PRF protocol was 29,10 millimeter (mm) and those from the Pompac protocol was 34,35 mm (p<0.001; n=20). For the maximum dimension, the value of 35 mm was recorded for the A⁺-PRF protocol and 41 mm for the A⁺-PRF protocol with Pompac (p<0.001; n=20).

Conclusion:

This study allowed us to conclude that the A⁺-PRF protocol with Pompac allows to obtain clots with higher maximum and average length than those obtained with the conventional A⁺-PRF protocol. These facts make the A⁺-PRF protocol with Pompac a better choice over the conventional A⁺-PRF protocol in terms of the amount of biomaterial available.

Key-words: A⁺-PRF; A-Platelet-rich fibrin; Blood collection; PomPac; Temperature

Coágulo A⁺-PRF convencional versus coágulo A⁺-PRF com protocolo PomPac: Estudo comparativo do comprimento.

DEDICATÓRIA

À evolução da Medicina Dentária.

Coágulo A⁺-PRF convencional versus coágulo A⁺-PRF com protocolo PomPac: Estudo comparativo do comprimento.

“A melhor maneira de prever o futuro é criá-lo.” – Peter Drucker

ÍNDICE GERAL

ABREVIATURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. DESENVOLVIMENTO.....	3
1. Advanced Plus - Platelet Rich Fibrin (A ⁺ -PRF).....	3
i. Material biológico obtido.....	4
2. Coagulação sanguínea.....	5
i. Efeito da temperatura nas plaquetas, função plaquetária, fibrinogénio e fatores de coagulação.....	5
3. Objetivo do estudo.....	7
4. Materiais e Métodos.....	7
5. Resultados	10
III. DISCUSSÃO.....	10
IV. CONCLUSÃO	12
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
ANEXOS.....	21
FIGURAS.....	26
TABELAS.....	35

ABREVIATURAS

α - Alfa

A-PRF: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos Avançado

A⁺-PRF: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos Avançado Mais

°C: Graus Celsius

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FGF: Fator de crescimento fibroblástico

IGF-1: Fator de crescimento insulínico -1

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-8 – Interleucina-8

LSCC: Conceito de centrifugação de baixa velocidade

L-PRF: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos

MCP-1 – Proteína 1 quimioatraente de monócitos

mm: milímetro

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

%: Por cento

PRF: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos

PRP: Plasma rico em plaquetas

RCF: Força de centrifugação relativa

Rpm: rotações por minuto

TGF- β 1: Fator de crescimento transformador - β 1

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 - Parecer positivo da Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa...	22
Anexo 2 - Consentimento Informado.....	23
Anexo 3 - Certificado de Licenciatura em Enfermagem.....	24
Anexo 4 - Certificado do “Curso de PRF – Fibrina Rica em Plaquetas – Advanced-PRF e Injectable-PRF”.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação de biomaterial final disponível entre PRF's (El Bagdadi et al, 2019)	27
Figura 2 – Análise de microscopia de luz do coágulo PRF (Dohan Ehrenfest et al, 2010) e Scan total de um coágulo de fibrina ao longo de seu eixo longitudinal (Ghanaati et al, 2014)	28
Figura 3 – Material obtido do PRF (imagens de autoria própria).....	29
Figura 4 – Influência da temperatura na formação da rede de fibrina e atividade plaquetária a 4°C, 24°C e 37°C (Walner et al, 2020)	30
Figura 5 – Colheita de sangue (imagens de autoria própria)	31
Figura 6 – A ⁺ -PRF com Pompac (imagens de autoria própria).....	32
Figura 7 – Centrifugação e obtenção de coágulos (imagens de autoria própria)	33
Figura 8 – Preparação e medição do coágulo (imagens de autoria própria).....	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e Limitações do PRF.....	36
Tabela 2 - Etapas do Protocolo A ⁺ -PRF.....	37
Tabela 3 - Fatores de Crescimento presentes no A ⁺ -PRF.....	38
Tabela 4 - Etapas do Protocolo A ⁺ -PRF com Pompac.....	39
Tabela 5 - Resultados relativos ao comprimento (mm) das duas réplicas dos coágulos analisados pelo protocolo A ⁺ -PRF e A ⁺ -PRF PomPac (n=10 pacientes).....	40
Tabela 6 – Resultados relativos ao comprimento dos coágulos (A ⁺ -PRF e A ⁺ -PRF PomPac).....	41
Tabela 7 - Diferença de médias entre o protocolo A ⁺ -PRF e A ⁺ PRF com PomPac (Teste t para grupos emparelhados)	42

Coágulo A⁺-PRF convencional versus coágulo A⁺-PRF com protocolo PomPac: Estudo comparativo do comprimento.

I. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da investigação clínica prende-se com o desenvolvimento de aditivos cirúrgicos bioativos que auxiliem a regulação da inflamação e aumentem a velocidade do processo de cicatrização e regeneração tecidual (Dohan et al, 2006). Com efeito, a pesquisa e o desenvolvimento de protocolos que promovam a hemóstase, a cicatrização e a regeneração tecidual são uma questão recorrente em todas as áreas cirúrgicas (Del Corso et al, 2012).

Otimizar estes processos é um objetivo fundamental no campo da biotecnologia na área da Medicina Dentária, em que as melhores modalidades de tratamento são frequentemente inspiradas no mecanismo natural de cura do organismo humano. Entre elas, a fibrina rica em plaquetas (PRF) lidera a frente com uma grande quantidade de evidências de estudos apoiando a sua eficácia (Desai M., Home Page Periospot).

Desde a sua criação em 2001 por Joseph Choukroun (Dohan et al, 2006) que este tem sido sujeito a pesquisas aprofundadas sobre as aplicações clínicas, ações biológicas, várias modificações técnicas e otimizações (Miron et al, 2017). Evoluiu para se tornar um dos concentrados de plaquetas mais amplamente usado na medicina dentária, evidenciando-se no tratamento de recessões gengivais (Shetty et al, 2014), na regeneração óssea guiada em defeitos ósseos periodontais (Castro et al, 2016; Miron et al 2017; Liu et al, 2019; Fahimipour et al, 2020), na cirurgia oral (Choukroun et al, 2006) e peri-implantar (Diss et al, 2008; Simonpieri et al, 2009) e na endodontia regenerativa (Shivashankar et al, 2017; Zein et al, 2019; Chisini et al, 2019).

A principal meta é conseguir numa amostra de sangue, todos os elementos que possam ser utilizados para a promoção de angiogénese, hemostasia e controlo local da inflamação, tais como: plaquetas, leucócitos e citocinas. A meta foi alcançada com o A⁺-PRF que se traduz num coágulo que possui os elementos chave necessários para promover a cicatrização e a regeneração dos tecidos: a fibrina (servindo como matriz tridimensional de suporte), as plaquetas (ricas em fatores de crescimento) e células do hospedeiro (principalmente as várias populações de leucócitos e células-tronco mesenquimais, fundamentais no processo antibacteriano, neovascularização e propriedades regenerativas) (Choukroun et al, 2006; Agrawal, 2017).

Para além das plaquetas e dos leucócitos, as citocinas são de extrema importância neste biomaterial, mas é a matriz de fibrina que os suporta e auxilia na constituição dos elementos realmente responsáveis pelo potencial terapêutico do PRF (Gaultier et al, 2003;

Simonpieri et al, 2004; Del Corso et al, 2012) possuindo propriedades mecânicas que nenhum outro concentrado rico em plaquetas oferece (Wu et al, 2012).

O interesse significativo da utilização de PRF na área da Medicina Dentária surge por ser de preparo extemporâneo e facilmente produzido na cadeira do consultório a partir do próprio sangue do paciente (Fan et al, 2020) o que elimina qualquer risco de transmissão de doenças (Tatullo et al, 2012). Com um processamento simplificado e com uma única centrifugação, sem aditivos ou anticoagulantes e não sujeito a manipulação bioquímica de sangue, conseguiu colocar fim às complicações legais da manipulação sanguínea (Chatterjee et al, 2019).

Porém por ser totalmente autólogo e cem por cento natural (Dohan et al, Part I, 2006; Dohan et al, Part II, 2006) as quantidades produzidas são baixas, estando esta limitação relacionada com a utilização não sistemática deste biomaterial (Borie et al, 2015). O coágulo de A⁺-PRF apresenta características otimizadas perante os outros PRF e concentrados plaquetários, no entanto é o protocolo que entrega menor quantidade de biomaterial final (El Bagdadi et al, 2019). Apresentando assim, como todas as técnicas, as suas vantagens e limitações (Tabela 1).

Numa busca constante de melhoria, em Setembro de 2020, Choukroun divulga uma nova otimização ao protocolo de PRF: a utilização do Kit PomPac. Esta implica a colheita da amostra sanguínea com acessórios e acondicionamento da amostra a uma temperatura de 4 graus Celsius (°C) o que promete obter coágulos de fibrina maiores, alterando apenas a temperatura entre o período da colheita e a centrifugação.

Ainda não há evidência científica desta evolução introduzida por Choukroun, estando de momento a serem distribuídos os kits PomPac pelos representantes a nível mundial.

A confirmação desta realidade poderá trazer benefícios aos protocolos desenvolvidos por Choukroun permitindo que este biomaterial reúna características vantajosas perante todos os outros biomateriais, tanto no que respeita às suas propriedades como à quantidade de biomaterial final disponível.

II. DESENVOLVIMENTO

1. Advanced plus-platelet rich fibrin (A⁺-PRF)

Em 2014 Joseph Choukroun desenvolveu o “CHOUKROUN’S Advanced PRF” introduzindo um novo protocolo de centrifugação seguindo a teoria do “conceito de centrifugação em baixa velocidade”. A redução da força de centrifugação relativa (RCF) de acordo com o conceito de centrifugação de baixa velocidade (LSCC) (Fujioka-Kobayashi et al, 2017) resultou num aumento de libertação de fatores de crescimento e formação de uma estrutura angiogénica (Masuki et al, 2016; Miron et al 2017), verificando-se uma melhoria nas propriedades de degradação mecânica e química da matriz de fibrina (Herrera-Vizcaíno et al, 2019).

Este conceito foi apresentado como uma ferramenta capaz de gerar matrizes de PRF mais bioativas contendo altas concentrações de leucócitos e plaquetas, bem como libertação avançada de fatores de crescimento, de acordo com os requisitos clínicos (Choukroun et Ghanaati, 2017).

O fator mais crítico que pode afetar o sucesso da formação do coágulo de PRF na cicatrização e regeneração é a qualidade da preparação, requerendo bom conhecimento/habilidades do clínico sobre produção, preparação e conservação do coágulo otimizando/aumentando a eficiência e qualidade clínica (Simonpieri et al, 2009). Neste protocolo o sangue é colhido antes do procedimento cirúrgico diretamente do paciente por punção intravenosa, sem adição de anticoagulante, em tubos de vidro de 10 mililitros (ml) que são imediatamente centrifugados (Dohan Ehrenfest et al, 2018). O grupo de Choukroun estudou e modificou ainda mais o PRF produzindo o A⁺-PRF (protocolo elencado na Tabela 2) levando em consideração que a força de centrifugação tem efeito direto sobre a quantidade de células aprisionadas dentro da matriz de PRF (Fujioka-Kobayashi et al, 2017). Este conceito otimizou as propriedades do coágulo com a presença de um maior número de plaquetas e leucócitos na rede de fibrina (Pitzurra et al, 2020). A matriz de fibrina formada mostra uma estrutura mais porosa (Ghanaati et al, 2014; Miron et al, 2017) com uma população de células uniforme, permitindo mais espaço para o aprisionamento celular e assim uma maior e mais sustentada libertação de fatores de crescimento e glicoproteínas ao longo do tempo (Ghanaati et al, 2014; Masuki et al, 2016; Fujioka-Kobayashi, 2017; Choukroun et al, 2017; El Bagdadi et al, 2019) até um período de 10 dias (Ghanaati et al, 2014; Kobayashi et al, 2016; El Bagdali et al,

2019), em comparação com L-PRF e PRP (Kobayashi et al, 2016; El Bagdali et al, 2019; Pitzurra et al, 2020).

Um estudo de Fujioka-Kobayashi e colaboradores em 2017 demonstrou que o coágulo de A⁺-PRF revelou um nível significativamente aumentado de fatores de crescimento liberados (Tabela 3) em comparação com A-PRF e L-PRF, sendo este o mais alto de todos os grupos de concentrados plaquetários (Dohan et al, 2006; Masuki et al, 2016).

Além disso, existem grandes quantidades de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) liberados principalmente dos grânulos alfa (α) das plaquetas (Ghanaati et al, 2018), que atuam como um regulador essencial para a produção de colagênio e migração e proliferação de células mesenquimais (Fujioka-Kobayashi et al, 2017; Ghanaati et al, 2018).

Assim, a cura aprimorada e o conforto do paciente de maneira econômica são os destaques do A⁺-PRF (Gupta et Agarwal, 2021) porém com volume limitado e baixa quantidade de biomaterial final disponível (Borie et al, 2015) inclusive quando comparado com outros PRF (El Bagdadi et al, 2019) (Figura 1).

i. Material biológico obtido

O PRF é formado pela separação do sangue, após centrifugação, em vários componentes, incluindo hemácias, plasma, leucócitos e plaquetas. O concentrado final do PRF é um concentrado de leucócitos, plaquetas e fibrina. As 3 camadas distintas visíveis após centrifugação são: glóbulos vermelhos na parte inferior, um coágulo de PRF no meio e uma camada superior de sobrenadante de plasma (plasma pobre em plaquetas) (Dohan et al, 2006).

O coágulo PRF é composto por duas partes principais observável a olho nu: uma porção amarela de fibrina, constituindo o corpo principal, e uma porção vermelha localizada no fim do coágulo (cheio de hemácias). Entre essas duas áreas, uma camada esbranquiçada chamada de "camada leucocitária" pode igualmente ser observada a olho nu (Dohan Ehrenfest et al, 2010; Ghanaati et al, 2014) (Figura 2).

O PRF pode ser usado diretamente como um coágulo/*clot* (Figura 3A), ou após a compressão como *plug* (Figura 3B) ou como membrana (Figura 3C) mediante a finalidade do tratamento (Simonpiere et al, 2009).

2. Coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea representa um dos processos mais estudados na modelagem biomédica. No entanto, as aplicações clínicas desta modelagem permanecem limitadas devido à complexidade deste processo e devido à grande variação interpaciente das concentrações de fatores sanguíneos, constantes cinéticas e condições fisiológicas (Ratto et al, 2021).

O processo de coagulação envolve os mecanismos de formação do coágulo no local da lesão, a prevenção do crescimento incontrolável do coágulo e a lise do coágulo. Esse processo é caracterizado por uma série de reações que envolvem plaquetas, hemácias, fatores de coagulação e anticoagulantes em um procedimento de três estágios. No primeiro estágio do processo, denominado hemostasia primária, é formado um coágulo inicial branco solúvel, constituído principalmente de plaquetas ativadas. No estágio seguinte, a hemostasia secundária, os fatores de coagulação inativos, que existem no plasma em condições fisiológicas, são ativados. Em um processo complexo, os fatores de coagulação promovem a transformação / conversão do coágulo branco solúvel e fibrinogénio em um coágulo insolúvel e estável e uma matriz de fibrina (Gale, 2011; Rustem et al, 2004).

Quando o sangue é removido do corpo e colocado em um tubo de ensaio de vidro, os glóbulos vermelhos (RBCs) são capazes de se agregar e o sangue inicia o processo de coagulação com o simples contato com as paredes do tubo (Naik et al, 2013), e as plaquetas são ativadas durante a centrifugação (Kobavashi et al, 2012; Fujioka-Kobayashi, 2017; Louka et al, 2021).

i. Efeito da temperatura nas plaquetas, função plaquetária, fibrinogénio e fatores de coagulação

A temperatura tem um papel muito importante na qualidade do coágulo, ou seja, se através da temperatura atrasarmos a coagulação, o fibrinogénio não é consumido no momento da colheita de sangue, o que permitirá obter coágulos com maiores dimensões, tendo sido esta a afirmação de Choukroun em 2020 na apresentação do Kit Pompac a utilizar no protocolo A⁺-PRF (Tabela 4).

A diminuição acentuada de temperatura tem efeitos marcados nas plaquetas, função plaquetária, fibrinogénio e fatores de coagulação; tendo um impacto negativo na geração

de trombina visto inibir maioritariamente a fase de iniciação de formação da mesma (Martini, 2009).

Um estudo *in vitro* demonstrou que a diminuição de temperatura promove a diminuição da função plaquetária e reduz a atividade das plaquetas. Confirmou igualmente a inibição dos fatores de coagulação e a implicação da função plaquetária provavelmente resultado do comprometimento da trombina induzida pela diminuição da temperatura. Esta diminuição leva também a mudanças dinâmicas no metabolismo do fibrinogénio diminuindo a síntese de fibrinogénio em comparação com a normotermia. Alterações moleculares, como a diminuição na rede de fibrina associada à temperatura, foram acompanhadas por efeitos celulares, como a menor atividade das plaquetas e a quase ausência de rede de fibrina a 4°C (Martini, 2009; Jeppesen et al, 2017; Wallner et al, 2020) (Figura 4).

Wolberg et al (2004) afirmaram que principalmente as plaquetas e as células portadoras de fatores de coagulação são potencialmente afetadas pela temperatura. A polimerização da fibrina é desencadeada pelo contato entre o fator de coagulação XII e a superfície do vidro do tubo de colheita. Os tubos utilizados em A⁺-PRF são de vidro o que já por si atrasa a coagulação, ao contrário dos tubos de plástico revestidos de sílica que facilitam a coagulação. A combinação do uso de tubos de vidro e a colheita com temperatura a 4°C levam a acreditar que estes dois fatores induzem, no protocolo desta técnica, um potencial deficit na disponibilidade de fibrinogénio e um atraso na geração de trombina, conseqüentemente inibindo a função de coagulação na pré-centrifugação. Assim sendo, permite a separação eficaz dos componentes na centrifugação e a formação do coágulo pelo processo de coagulação natural na pós-centrifugação (Aizawa et al, 2020).

Para o sucesso da técnica é necessário que a recolha do sangue e a transferência para a centrífugadora sejam o mais rápido possível. Este requisito é de extrema importância uma vez que como o tubo é desprovido de anticoagulantes, em poucos minutos o sangue inicia a coagulação, com a ativação das plaquetas, dando início à cascata de coagulação com o simples contato do sangue no tubo de colheita. Deste modo, é imprescindível que a centrifugação seja feita imediatamente após a colheita (Naik et al, 2013).

3. Objetivo do estudo

Esta investigação teve como objetivo verificar se a temperatura a que a colheita sanguínea é efetuada no protocolo de A⁺-PRF, interfere no comprimento do coágulo de A⁺-PRF obtido. Para isso foram preparados coágulos de A⁺-PRF provenientes de colheitas sanguíneas convencionais à temperatura ambiente (21°C) sendo estes comparados com coágulos provenientes de colheitas sanguíneas sob o protocolo PomPac (4°C). Os coágulos sujeitos a comparação foram provenientes do mesmo dador para garantir as mesmas características sanguíneas.

No final espera-se a produção de coágulos de acordo com o protocolo A⁺-PRF, retratando metade da amostra coágulos originários de colheita à temperatura ambiente e outra metade da amostra correspondente a coágulos provenientes de colheitas segundo o protocolo Pompac.

Tendo-se assim como objetivo estabelecer uma comparação entre os valores encontrados validando ou não a conclusão de que o protocolo Pompac pode produzir um coágulo com maior comprimento, apenas alterando a temperatura da colheita até à centrifugação. Esta introdução ao protocolo anuncia permitir maior quantidade de material biológico para aplicação em enxertos ósseos e tecidulares na cavidade oral, recorrendo à mesma quantidade de sangue colhido ao indivíduo.

Apesar de existir a garantia de Joseph Choukroun de que com o protocolo Pompac obteremos coágulos maiores, como é uma inovação ao protocolo A⁺-PRF em lançamento e em experimentação clínica inicial a nível mundial, não há ainda, até onde sabemos, estudos comparativos diretos na literatura entre o protocolo A⁺-PRF e o protocolo A⁺-PRF com metodologia Pompac.

Este estudo procura assim ser um estudo piloto, em que testará ambos os protocolos numa escala reduzida conduzida à vista de uma investigação maior.

4. Materiais e Métodos

A. Aprovação Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa (Nº FCS/MED – 109/20-2) (Anexo 1).

O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes do estudo. O estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsínquia (Anexo 2).

Todos os procedimentos respeitaram as normas da Direção Geral de Saúde em vigor.

B. População

Um total de 10 voluntários participaram deste estudo dos quais 6 eram mulheres e 4 homens. Eram pacientes com intervenções clínicas agendadas que incluíam tratamento coadjuvante com uma das formas finais de A⁺-PRF.

Os critérios de exclusão foram histórico de toma de anticoagulantes.

Foi mantido o anonimato de todos os pacientes, sendo atribuído a cada voluntário um código (de 1 a 10), em que ao código correspondente estava associado o registo do comprimento dos coágulos e o consentimento informado, respetivos.

C. Colheita de sangue e preparação das amostras

A cada voluntário, sem histórico de toma de anticoagulantes, foram colhidas quatro amostras de sangue com coletor de sangue *butterfly* “BC12” (21Gx3/4, Lote 19-03, Validade 02-2024). Sempre que necessário recorreu-se ao visualizador portátil de acesso venoso (Modelo ZY-725, Z-IMAGING®, Standard N° GB4706. 10-2008). Os tubos utilizados foram tubos de vidro de vácuo simples de 10ml, sem adição de qualquer aditivo (“A-P by CHOUKROUN®”, Lote 19-06-KA, Validade 05-2021) (Figura 5).

Dois dos tubos foram submetidos a colheita sanguínea com protocolo Pompac (estes foram identificados com “PP” previamente) e os outros dois tubos com colheita convencional, em que a temperatura ambiente estava regulada para 21°C.

O kit Pompac, os tubos de colheita e o coletor de sangue foram retirados do frigorífico (regulado a uma temperatura controlada e vigiada de 4°C) apenas no momento da colheita. Os tubos com identificação “PP” foram acondicionados na vertical sempre no Kit PomPac imediatamente após a sua retirada do frigorífico, antes da colheita e após a colheita, para acondicionamento contínuo à temperatura de 4°C (Figura 6).

Após os quatro tubos de sangue serem preenchidos, foram imediatamente colocados na centrífugadora “DUO Quattro PRF PROCESS® by CHOUKROUN”, (Serial Number LA 192AM0000144, Data de Fabrico 2019) e posicionados opostos um ao outro, para garantir a correta calibração do equipamento. A tampa da centrífugadora foi fechada, selecionado o programa A⁺-PRF (centrifugação e tempo de 1300 rpm por 14 minuto, respetivamente, assumidos automaticamente) e ativado o botão “Start” (Figura 7).

Entre a colheita e o início da centrifugação nunca foi excedido o tempo de 2 minutos. Decorridos os 14 minutos de centrifugação, a centrifugadora abriu automaticamente e as amostras estavam prontas para preparação dos coágulos.

As colheitas assumiram código igual ao consentimento informado do voluntário dador.

D. Preparação do coágulo

Os 4 tubos foram retirados da centrifugadora, retiradas cuidadosamente as tampas e colocados no suporte do Kit A-PRF em repouso durante 5 minutos pós centrifugação. Decorridos esses 5 minutos foram retirados os coágulos com pinça de preensão. Com o coágulo suspenso pela pinça e com a ajuda da tesoura realizou-se a separação do coágulo dos glóbulos vermelhos. De forma individual colocou-se o coágulo sobre a mini-bandeja protegida com compressa para retirar os restantes vestígios de células vermelhas. Após a preparação do coágulo, este foi acondicionado na Box de A-PRF para o efeito (Figura 8). Este processo foi efetuado de forma igual e sucessiva para os 4 coágulos.

Após o acondicionamento dos quatro coágulos na Box de A-PRF estes estavam prontos para medição.

Estes procedimentos foram realizados pela autora desta tese, detentora de curso prévio de Licenciatura em Enfermagem com término em 2003, que a habilita à colheita sanguínea (Anexo 3) e do “Curso de PRF – Fibrina Rica em Plaquetas – Advanced PRF e Injectable-PRF” realizado em 2019 e ministrado pelo inventor do PRF Dr. Joseph Choukroun, que a habilita à realização dos protocolos desta técnica (Anexo 4).

E. Medição do comprimento do coágulo A⁺-PRF

Antes da medição do comprimento dos coágulos, foi garantido que os coágulos se encontravam o mais alinhado possíveis dentro das possibilidades técnicas da Box de A-PRF. Esta medição foi realizada pelo Médico Dentista que efetuou o procedimento cirúrgico que se seguiu, fazendo assim com que nunca fosse previamente conhecido de que tipo de protocolo (Pompac ou convencional) os presentes coágulos tinham provido. A medição do comprimento dos coágulos foi realizada com craveira digital em milímetros (Figura 8).

Este procedimento foi repetido criteriosamente nos 4 coágulos dos 10 voluntários.

F. Dados e análise estatística

Os comprimentos dos coágulos foram registados em milímetros (mm) para cada coágulo.

Esta informação permitiu a construção de um gráfico onde evidencia a comparação do comprimento médio dos coágulos obtidos com colheita convencional e o comprimento médio dos coágulos obtidos com colheita com protocolo Pompac.

Os dados foram colhidos em Microsoft Excel e as análises estatísticas foram realizadas com SPSS.

5. Resultados

A avaliação do tamanho dos coágulos obtidos foi baseada na quantificação do comprimento obtido para cada coágulo colhido sob protocolo convencional comparativamente com os colhidos sobre protocolo Pompac.

O comprimento das 2 amostras (2 réplicas) de coágulo obtidas para cada um dos 10 voluntários para o protocolo A⁺-PRF e as outras 2 amostras para o protocolo A⁺-PRF com PomPac apresentaram diferenças significativas de comprimento dentro do mesmo protocolo (teste t para grupos emparelhados, $p < 0,001$ em ambos os tratamentos). Por esta razão, a comparação dos dois protocolos foi realizada utilizando todos os valores das 2 amostras para cada um dos protocolos por voluntário.

Os resultados de medição de comprimento apresentam alguma variabilidade dentro e entre os grupos (Tabela 5).

A partir da avaliação do comprimento dos 20 coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita convencional e dos 20 coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita com Kit PomPac verificou-se que os coágulos analisados pelo protocolo A⁺-PRF com PomPac apresentam um comprimento, quer médio, quer máximo superior ao verificado pelo protocolo A⁺-PRF convencional (Tabela 6). Esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa ($t = -12,43$, $p < 0,001$) (Tabela 7).

III. DISCUSSÃO

Com este estudo pretendeu-se avaliar a existência de alguma diferença nas dimensões de tamanho entre coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita convencional e coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita com Kit Pompac (em que os acessórios utilizados no procedimento de colheita e no armazenamento das amostras até à centrifugação são

retirados do frigorífico que se encontra regulado a temperatura de 4°C). Consideramos esta uma questão relevante, uma vez que com a introdução do Kit Pompac no protocolo de A⁺-PRF podemos melhorar as dimensões dos nossos coágulos, permitindo com o mesmo sangue colhido no indivíduo obter maiores coágulos e maior quantidade de material biológico para a elaboração de “clots”, “plugs”, membranas e “stick bone” para utilização em cirurgia de regeneração tecidular e óssea.

Com os resultados obtidos, é possível afirmar que os coágulos de A⁺-PRF com protocolo de colheita com Kit Pompac apresentam maiores dimensões que os coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita convencional. Os coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita com Kit Pompac apresentaram comprimento máximo de 41 mm e os coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita convencional comprimento máximo de 35 mm (p=<0,001 usando teste t para grupos emparelhados; n = 20).

Em relação ao comprimento médio, os coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita com Kit Pompac apresentaram comprimento médio de 34,35 mm e os coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita convencional comprimento médio de 29,10 mm (p=<0,001 usando teste t para grupos emparelhados; n = 20).

Observamos que os coágulos A⁺-PRF em cada protocolo não obtiveram o mesmo comprimentos em cada voluntário, indicando que as características de cada coágulo é diferente de indivíduo para indivíduo. Verificamos assim a existência de variação ao produzir coágulos A⁺-PRF o que nos mostra não se poder esperar obter a maior dimensão possível.

Sabemos que o A⁺-PRF apresenta maior concentração de fatores de crescimento na sua matriz de fibrina comparativamente a qualquer outro agregado plaquetário, aumentando a taxa de regeneração dos tecidos quando aplicado em ferida cirúrgica. Contudo, baseando-nos nas evidências científicas, até ao momento o único item que não permitia colocá-lo como o coágulo de agregado plaquetário com melhores características globais era o tamanho inferior quando comparado com coágulos obtidos com outros protocolos. A alteração do protocolo com a introdução do kit Pompac aliado à maior dimensão do coágulo que este origina, parece torná-lo o material autólogo e 100 por cento (%) natural mais adequado para regeneração tecidular.

Como objetivo, tinha-se produzir coágulos de A⁺-PRF com protocolo de colheita convencional e coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita com Kit Pompac, o que foi alcançado. Procurou-se também encontrar a diferença nas propriedades dimensionais do coágulo de ambos os protocolos sendo o propósito conseguido. Provou-se que de facto a

colheita com o acondicionamento à temperatura de 4°C produz coágulos com comprimento superior. Isto revela que, quando aplicado em várias situações clínicas, os coágulos de A⁺-PRF com colheita com protocolo Pompac permite obter coágulos maiores. Com este estudo, pode-se aconselhar os Médicos a usar coágulos A⁺-PRF com colheita sob protocolo Pompac, em vez da colheita convencional, para obter coágulos com maiores dimensões com a mesma quantidade de sangue colhido no paciente.

Ao aumentar o tamanho do coágulo conseguimos aumentar o campo de exposição que resultará em um maior tempo de absorção, prolongando os efeitos de libertação de fatores de crescimento e leucócitos onde o coágulo for aplicado, nas suas diversas formas possíveis.

IV. CONCLUSÃO

O A⁺-PRF traduz-se numa fonte autóloga que fornece uma concentração sobrenatural de plaquetas, de fatores de crescimento e leucócitos que simplificou drasticamente o procedimento de preparação de biomateriais concentrados em plaquetas e facilitou a sua aplicação clínica.

O objetivo da tecnologia PRF é extrair uma amostra de sangue dos pacientes que contém esses elementos chave e prepara-la clinicamente para uso imediato em qualquer situação clínica para melhorar a cura e para promover a regeneração do tecido.

O uso de PRF permite a entrega local de uma matriz de fibrina, células, fatores de crescimento e proteínas que fornecem propriedades biológicas para promover a neovascularização, acelerando potencialmente a cicatrização e regeneração de tecidos, enquanto ao mesmo tempo reduz a morbidade devido ao seu efeito antibacteriano e hemostático e sem efeitos e rejeição.

O futuro do PRF e suas aplicações em Medicina Dentária na regeneração dos tecidos moles e ósseo tem diversas aplicações terapêuticas dependendo agora da sua coerência e clareza científica.

Estudos científicos independentes são necessários para validar e padronizar os protocolos PRF o que irá melhorar os resultados terapêuticos.

Através deste estudo podemos afirmar que existe formação de coágulos de A⁺-PRF com maiores dimensões quando a colheita é feita com o protocolo Pompac. Estes resultados mostram um futuro promissor no campo da aplicação de coágulos de A⁺-PRF permitindo

maiores coágulos com a mesma quantidade de colheita de sangue. Conforme mostrado, os coágulos de A⁺-PRF com colheita sob protocolo Pompac têm dimensões maiores quando comparadas com os coágulos A⁺-PRF com protocolo de colheita convencional. Por esse motivo, acreditamos que a introdução do Protocolo Pompac na confecção de coágulos A⁺-PRF será benéfica, uma vez que oferece maior quantidade de material biológico para utilização em intervenções cirúrgicas.

Os resultados do atual estudo suportam a aplicação clínica do A⁺-PRF como o PRF com mais vantagens, contudo ainda faltam eficácia clínica e significado clínico.

A relevância e a viabilidade deste conceito de engenharia de tecidos devem ser comprovadas por meio de estudos *in vitro*.

O alcance das aplicações clínicas do A⁺-PRF é amplo, porém, um conhecimento preciso deste, da sua eficácia e dos seus limites são necessários para otimizar o seu uso sistemático na prática clínica diária.

No entanto, outros estudos clínicos devem demonstrar até que ponto a aplicação de baixas temperaturas (4°C) na colheita de sangue para obter coágulos A⁺-PRF irá beneficiar os resultados clínicos.

Evidências rigorosas obtidas de grandes ensaios clínicos randomizados de alta qualidade devem ser apresentados. Os investigadores devem compreender a natureza real da terapia com concentrados plaquetários (ou seja, terapia adjuvante), padronizar os protocolos de preparação (por exemplo, escolha de centrifugadoras e tubos) e aplicação clínica (por exemplo, avaliação das condições do recetor). Assim, como conclusão deste estudo o que se propõe é padronizar a qualidade, os protocolos e os diagnósticos. Acreditando que estudos específicos de bioengenharia devem possibilitar a padronização desta importante estratégia terapêutica.

Atualmente é uma técnica minimamente invasiva, com baixos riscos e resultados clínicos bastante satisfatórios. Contudo, serão necessários mais estudos, com resultados histológicos padronizados que confirmem estes resultados clínicos satisfatórios.

Com base neste estudo e na literatura, o uso de A⁺-PRF pode ser aconselhado em termos de cicatrização dos tecidos da cavidade oral. No entanto, não existem estudos clínicos que apoiem a utilização de um ou outro protocolo para a preparação de PRF. Portanto, ainda é necessário tempo para atingir o nível de conhecimento suficiente para a relevância clínica do protocolo de preparação do PRF ideal.

Mais estudos são aguardados a fim de comprovar os efeitos benéficos da utilização do Kit Pompac no protocolo de A⁺-PRF assim como a regulamentação dos protocolos de preparação.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal A. A.. 2017. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World Journal of Clinical Cases*. 5(5), pp. 159–171

Aizawa H. et al. 2020. Quantitative Near-Infrared Imaging of Platelets in Platelet-Rich Fibrin (PRF) Matrices: Comparative Analysis of Bio-PRF, Leukocyte-Rich PRF, Advanced-PRF and Concentrated Growth Factors. *Internation Journal of Molecular Sciences*. 21(12), pp. 4426

Borie E. et al. 2015. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 8 (5), pp. 7922-9

Castro A. B. et al. 2016. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*. 44(1), pp. 67-82

Chatterjee A. e Debnath K.. 2019. Comparative evaluation of growth factors from platelet concentrates: An *in vitro* study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 23(4), pp. 322–328

Chisini L. A. et al. 2019. Bone, Periodontal and Dental Pulp Regeneration in Dentistry: A Systematic Scoping Review. *Brazilian Dental Journal*. 30(2), pp. 77-95

Choukroun J. et al. 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery Oral Medecine Oral Pathology, Oral Radioiology*. 101, pp. 56-60

Choukroun J. et al. 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on boné allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 101(3), pp. 299-303

Choukroun J. e Ghanaati G.. 2017. Reduction of relative centrifugation force within PRF- (Platelet-Rich-Fibrin) concentrates advances patients' own inflammatory cells and platelets: First introduction of the Low speed centrifugation Concept. *European Journal of Trauma Emergency Surgery*. 44(1), pp. 87–95

Del Corso M. et al. 2012. The Use of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin During Immediate Postextractive Implantation and Loading for the Esthetic Replacement of a Fractured Maxillary Central Incisor. 2012. *The Journal of Implant*, 38 (2), pp.181-187

Diss A. et al. 2008. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants. . *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 105, pp. 572-579

Dohan D. M. et al. 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 101(3), pp. 37-44

Dohan D. M. et al. 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 101, pp. 45–50

Dohan D. M. et al. 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*., 101 (3), pp. 51-55

Dohan Ehrenfest D.M. et al. 2010. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of Periodontology*, 81 (4), pp. 546-555

Dohan Ehrenfest, D. M.. 2010. How to optimize the preparation of leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*.. 110 (3), pp. 275-278; author reply 278-280

Dohan Ehrenfest D. M. et al. 2018. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 29(2), pp. 171-184

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

Eming S. A. et al. 2007. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 42(3), pp. 115-170

Fahimipour F. et al. 2020. Critical-sized bone defects regeneration using a bone-inspired 3D bilayer collagen membrane in combination with leukocyte and platelet-rich fibrin membrane (L-PRF): An *in vivo* study. *Tissue and Cell*. 63, pp. 101326

Fan Y., Perez k. e Dym H.. 2020. Clinical Uses of Platelet-Rich Fibrin in Oral and Maxillofacial Surgery. *Dental Clinics of North America*. 64(2), pp. 291-303

Fujioka-Kobayashi M. et al. 2017. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *Journal of Periodontology*. 88(1), pp. 112–21

Gale A. J.. 2011. Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicologic Pathology*. 39, pp. 273–280

Ghanaati S. et al. 2014. Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF) – a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *Journal Oral Implantology*. 40 (6), pp. 679–689

Ghanaati S. et al. 2018. Fifteen Years of Platelet Rich Fibrin in Dentistry and Oromaxillofacial Surgery: How High is the Level of Scientific Evidence?. *Journal Oral Implantology*. 44(6), pp.471-492

Gupta N. et Agarwal S.. 2021. Advanced-PRF: Clinical evaluation in impacted mandibular third molar sockets. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*. 122(1), pp. 43-49

Gaultier F. et al. 2003. Concentrés plaquettaires: Technologies, biologie associée, applications cliniques, analyses histologiques 3^a partie: applications cliniques. *Implantodontie*. 13, pp. 3-11

Herrera-Vizcaíno C. et al. 2019. Platelet-rich fibrin secretome induces three dimensional angiogenic activation in vitro. *European cells & materials*. 37, pp. 250-264

Home Page da Periospot. Disponível em < <https://periospot.com/clinical-advantages-of-the-platelet-rich-fibrin-in-dentistry/>> [Consultado em 17/03/21]

Jeppesen N.A. et al. 2017. Prolonged targeted temperature management compromises thrombin generation: A randomised clinical trial. *Resuscitation*. 118, pp. 126-132

Kobayashi M. et al. 2012. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*. 40 (5), pp. 323-329

Kobayashi E. et al. 2016. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical and Oral Investigation*. 20 (9), pp. 2353-2360

Liu Y. et al. 2019. Platelet-Rich Fibrin as a Bone Graft Material in Oral and Maxillofacial Bone Regeneration: Classification and Summary for Better Application. *BioMed Research International*. 2019: 3295756

Louka M. e Kaliviotis E.. 2021. Development of na Optical Method for the Evaluation of Whole Blood Coagulation. *Biosensors*. 11(4), pp. 113

Martini W. Z.. 2009. Fibrinogen metabolic responses to trauma. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. 17, pp. 2

Masuki H. et al. 2016. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International Journal of Implant Dentistry*. 2 (1), pp. 19

Miron R. J. et al. 2017. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical and Oral Investigation*. 21(6), pp. 1913-1927

Naik B. et al. 2013. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *Journal of Conservative Dentistry*. Vol.16 (4), pp. 284-293

Pitzurra L. et al. 2020. Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. *Journal of Periodontal Research*. 55(2), pp. 287-295

Ratto N. et al. 2021. Patient-Specific Modelling of Blood Coagulation. *Nature Public Health Emergency Collection. Bulletin of Mathematical Biology*. 83 (5), pp. 50

Rustem I. L. e Weisel J.W.. 2004. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry*. 112, pp. 267–276

Shetty A.A., Chatterjee A. e Bose S.. 2014. Bilateral multiple recession coverage with platelet-rich fibrin in comparison with amniotic membrane. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 18(1), pp. 102–106

Shivashankar V.Y. et al. 2017. Comparison of the Effect of PRP, PRF and Induced Bleeding in the Revascularization of Teeth with Necrotic Pulp and Open Apex: A Triple Blind Randomized and Clinical Trial. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. 11 (6), ZC34-ZC39

Simonpieri A. et al. 2004. Implantation immédiate post-extractionnelle: l'intérêt du PRF. *Implantodontie*. 13, pp. 177-189

Simonpieri A. et al. 2009. The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin and Metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part I: A New Grafting Protocol. *Implant Dentistry*. 18(2), pp. 102-111

Simonpieri A. et al. 2009. The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF) and Metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft: Part II: Implant surgery, prosthodontics and survival. *Implant Dentistry*. 18(3), pp. 220-229

Tatullo M. et al. 2012. Platelet Rich Fibrin (PRF) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *International Journal of Medical Sciences*. 9(10), pp. 872-80

Wallner B. et al. 2020. Hypothermia-Associated Coagulopathy: A Comparison of Viscoelastic Monitoring, Platelet Function, and Real Time Live Confocal Microscopy at Low Blood Temperatures, an *in vitro* Experimental. Study. *Frontiers in Physiology*. 11, pp. 843

Wolberg A.S. et al. 2004. A Systematic Evaluation of the Effect of Temperature on Coagulation Enzyme Activity and Platelet Function. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 56 (6), pp. 1221-1228

Wu C-L et al. 2012. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal*. 57, pp. 207-212

Zein N. et al. 2019. Polymer-Based Instructive Scaffolds for Endodontic Regeneration. *Material (Basel)*. 12(15), pp. 2347

ANEXOS

Anexo 1

Parecer positivo da Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa



Universidade Fernando Pessoa
www.ufp.pt

Exma. Senhora
Prof. Doutora Sandra Gavinha
Directora da FCS

Nº	Data
FCS/MED – 169/20-2	29 de Janeiro de 2021

Exma. Senhora Prof. Doutora,

A Comissão de Ética, depois de reapreciado o projeto de dissertação de Mestrado em Medicina Dentária, de Cláudia Sofia Pinto e Silva Cardoso, intitulado "Coágulo A+-PRF versus Coágulo A+-PRF com protocolo PomPac: Estudo comparativo do comprimento", considera nada haver a opor à realização do estudo, dado que as questões colocadas no parecer anterior estão esclarecidas. A investigadora garantiu, por escrito, à CE que os participantes não serão convidados/convocados à instituição de propósito para participar no estudo e que cumprirá as directrizes em vigor da DGS.

O anonimato dos dados recolhidos está salvaguardado, tendo sido alterado o consentimento informado, como solicitada a 22 de Dezembro 2020, que será apresentado de forma a não causar constrangimentos aos pacientes, no caso de não quererem participar no estudo. Está, igualmente, assegurado que a intervenção no âmbito desta investigação não coloca em risco o bem-estar do participante, bem como o tratamento previsto para o caso.

Com os melhores cumprimentos.

A Presidente da
Comissão de Ética da UFP

T. Toldy

Teresa Toldy



Fundação Ensino e Cultura "Fernando Pessoa"

UFP, 022 457 622 - Reg. Comércio n.º 36 Conservatória de Registo Comercial do Porto
REITORIA - [Faculdade de Ciências Humanas e Sociais] - [Instituto de Ciências e Tecnologia] Praça 9 de Abril, 343 - 4201-904 Porto - Portugal - T. +351 22 321 1300 - F. +351 22 520 8469 - geral@ufp.pt
[Faculdade de Ciências da Saúde] - [Escola Superior de Saúde] R. Carlos de Matos, 256 - 4100-550 Porto - Portugal - T. +351 22 507 4750 - F. +351 22 507 4637 - R. Belém, 334 - 4100-253 Porto - Portugal
T. +351 22 509 6371 - geral@esps.ufp.pt - [Instituto de Saúde] - Casa da Gardia - R. Conde de Balthazar - 4910-078 Póvoa do Lopo - Portugal - T. +351 236 741 026 - F. +351 236 741 410 - geral@is.ufp.pt

Anexo 2

Consentimento Informado

Colheitas Nº _____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Considerando a "Declaração de Helsínquia" da Associação Médica Mundial

(Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000)

Designação do Estudo:

Este estudo terá como objetivo verificar se a temperatura a que a colheita sanguínea é efetuada no protocolo de A⁺-PRF, interfere no comprimento do coágulo de A⁺-PRF obtido. Para isso serão realizados coágulos de A⁺-PRF provenientes de colheitas sanguíneas à temperatura ambiente sendo estes comparados com coágulos provenientes de colheitas sanguíneas sob o protocolo PomPac. Os coágulos sujeitos a comparação serão provenientes do mesmo dador para garantir as mesmas características sanguíneas.

Eu, abaixo-assinado, _____

compreendi a explicação que me foi fornecida acerca da minha participação na investigação que se tenciona realizar, bem como do estudo em que serei incluído. Foi-me dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias e de todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia, a informação ou explicação que me foi prestada versou os objetivos e os métodos e, se ocorrer uma situação de prática clínica, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo pessoal.

Por isso, consinto que me seja aplicado o método ou o tratamento, se for caso disso, propostos pelo investigador.

Data: ____/____/202__

Assinatura do voluntário: _____

O Investigador responsável: Cláudia Sofia Pinto e Silva Cardoso

Assinatura: _____

Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa

Anexo 3

Certificado da Licenciatura em Enfermagem

2/2



Escola Superior de Enfermagem de Coimbra

CERTIFICADO

---- Susete Maria Lopes de Araújo, Secretária da ESCOLA SUPERIOR DE ENFERMAGEM DE COIMBRA, certifica, em cumprimento do despacho exarado em requerimento que fica arquivado na Secção de Alunos desta Escola, que:

Cláudia Sofia Pinto e Silva Cardoso, natural do Concelho de Lamego, Distrito de Viseu, nascida a 1981-09-15, portadora do Bilhete de Identidade nº 11906293, filha de José Joaquim Ferreira da Silva Cardoso e de Maria Teresa Pinto Ferreira Cardoso, concluiu em 2003-07-14 o curso de Licenciatura em Enfermagem, com a classificação final de 15,00 (Quinze) valores, pelo que lhe é conferido o grau de licenciada em Enfermagem, com a informação final de Bom.

---- O presente certificado é assinado e autenticado com o selo branco desta Escola.


Escola Superior de Enfermagem de Coimbra
Coimbra, em 28 de Outubro de 2008

A Secretária,



(Susete Maria Lopes de Araújo)

Emol. Cert.: 20,00 €

Conferido por:  _____

reira
ra
873 770
dra, 1299
e Gandra
a PRP
009

ESEntC - Mod.99 - Tip. Erel

Anexo 4

Certificado do Curso PRF – Fibrina Rica em Plaquetas – Advanced-PRF e Injectable-PRF por Dr. Joseph Choukroun



FIGURAS

Figura 1

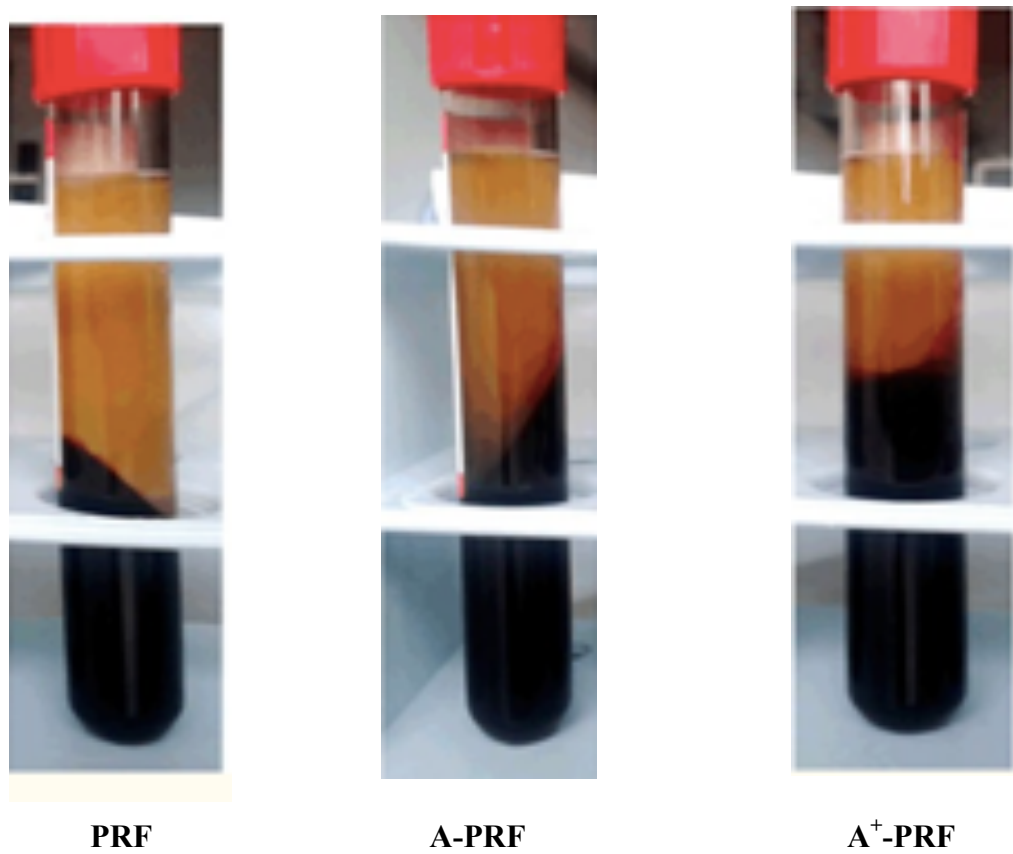
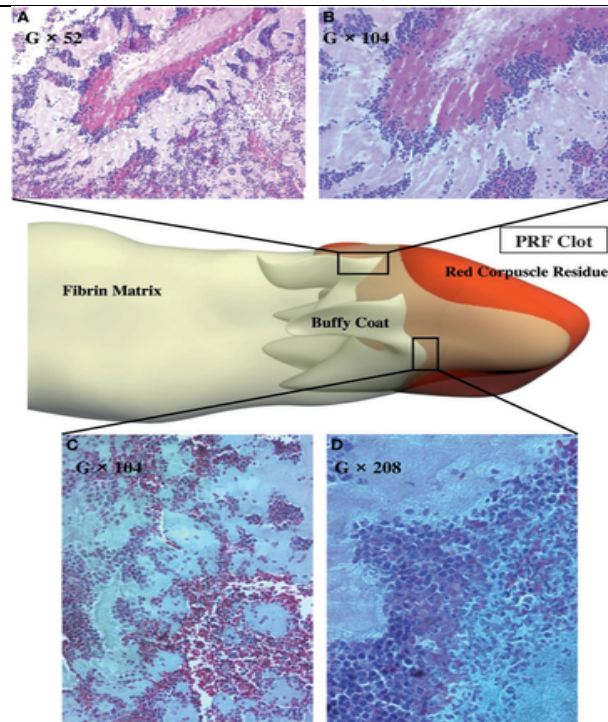
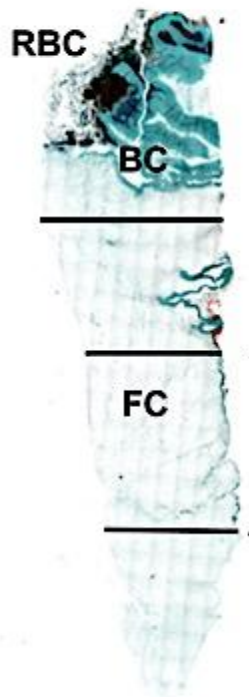


Figura 1. Comparação de biomaterial final disponível entre PRF's (El Bagdadi et al, 2019)

Figura 2



Análise de microscopia de luz dos coágulos PRF. A e B: As colorações de hemalaun e eosina não foram suficientes para distinguir corretamente os vários corpos celulares aprisionados na matriz de fibrina. C e D: Utilizando a coloração com tricrômio de Masson, foi possível separar mais facilmente agregados plaquetários e leucócitos (azul escuro) de hemácias (vermelho). As ampliações (G) são indicadas em cada painel.



Scan total de um coágulo de fibrina ao longo de seu eixo longitudinal (coloração de Masson-Goldner). RBC representa a fração de glóbulos vermelhos; a camada leucocitária (BC) é a zona de transformação entre a fração de hemácias e o coágulo de fibrina, e FC representa o coágulo de fibrina.

Figura 2. Análise de microscopia de luz do coágulo PRF (Dohan Ehrenfest et al, 2010) e Scan total de um coágulo de fibrina ao longo de seu eixo longitudinal (Ghanaati et al, 2014)

Figura 3

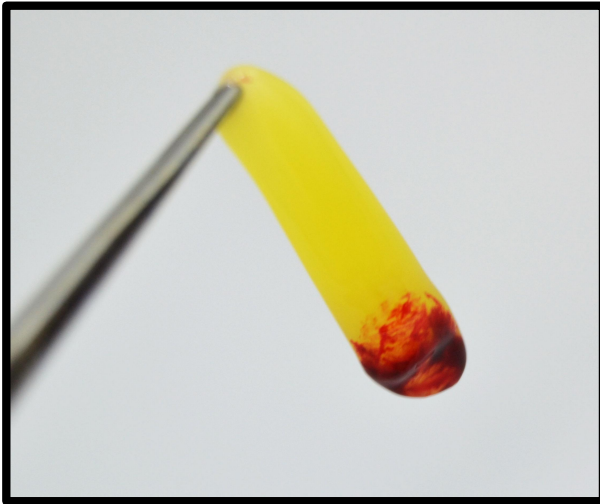


Figura 3A – Coágulo/ “Clot”



Figura 3B – “Plug”

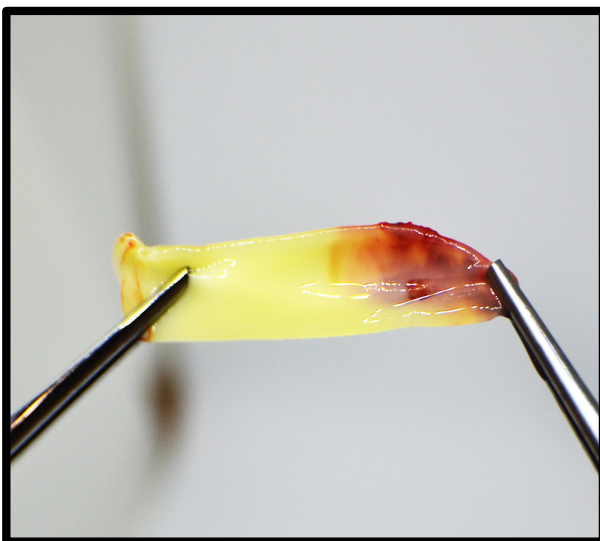
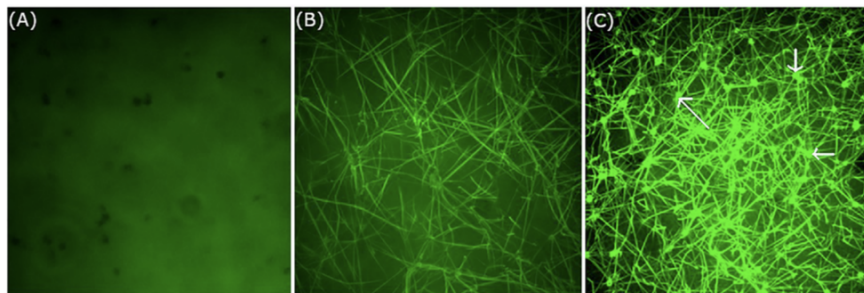


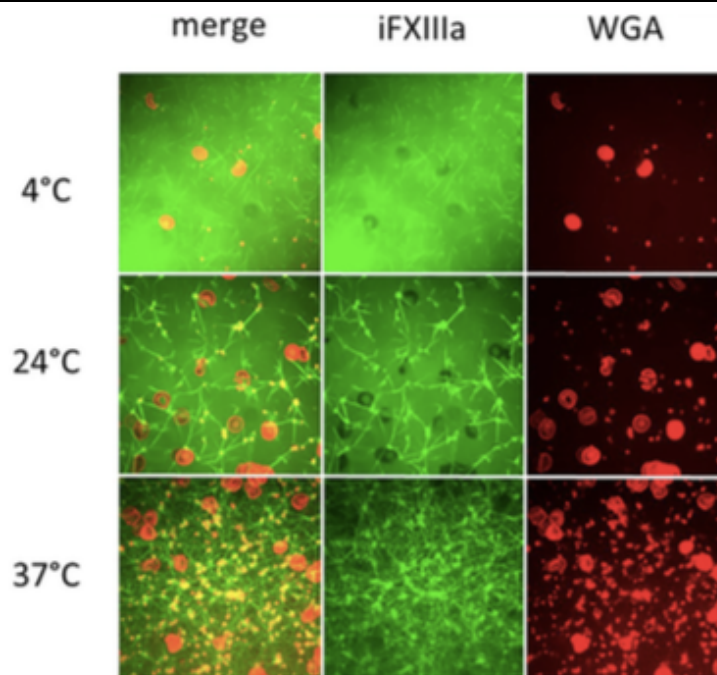
Figura 3C - Membrana

Figura 3. Material obtido do PRF (Imagens de autoria própria)

Figura 4



Observa-se a quase ausência de uma rede de fibrina a 4°C (A) e uma maior densidade de fibrina em condições de 37°C (C) em comparação com a rede de fibrina formada a 24°C (B). Isso também é visível em paralelo no que respeita à atividade.



Influência da temperatura na coagulação e função plaquetária visualizada com imagem confocal ao vivo em tempo real. Fotos representativas de um voluntário saudável em que se visualiza a rede de fibrina (verde), agregados plaquetários (amarelo) e eritrócitos (vermelho) a 4°C (primeira linha), 24°C (linha do meio) e 37°C (linha abaixo). Canal fundido (coluna esquerda), assim como canal iFXIIIa (coluna mediana) e o canal WGA (coluna da direita) são mostrados. Como esperado, a densidade de rede de fibrina aumenta com a temperatura, bem como a atividade plaquetária.

Figura 4. Influência da temperatura na formação da rede de fibrina e atividade plaquetária a 4°C, 24°C e 37°C (Walner et al, 2020)

Figura 5



Figura 5. Colheita de sangue (imagens de autoria própria)

Figura 6



Figura 6. A⁺-PRF com PomPac (imagens de autoria própria)

Figura 7



Figura 7. Centrifugação e obtenção de coágulos (imagens de autoria própria)

TABELAS

Tabela 1

Vantagens	<ul style="list-style-type: none">- É um produto totalmente autólogo;- Minimiza a manipulação do sangue sem manipulação bioquímica;- Não requer trombina bovina, pois a polimerização ocorre naturalmente;- Matriz de fibrina PRF contém fatores de crescimento, leucócitos e citocinas envolvidos no processo de cicatrização;- Mostra liberação prolongada de fatores de crescimento em comparação com outros concentrados de plaquetas;- A membrana PRF possui alta flexibilidade e elasticidade;- É barato e envolve um procedimento simples que requer apenas uma etapa de centrifugação.
Limitações	<ul style="list-style-type: none">- O sucesso da preparação de PRF depende principalmente da velocidade do manuseio do sangue;- A membrana PRF deve ser usada imediatamente, uma vez que a integridade estrutural do PRF modula ao longo do tempo;- O armazenamento da membrana PRF não é possível devido à potencial contaminação bacteriana e desidratação;- Por se tratar de um produto autólogo, a quantidade de PRF é baixa.

Tabela 1. Vantagens e Limitações do PRF (adaptado Pavlovic V et al, 2021)

Tabela 2

Etapas	Procedimentos
1	-Colheita de uma amostra de sangue do paciente num tubo de vidro de 10 ml sem anticoagulantes ou aditivos (A-P)
2	-Centrifugação a 1300 rotações por minuto (rpm) durante 14 minutos (imediatamente após o passo 1). Como resultado do sangue centrifugado, no tubo serão visíveis três porções: a porção superior do tubo é preenchida pela concentração de fibrinogénio (plasma pobre em plaquetas), na porção central o coágulo de A ⁺ -PRF onde estão contidos grande parte das plaquetas e leucócitos e a porção inferior é representada pelos glóbulos vermelhos (Dohan et al, 2006 ^a , 2009, 2010, 2018)
3	-De seguida, retirar os tubos da centrifugadora e coloca-los no suporte estéril A-PRF
4	-Deixar os tubos em repouso durante 5 minutos
5	-Retirar o coágulo de fibrina do tubo com pinça de PRF estéril
6	-Colocar o coágulo na mini-bandeja coberto com uma compressa. Com a tesoura PRF retirar os excessos do coágulo vermelho (este passo é feito para ser possível separar facilmente o coágulo de fibrina dos glóbulos vermelhos)
7	-Colocar o coágulo de fibrina na Box de PRF e cobrir com a bandeja ou tapar com a tampa (mediante o material que iremos utilizar no procedimento cirúrgico: “Clot”, Membrana ou “Plug”). Caso se opte pelo fabrico de membranas, coloca-se a bandeja sobre os coágulos e estas estarão prontas para uso dentro de 3 minutos. -A Box de PRF é utilizada pois ajuda a obter membranas de espessura constante e sempre hidratadas e a mantê-las intactas por duas a três horas. -O exsudado depositado no fundo da box é muito rico em proteínas (Fibronectina e Vitronectina) que é utilizado para ajudar a hidratar biomateriais, lavar os locais cirúrgicos, cavidades e preservar os blocos ósseos autógenos.

Tabela 2. Etapas do Protocolo A⁺-PRF (Adaptado dos protocolos facultados por Dr. Joseph Choukroun em www.a-prf.com)

Tabela 3

Fator de Crescimento	Abreviatura	Vantagens
Fator de crescimento transformador	(TGF- β 1)	-Aumenta a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos; -Estimula a proliferação de osteoblastos com a mesma facilidade com que causa a sua inibição; -Indução de moléculas da matriz, como colagénio I e fibronectina, seja por osteoblastos ou fibroblastos; -Regula a inflamação pela capacidade de induzir a cicatrização fibrosa -Estimula a proliferação celular e remodelação da matriz
Fator de crescimento vascular endotelial	(VEGF)	-Aumenta a permeabilidade vascular; -Principal promotor da angiogénese;
Fator de crescimento derivado de plaquetas	(PDGF)	-Aumenta a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos; -Regula a migração, proliferação e sobrevivência das células mesenquimatosas; -Papel fundamental nos mecanismos de remodelação tecidual e cicatrização fisiológica. -Tem potencial angiogénico e capacidade estimulativa do colagénio e formação de matriz
Fator de crescimento semelhante a insulina 1	(IGF1)	-Regula a proliferação e diferenciação para a maioria das células; -Mediadores de multiplicação celular e eixo principal da regulação da morte celular programada (apoptose)
Fator de crescimento epidérmico	(EGF)	-Estimula a proliferação epitelial e a migração; -Estimula o crescimento e a diferenciação celular
Fator de crescimento fibroblástico	(FGF)	-Estimula a migração de células progenitoras mesenquimais

Tabela 3. Fatores de Crescimento aumentados no A⁺-PRF (adaptado de Dohan et al, 2006; Eming et al, 2007; livro “Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral” de Jan Lindhe)

Tabela 4

Etapas	Procedimentos
1	Os tubos A-PRF, os coletores de sangue e o Pompac deverão estar armazenados no frigorífico a 4°C
2	Quando retirados os tubos do frigorífico estes devem ser colocados imediatamente no Pompac para manter a temperatura a 4°C
3	Na colheita de sangue: retirar o tubo do Pompac para a colheita de sangue e colocar imediatamente no Pompac após finalização da colheita para manter a temperatura
4	No final da colheita de sangue: colocar os tubos na centrífugadora e iniciar a centrifugação
5	Seguir os passos 3, 4, 5, 6 e 7 do Protocolo A ⁺ -PRF (Anexo 2)

Tabela 4. Etapas do Protocolo A⁺-PRF com Pompac (Adaptado dos protocolos facultados por Dr. Joseph Choukroun em www.a-prf.com)

Tabela 5

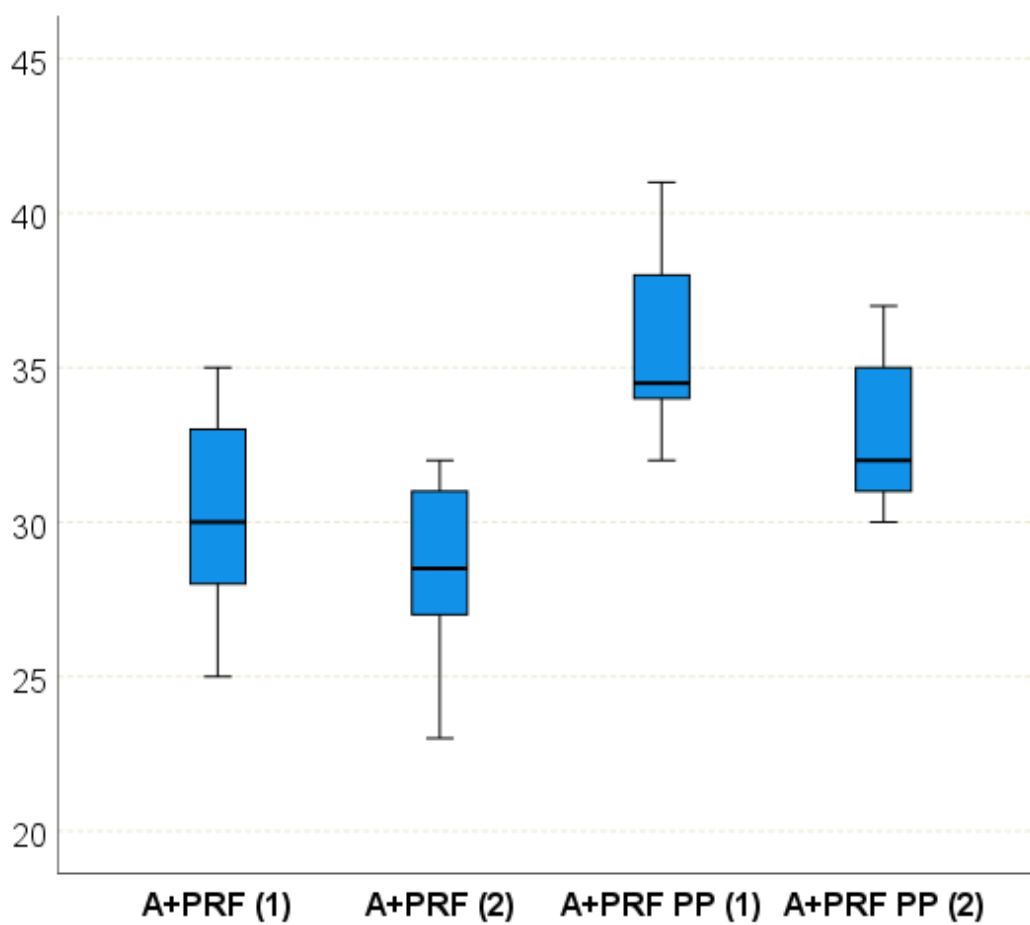


Tabela 5. Resultados relativos ao comprimento (mm) das duas réplicas dos coágulos analisados pelo protocolo A⁺-PRF e A⁺-PRF PomPac (n=10 pacientes)

Tabela 6

<i>Comprimento do coágulo (mm)</i>	<i>A⁺-PRF (n=20)</i>					<i>A⁺-PRF PomPac (n=20)</i>				
	<i>Média</i>	<i>± Desvio Padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Média</i>	<i>± Desvio Padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
	29,10	± 3,28	29	23.00	35.00	34,35	± 3,07	34	30.00	41.00

Tabela 6. Resultados relativos ao comprimento dos coágulos (A⁺-PRF e A⁺-PRF PomPac)

Tabela 7

	<i>Diferença de médias</i>	<i>T</i>	<i>P</i>
<i>A⁺-PRF & A⁺-PRF PomPac</i>			
	-5,25	-12,43	<0,001

Tabela 7. Diferença de médias entre o protocolo A⁺-PRF e A⁺PRF-PomPac (Teste t para grupos emparelhados)