

Universidade de Brasília

PROADI-SUS

Seminário Internacional Sobre o Uso e a Regulação do Plasma Rico em Plaquetas

Leonel Alves de Oliveira

Professor de Morfologia Médica - Faculdade de Medicina - UNB

Mestre em Bioquímica - UNB

Doutorando em Morfologia - Ciências Médicas - UNB

Assessor Técnico do Conselho Federal de Odontologia para assuntos relacionados ao sangue, células, tecidos e órgãos



**HOSPITAL
SÍRIO-LIBANÊS**

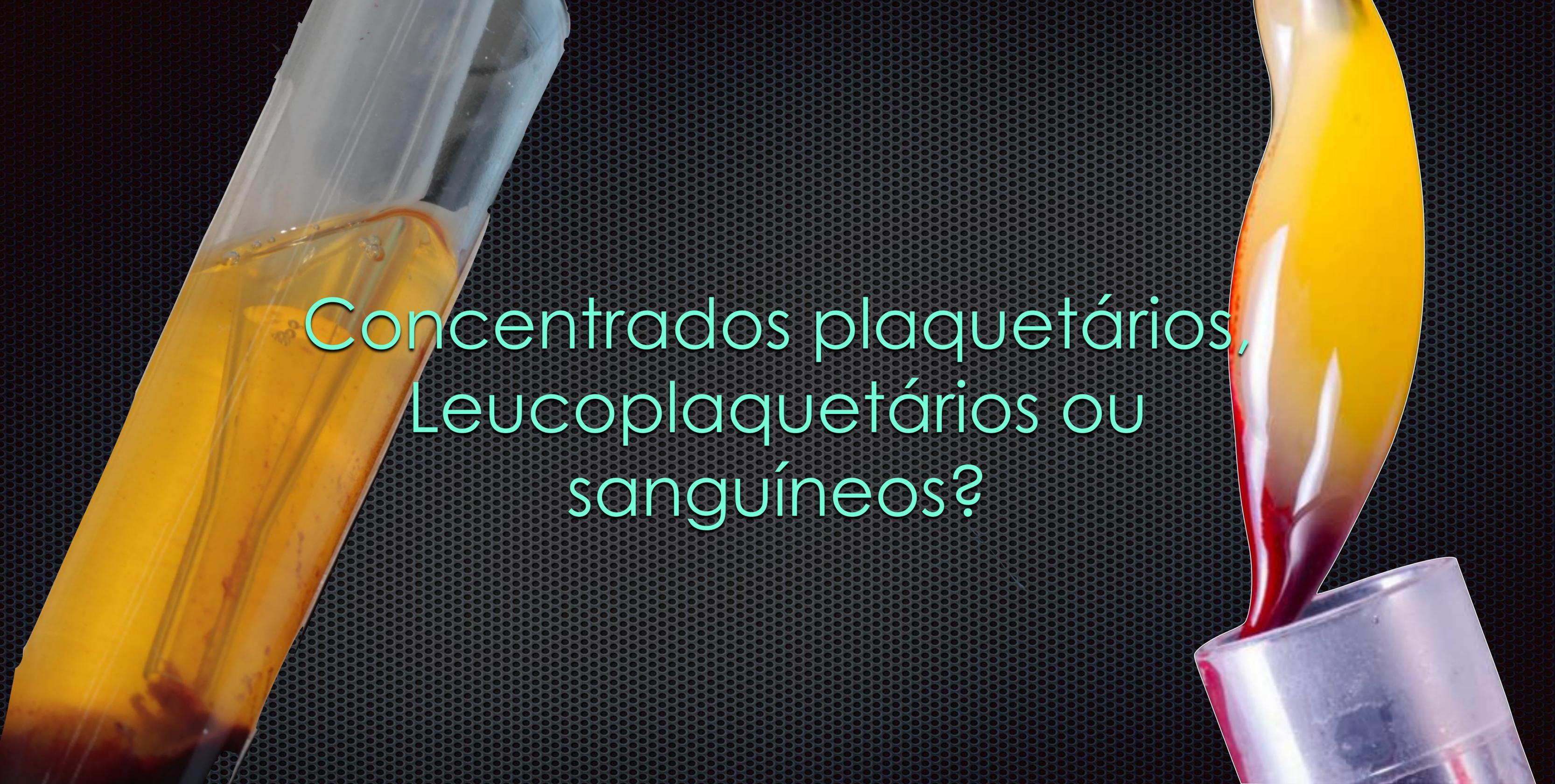


**MINISTÉRIO
DA SAÚDE**

**GOVERNO
FEDERAL**

Plasma Rico em Plaquetas, PRP. Aplicações Terapêuticas e Evoluções Metodológicas no âmbito da odontologia (L-PRF).

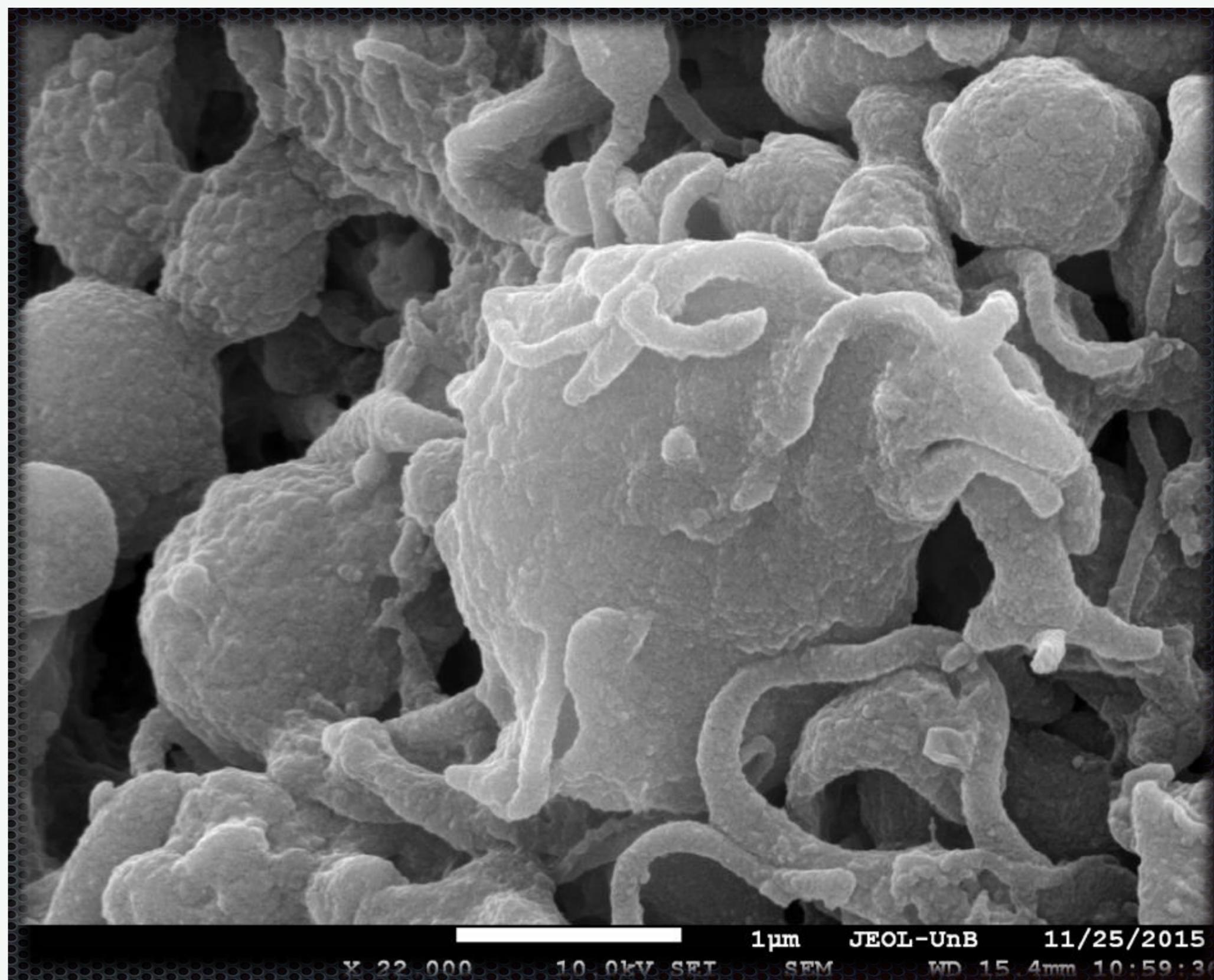
Prof. Leonel Oliveira, DDS, MSc

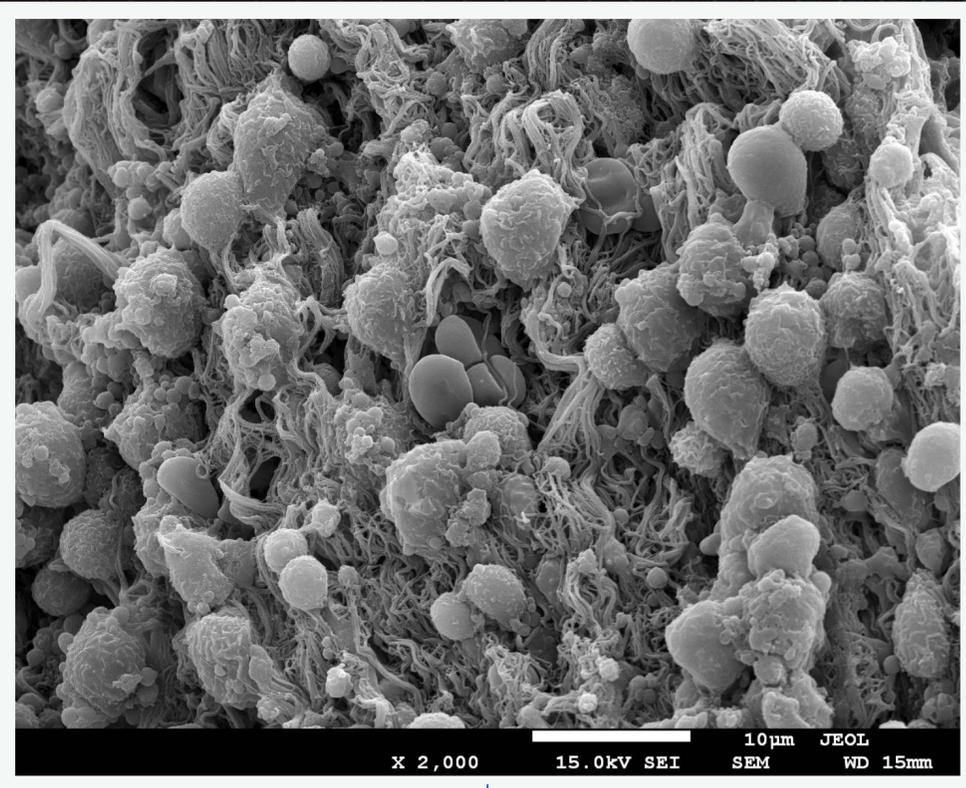


Concentrados plaquetários, Leucoplaquetários ou sanguíneos?

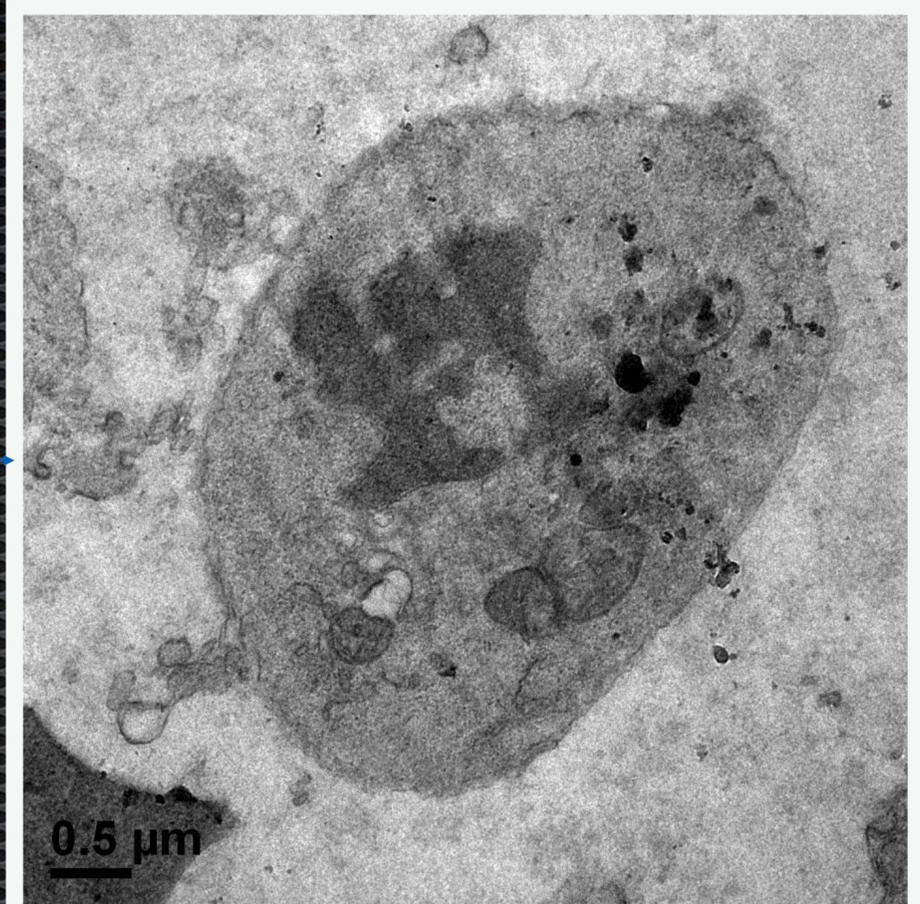
Plaquetas ativadas

Microscopia
Eletrônica de
Varredura

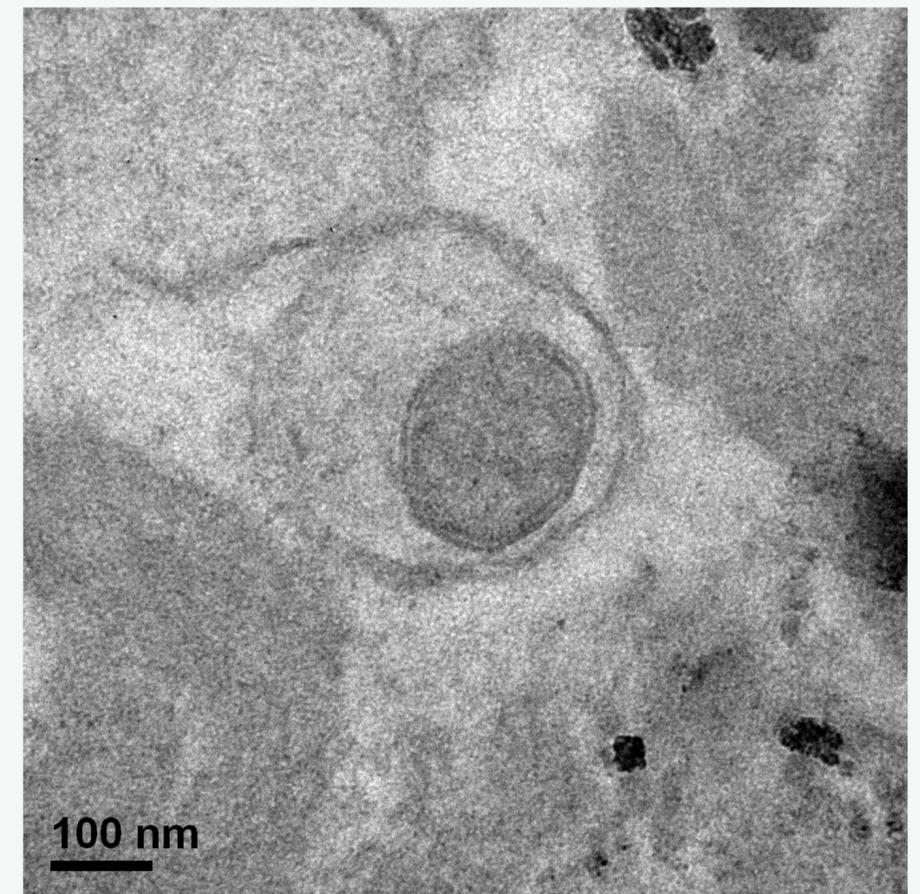
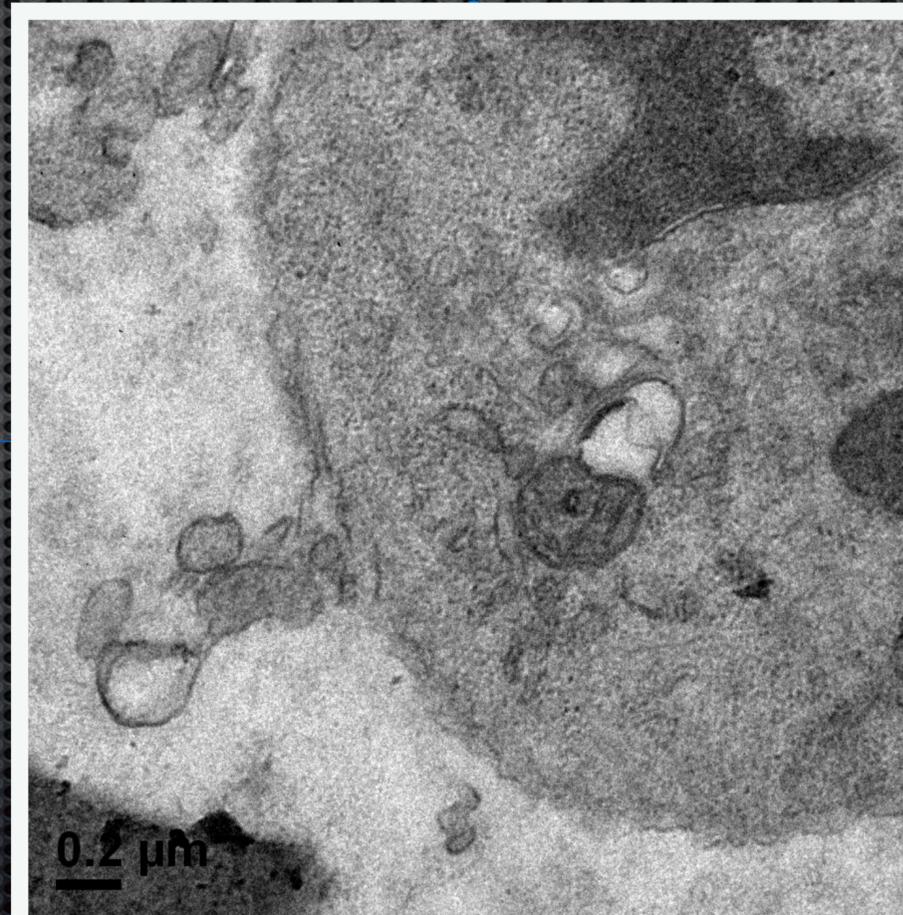




Microscopia de transmissão



Grânulos
Fatores de
Crescimento
Moléculas de
adesão



Leonel Oliveira,
MSc

Apenas as plaquetas e seus exossomos possuem função no reparo tecidual?

Não!

Leucócitos e demais elementos do plasma também!

Fatores de
Crescimento

Mononucleares

Concentrados plaquetários, Leucoplaquetários ou sanguíneos?

Glicoproteínas

PRP

L-PRF

Plaquetas

Sangue total

Scaffold

PRP - Platelet Rich Plasma
(1ª Geração)

L-PRF - Leukocyte - Platelet Rich Fibrin
(2ª Geração)

Evolução Metodológica

- 1950 Matras e Cols
- 1970 Colas de Fibrina
- 1990 PRP
- 2000 L-PRF



70's

Auto
"hemotransplante"
Tratamento de
alveolites com
sangue periférico
total



Prof. Dr. Clóvis Marzola

Platelet Rich
Plasma

Um adjuvante
terapêutico no
reparo tecidual

Um
agregado
plaquetário
por conceito
e
aplicabilidade

Um produto de
origem autóloga
para uso
exclusivamente
não-transfusional

Plasma Rico em Plaquetas

Obtido por
Anticoagulação
química*

Transferência de
sobrenadante em
sistema aberta*

Sistema de dupla
centrifugação*

Obtido por
processamento
mínimo

Obtido em
dispositivos IVD*

Ativação
plaquetária
química*

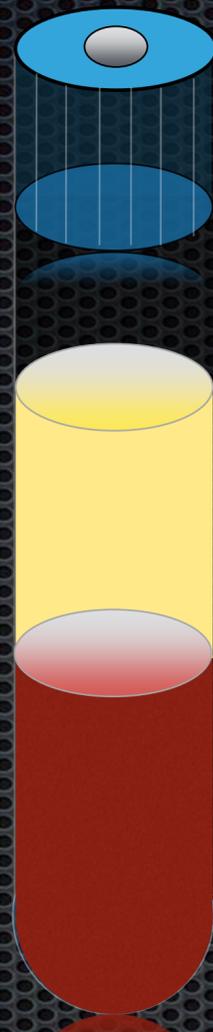
PRP: Method

1. Blood collection and anticoagulant



Total Blood

2. 1nd Spin



Blood Fractions

Plasma 55%

Buffy Coat 1%

Eritrocytes 44%

3. Open Transfer



Total Plasma

4. 2nd Spin



Platelet Poor Plasma

Platelet Rich Plasma

5. Activation



Sistemas Aberto e Fechado

Platelets Concentrates Classification

REVIEW | VOLUME 27, ISSUE 3, P158-167, MARCH 01, 2009



Purchase



Subscribe

Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)

David M. Dohan Ehrenfest  • Lars Rasmusson • Tomas Albrektsson

Published: February 02, 2009 • DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>



Platelets Concentrates Classification

PRP PRP_{pur}

L-PRP

PRF PRF_{pur}

L-PRF

Table 2. Characteristics and classification of the main platelet concentrates protocols available

PC class	Method (and relevant Refs)		Main characteristics									
			A: Process				B: Content				C: Fibrin	
			A1: Centrifuge type	A2: Duration	A3: Cost	A4: Ergonomy	B1: Volume	B2: Platelet collection	B3: Leucocyte collection	B4: Preservation	C1: Density	C2: Polymerization
P-PRP	AP	Cell separator PRP [8]	Heavy	Very long	Expensive	--	Small	Excellent	No leucocytes	Damaged	Low	Weak
		Vivostat PRF [9]	Heavy	Long	Expensive	+	Small	Low	No leucocytes	Damaged	Low	Weak
	MP	Anitua's PRGF [10-14] Nahita PRP [15]	Heavy but potentially light	Long	Inexpensive	-	Variable	Low	No leucocytes	Unknown	Low	Weak
L-PRP	AP	PCCS PRP [9,14] SmartPReP PRP [9,16,18] Magellan PRP [19] GPS PRP [20]	Heavy	Long	Expensive	+	Variable	Good	Good	Unknown	Low	Weak
		MP	Friadent PRP [16] Curasan PRP [8] Regen PRP Plateltex PRP [17] Ace PRP [15]	Heavy but potentially light	Long	Expensive	-	Variable	Good	Good	Unknown	Low
P-PRF	MP	Fibrinet PRFM [9]	Heavy but potentially light	Long	Expensive	+	Large	Good	No leucocytes	Healthy, activated	High	Strong
L-PRF	MP	Choukroun's PRF [21-30]	Light	Quick	Very inexpensive	++	Large	Excellent	Good	Healthy, activated	High	Strong

Abbreviations: AP, automated protocols; MP, manual protocols, PC, platelet concentrate.

Dohan et al, 2009

Leukocyte and Platelet Rich Fibrin

Um agregado leucoplaquetário por conceito e aplicabilidade

Um produto de origem autóloga para uso exclusivamente não-transfusional

Um adjuvante terapêutico no reparo tecidual

Obtida por processamento mínimo

Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos

Única centrifugação de baixa rotação

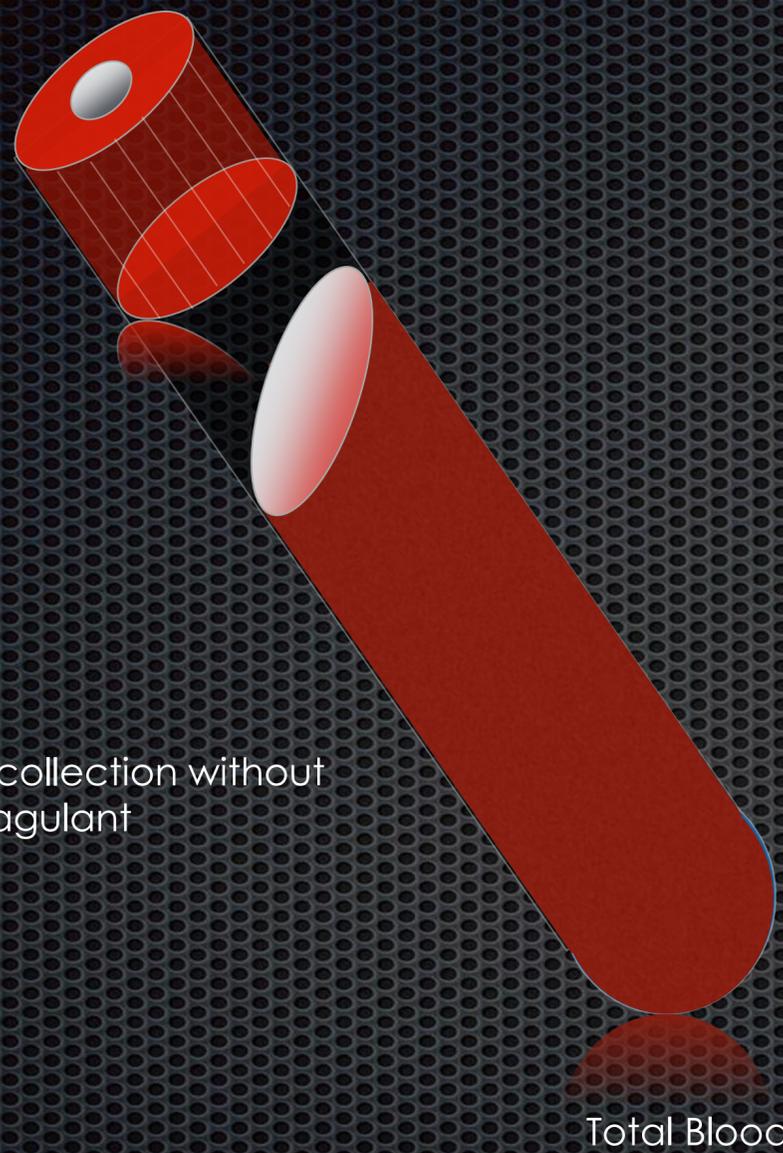
100% em sistema fechado

Sem intervenção na cascata da coagulação

Obtida em dispositivos IVD*

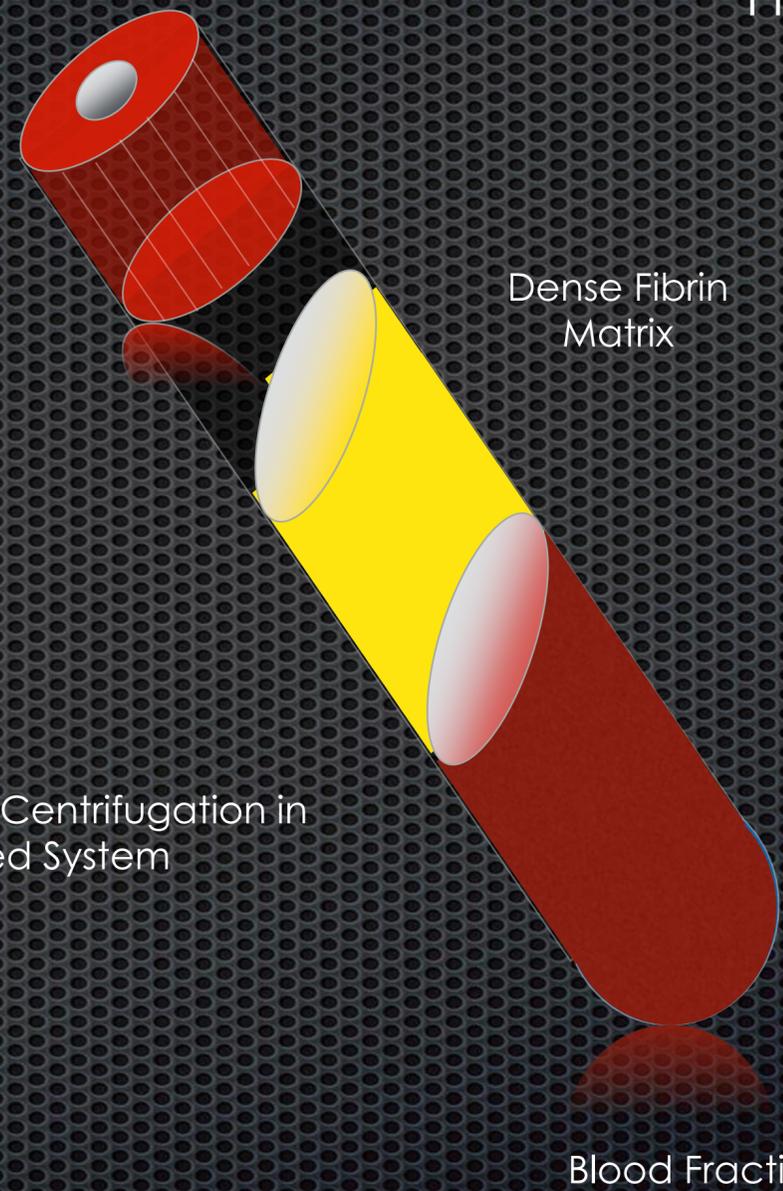
L-PRF: Method

1. Vacum blood collection without anticoagulant



Total Blood

2. One step Centrifugation in Closed System



Dense Fibrin Matrix

Autologous Leuko-platelet Fibrin Matrix

Blood Fractions



Distinções Metodológicas

PRP

- Técnica aberta e fechada
- Biossegurança
- IVD
- Ativadores xenógenos
- Aproveitamento mínimo do conteúdo sanguíneo (1/5mL)

L-PRF

- Técnica fechada
- IVD e MD* (CE, FDA)
- Ativação tixotrópica fator XII (contato)
- Aproveitamento racionalizado do volume sanguíneo coletado (2,25/5mL)

Fragilidades Sanitárias

- Normas técnicas sanitárias adequadas ao manuseio, aplicação terapêutica, descarte e classificação sanitária de equipamentos e insumos;
- Adequação
- Construção normativa de acordo com experiências internacionais;
- Exequibilidade

Itália

*Ministerial Decree of November 02 - 2015. published in the official gazette December 28 - 2015 - N '300. N'69 ordinary supplement

Fundamentos biológicos para o emprego clínico

- Contém dois elementos do tripé da engenharia tecidual (Scaffold e Fatores de crescimento);
- Possui concentrações suprafisiológicas de fatores de crescimento indutores do reparo (TGFb, PDGF, VEGF, FEGb...);
- Ancora células migratórias de áreas adjacentes ao leito cirúrgico;
- Aumenta a angiogênese local;
- Reduz a sintomatologia da fase aguda e torna precoce alguns elementos das fases crônica e proliferativa do reparo.

Expectativas Terapêuticas com PRP/L-PRF

- Reparo tecidual
- Aceleração
- Neoformação óssea
 - Maior Densidade
 - Precocidade
 - Angiogênese
- Tecidos Moles
 - Precocidade no fechamento da ferida cirúrgica
- Substituição ao enxerto de tecido conjuntivo

Aplicações Clínicas no âmbito da odontologia

- Cobertura de leitos cirúrgicos;
- Proteção de área doadora de enxerto de tecido conjuntivo;
- Hemostasia tópica trans e pós-cirúrgica;
- Estabilização de enxertos ósseos;
- Viscosuplementação e indução de regeneração cartilaginosa em ATM;
- Revascularização endodôntico;
- Indução Intradérmica da síntese de colágeno;

É um meio
promotor da
migração e
diferença celular

Cirurgia Oral

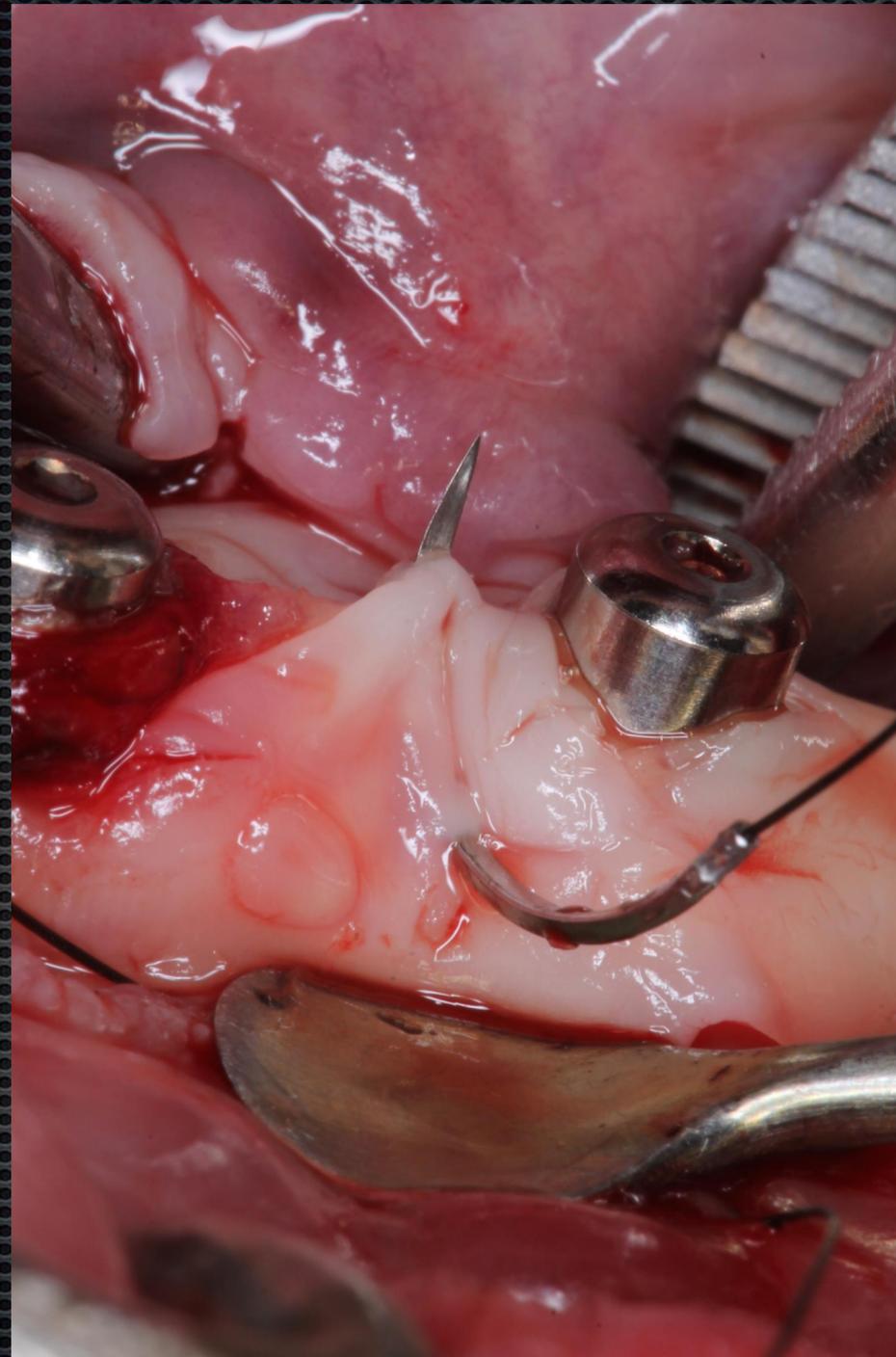
É um potente
adjuvante
cirúrgico



Facilita o fechamento mecânico e biológico da ferida cirúrgica

Possui resistência mecânica sutura

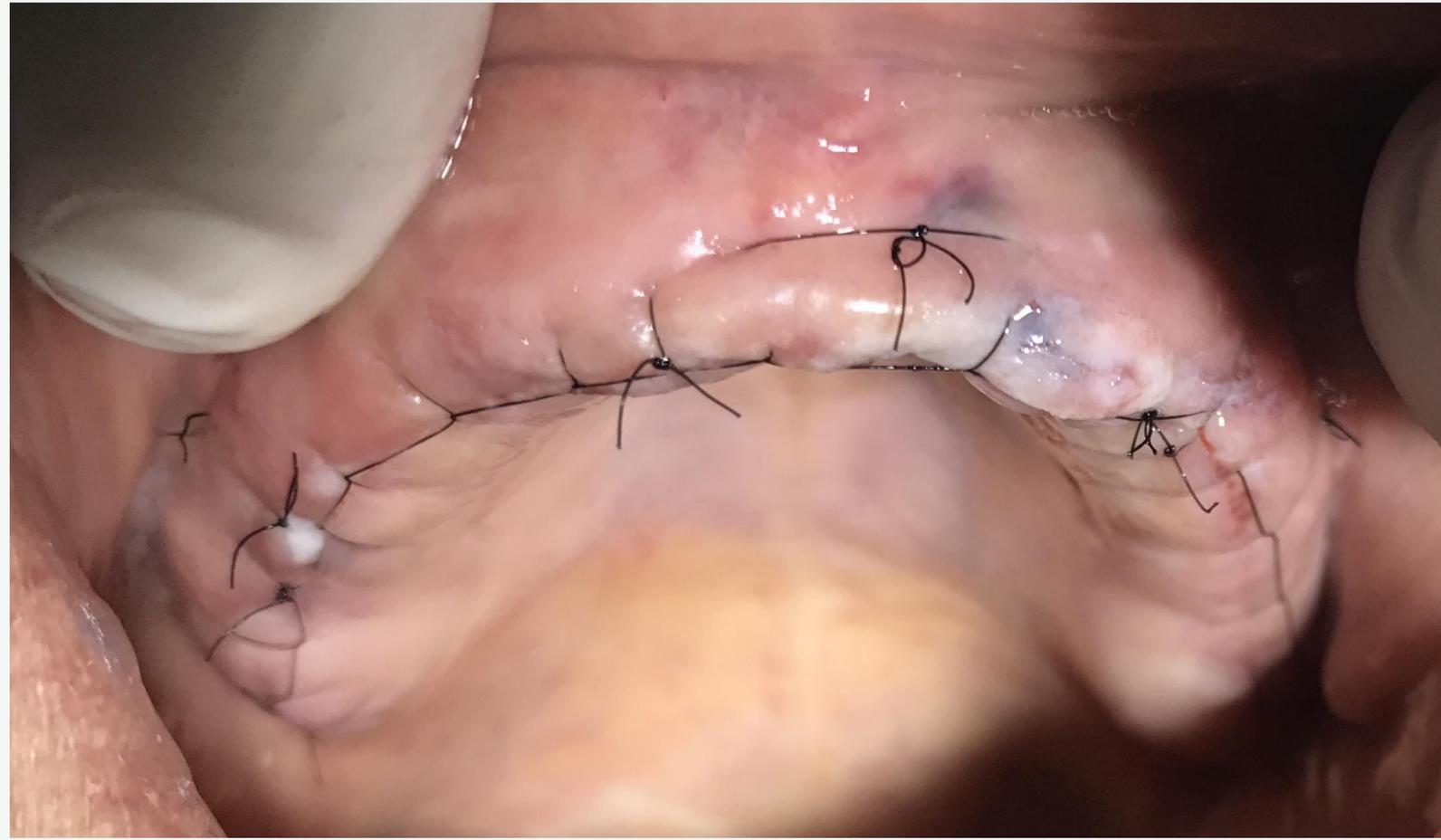
Atua como poderoso hemostático tópico



É um meio mimético a uma autêntica matriz extracelular

Promove espaço e estabilidade em enxertos ósseos

Estimula a atividade dos fibroblastos com precocidade



24 horas de pós-operatório



24 horas de pós-operatório

Prof. Leonel Oliveira

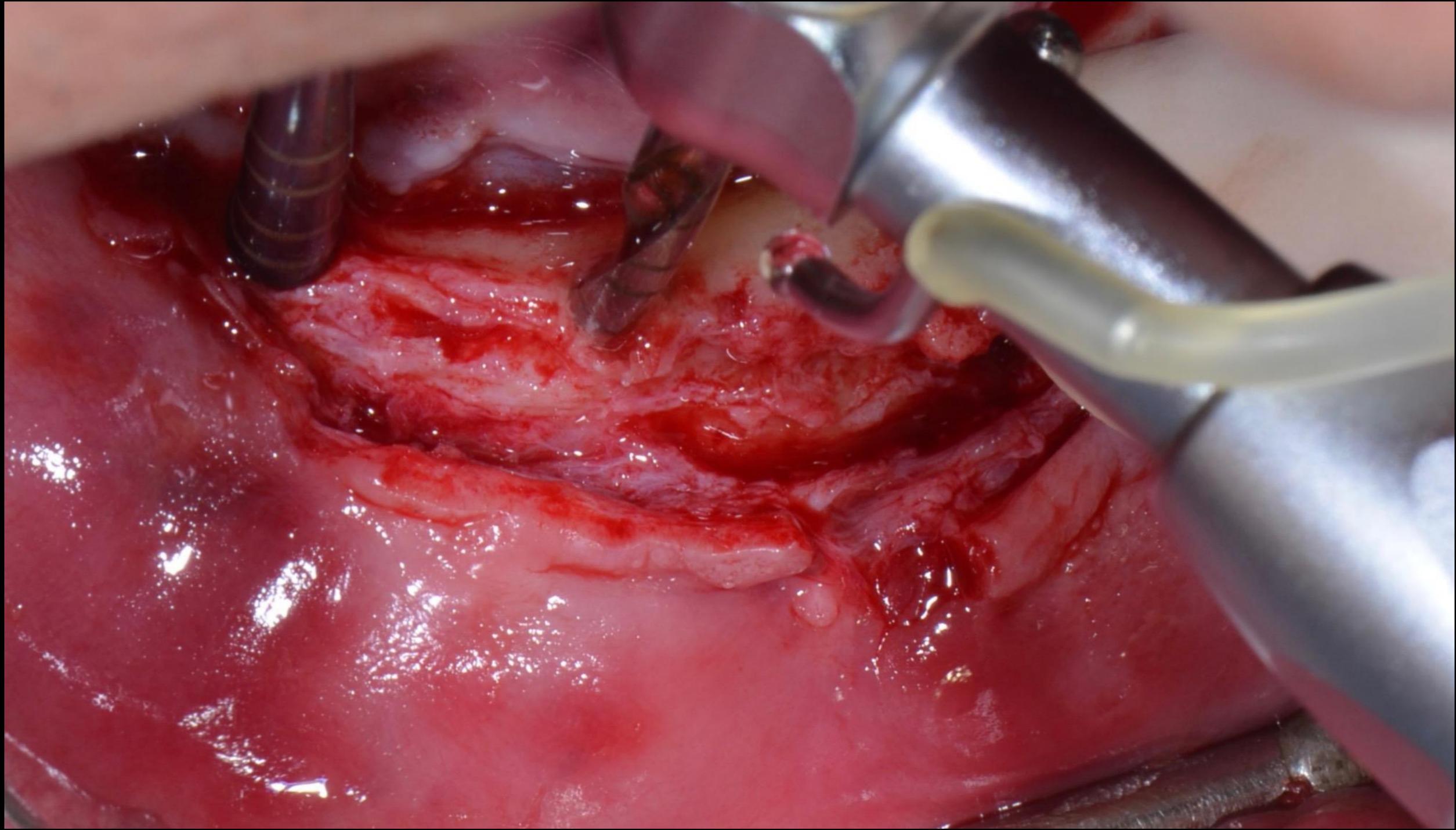


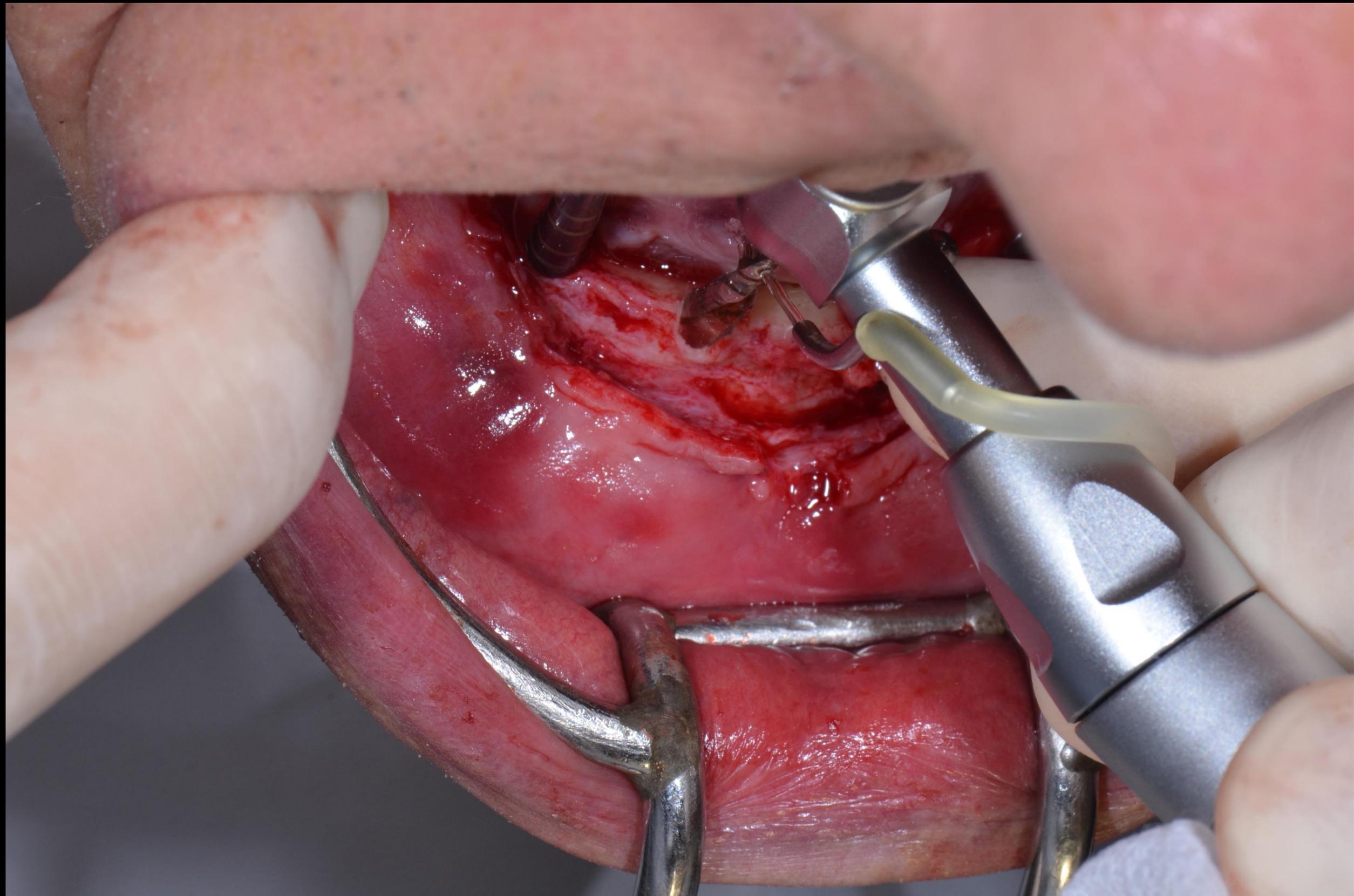
Dr Leonel Oliveira

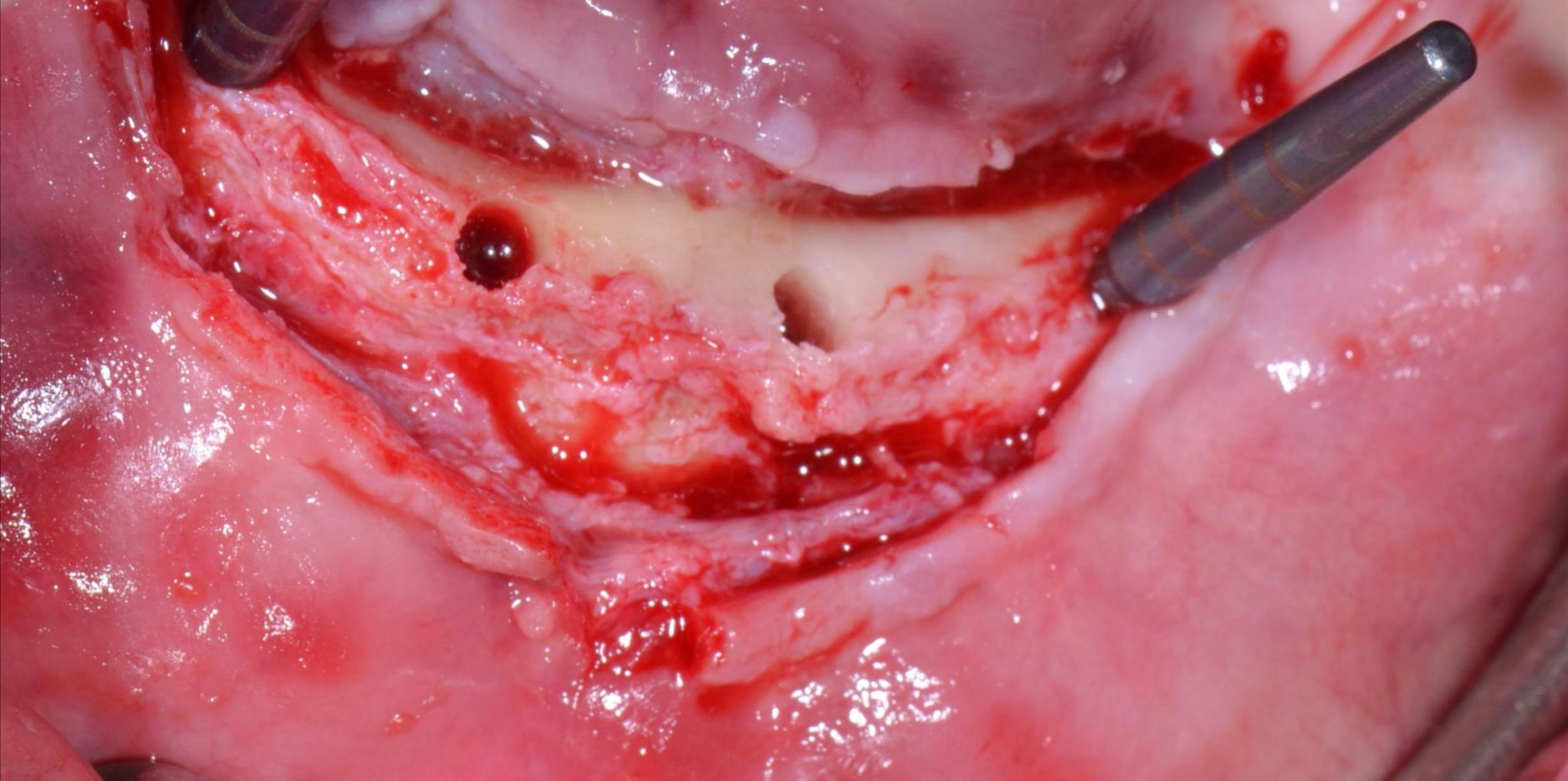
Dr Marcelo Januzzi

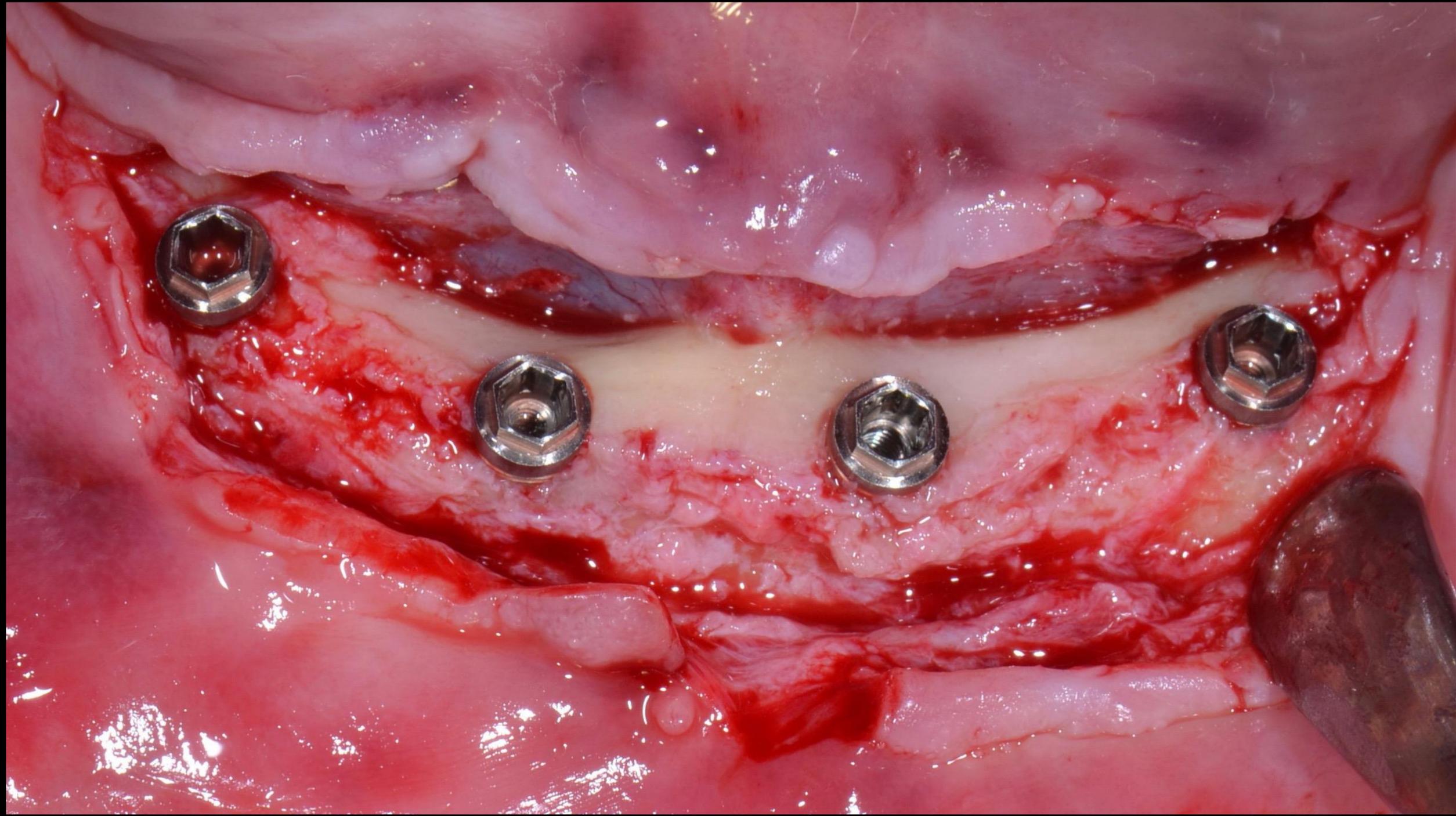
Dr Sérgio Abraham

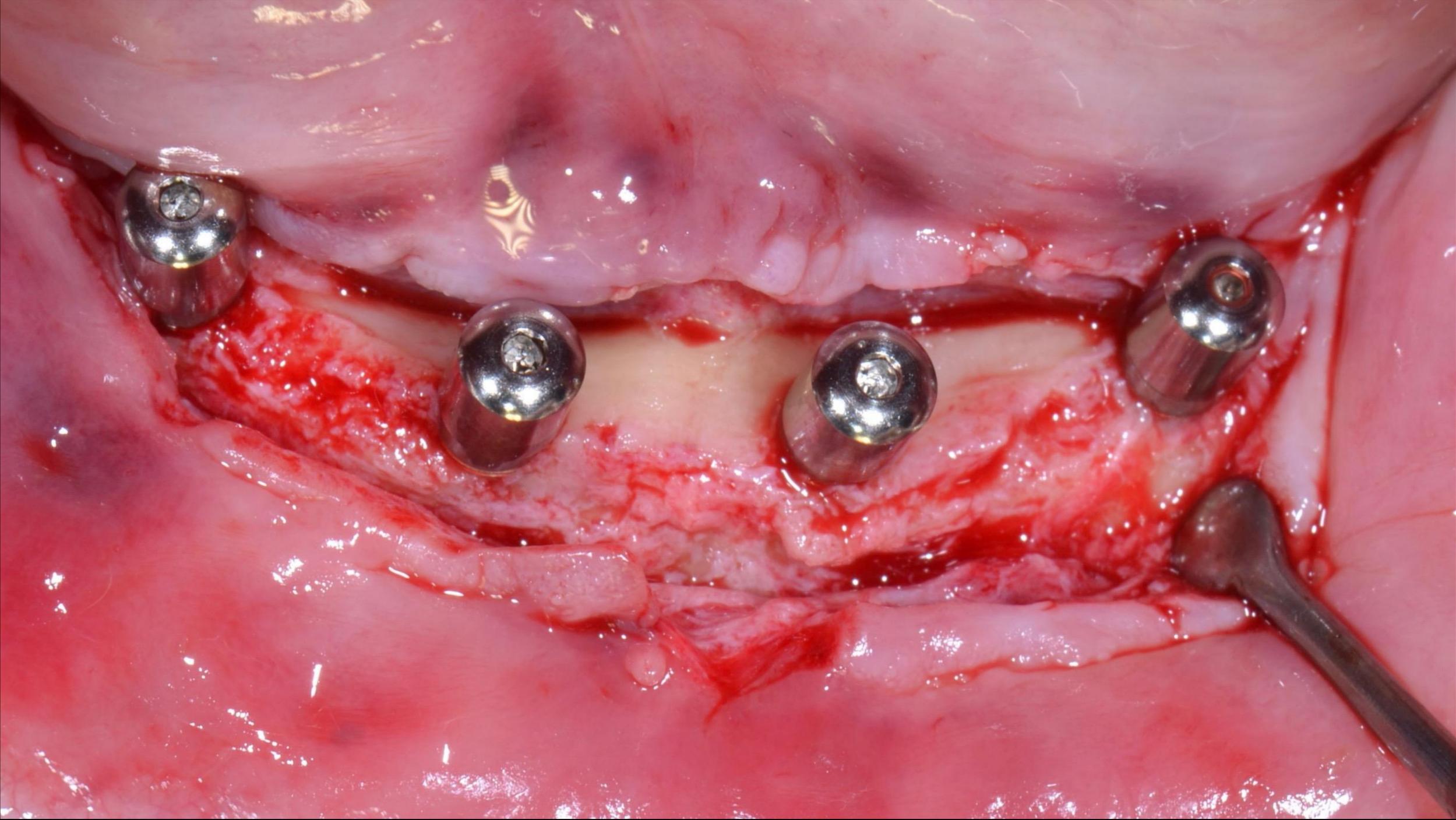




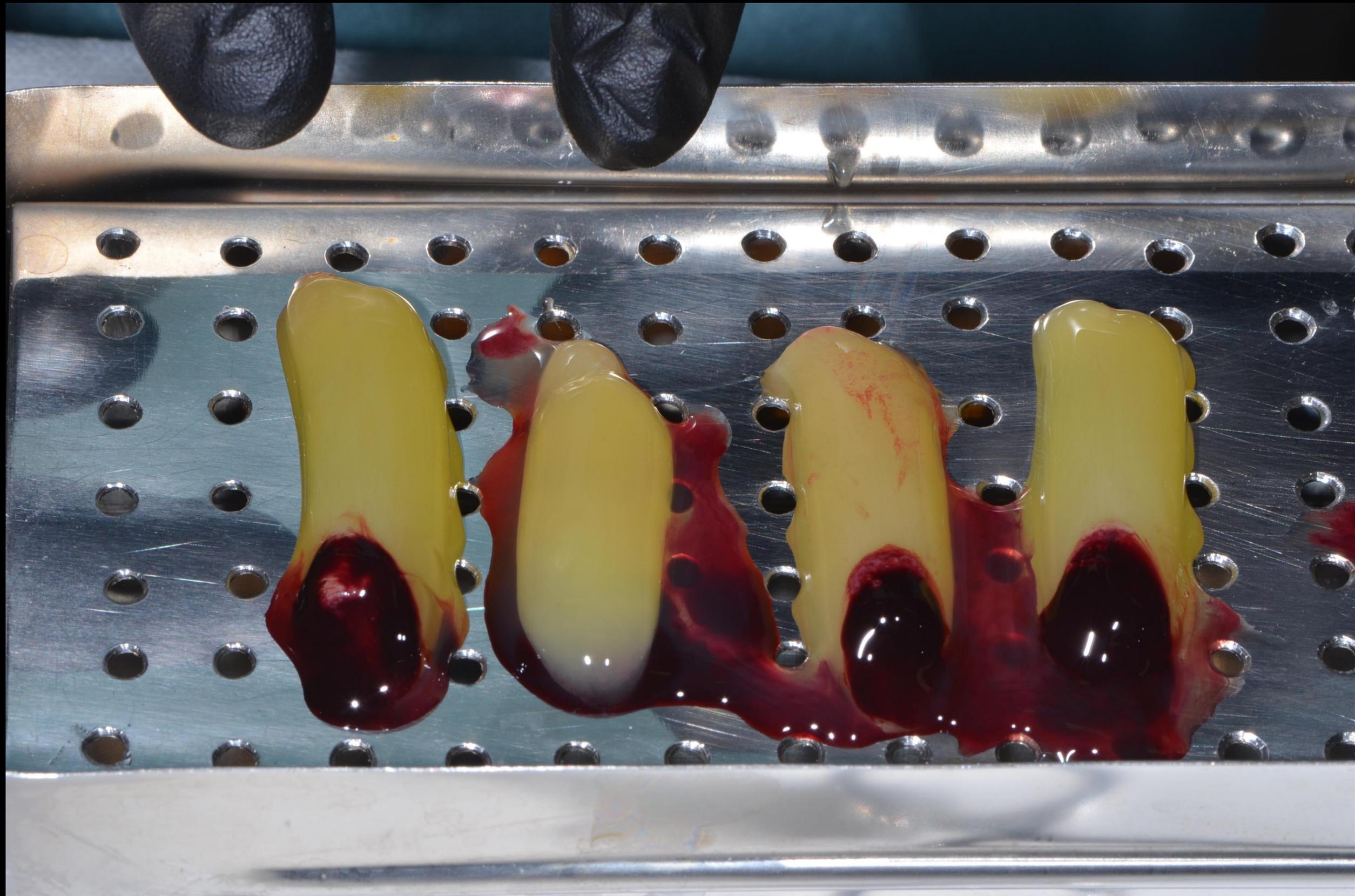




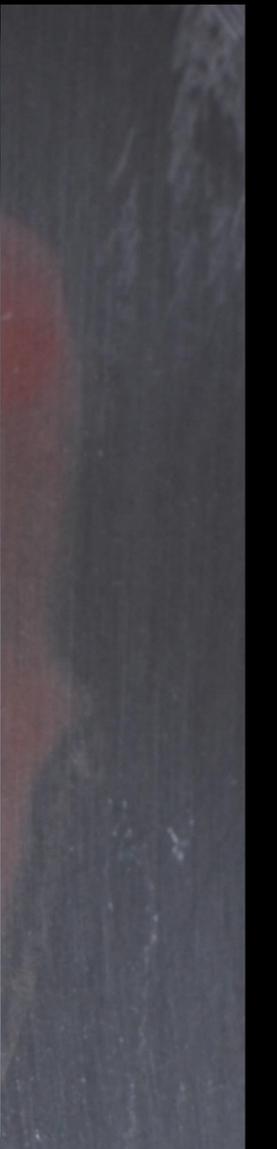
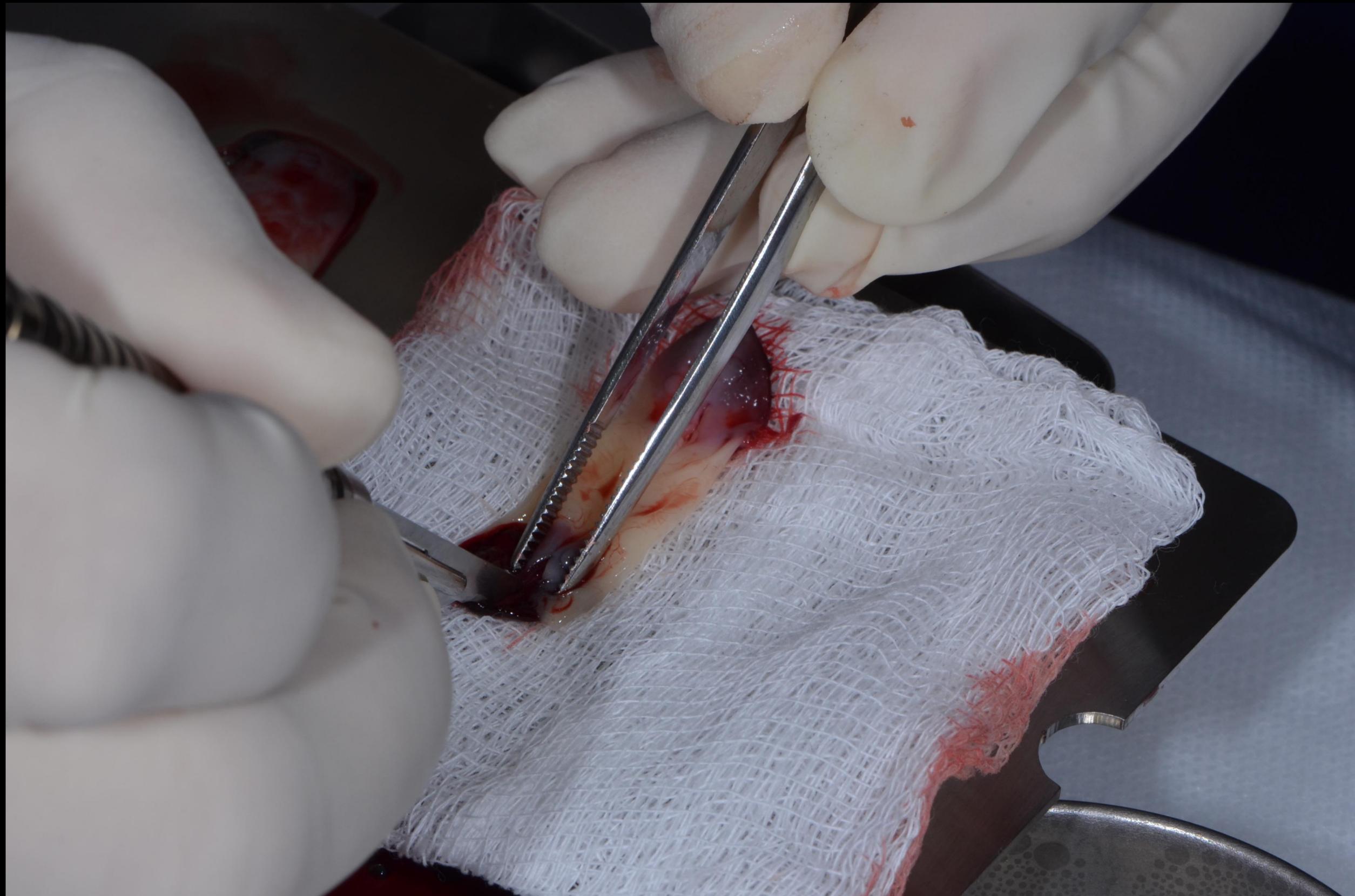


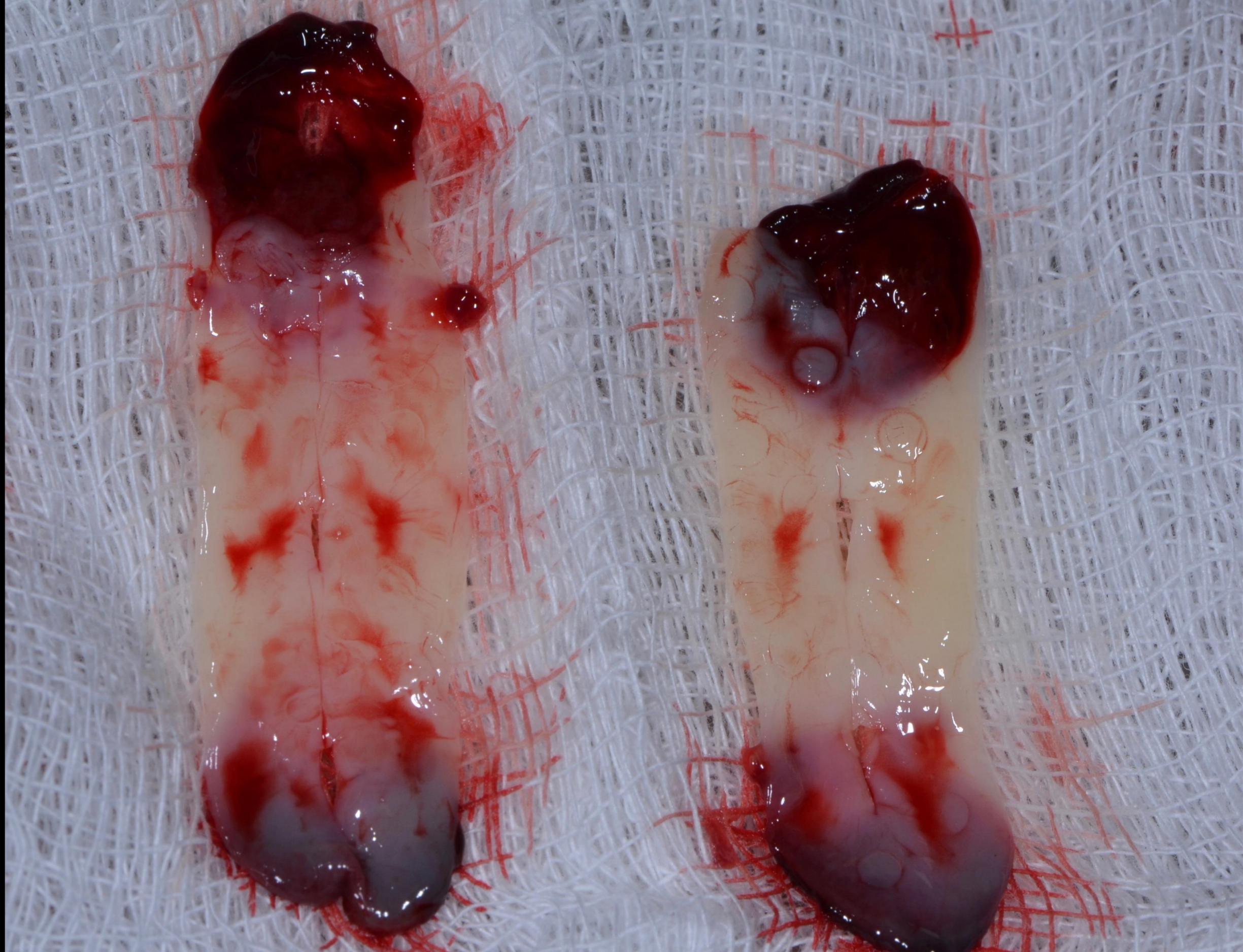






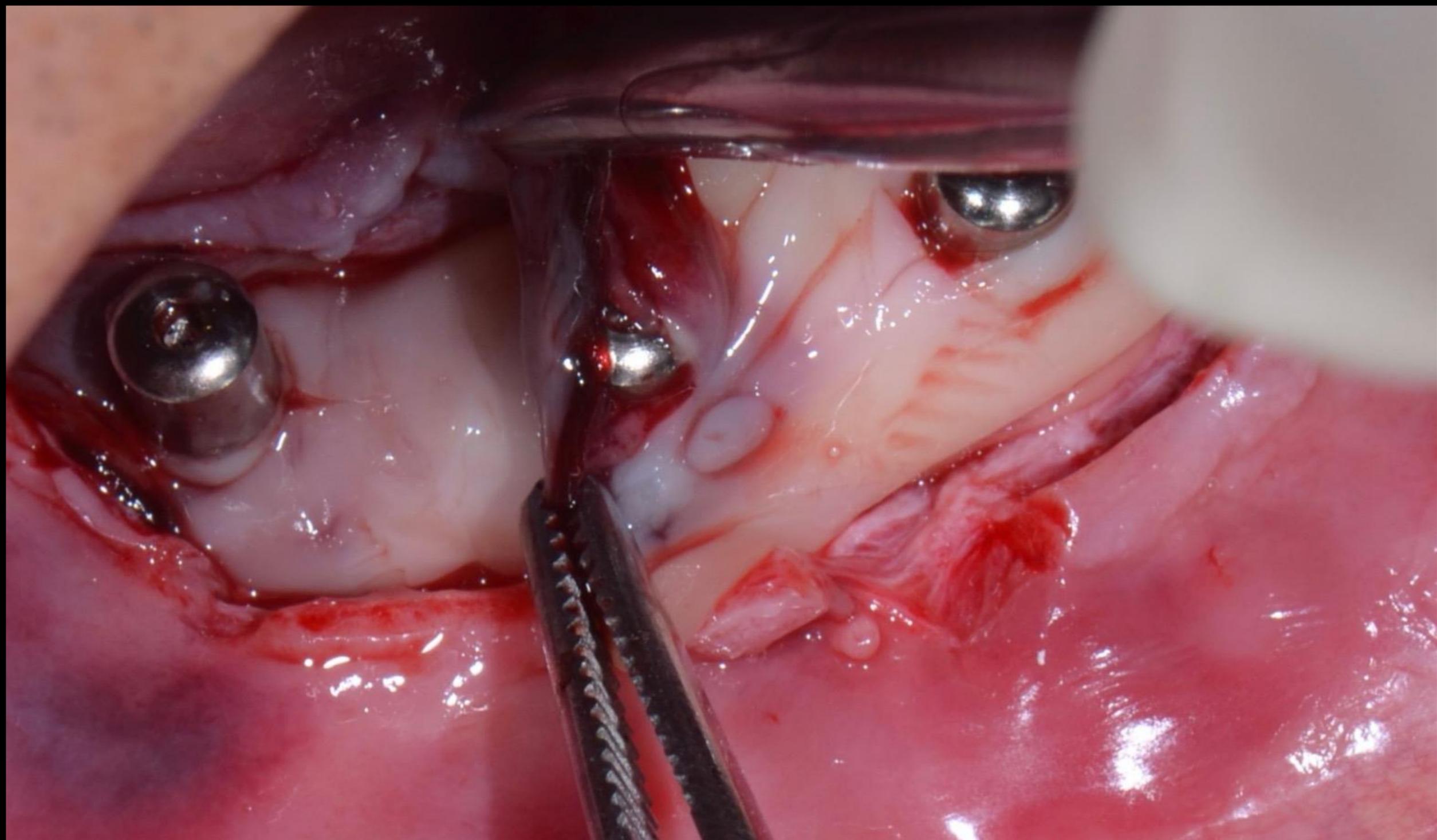


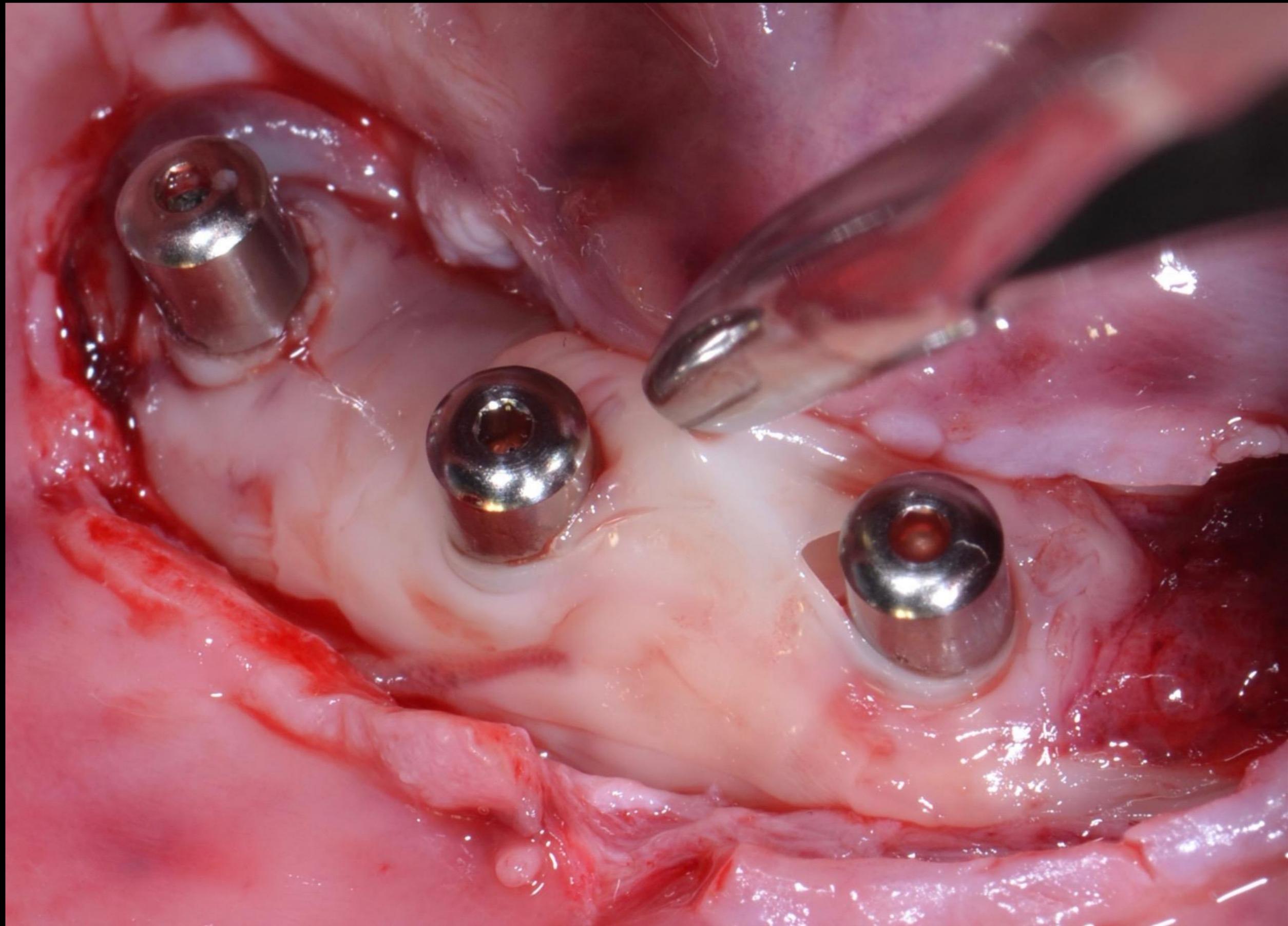


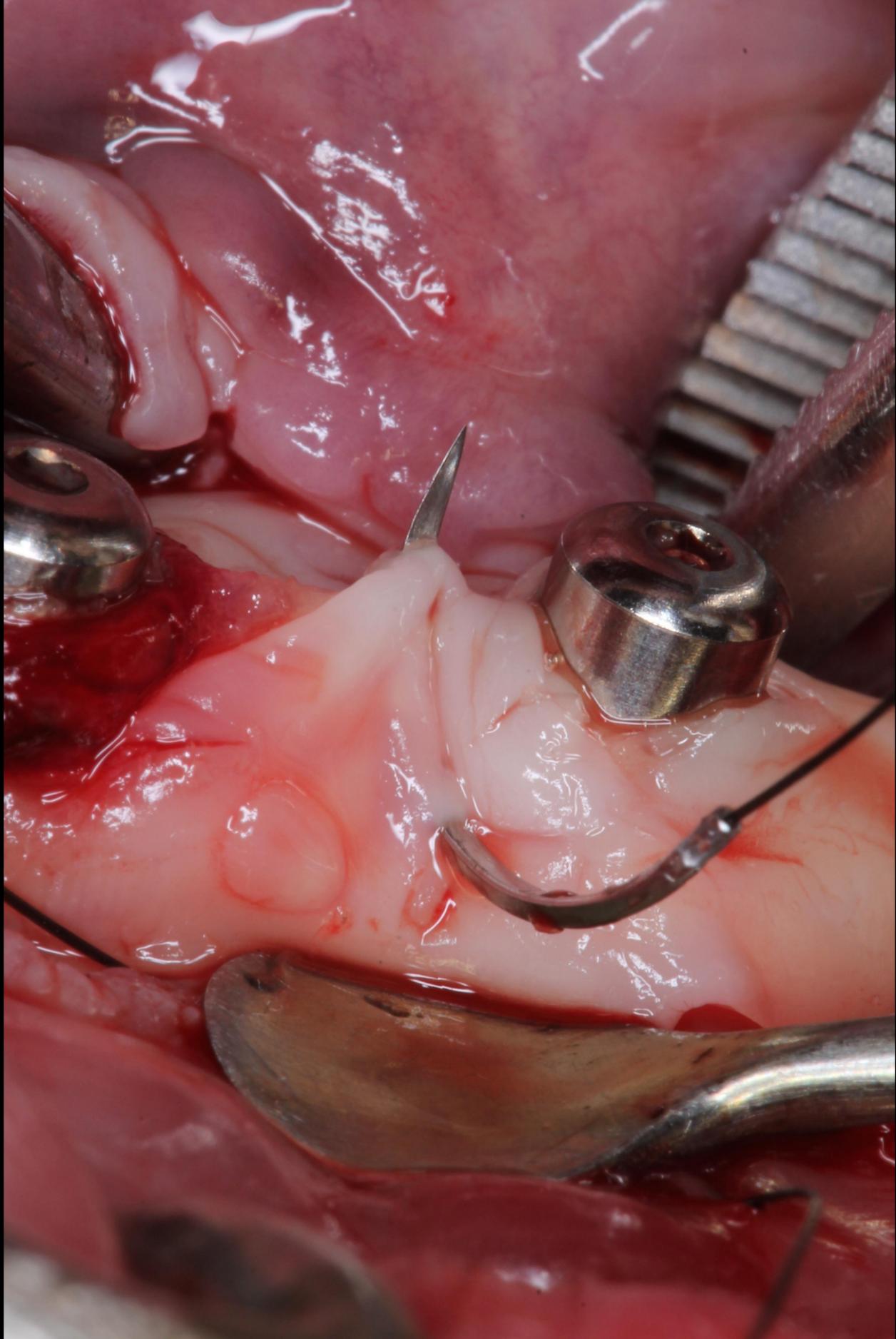


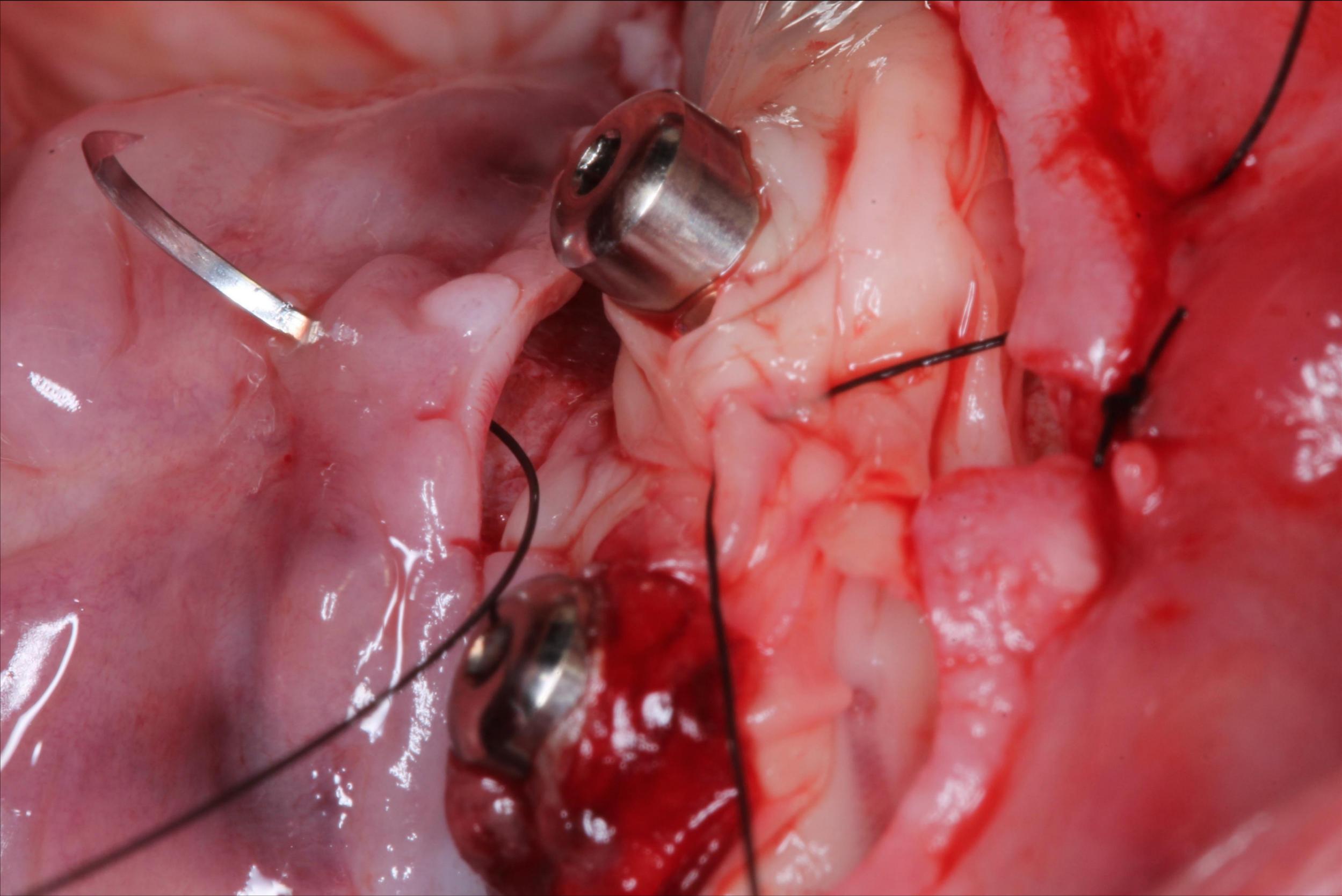


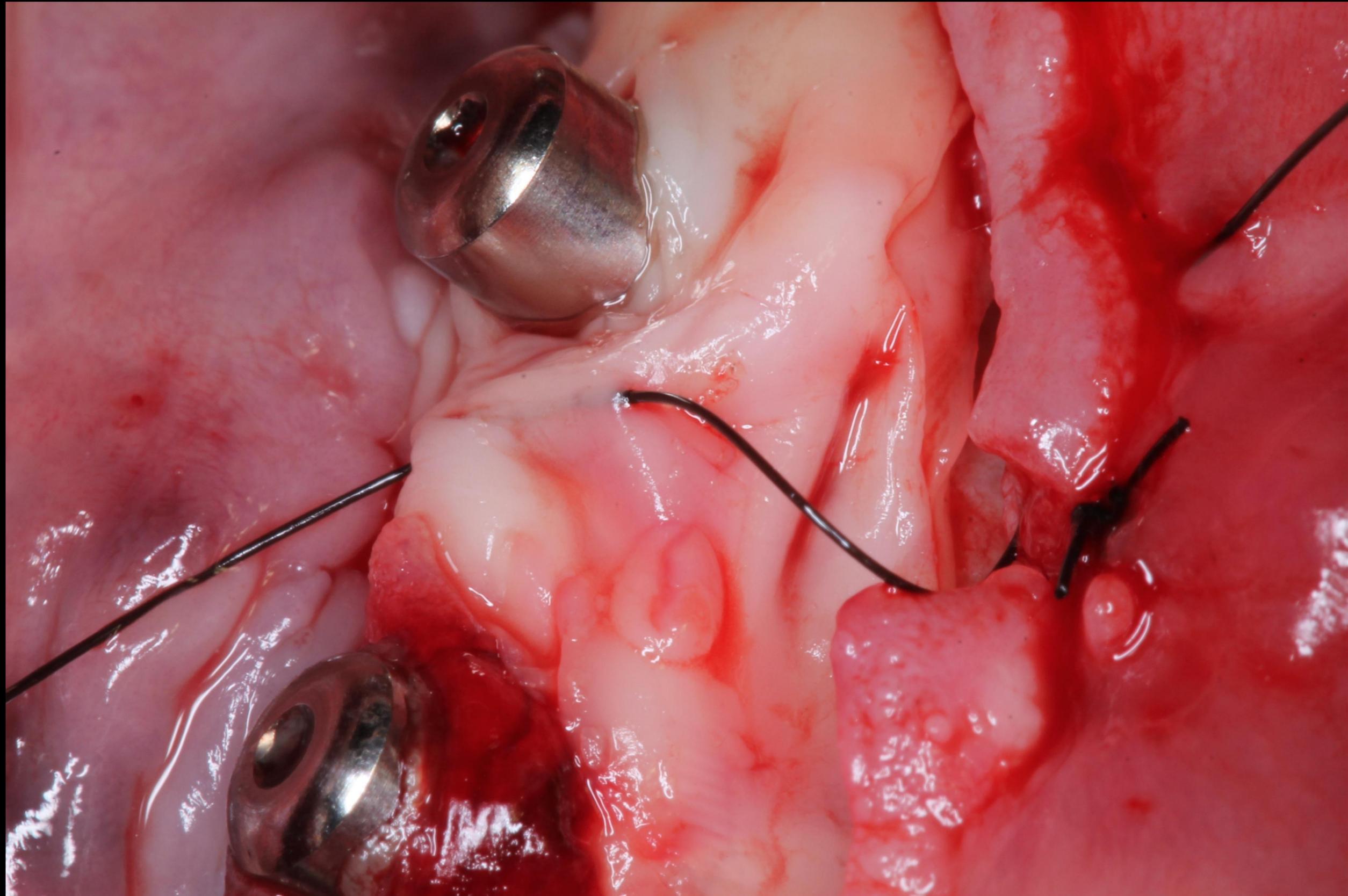


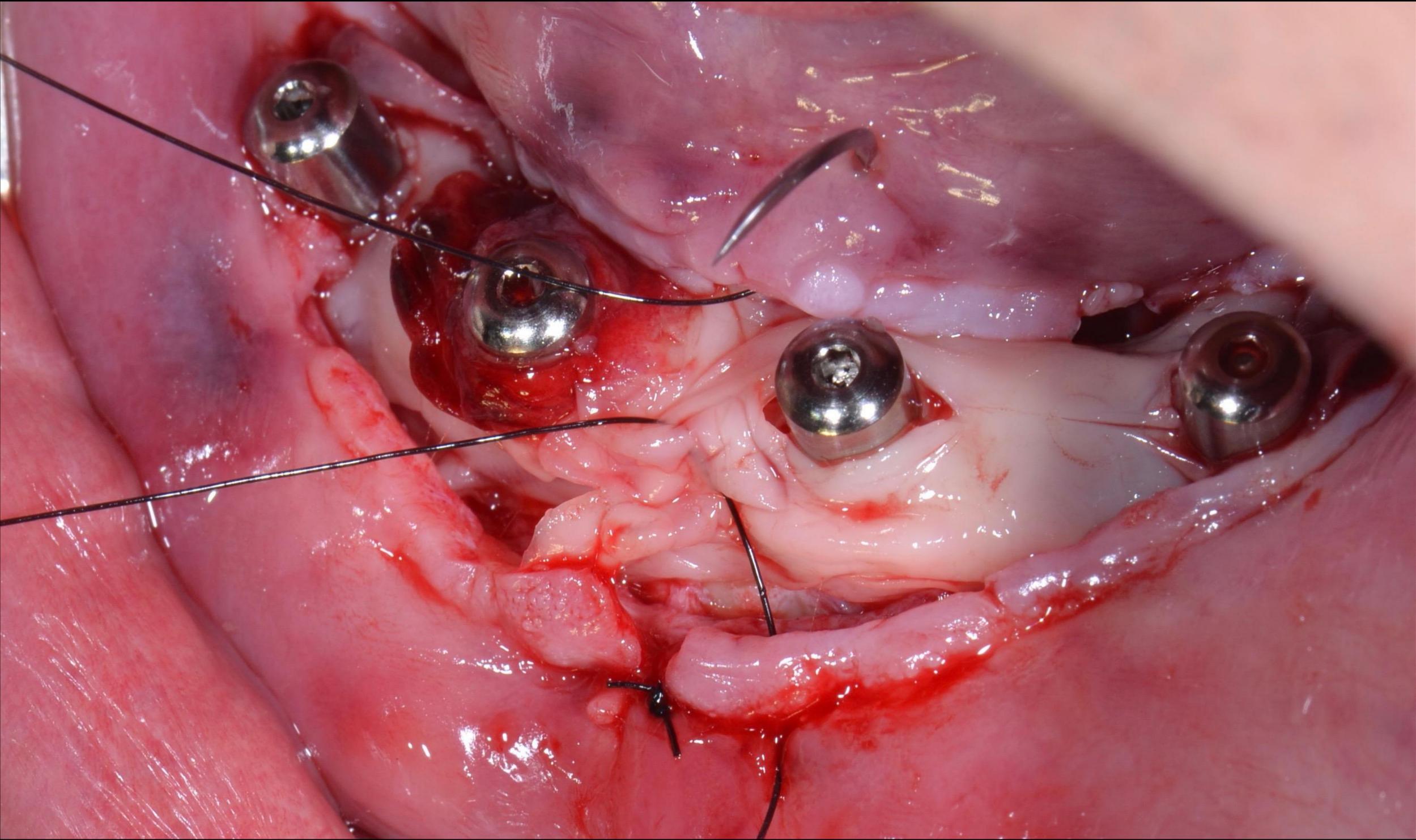


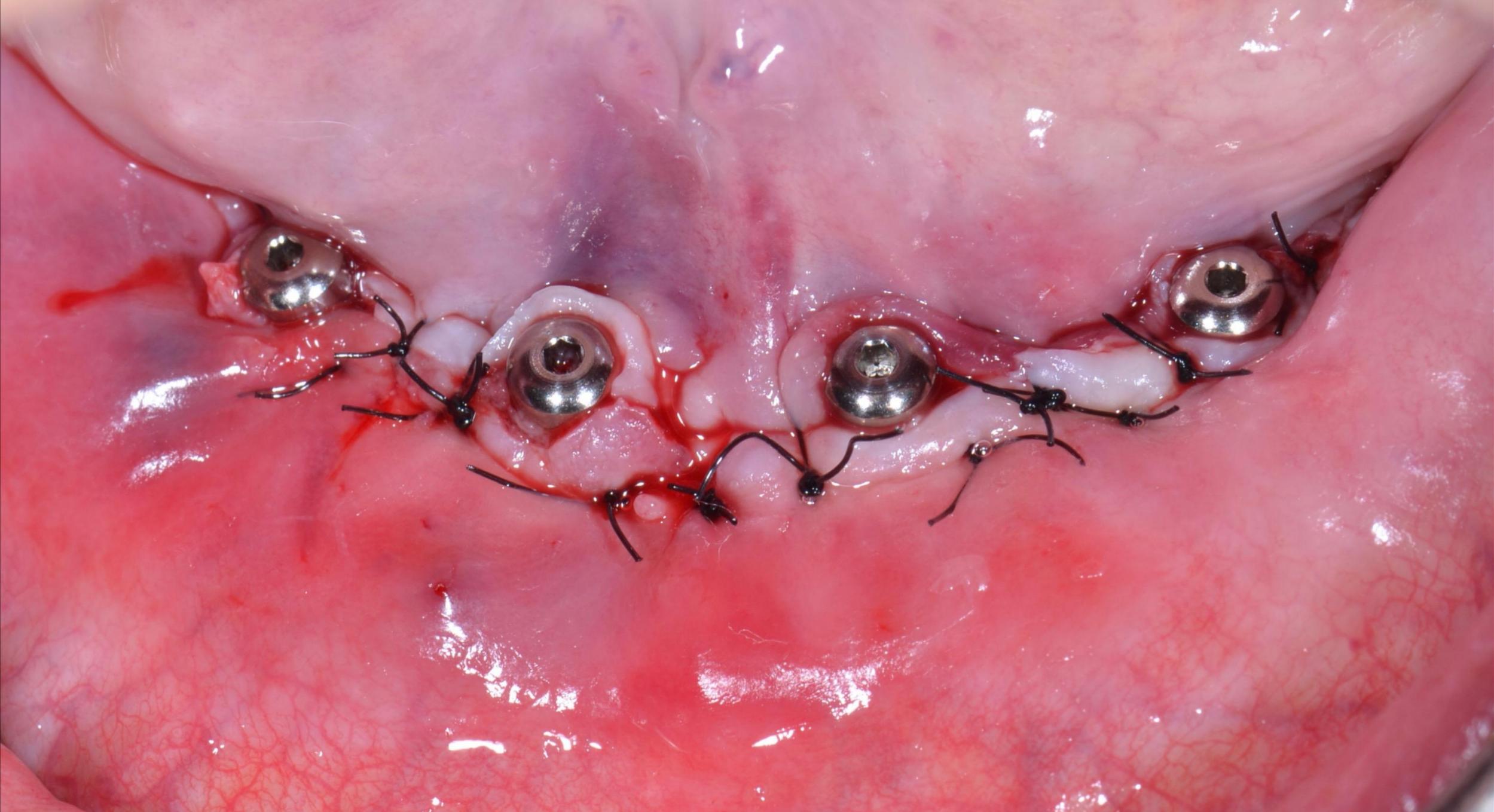


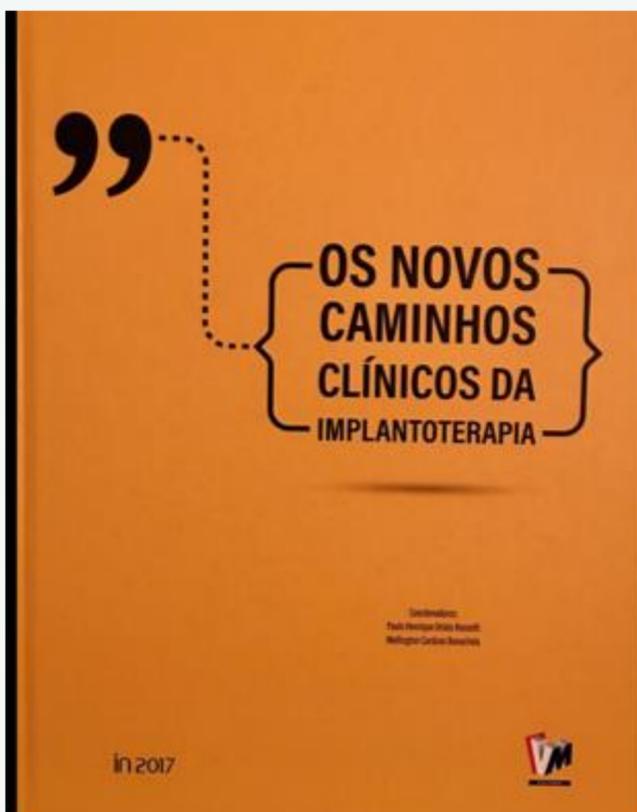












A primeira publicação científica que traz evidências laboratoriais de caracterização associadas a respostas clínicas da matriz de fibrina leucoplaquetária obtida pelo protocolo Fibrin®.





Leonel Alves de Oliveira ¹

Marcelo Buzzi ²

Moira Pedroso Leão ³

Pâmela Cândida Aires Ribas de Andrade ⁴

Selma Aparecida Souza Kuckelhaus ⁵



Caracterização morfológica ultraestrutural da matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga em associação com biomateriais xenógeno e aloplástico para enxertia óssea. Protocolo Fibrin®.

Ultrastructural morphological characterization of the autologous leuko-platelet fibrin matrix in association with xenogenic and alloplastic biomaterials for bone grafting. Fibrin® Protocol.

RESUMO

O Protocolo Fibrin® é um método de centrifugação de baixa rotação para obtenção conjunta e ininterrupta da matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga em duas apresentações físicas: a forma coagulada ou polimérica e a forma em fase líquida ou monomérica. Este método provê um importante artifício para a associação desta matriz com biomateriais mineralizados particulados para emprego em enxertias ósseas reconstitutivas. A matriz de fibrina atua como o primeiro microambiente indutor do reparo tecidual. Em sua estrutura tem incorporados componentes sanguíneos como: plaquetas, leucócitos, micropartículas plaquetárias, glicoproteínas, fatores de crescimento, imunoglobulinas e demais proteínas plasmáticas. Estes atuam de modo orquestrado modulando as respostas inflamatória, imunológica e proliferativa do reparo tecidual. A literatura internacional sobre este tema exhibe uma intensa busca pela melhor nos métodos de obtenção desta matriz de fibrina. Métodos variando tipos de tubos, intervalos de tempo e faixas de forças são comuns e apresentam resultados diversificados em ensaios *in vitro*, contudo, sem implicar em alterações significativas nas respostas clínicas quando comparados entre si. Diante desta premissa, este manuscrito trata exclusivamente da sua validação pela caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A centrífuga eleita para o estudo, FibrinFuge25, apresentou mínima vibração radial em funcionamento (0,54m/s²) e mínima variação térmica (+0,7°C) na câmara de centrifugação provendo funcionalidade metodológica e manutenção da integridade celular e plaquetária, bem como da trama tridimensional da densa rede de fibrina. Observou-se a incorporação de glicoproteínas, micropartículas e fatores de crescimento em íntimo contato com a matriz mineral dos biomateriais analisados. Novos métodos tendem a expandir a acessibilidade de uso dos agregados sanguíneos autólogos tornando possível seu emprego em várias esferas clínicas. Métodos reprodutíveis e validados são necessários para fortalecer a evolução do emprego terapêutico desta matriz de fibrina. Deste modo, nossa proposta metodológica, que foi desenvolvida mediante uma minuciosa investigação científica para proporcionar sua devida fundamentação e validação, ilustra em caráter inédito no Brasil a interação morfológica ultraestrutural entre a matriz de fibrina leucoplaquetária e dois tipos de biomateriais de produção nacional (xenógeno e sintético) utilizados em cirurgias reconstitutivas.

PALAVRAS-CHAVE:

Fibrina, fatores de crescimento, enxerto ósseo, biomateriais e cirurgias reconstitutivas.

ABSTRACT

The Fibrin® protocol is a low-speed centrifugation method for joint and uninterrupted obtention of autologous leuco-platelet fibrin matrix in two physical presentations: the coagulated or polymeric form and the liquid or monomeric phase form. This method provides an important artifice for the association of this matrix with particulate mineralized biomaterials for use in reconstructive bone grafts. The fibrin matrix acts as the first microenvironment inducing of the tissue repair. It has blood components incorporated in its structure, such as: platelets, leukocytes, platelet microparticles, glycoproteins, growth factors, immunoglobulins and other plasma proteins. They act in an orchestrated way modulating the inflammatory, immune and proliferative responses of tissue repair.

¹ Professor de Morfologia Médica - UNB; Doutorando em Ciências Médicas - UNB; Mestre em Bioquímica - UNB; Especialista em Implantodontia - FUNORTE-MG. Biólogo; Cirurgião-Dentista. Assessor técnico suplente do CFO nas áreas de sangue, células, tecidos e órgãos.

² Doutor em Ciências Biológicas e Biomoleculares pela Universidade de Stirling - Scotland - UK; Mestre em Ecologia Marinha - Vrije Universiteit Brussel - Belgium, Biólogo; Farmacêutico. Professora e Pesquisadora da Universidade Positivo; Especialista em Prótese - ABO-PR; Mestre e Doutora em Implantodontia - UFSC; Especialista em Prótese Dentária - ABO-PR; Cirurgã-Dentista Diretora Administrativa do CPC Curitiba Biotech; Assessora técnica titular do CFO nas áreas de sangue, células, tecidos e órgãos.

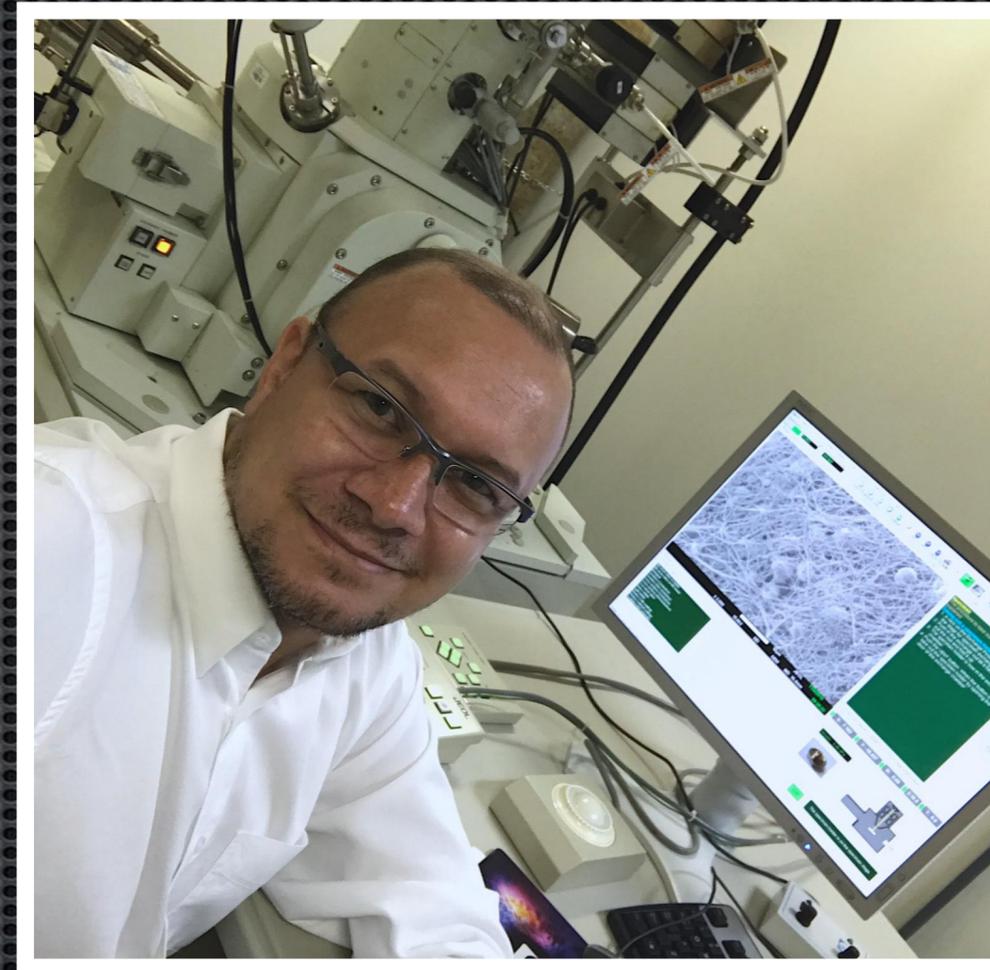
³ Doutora, Mestre e Especialista em Implantodontia - UFSC; Especialista em Prótese Dentária - HRAC - USP, Cirurgã-Dentista.

⁴ Professora de Morfologia Médica - UNB, Doutora em Ciências Médicas-UNB e Mestre em Biologia Animal-UNB, Bióloga.

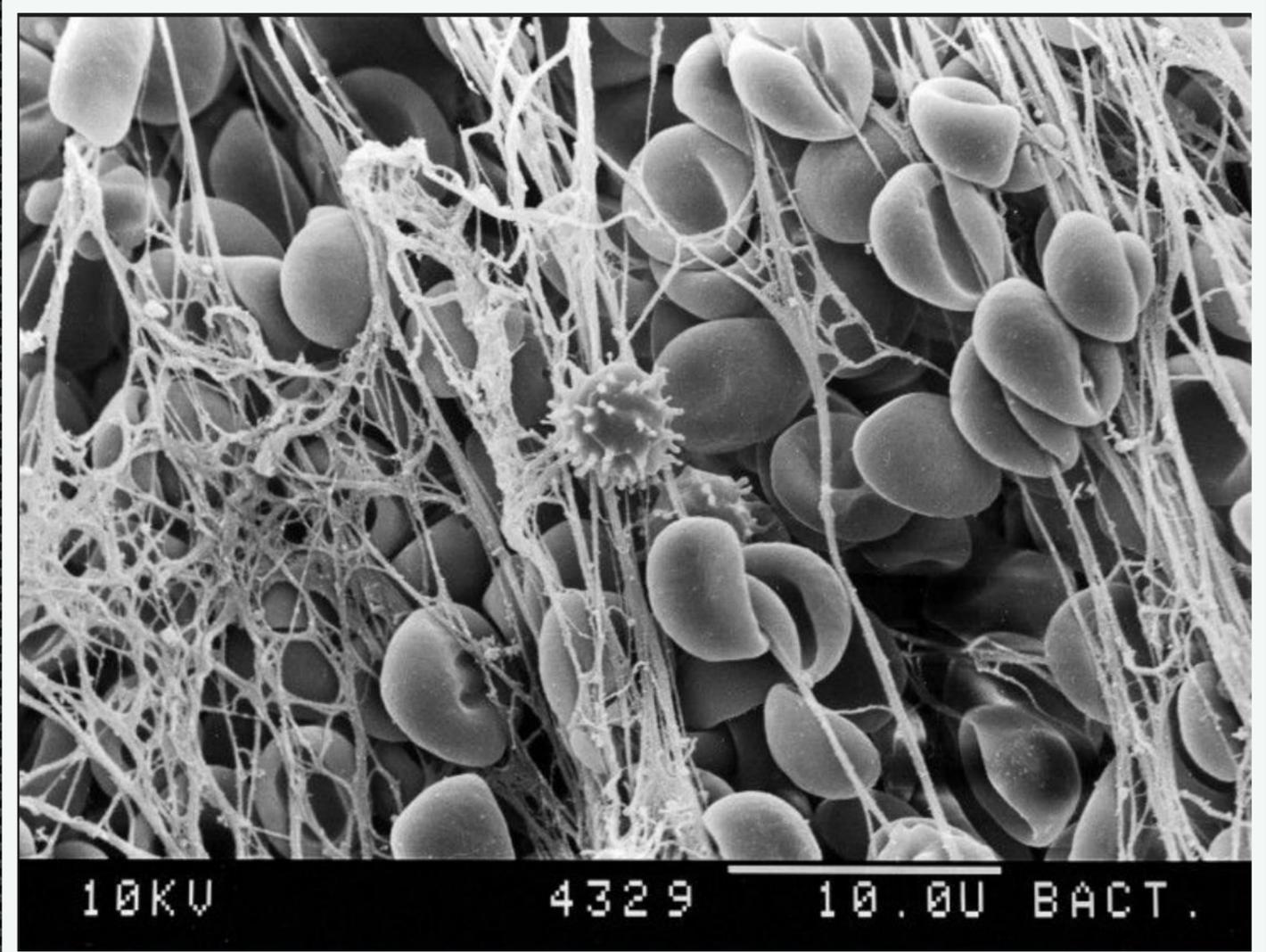
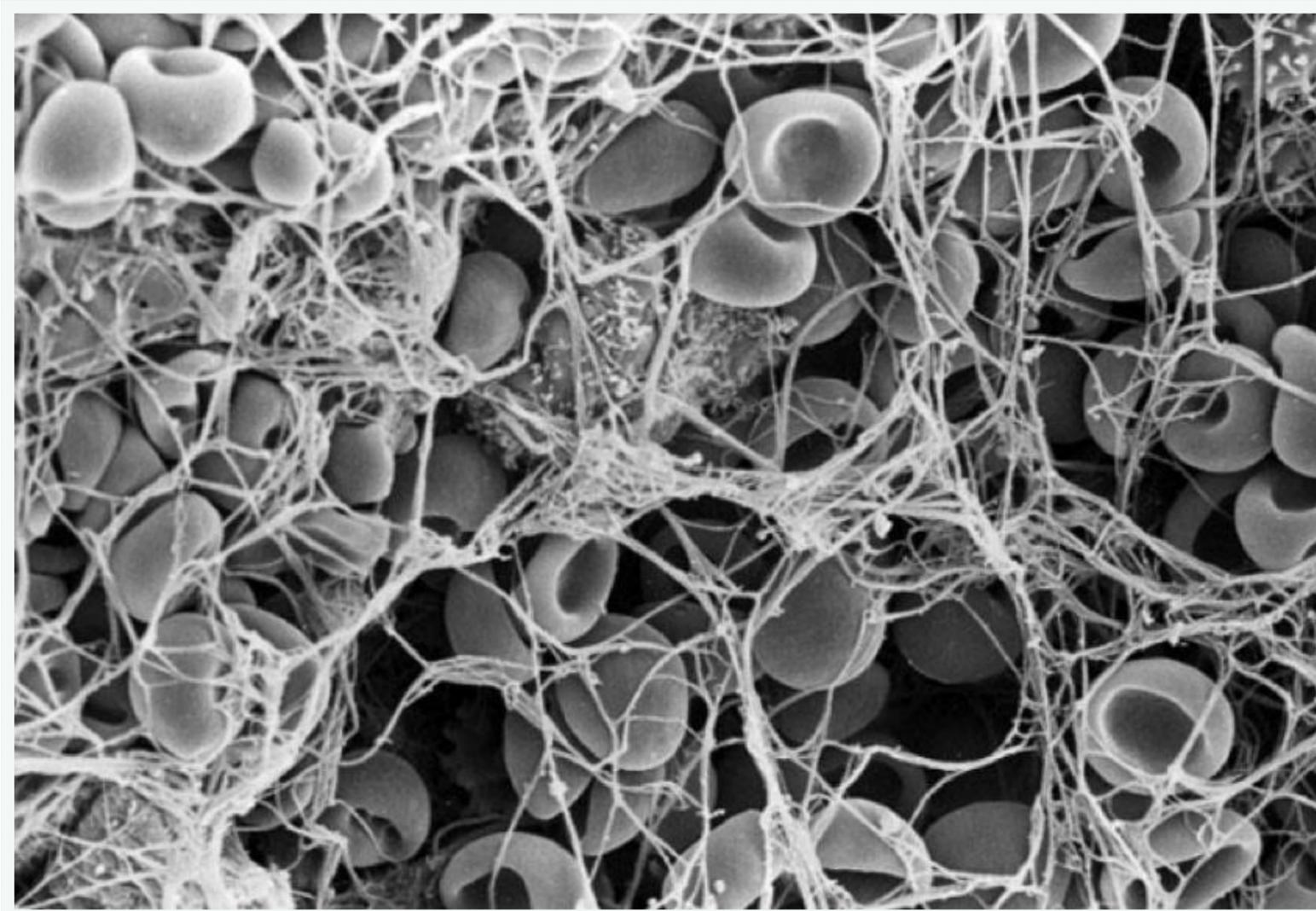
Microscopia
Eletrônica de
Varredura

Coágulo de Sangue
Total

Coágulo de Fibrina
Leucoplaquetária

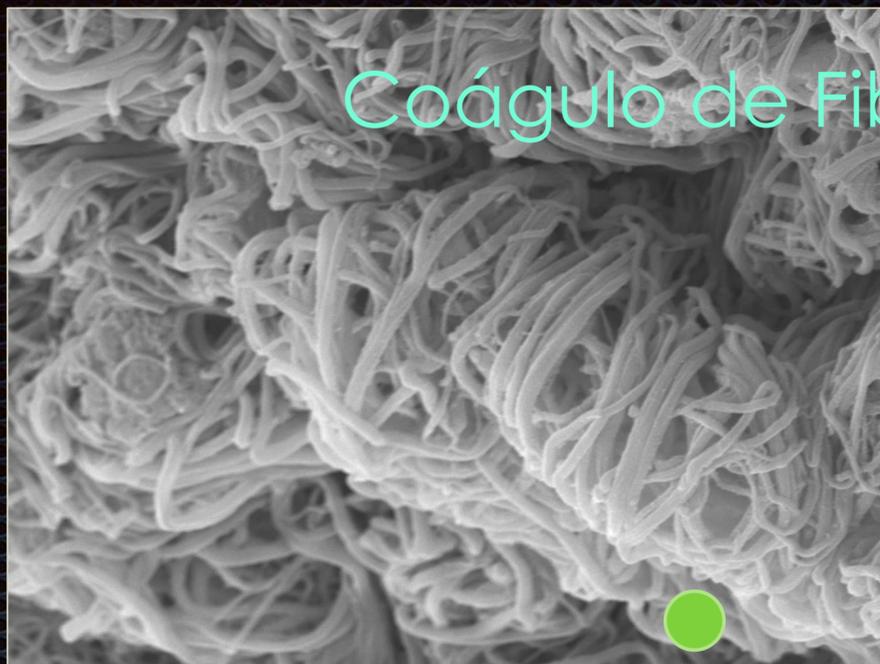


Coágulo de Sangue Total

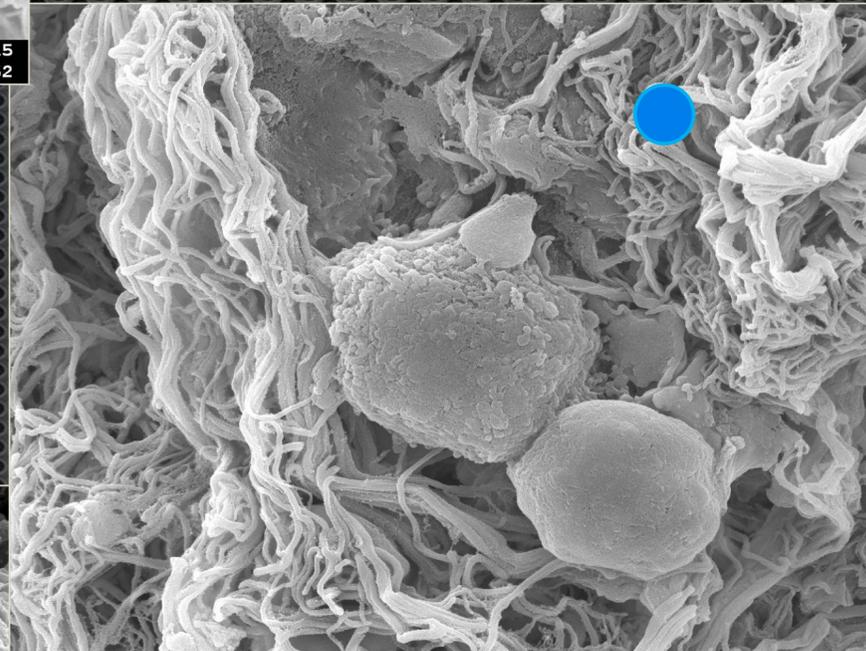


Marshal Debi,
PhD

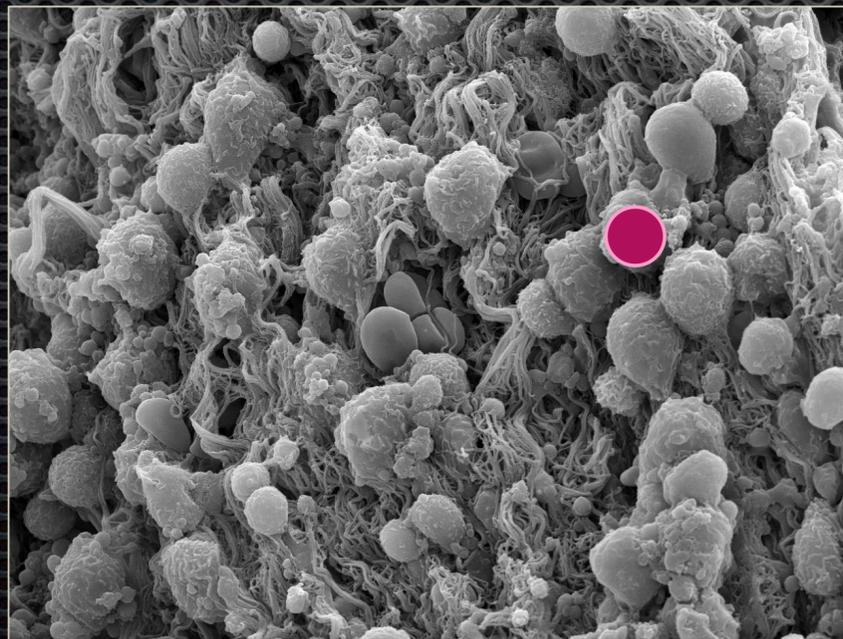
Coágulo de Fibrina Leucoplaquetária



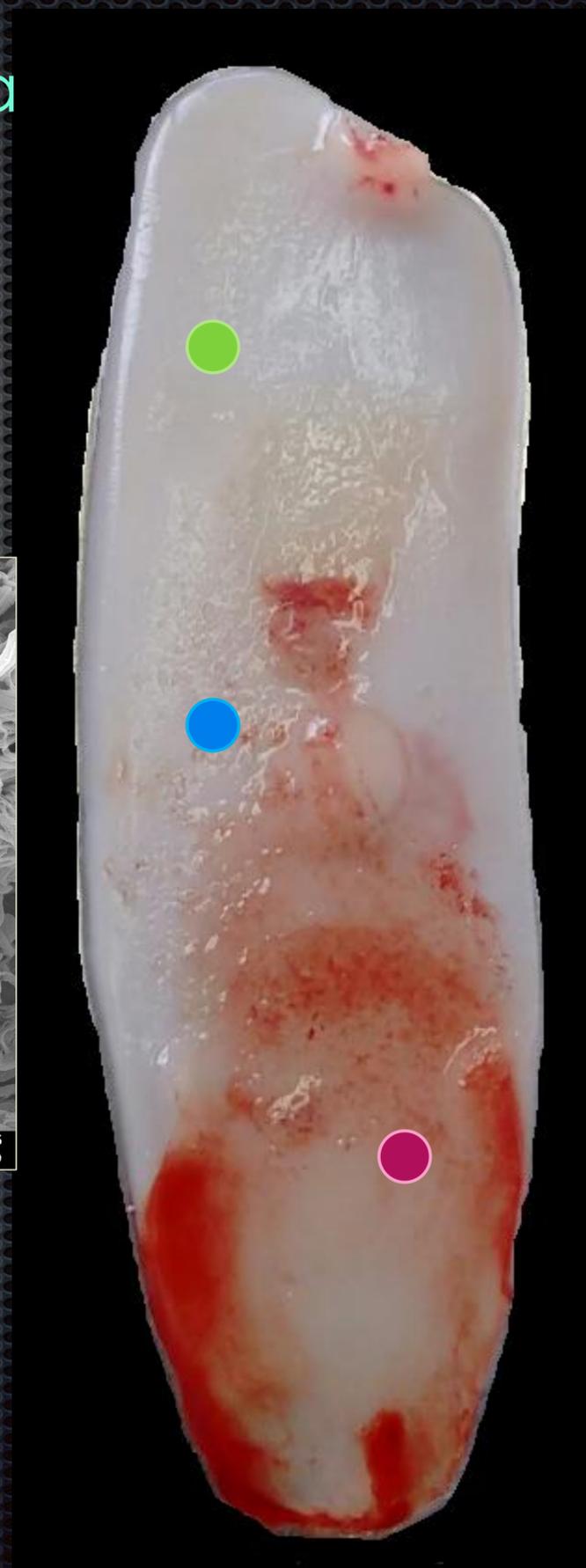
1µm JEOL-UnB 11/11/2015
X 7,000 10.0kV SEI SEM WD 12.9mm 5:29:52



1µm JEOL-UnB 11/11/2015
X 5,500 10.0kV SEI SEM WD 17.4mm 4:45:09

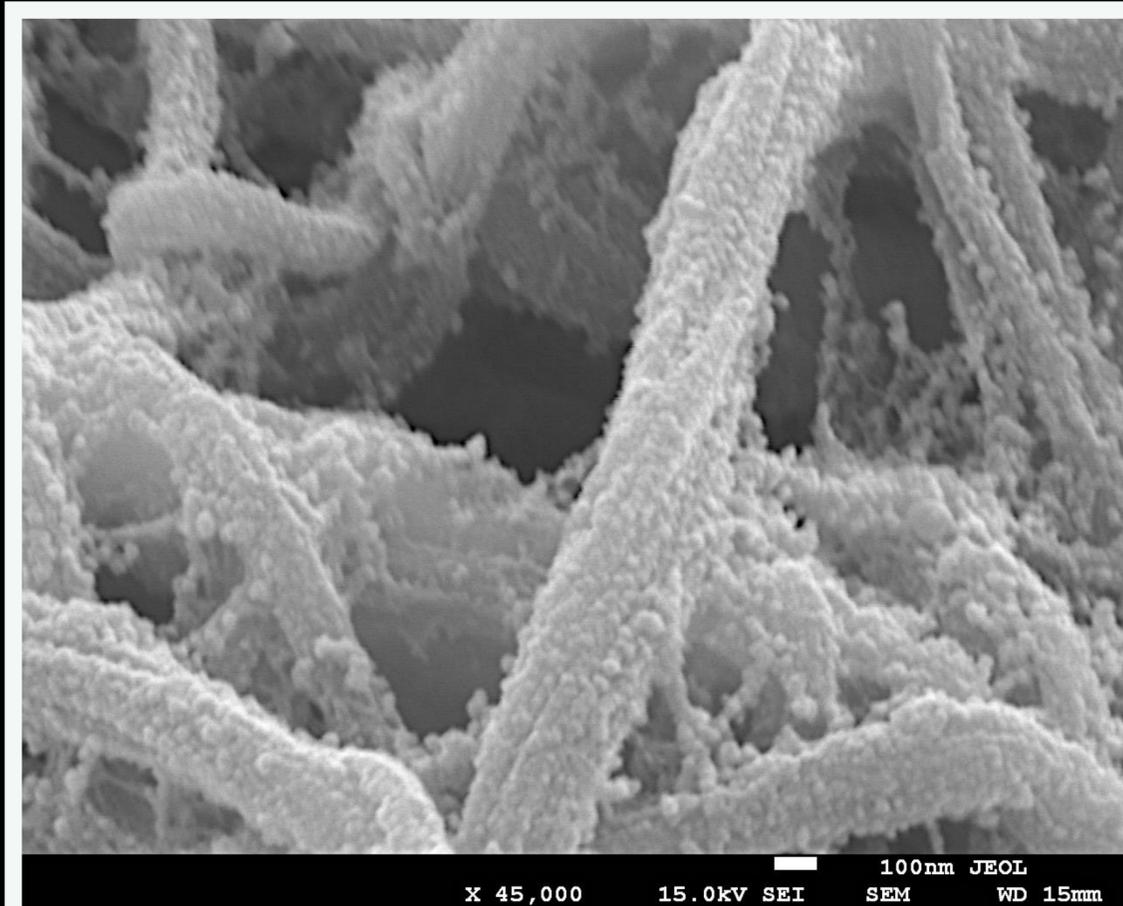
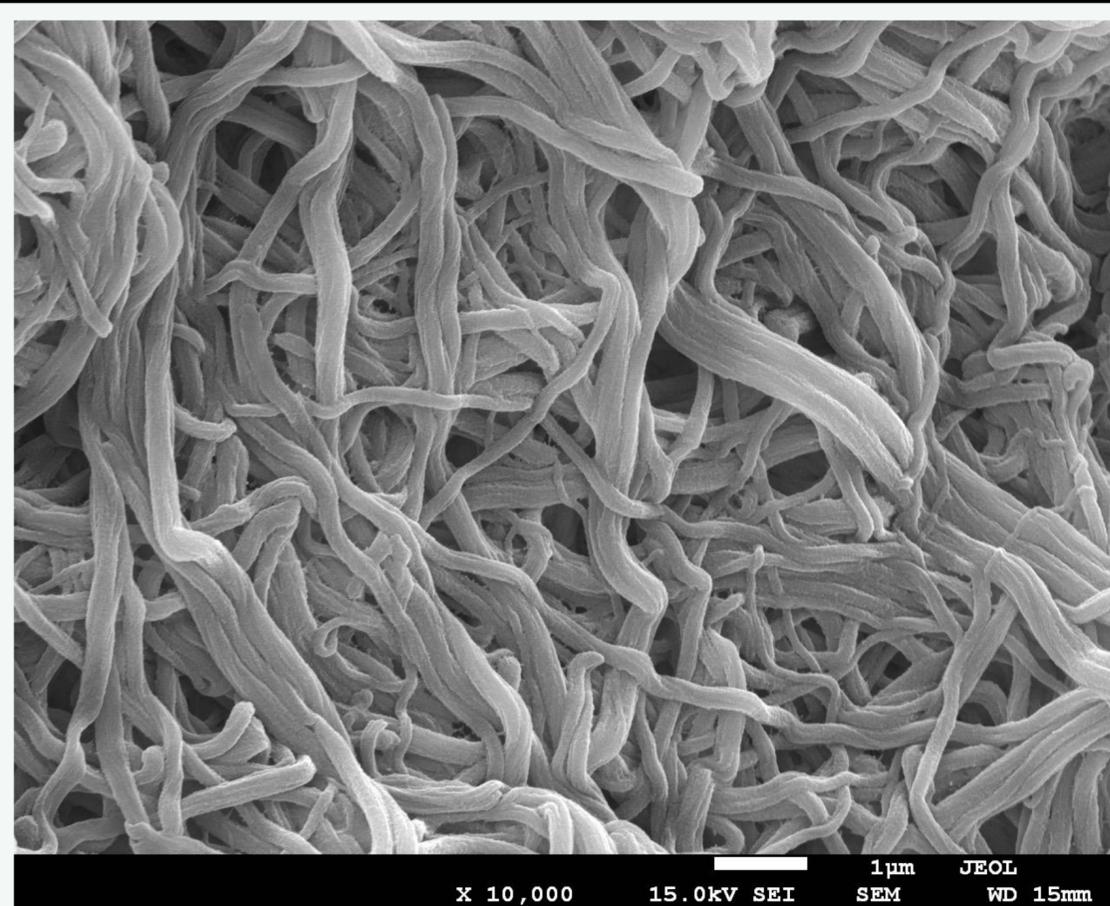
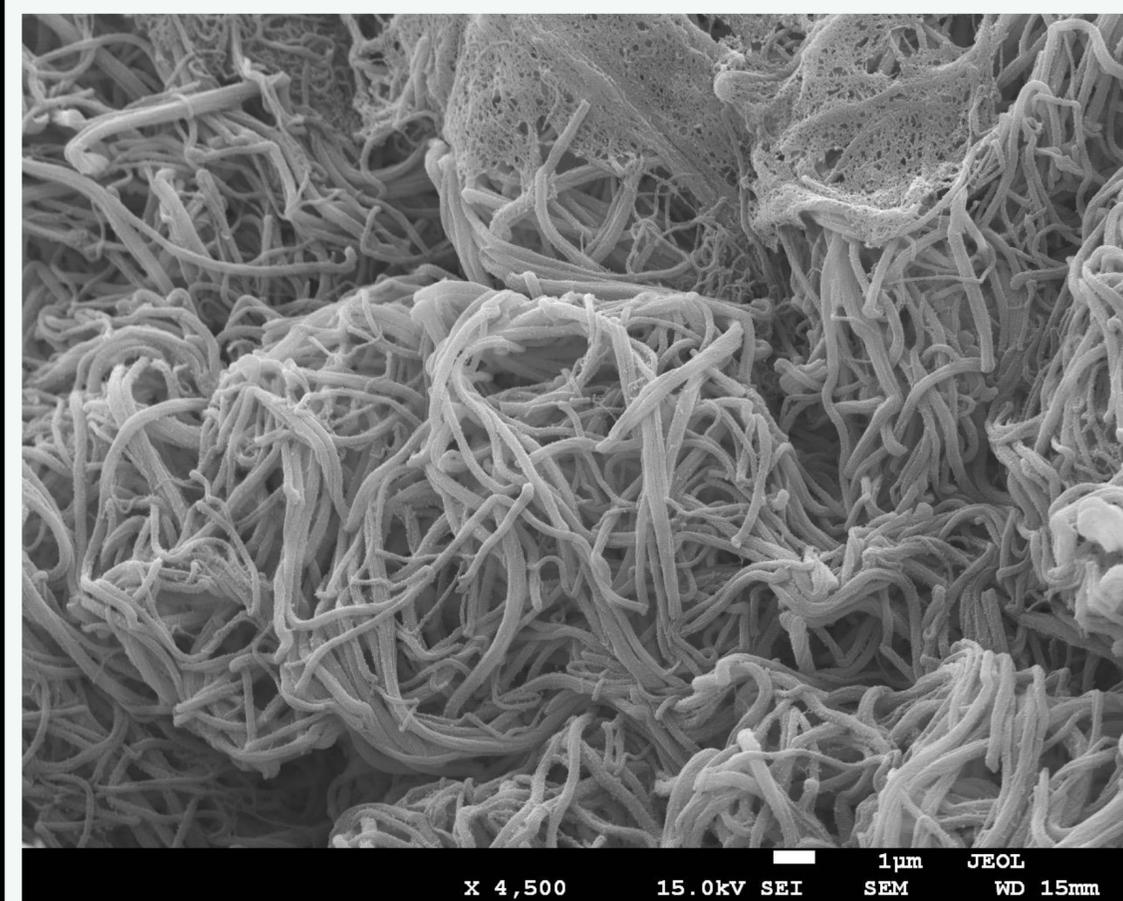
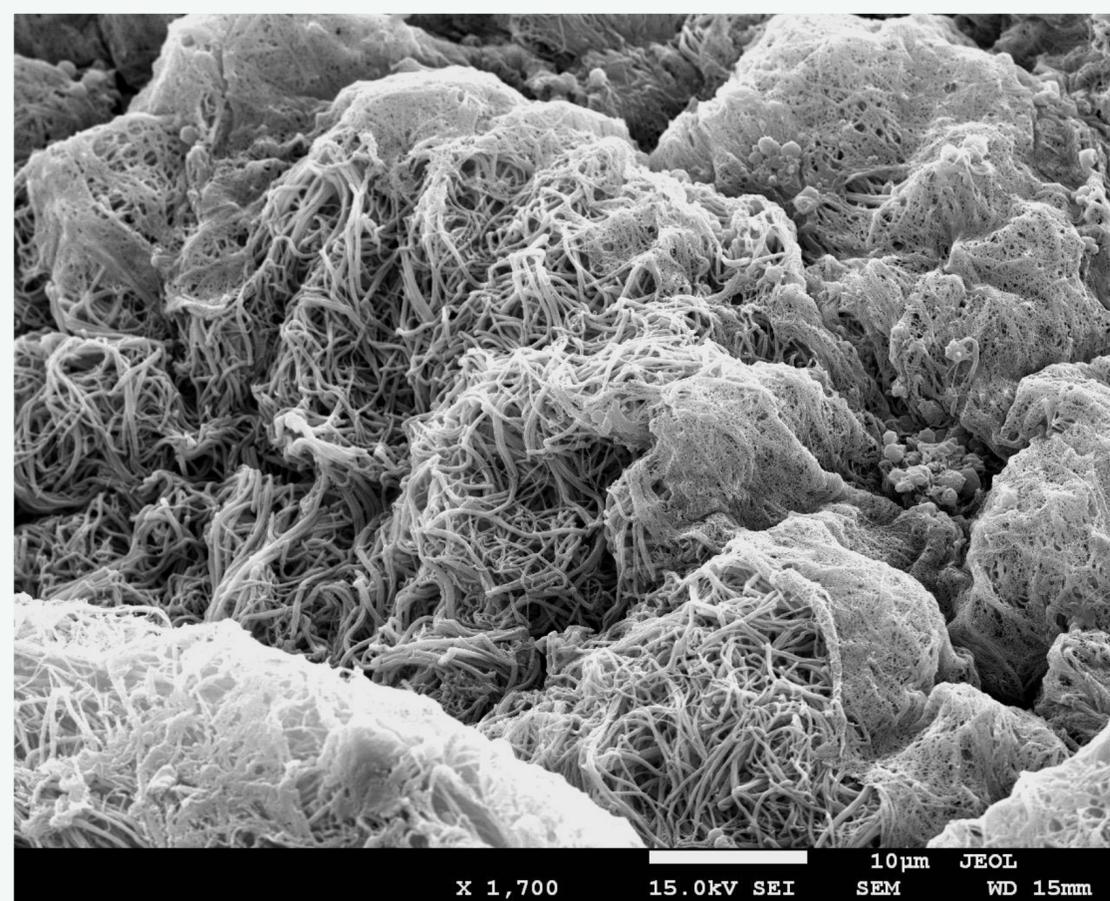


10µm JEOL
X 2,000 15.0kV SEI SEM WD 15mm

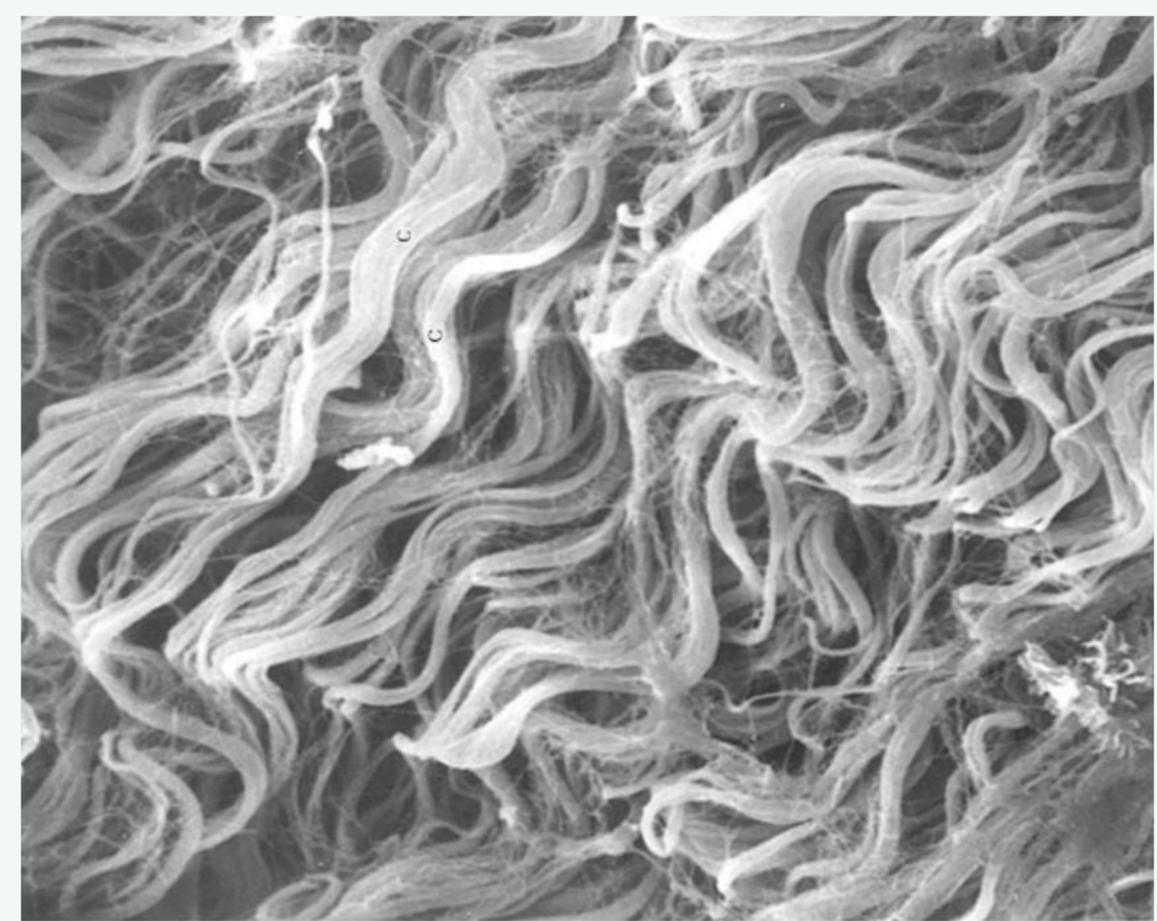
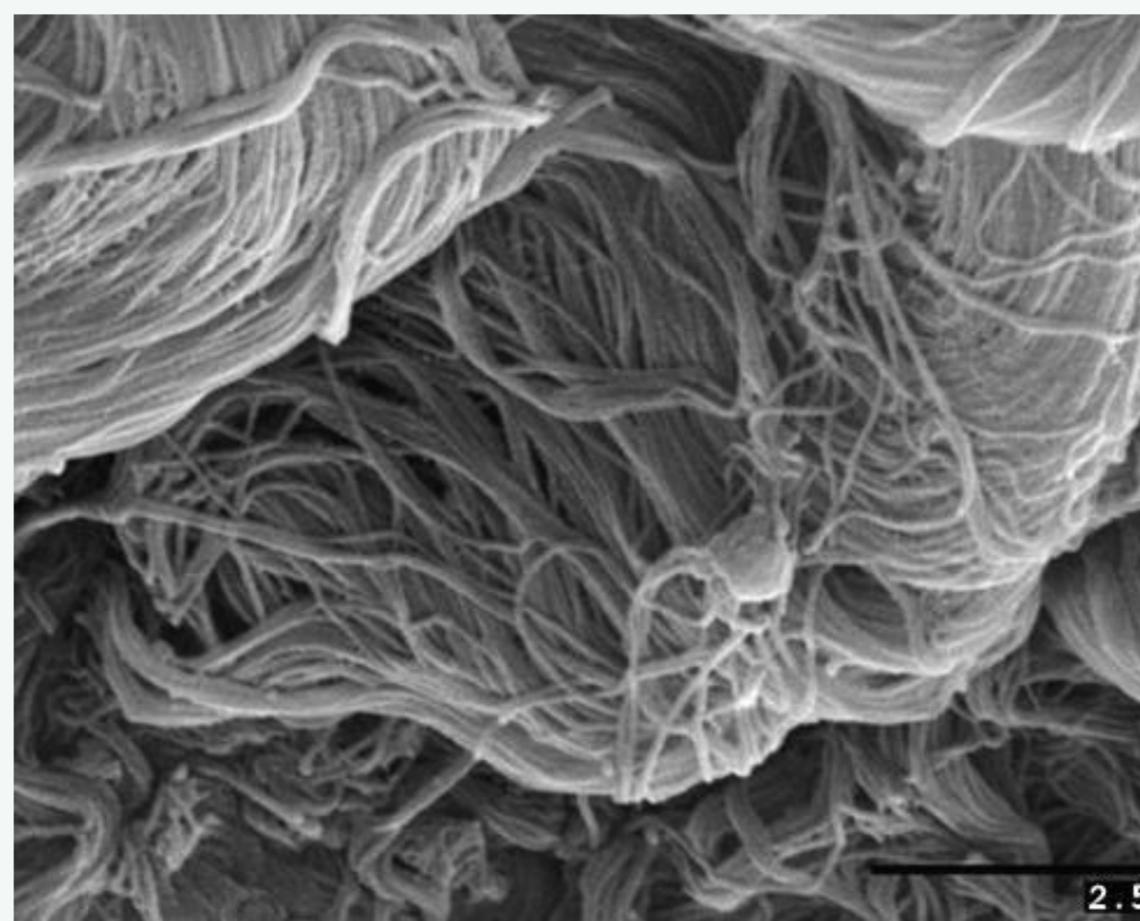


Matriz de Fibrina

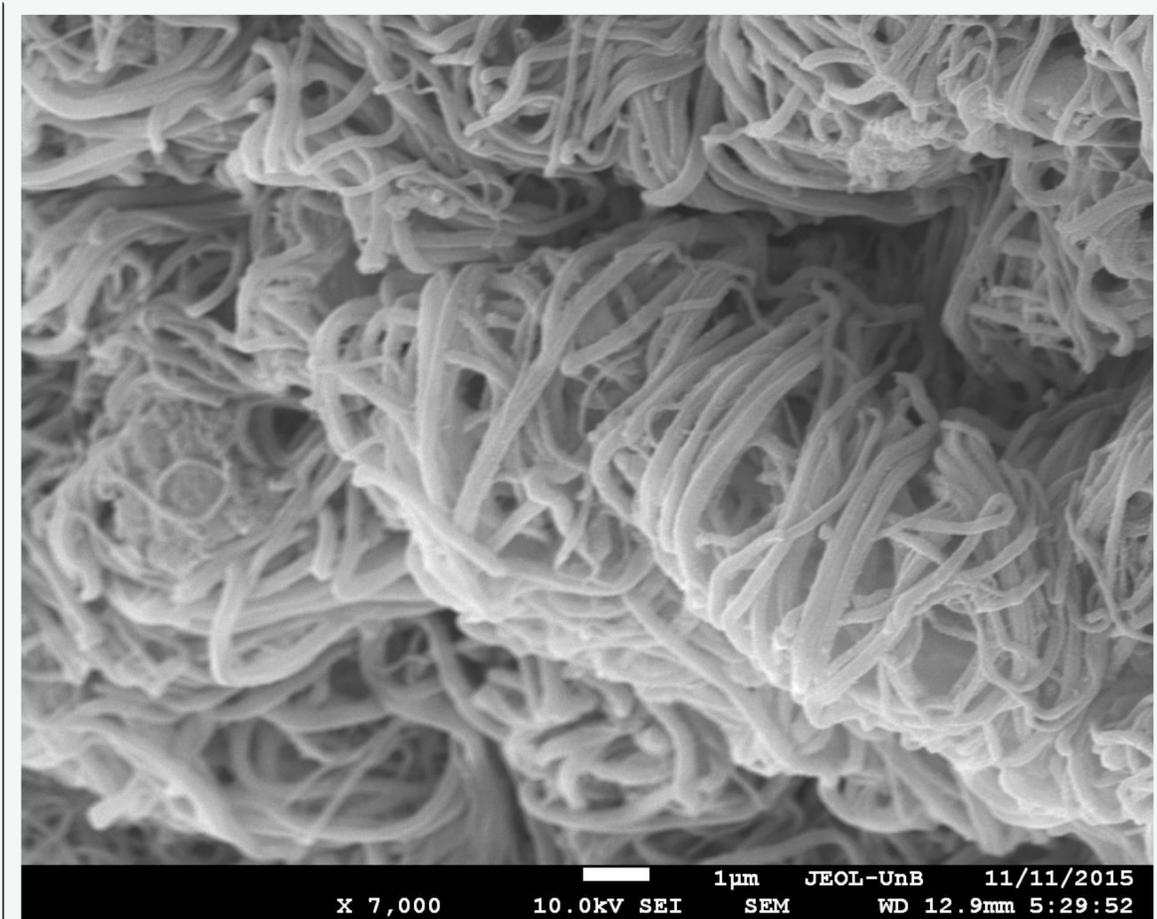
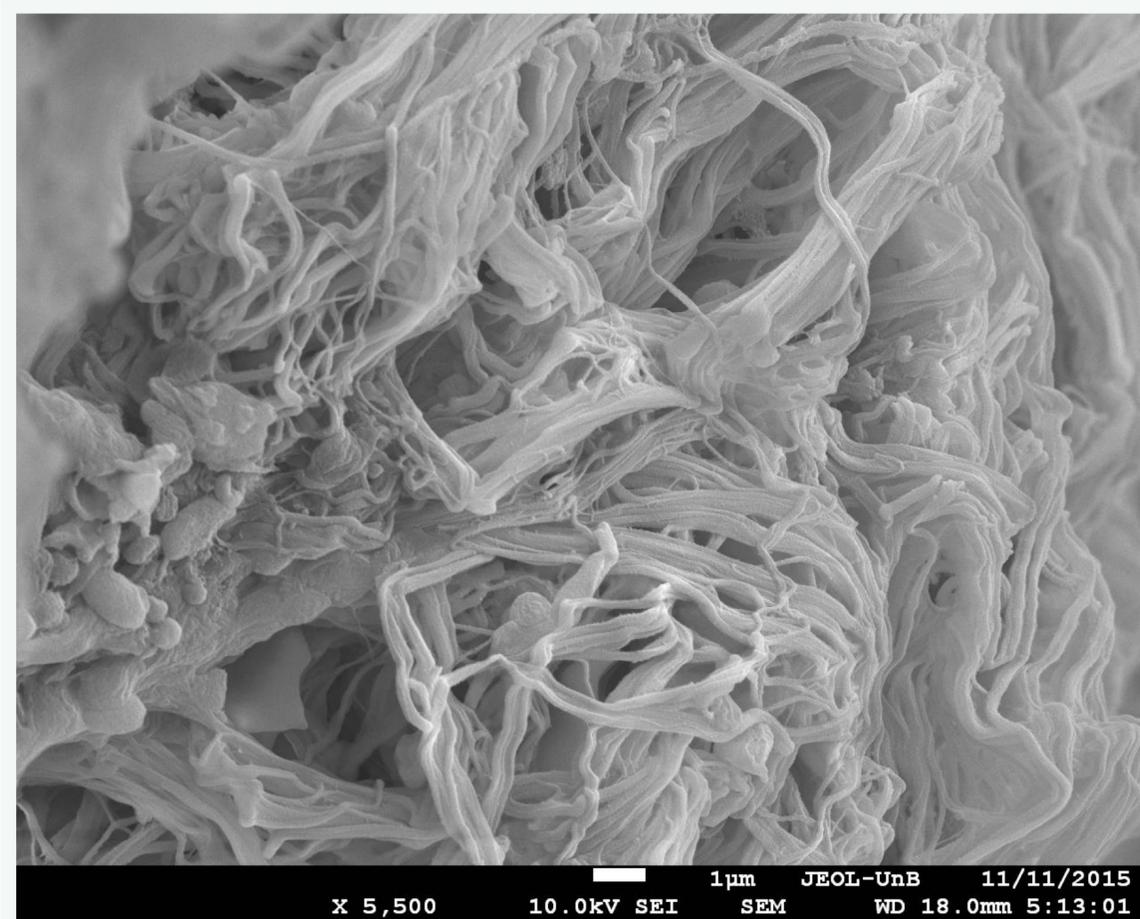
Diferentes
magnitudes



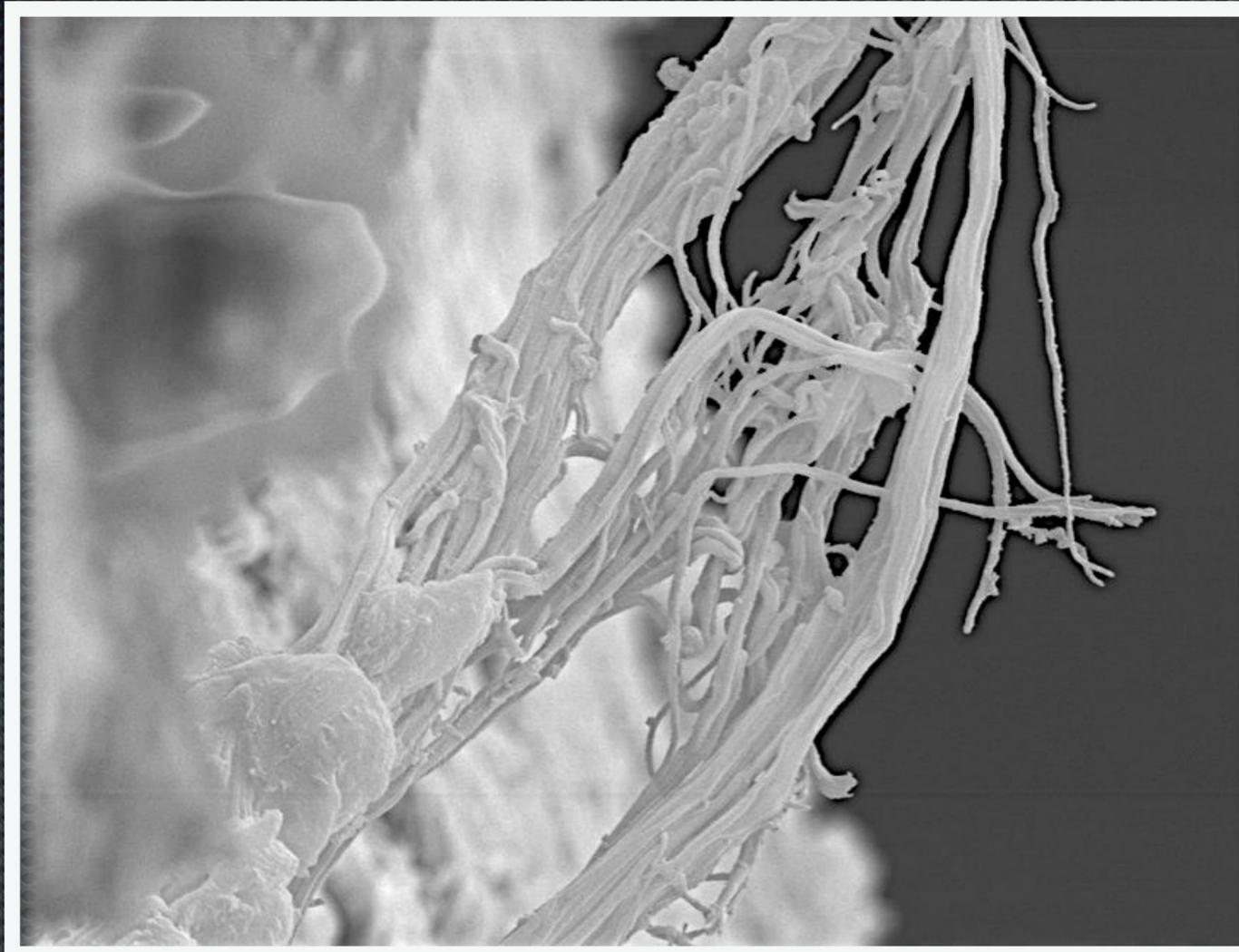
Matriz de Colágeno



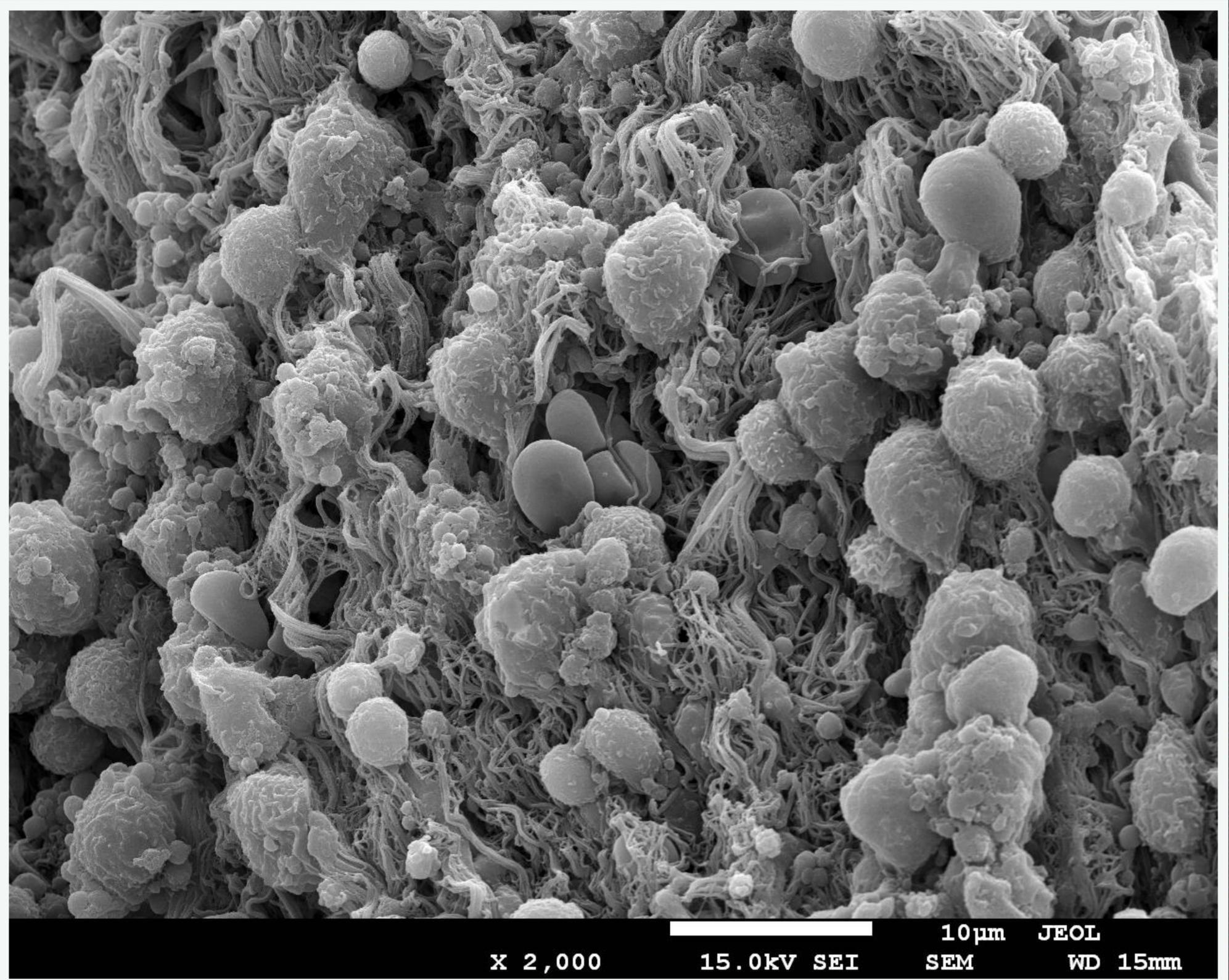
Matriz de Fibrina



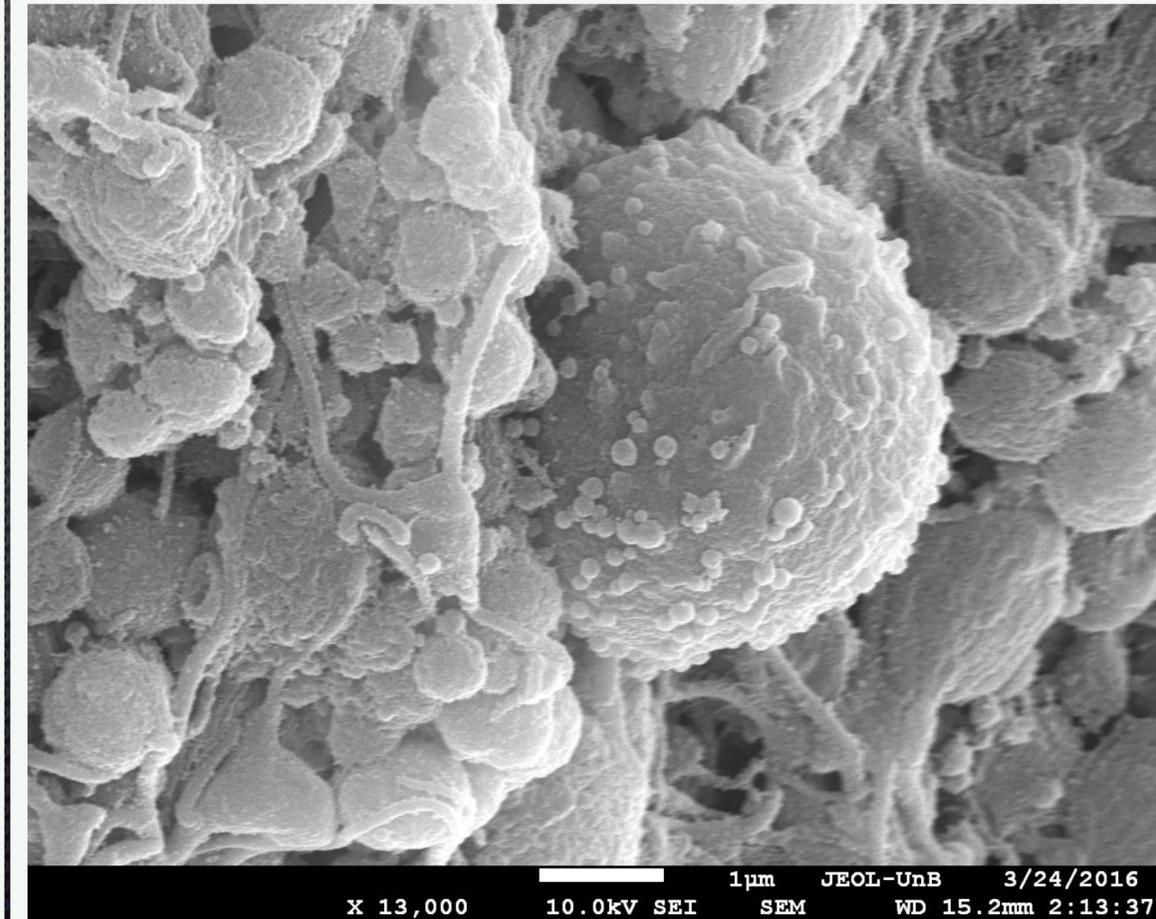
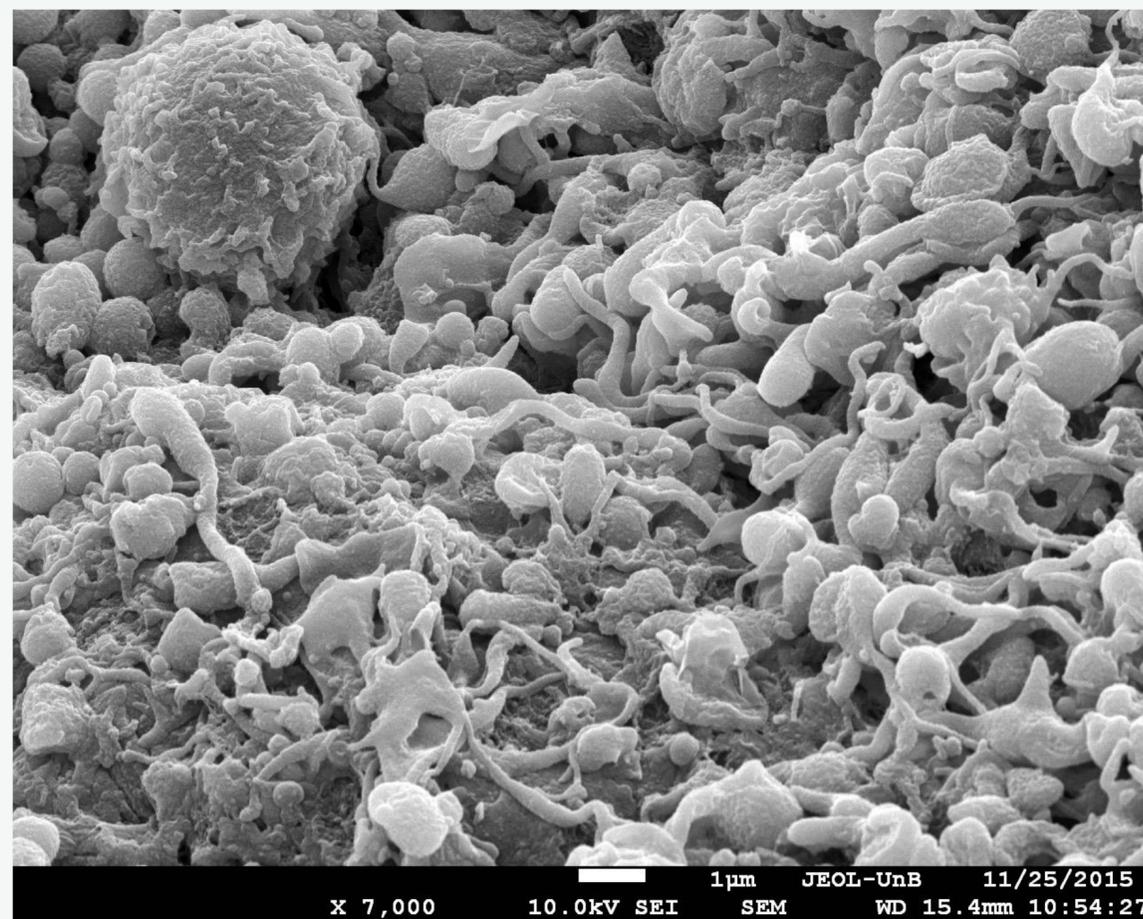
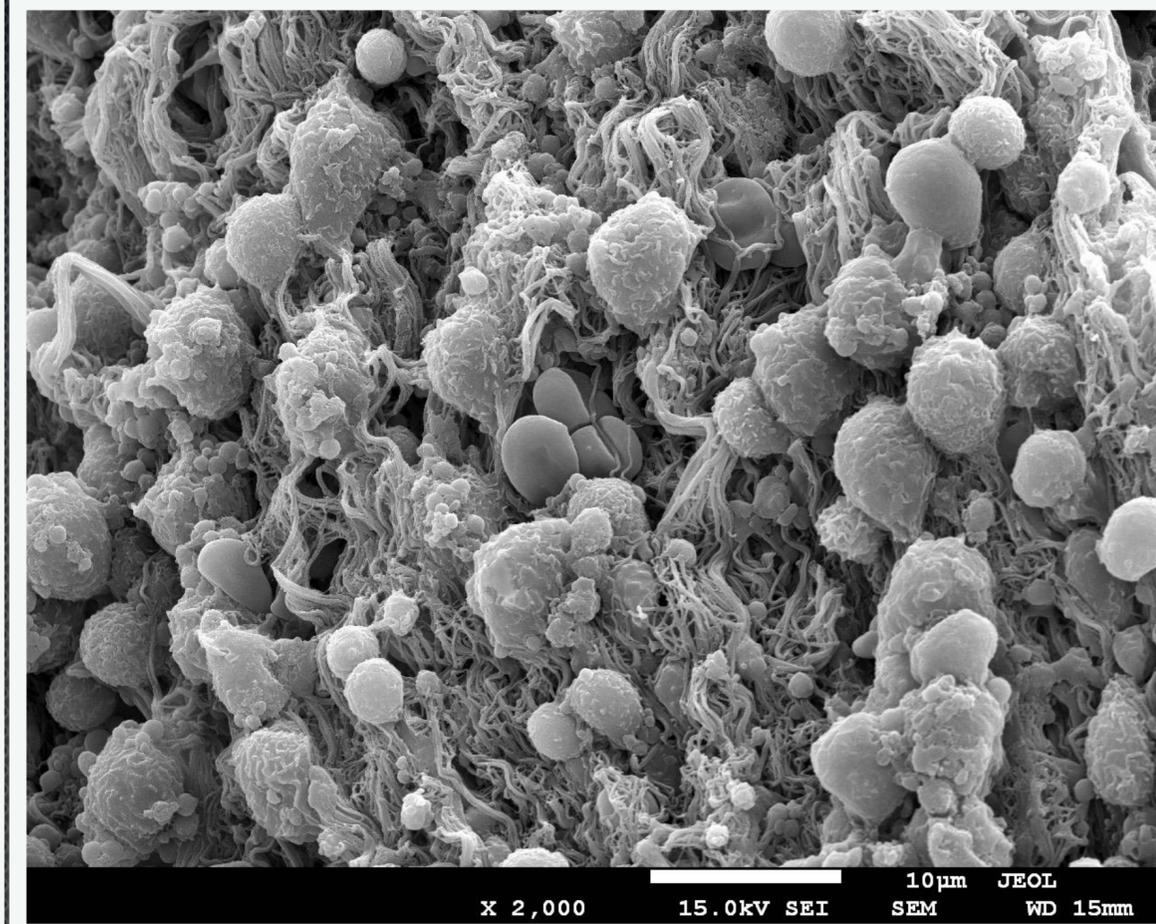
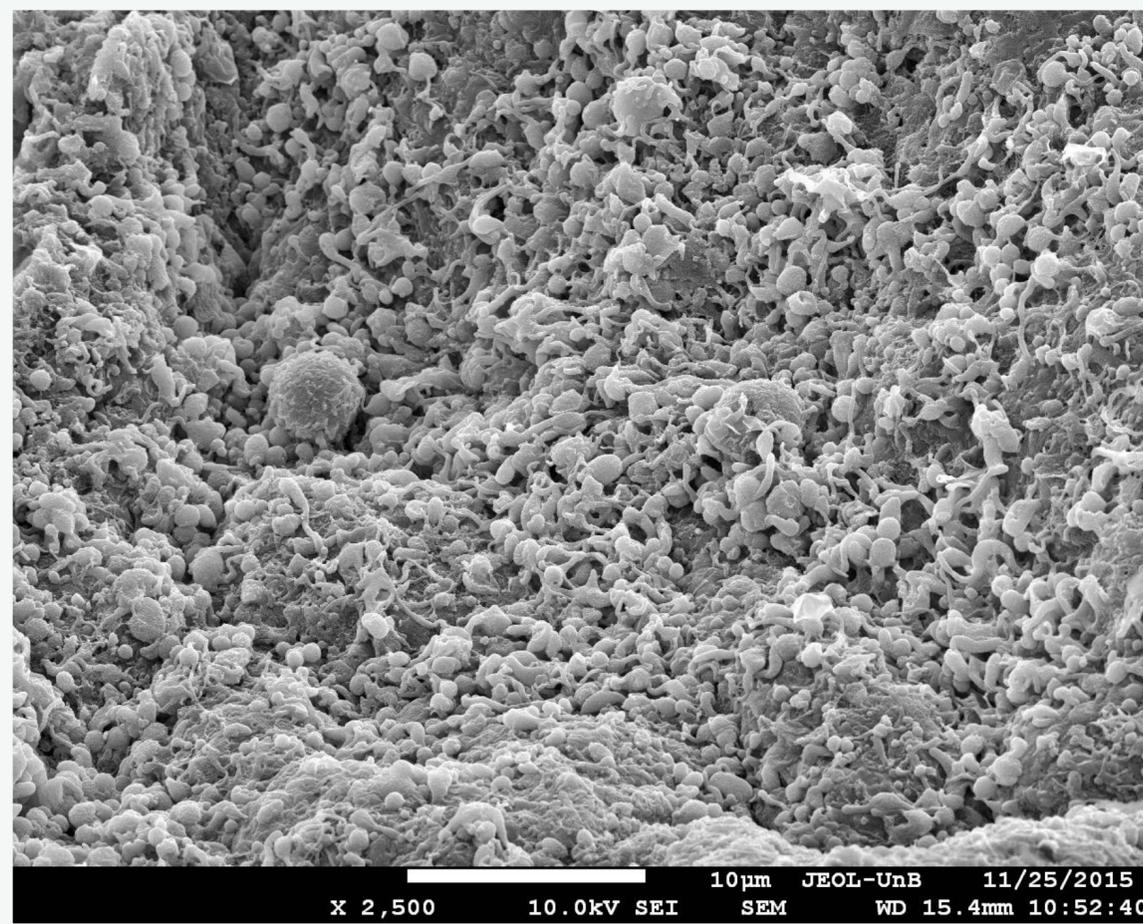
Fibrilas de Fibrina



Buffy Coat



Buffy Coat



Fatores de Crescimento

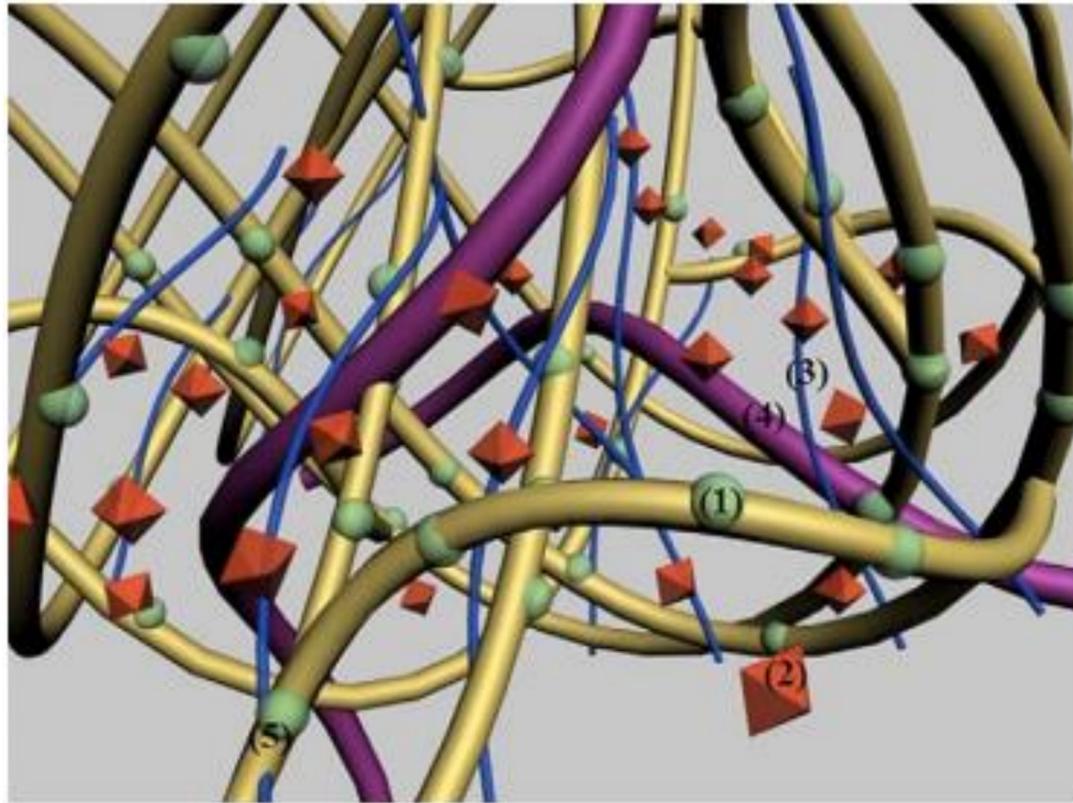


Fig. 10. Theoretical computer modeling of a PRF clot. Note the presence of structural glycoproteins (fibronectin) and extrinsic cytokines (in solution) enmeshed in the fibrin matrix. The PRF slow polymerization process would also allow the intrinsic retaining of glycanic chains and cytokines within fibrin polymers. PRF would be thus very close to a natural fibrin thrombus (D-TEP v1.3; scales not respected). (1) Cytokine intrinsically retained within fibrin fibrillae. (2) Platelet cytokine in solution (extrinsically associated with fibrin polymers). (3) Fibrin-associated glycanic chains. (4) Circulating glycoproteins (fibronectin). (5) Fibrin fibrilla associated with glycanic chains and intrinsic cytokines.



Considerações Finais

- Evolução metodológica;
- Princípios Biológicos;
- Adequação Sanitária;
- Legislação Profissional;
- Formação / Capacitação;
- Prudência, Ética e responsabilidade.

Obrigado pelo prestigioso
convite!

Acreditamos que o sangue
autólogo não-transfusional
representa um importante
fundamento na medicina
regenerativa

profleone12@gmail.br





**HOSPITAL
SÍRIO-LIBANÊS**

www.hsl.org.br