

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Ângela Vezaro Vanz

**ANÁLISE DAS MATRIZES
LEUCOPLAQUETÁRIAS PRODUZIDAS
COM E SEM OZONIZAÇÃO**

Passo Fundo 2024

Ângela Vezaro Vanz

**ANÁLISE DAS MATRIZES
LEUCOPLAQUETÁRIAS PRODUZIDAS
COM E SEM OZONIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Pedro Henrique Corazza e coorientação do prof. Dr. João Paulo de Carli.

Passo Fundo 2024

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Ângela Vezaro Vanz, nascida em 12 de outubro de 1986, na cidade de Paim Filho, graduada em Odontologia pela Universidade de Passo Fundo (UPF), no ano de 2009, na cidade de Passo Fundo. Especialista em Endodontia (2011) e Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (2014), pelo Centro de Estudos Odontológicos Meridional (CEOM), na cidade de Passo Fundo. Especialista em Harmonização Orofacial pela Facialmed Center, no ano de 2020, na cidade de Passo Fundo. Cirurgiã dentista há quatorze anos, autônoma; atou na endodontia até agosto de 2023, dedicando-se, a partir de então, somente à Cirurgia Bucomaxilofacial e Harmonização Orofacial.

OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS

Não existe como começar diferente. Primeiro, agradeço a Deus, pela vida, pelas oportunidades e dificuldades. Tudo a Ele e por Ele.

Agradeço a minha família, minha base, meu apoio em dias ruins, sorrisos em dias bons e esperança de que tudo daria certo.

Ao meu filho, Bento Vezaro Vanz de Britto, luz na minha vida e a razão por eu querer ser sempre melhor. Eu o amo com o mais genuíno amor do mundo.

Ao meu marido, Vitor Trancoso de Britto, que suportou os piores dias e se manteve otimista, mesmo quando tudo o que eu queria era desistir. Por ser abrigo, colo e amor.

Ao meu orientador, Dr. Pedro Henrique Corazza, que me auxiliou em fazer o projeto se tornar real e chegar até aqui.

Ao meu co-orientador, Dr. João Paulo de Carli, pela disponibilidade e auxílio sempre que precisei.

A Dra. Alessandra Morassuti, que mesmo sem ter ligação, se fez disponível e me ajudou a entender o processo.

Ao Rafael Dalbosco dos Santos, e a toda equipe do Laboratório Widal Pacheco, por disponibilizar o ambiente e suporte necessário para realizar a pesquisa. A ele e toda a equipe que me auxiliou, meu muito obrigada.

Ao Professor Fábio Andretti, pela disponibilidade e prontidão no decorrer de todo o processo.

Ao professor Leonel Oliveira, que me mostrou o mundo da PRF com seriedade, comprovação e um nítido amor pelo que faz.

Aos meus amigos, que muitas vezes foram uma válvula de escape pelo esgotamento mental, que me deram apoio e suporte.

Obrigada pelas risadas, o papo leve e descontraído.

A toda Equipe da Faculdade de Odontologia e do PPG da UPF, Professores, Coordenadores, Prestadores de Serviços Gerais, pela estrutura, disponibilidade e meios de desenvolver todas as atividades.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Aplicação do PRF em Odontologia	20
2.2 Processo de Centrifugação	24
2.3 Ozonioterapia	30
3. PROPOSIÇÃO	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Aspectos éticos	40
4.2 Delineamento e grupos do estudo	40
4.2.1 Seleção dos pacientes e critérios de inclusão e exclusão	40
4.2.2 Obtenção das amostras	41
4.2.3 Centrifugação	44
4.2.4 Obtenção do plasma sanguíneo	46
5. RESULTADOS	50
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	62
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
9. REFERÊNCIAS	64
10. APÊNDICE	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores das plaquetas presentes nas matrizes de PRF e sangue total, antes e após a ozonização (p/mm³). 50

Tabela 2. Valores dos leucócitos presentes nas matrizes de PRF e sangue total, antes e após a ozonização. Unidade de medida p/mm³. 52

Tabela 3. Valores do VEGF-A presentes nas matrizes de PRF antes e após a ozonização. Unidade de medida pg/mL. 53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sequência da venopunção para obtenção das amostras. A) Antissepsia da tampa do tubo. B) Escolha do braço com melhor visualização das veias. C) Garroteamento do braço e palpação digital. D) Inserção do dispositivo venopuntor. E) Inserção e compressão do tubo sobre a tampa para seu completo enchimento. F) Remoção do dispositivo venopuntor. G) Compressão digital do local da punção e remoção do garrote..... 42
- Figura 2. Gerador de ozônio medicinal Medplus MX, Philozon, Brasil. 43
- Figura 3. Centrífuga Fibrin Fuge 25, Montserrat, Brasil 44
- Figura 4. Fluxograma dos grupos para contagem de plaquetas e leucócitos..... 45
- Figura 5. Fluxograma dos grupos para análise do VEGF-A..... 45
- Figura 6. Amostras coletadas de um doador voluntário. A) Matriz leucoplaquetária não ozonizada. B) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 40 μ g/mL. C) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 60 μ g/mL. D) Matriz leucoplaquetária não ozonizada. E) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 40 μ g/mL. F) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 60 μ g/mL. G) Sangue total não ozonizado. H) Sangue total ozonizado com 40 μ g/mL. I) Sangue total ozonizada com 60 μ g/mL 47

Figura 7. Contador hematológico eletrônico Icounter 5D, Diagno, Hungria. 48

Figura 8. Amostras das matrizes leucoplaquetárias armazenadas nos tubos para congelamento e transporte. A) Matriz leucoplaquetária não ozonizada. B) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 40µg/mL. C) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 60µg/mL. 49

Figura 9. Análise da quantidade de plaquetas entre os grupos das matrizes e sangue total, antes e após a ozonização. GI – Matriz leucoplaquetária sem ozonização, GII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 40µg/mL, GIII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 60µg/mL. 51

Figura 10. Análise da quantidade de leucócitos entre os grupos de PRF e sangue total, antes e após a ozonização. GI – Matriz leucoplaquetária sem ozonização, GII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 40µg/mL, GIII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 60µg/mL, GVII – Sangue total sem ozonização, GVIII – Sangue total ozoniado a 40µg/mL e GIX – Sangue total ozonizado a 60µg/mL. 52

Figura 11. Análise da quantidade de VEGF-A entre os grupos das matrizes leucoplaquetárias antes e após a ozonização. GIV – Matriz leucoplaquetária sem ozonização, GV – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 40µg/mL, GVI – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 60µg/mL. 54

LISTA DE ABREVIATURAS

- PRF** – Fibrina Rica em Plaquetas;
- A-PRF** – Fibrina Rica em Plaquetas Avançada;
- L-PRF** – Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos;
- PRP** – Plasma Rico em Plaquetas;
- PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas;
- VEGF** – Fator de crescimento endotelial vascular;
- TGF- β** – Fator de crescimento transformador β ;
- G-force** – Velocidade de centrifugação;
- EOA** – Enxerto de osso autógeno;
- MEV** – Microscopia eletrônica de varredura;
- FCR** – *Forca centrifuga relativa*;
- LSCC** – *Low Speed Centrifugation Concept*;
- CF** – Citometria de fluxo;
- EDTA** – Etilenodiaminotetracético;
- O₂** – Oxigênio;
- O₃** – Ozônio;
- H₂O₂** – Peróxido de Hidrogênio;
- EUA** – Estados Unidos da América;
- ST** – Sangue total;
- ML** – Matriz leucoplaquetária

RESUMO

A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um biomaterial conhecido pela sua capacidade de estimular a vascularização dos tecidos devido à alta concentração de plaquetas e fatores de crescimento derivados do sangue. A ozonioterapia destaca-se por sua ação antimicrobiana, melhora da circulação sanguínea, estímulo da oxigenação tecidual e promoção do alívio da dor. Este estudo teve como objetivo verificar a influência da aplicação do ozônio medicinal na contagem de células presentes nas matrizes leucoplaquetárias. Amostras de sangue humano de doadores voluntários foram utilizadas para obter as matrizes de plasma sanguíneo, utilizando uma centrífuga com força de 200g, durante 5 min. Contagens de plaquetas e leucócitos foram realizadas em amostras de sangue total (ST) e nas matrizes leucoplaquetárias (ML) após a centrifugação. O fator de crescimento endotelial VEGF-A foi quantificado nas matrizes leucoplaquetárias. Tanto nas avaliações do ST como nas do ML, as amostras foram divididas em: sem ozonização (não passaram pelo processo de ozonização), ozonização com concentração de 40µg/mL, e ozonização com concentração de 60µg/mL. Para medir a quantidade de plaquetas e leucócitos presentes tanto nas matrizes, quanto no sangue total, foi utilizado um contador hematológico automático e para analisar o VEGF-A presente nas matrizes, foi realizado o exame de expressão gênica. A contagem de células no plasma apresentou maiores concentrações de plaquetas no sobrenadante, contudo, registrou uma diminuição na quantidade de leucócitos quando comparada ao sangue total. O valor do VEGF-A não teve diferença significativa entre as

matrizes com e sem ozonização analisadas, mas mostrou uma quantidade muito superior ao valor de referência. A ozonização não interfere na contagem de plaquetas, leucócitos e VEGF-A das amostras testadas. A utilização do gás de ozônio também não mostrou prejuízos à matriz formada. A centrifugação com o método utilizado foi suficiente para aumentar consideravelmente o número de plaquetas na matriz, mas o tempo não foi suficiente para aumentar o número de leucócitos.

Palavras-chave: Regeneração, Cicatrização, Ozonioterapia, Fibrina Rica em Plaquetas

ABSTRACT

This study aimed to verify the influence of the application of medicinal ozone on the cell count present in leukoplatelet matrices. Human blood samples from volunteer donors were used to obtain blood plasma matrices, using a centrifuge with a force of 200g, for 5 min. Platelet and leukocyte counts were performed on whole blood samples (ST) and leukoplatelet matrices (ML) after centrifugation. The endothelial growth factor VEGF-A was quantified in leukoplatelet matrices. In both the ST and ML evaluations, the samples were divided into: without ozonation, ozonation with a concentration of 40µg/mL, and ozonation with a concentration of 60µg/mL. To measure the amount of platelets and leukocytes present both in the matrices and in whole blood, an automatic hematological counter was used and to analyze the VEGF-A present in the matrices, a gene expression test was performed. Plasma cell counts showed higher concentrations of platelets in the supernatant, however, there was a decrease in the number of leukocytes when compared to whole blood. The VEGF-A value had no significant difference between the matrices with and without ozonation analyzed, but showed an amount much higher than the reference value. Ozonation does not interfere with the platelet, leukocyte and VEGF-A count of the tested samples. The use of ozone gas also did not show any damage to the matrix formed. Centrifugation with the method used was enough to considerably increase the number of platelets in the matrix, but the time was not enough to increase the number of leukocytes.

Key words: Regeneration, Healing, Ozone Therapy, Platelet Rich Fibrin

1. INTRODUÇÃO

O processo biológico de cicatrização das feridas é complexo, envolvendo muitos eventos celulares, levando simultaneamente à reparação ou regeneração dos tecidos danificados. Quatro estágios são necessários para que ela ocorra de forma eficaz, descritos como hemostasia, inflamação, proliferação e maturação (CHOUKROUN; MIRON, 2017).

Muitas tentativas foram realizadas com objetivo de obter uma previsibilidade de resposta na regeneração frente aos danos teciduais, que incluíram estratégias com materiais sintéticos. Muitos deles estão disponíveis no mercado com suas especificidades, vantagens e desvantagens para o processo de regeneração tecidual. Apesar disso, poucos materiais sintéticos possuem potencial de promover o suprimento sanguíneo e angiogênese diretamente aos tecidos danificados (CHOUKROUN; MIRON, 2017)

O uso de concentrados de plaquetas foi introduzido há mais de 20 anos e seu conceito foi desenvolvido com o objetivo de utilizar as proteínas do sangue humano como fonte de fatores de crescimento capazes de apoiar a angiogênese e o crescimento tecidual, baseado em que o suprimento sanguíneo é imperativo na regeneração dos tecidos (CHOUKROUN et al., 2006; KIRAN; MUKUNDA; TILAK RAJ, 2011), além de influenciar na integração do biomaterial no tecido

circundante, fornecendo uma conexão eficaz com a rede de vasos sanguíneos do tecido periimplantar do hospedeiro (GHANAATI et al., 2011).

A utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) na cirurgia oral estimula o reparo e a formação óssea (FURSEL et al., 2021). O concentrado PRP, ao utilizar trombina bovina e cloreto de cálcio, visam acelerar os estágios finais da coagulação e promover a rápida polimerização da fibrina. Essa reação rápida é crucial para uma fixação quase imediata e impacta as propriedades mecânicas e biológicas da matriz de fibrina resultante (DOHAN et al., 2006b). No entanto, o uso de trombina bovina que é utilizada nesse protocolo, muitas vezes, torna-se perigoso, uma vez que podem se formar anticorpos V, XI, e fatores de trombina, que contribuem para a coagulopatia (FURSEL et al., 2021).

A fibrina rica em plaquetas (PRF) pertence a uma nova geração de concentrados de plaquetas, com um processo simplificado e sem manipulação bioquímica do sangue (CHOUKROUN et al., 2006). A PRF foi utilizada pela primeira vez, especificamente em cirurgia oral e maxilofacial, por Joseph Choukroun, em 2001, e foi denominado de forma moderna de plaquetas (DOHAN et al., 2006b). Ela consiste em uma matriz fibrina autóloga com muitos benefícios em comparação com o PRP, incluindo melhor armazenamento, ausência de aditivos e fácil manejo (CHOUKROUN et al., 2006).

A tecnologia PRF é muito simples de usar, não onerosa, (DOHAN EHRENFEST et al., 2014) e eficiente em muitas aplicações orais (DOHAN EHRENFEST et al., 2013), onde a amostra de sangue é coletada em tubos de 9mL e imediatamente centrifugada

(SIMONPIERI et al., 2011). Como os anticoagulantes foram removidos, o sangue está sujeito a coagulação ao longo do tempo, portanto, é necessário um protocolo de centrifugação curto e rápido para que a sedimentação das hemácias ocorra antes da coagulação (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009). Após a centrifugação, um grande coágulo de PRF pode ser coletado no meio de cada tubo (SIMONPIERI et al., 2011).

As células contidas na matriz, após a centrifugação da coleta sanguínea incluem plaquetas e leucócitos contendo fatores de crescimento e citocinas derivadas do sangue (KOBAYASHI et al., 2016). Sabe-se que as plaquetas liberam diferentes fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que está envolvido na vascularização, e fator de crescimento transformador β (TGF- β), que tem efeito regulador sobre as células envolvidas em novos tecidos em formação (CHOUKROUN; MIRON, 2017; EKSTRÖM et al., 2013; FUJIOKA-KOBAYASHI; MIRON, 2017; LUCARELLI et al., 2003; PERUT et al., 2013).

Altas forças de centrifugação tendem a empurrar as células para o fundo dos tubos de coleta, enquanto a PRF é coletada da terceira camada superior. Estudos confirmaram que reduzir a velocidade de centrifugação (*G-force*), resulta em uma maior concentração de leucócitos e fatores de crescimento dentro da matriz de PRF (GHANAATI, SHAHRAM et al., 2014; MIRON et al., 2020).

A liberação dos fatores de crescimento prolongada, sustentada e lenta de todos os grupos PRF pode apoiar a migração e a proliferação

celular, além de oferecer vantagens no processo de cicatrização de feridas (EL BAGDADI et al., 2019).

No método de ozonização, o ozônio dissolvido no plasma reage imediatamente com biomoléculas para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e produtos de oxidação lipídica (LOPs), que atuam como mensageiros/moléculas de sinalização de ozônio, resultando nos efeitos biológicos e terapêuticos da ozonização. Essas moléculas sinalizadoras afetam a hemoglobina e a albumina, que são as proteínas mais abundantes nos glóbulos vermelhos e no plasma, respectivamente. Por estas proteínas desempenharem funções fisiológicas importantes, mudanças estruturais resultantes de intervenções e procedimentos terapêuticos adicionais, como auto-hemoterapia ozonizada, podem causar disfunção em concentrações incorretas podem causar disfunções (MEHRABAN; SEYEDARABI, 2023).

Tendo em vista a crescente utilização da ozonioterapia em associação com o sangue e com os concentrados sanguíneos, faz-se necessária uma padronização da obtenção desta agregação, uma vez que a literatura sobre a associação das duas técnicas é escassa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aplicação do PRF em Odontologia

A fibrina rica em plaquetas é uma das quatro principais famílias de concentrados plaquetários para o uso em cirurgias (DOHAN EHRENFEST et al., 2013), pela sua capacidade de estimular rapidamente a vascularização dos tecidos devido à alta concentração de plaquetas e fatores de crescimento derivados do sangue (MIRON et al., 2017).

Em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial, a reconstrução de defeitos ósseos é um problema comum. Existem muitas razões para a formação desses defeitos, o que inclui trauma, infecções, formação congênita, doença oncológica e perdas dentárias precoces. O uso de osso autólogo para substituir o osso perdido ainda é o padrão-ouro, pois contém células osteogênicas que estimulam a produção de osso novo, bem como características osteoindutoras e osteocondutoras (STUMBRAS et al., 2020). No entanto, a coleta óssea autóloga está associada a um maior tempo de cicatrização e morbidade pós-operatória (CLAVERO; LUNDGREN, 2003), além de ter quantidade limitada e ter taxa de reabsorção desconhecida (CLAVERO; LUNDGREN, 2003; STUMBRAS et al., 2020; WILTFANG et al., 2005).

Além disso, substitutos de enxertos ósseos de origem xenogênica, alogênica e aloplástica têm limitações, principalmente por ter apenas capacidade osteocondutora, funcionando como um suporte para o reparo ósseo. Segundo alguns autores, os aloenxertos ósseos liofilizados desmineralizados possuem potencial osteoindutor, mas isso depende do processamento do doador e do banco de tecidos (A. ZUMSTEIN et al., 2012). Ainda, os enxertos ósseos alogênicos apresentam desvantagens, como alto custo, dificuldades de esterilização, reação imune do hospedeiro e transmissão de doenças (STUMBRAS et al., 2020).

É impossível encontrar enxerto de osso autógeno (EOA) maiores que 10mL na cavidade oral, obrigando a escolha de sítios doadores extraorais. A utilização de PRF ajuda a reduzir o volume ósseo autógeno necessário, além de aproveitar as capacidades osteogênicas das plaquetas (BETTEGA et al., 2009). É uma técnica amplamente utilizada em procedimentos cirúrgicos pelas suas propriedades cicatrizantes, alta concentração de fibrina e de fator de crescimento (JAMES C; SUMEET, 2002; TAMIMI et al., 2007).

Sendo o substituto ósseo, xenogênico ou sintético, um arcabouço osteocondutor, a interação dos biomateriais com a matriz do coágulo sanguíneo parece ser um ponto fundamental para promover a resposta reparadora (OLIVEIRA et al., 2018).

Alguns estudos tem demonstrado que o uso de Fibrina Rica em Leucócitos e Plaquetas (L-PRF) nas cirurgias reconstrutivas por enxertia óssea tem atuado como adjuvante importante (CHOUKROUN et al., 2006; SIMONPIERI et al., 2011). Sua ação é promover a hemostasia, bem como a migração e adesão celular,

atuando no leito dos tecidos lesados como um arcabouço tridimensional constituinte do coágulo sanguíneo (LITVINOV et al., 2021) com finalidades regenerativas, representando um microambiente tissular favorável à acomodação celular para reorganização dos tecidos (DOHAN EHRENFEST et al., 2010).

O uso de produtos biológicos autólogos, como matrizes à base de PRF, em conjunto com biomateriais xenogênicos tem despertado interesse terapêutico. Vários estudos clínicos, particularmente em periodontia, detalharam o uso de matrizes de PRF usando vários métodos de centrifugação em combinação com biomateriais à base de colágeno (AROCA et al., 2009). Porém, os resultados nem sempre são consistentes. Algumas pesquisas descobriram que a adição de PRF a biomateriais à base de colágeno teve um efeito favorável, oferecendo suporte estrutural e ajudando na reconstrução dos tecidos, enquanto outras não encontraram efeito significativo (GHANAATI et al., 2018).

Zhang e colaboradores (2012), obtiveram resultados positivos quando associaram PRF ao enxerto bovino, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle. O mesmo resultado foi obtido em outro estudo para atrofia maxilar posterior, onde os grupos com e sem associação de membranas de PRF tiveram desempenho semelhantes (BOLUKBASI et al., 2015). No entanto, outros estudos demonstraram uma melhora na qualidade biomecânica com a associação da membrana de PRF (TROEDHAN et al., 2015), ganho ósseo significativo quando comparado ao grupo controle (BOORA; RATHEE; BHORIA, 2015) além de aumentar a estabilidade primária (KOTSAKIS et al., 2016) e secundária dos implantes (ÖNCÜ; ALAADDINOĞLU, 2015).

Este coágulo de PRF reúne a maioria das plaquetas e metade dos leucócitos (principalmente os linfócitos) da amostra de sangue (DOHAN EHRENFEST et al., 2010), e por isso é chamado de fibrina rica em leucócitos e plaquetas (L-PRF) (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009). Em comparação com géis de PRP, este PRF gel é particularmente forte e libera durante mais de 7 dias, quantidades significativamente maiores das principais moléculas de coagulação e cicatrização (trombospondina-1, fibronectina, vitronectina) e fatores de crescimento, particularmente os fatores de crescimento plaquetário TGF β 1, PDGF e VEGF (DOHAN EHRENFEST et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2016).

Por causa da estrutura tridimensional da fibrina na matriz de PRF é capaz de aprisionar um maior número de leucócitos que depois libertam citocinas e fatores de crescimento que se difundem nos tecidos num tempo gradual e contínuo por um período de 10 dias (MIRON et al., 2017).

O VEGF-A (Fator de Crescimento Endotelial Vascular A) é uma proteína que desempenha um papel importante na regulação da angiogênese, ou seja, no processo de crescimento e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. É uma das várias isoformas de VEGF, cada uma com funções específicas (OLIVEIRA, 2020).

O VEGF-A é secretado por várias células em resposta a condições como hipóxia (baixo teor de oxigênio) e lesões teciduais, e desempenha um papel vital em situações em que é necessária uma maior vascularização (fornecimento de sangue) para os tecidos. Suas principais funções incluem a estimulação da angiogênese (processo

essencial para o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes aos tecidos em crescimento ou lesados), permeabilidade vascular (permitindo que proteínas e células do sangue saiam dos vasos e entrem nos tecidos, desempenhando um papel importante na resposta inflamatória) e a manutenção dos vasos sanguíneos (manutenção e reparo dos vasos sanguíneos existentes) (OLIVEIRA, 2020).

2.2 Processo de Centrifugação

A centrifugação é uma técnica amplamente utilizada para separar uma mistura biológica dentro de uma fase líquida. Os princípios dessa técnica baseiam-se no uso da força centrífuga, que é muito superior à da gravidade. Durante o processo de centrifugação, há interação de diferentes forças que influenciam no movimento das partículas dentro do líquido, o que inclui a força centrífuga, a gravitacional e a de arrasto das partículas (células). A migração das partículas vai depender do seu tamanho, densidade e massa (MIRON et al., 2017).

Para a preparação de PRF sólido, de acordo com protocolo estabelecido de Choukroun, tubos de vidro foram usados para coletar o sangue. Uma superfície específica de vidro permite a ativação da cascata de coagulação durante o processo de centrifugação para gerar um coágulo de fibrina. Além disso, a aplicação de uma alta força relativa de centrifugação (RCF); isso é, 708 g, se faz necessária (MIRON et al., 2017).

A ausência de anticoagulante resulta na ativação em poucos minutos da maioria das plaquetas em contato com as paredes do tubo e a liberação da cascata de coagulação. Ao final do procedimento, três camadas são formadas, sendo que na inferior ficam os glóbulos vermelhos, na do meio o coágulo de fibrina e na superior o plasma acelular (DOHAN et al., 2006a; MIJIRITSKY et al., 2021).

A técnica é simples de realizar e o material é fácil de preparar. Outra vantagem é a diminuição do desconforto do paciente no pós-operatório, durante os estágios iniciais da cicatrização de feridas. Na técnica PRF, o tempo e o custo de preparo são menores quando comparados à do PRP. No entanto, também existem limitações quanto ao seu uso. Embora exista estudos que apoiem o uso de PRF para fins periodontais e reparo de tecidos moles, ainda não tem dados suficientes sobre os efeitos do PRF no reparo do tecido duro durante a regeneração óssea (CHOUKROUN et al., 2006; MIJIRITSKY et al., 2021). Outra limitação é que por ser preparado a partir de sangue autólogo, apenas pequenas quantidades podem ser produzidas em uma única vez para obter PRF utilizável, além do processo de preparação ser realizado o mais rápido possível (MIJIRITSKY et al., 2021).

É muito importante considerar o tempo de preparo, que deve ser o menor possível entre a coleta de sangue e sua centrifugação para obter um produto clinicamente válido. Do contrário, o fibrinogênio será convertido em fibrina de forma difusa ao longo do tubo e após a centrifugação, pode ser observada uma quantidade mínima de PRF, com baixa consistência, e assim, será inutilizável (GIANNINI *et al.*, 2015).

Após a centrifugação do sangue, é feita a remoção do PRF, com o uso de pinça cirúrgica apropriada, deixando o sobrenadante acelular, o plasma pobre em plaquetas (PPP) no tubo. Por fim, a camada de PRF deve ser separada da camada inferior rica em glóbulos vermelhos com auxílio de uma tesoura estéril. O PRF, quando comprimido, resulta em uma membrana de consistência tenso-elástica e é capaz de resistir à tração da sutura (GIANNINI *et al.*, 2015).

Vários estudos vêm demonstrando que protocolos com velocidade de centrifugação reduzida, que indicam uma redução da força de centrifugação, formam uma matriz PRF com maior número de células e plaquetas (MIRON *et al.*, 2020).

As diferenças exatas entre os vários materiais e métodos para produzir a fibrina rica em leucócitos e plaquetas (L-PRF) e as características dos diferentes produtos L-PRF não foram claramente demonstradas e publicadas cientificamente até o momento, seja pela variação dos materiais e métodos que não oferecem o mesmo material que o L-PRF original, seja pela incompreensão devido às confusões criadas por declarações comerciais e reivindicações de marketing (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2017).

O protocolo do L-PRF original foi estabelecido utilizando-se uma centrífuga de mesa de alta qualidade, com tubos específicos, na velocidade de 2700 RPM por 12 minutos (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2017). Já a fibrina rica em plaquetas avançada (A-PRF) é uma variação do L-PRF original que consiste na diminuição da velocidade de centrifugação (1500 RPM), com um tempo maior (14 min) e com tubos de vidro (GHANAATI *et al.*, 2014).

Um estudo de Ghanaati et al., 2014, mostrou que tipos específicos de células são distribuídos diferencialmente dependendo da força centrífuga (cumulativa), permitindo que o conceito de que compósitos ideais sejam adaptados para aplicações clínicas específicas. Estes compostos poderosos podem contribuir para a cicatrização de feridas e reparação e regeneração de tecidos. Além disso, o A-PRF parece ser um fornecedor ideal de células autólogas (especialmente neutrófilos e macrófagos), permitindo a estimulação mútua, criando assim uma relação sinérgica no interesse da regeneração tecidual.

Os fatores de crescimento são moléculas sinalizadoras importantes no processo de cicatrização de feridas e na regeneração dos tecidos, podendo ter sua liberação aprimorada quando preparadas seguindo o *Low-Speed Centrifugation Concept* (LSCC). Isso pode oferecer uma ferramenta para influenciar a comunicação célula-célula, alterando seletivamente um fator de crescimento específico ou tipo celular (WEND et al., 2017).

Todas as centrífugas, por serem instrumentos mecânicos, possuem características mecânicas específicas que diferem significativamente entre os diversos modelos disponíveis. Nos casos das centrífugas utilizadas para a produção de L-PRF, os parâmetros mais relevantes para avaliar são as vibrações das centrífugas durante o processo de centrifugação, os choques de vibração durante as fases de aceleração e uma eventual ressonância das vibrações (DOHAN EHRENFEST et al., 2017).

Dohan Ehresnfet e colaboradores, em 2017, revelaram diferenças significativas na liberação dos fatores de crescimento entre

as membranas L-PRF originais e as membranas A-PRF. A lenta liberação dos quatro fatores de crescimento testados a partir das membranas L-PRF originais demonstrou uma assinatura biológica mais intensa em comparação com as membranas A-PRF. Além disso, observaram que os coágulos e membranas L-PRF (produzidos com 9 mL de sangue) eram consistentemente maiores do que os coágulos e membranas A-PRF (produzidos com 10 mL de sangue). As membranas A-PRF dissolveram-se *in vitro* em menos de 3 dias, enquanto as membranas L-PRF mantiveram boa forma por pelo menos 7 dias. Essas diferenças foram atribuídas aos protocolos distintos de preparação, especialmente em relação às forças de centrifugação, mesmo utilizando a mesma centrífuga para ambos os produtos. Concluíram que os protocolos produzem materiais distintos, independentemente das características da centrífuga, sugerindo expectativas de resultados clínicos significativamente diferentes entre os dois produtos.

Ainda sobre a busca de estabelecer um método que possa ser idealmente concluído em um curto período de tempo, um estudo mostrou diferença significativa na presença de neutrófilos nos coágulos, sendo superior no de A-PRF comparado ao L-PRF. Essa comprovação se deu por meio de análise histomorfométrica, que permitiu avaliar e comparar a distribuição celular nos coágulos de fibrina. Embora não tenha sido comprovada definitivamente, observou-se, também, que a diminuição da velocidade de centrifugação, aliada ao aumento do tempo, resultaram em maiores concentrações de plaquetas na parte distal do coágulo (GHANAATI et al., 2014).

Kubesch e colaboradores, (2019), realizaram um estudo *in vivo* que procurou determinar se a alteração do parâmetro de preparação das matrizes de fibrina afeta a reação celular, a vascularização do leito de implantação e o potencial regenerativo. Os resultados destacam o potencial angiogênico das matrizes à base de PRF e indicam que a redução da RCF usando o LSCC altera seletivamente a estrutura da fibrina e o número de células incluídas. Ao considerar que as células dentro das matrizes de PRF são um complexo sistema natural de liberação de drogas, a modificação do protocolo de preparação pode ser uma ferramenta para aumentar o potencial de regeneração nas regiões específicas de interesse. Em conclusão, matrizes sólidas e líquidas à base de PRF e especialmente aquelas geradas baseadas no LSCC podem ser benéficas para pesquisadores clínicos e de ciências básicas para entender melhor a comunicação entre células nos processos de cicatrização de feridas e regeneração de tecidos.

Em relação aos materiais de coleta, os tubos utilizados podem ser de vidro puro ou de plástico com sílica para ativação do coágulo. Um estudo demonstrou que os tubos plásticos com ativador comercializados contêm sílica citotóxica em seu revestimento interno. Essas micropartículas são incorporadas a matriz de fibrina e implantadas para regeneração dos tecidos. Os autores ponderaram sobre a possibilidade de ter a regeneração tecidual dificultada ou interrompida, embora não haja relatos na literatura sobre complicações graves decorrentes do processo de fabricação das matrizes a partir desse material (MASUKI et al., 2020). No entanto, não há indicação na literatura de ineficiência, implicações tóxicas ou imunogênicas pelo

uso dos tubos plásticos com ativadores de coágulo na obtenção de matrizes de PRF (DE OLIVEIRA et al., 2020).

As características das centrífugas e os protocolos de centrifugação têm um impacto muito significativo nas células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina de um coágulo e membrana de L-PRF. Qualquer modificação, seja de materiais e/ou do método original, deve ser claramente investigada e identificados separadamente dos métodos originais (DOHAN EHRENFEST et al., 2017). Ainda, pesquisas investigando as características dos tubos se fazem necessárias para otimização do PRF, já que estudos demonstram influência na obtenção dos agregados plaquetários nos diferentes materiais utilizados (DE OLIVEIRA et al., 2020; DOHAN EHRENFEST et al., 2017; MIRON et al., 2020).

2.3 Ozonioterapia

A discussão acerca da eficácia do ozônio medicinal vem gerando incertezas sobre seu uso. Ele começou a ser utilizado como tratamento médico no início do século XX. Os primeiros relatos sobre sua utilização remontam à Primeira Guerra Mundial, quando foi empregado na desinfecção de feridas e para combater infecções (BOCCI, 2005). No entanto, o uso do ozônio na medicina evoluiu ao longo do tempo e tem sido aplicado de diversas maneiras em diferentes países. Outros usos terapêuticos incluem o tratamento de esclerose múltipla (AMELI et al., 2019; DELGADO-ROCHE et al., 2017), diabetes (BOCCI et al., 2011, 2014) e úlceras de pés diabéticos

(IZADI et al., 2019; KUSHMAKOV et al., 2018; WEN; CHEN, 2020), doenças cardiovasculares (BOCCI; ZANARDI; TRAVAGLI, 2011a; JUCHNIEWICZ; LUBKOWSKA, 2020), fragilidade cognitiva (SCASSELLATI et al., 2020), doenças de pele (TRAVAGLI et al., 2010; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005; ZENG; LU, 2018), dor (ROWEN; ROBINS, 2019; SCONZA et al., 2020) e inflamações (TARTARI et al., 2020).

Baseado no pré-condicionamento da oxidação (LEÓN et al., 1998) ou na teoria de hormese, a qual propõem que baixas doses de uma substância nociva podem ser benéficas (CALABRESE, 2010), o ozônio, na via de ozonização, terá ação terapêutica benéfica, desde que as concentrações usadas estejam corretas e o método, apropriado (J. SMITH et al., 2015; SAGAI; BOCCI, 2011).

Ozônio (O_3) é a forma alótropa triatômica do oxigênio (O_2), que é muito reativa (menos estável) e 10 vezes mais solúvel em água e plasma do que a forma alótropa diatômica (O_2). É um dos oxidantes mais fortes da natureza, sua potência é a terceira depois do flúor e do persulfato e é superior ao O_2 (BOCCI, 2011).

A ozonioterapia consiste na utilização médica de uma mistura gasosa de O_3/O_2 , obtido a partir de oxigênio de uso médico por meio de um dispositivo gerador de ozônio e que deve ser administrado no local onde foi produzido, por causa da meia-vida curta (aos 20°C, a concentração de O_3 é reduzida pela metade em 40 minutos, já em 30°C, em 25 minutos) (BOCCI, 2011). O resultado é uma mistura de gases, tendo em sua composição de 1 a 5% de ozônio e 95 a 99% de oxigênio (TRAVAGLI et al., 2007). Assim, embora mais de 95% da mistura

gasosa seja sempre oxigênio, pequenas variações no conteúdo de O₃ altera seus efeitos potenciais (CLAVO et al., 2019).

O ozônio pode ser produzido no corpo por neutrófilos, através da reação catalítica das células imunes, a partir de moléculas únicas de oxigênio produzidas endogenamente e anticorpos (BABIOR et al., 2003). Também é gerado de forma endógena em tecidos vivos através da oxidação da água por moléculas de oxigênio singlete, uma reação que é catalisada por anticorpos ou aminoácidos (ONYANGO, 2016).

O termo ozonização refere-se ao processo quando o ozônio é usado no tratamento (NAZARI et al., 2018), já o termo ozonólise é qualquer reação com o ozônio, especialmente uma reação com uma ligação dupla que resulta na clivagem de ligação (MEHRABAN; SEYEDARABI, 2023).

Ele é capaz de criar um estresse oxidativo leve, transitório e controlado, a fim de induzir a síntese de enzimas antioxidantes (BOCCI et al., 2007) e reduzir o estresse oxidativo endógeno (BOCCI et al., 2009; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2005; SMITH et al., 2017). Além disso, pode ativar a produção de fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento transformador beta na cicatrização de feridas e inibir a formação de fator necrótico tumoral alfa, reduzindo a inflamação (BOCCI; ZANARDI; TRAVAGLI, 2011a, 2011b).

A utilização do ozônio se dá por dois métodos gerais: indiretos e sistemáticos, ou seja, envolvem a introdução do ozônio no corpo de forma não direta como a auto-hemoterapia ozonizada maior (MAH) (VIEBAHN-HÄNSLER; LEÓN FERNÁNDEZ; FAHMY, 2012),

insuflações retais e vaginais de ozônio para efeitos sistêmicos (BOCCI, 1994; MASLENNIKOV et al., 2008), ou diretos e tópicos, nos quais a aplicação do ozônio é feita de forma direta em uma área específica do corpo ou na superfície da pele; como o ensaque de ozônio, aplicação de óleo ozonizado sobre feridas ou infecções cutâneas e injeções de ozônio para tratamento da dor ou inflamação (MASLENNIKOV et al., 2008).

No caso MAH, uma pequena quantidade de sangue é extraída na presença de um anticoagulante, exposta a uma certa quantidade de ozônio na proporção de 1:1 e depois reinfundida na corrente sanguínea do paciente (OZLER et al., 2011; SCHIMIDT, 2002). O ozônio liga-se ou difunde-se nas células sanguíneas e em outros órgãos e ativa vias bioquímicas distintas (BOCCI, 2007). Quando dissolvido no plasma reage imediatamente com moléculas biológicas e produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a primeira molécula sinalizadora (com vida útil mais curta) e produtos de peroxidação lipídica (LOPs), a segunda molécula sinalizadora (que tem vida útil mais longa). As proteínas albumina (mais abundante no plasma) e hemoglobina (mais abundante nos glóbulos vermelhos) são mais afetadas pela ozonização (FANALI et al., 2012; MOUSAVY et al., 2009).

A ozonioterapia é uma abordagem não invasiva que pode melhorar a circulação sanguínea, estimula a oxigenação tecidual e promove o alívio da dor, através da redução das ocitocinas inflamatórias que estão aumentadas em casos de inflamação, além de contribuir para a liberação de fatores de crescimento (ANTONINO et al., 2023).

Segundo Bocci, (2005), a dose máxima de ozônio que se pode utilizar é 80µg/mL, como forma bactericida, sendo 40µg/mL o mínimo para o mesmo efeito. Já para terapias biomoduladoras, a dosagem fica na janela de 5 a 40µg/mL.

No entanto, Viebahn-Haensler e Fernández, em 2021, reavaliaram suas próprias investigações e publicações sobre a ozonioterapia e concluíram que a faixa de concentração de ozônio para aplicações sistêmicas na forma de MAH não deve exceder 10–40µg/mL. Além dos 50µg/mL, um efeito tóxico do ozônio deve ser levado em conta, e 80µg de ozônio por mL de sangue nunca deve ser usado.

O sangue humano é um tecido fluido complexo e os componentes celulares e plasmáticos podem reagir de maneira diferente com o ozônio, dependendo da sua composição química e dos parâmetros bioquímicos intrínsecos. Portanto, concentrações inadequadas de ozônio podem danificar biomoléculas através da via da ozonólise. Sendo assim, é importante determinar com precisão quanto ozônio é neutralizado pelos antioxidantes no sangue e quanto ainda precisa ser reagido (MEHRABAN; SEYEDARABI, 2023).

Anitua et al, em 2014, realizaram um estudo *in vitro* que investigou os efeitos de diferentes tratamentos com ozônio no plasma rico em fatores de crescimento (PRGF). O PRGF humano foi tratado com ozônio usando dois protocolos: método de fluxo contínuo e método de seringa. Foram testadas três concentrações de ozônio (20, 40 e 80 µg/mL). Concluiu-se que o método de fluxo contínuo prejudicou a formação da estrutura de fibrina, reduziu os níveis de fatores de crescimento e diminuiu o potencial proliferativo do PRGF.

Por outro lado, o método da seringa não alterou os resultados biológicos. Além disso, observou-se que doses baixas de ozônio não alteraram as propriedades do PRGF, mas doses mais altas induziram efeitos destrutivos. Esses resultados ressaltam a importância da dose e do método de combinação do ozônio com o PRGF para garantir seus efeitos terapêuticos.

Em um estudo, 20 pacientes com fibromialgia foram tratados com 10 sessões de hemoterapia com ozônio, com concentração de 30-60 mcgr/ml. O estado de saúde dos pacientes foi avaliado antes e após o tratamento, por meio de um questionário. As amostras de sangue foram coletadas de todos os pacientes para análises bioquímicas de rotina, incluindo níveis de serotonina no soro. Além disso, células mononucleares do sangue periférico (BMCs) foram isoladas para quantificação do estresse oxidativo, medindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica (LP) e conteúdo de proteína carbonila (PC), que são indicadores de dano celular oxidativo. Os pacientes tratados com ozônio relataram uma melhora significativa no sono e no estado de alerta mental, além de uma diminuição acentuada da astenia, acompanhada por uma redução notável no índice de qualidade de vida e nos pontos sensíveis. Houve também um aumento moderado nos níveis de serotonina e redução do estresse oxidativo (MORENO-FERNÁNDEZ et al., 2012).

Em um relato de caso, uma paciente com Síndrome de Sjögren foi submetida a um tratamento com ozônio após não obter sucesso com várias tentativas de outras terapias. O protocolo envolveu a administração de ozônio em sangue autólogo, com ajuste preciso de da dosagem e intervalos regulares de tratamento, ao longo de seis

semanas. O tratamento com auto-hemoterapia ozonizada mostrou-se eficaz na redução dos ANA (anticorpo antinuclear positivo) e na total regressão dos sintomas, após a segunda sessão. (VALDENASSI *et al.*, 2022).

As plaquetas são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), que desempenham um papel fundamental na ativação e agregação plaquetária. Essas espécies, como o peróxido de hidrogênio, o óxido nítrico e os produtos de oxidação lipídica, estão presentes em concentrações fisiológicas durante o processo de coagulação. Eles são importantes para regular a função plaquetária e influenciar a cascata de coagulação (DAVÌ; PATRONO, 2007).

O efeito negativo desses radicais é neutralizado por uma variedade de mecanismos antioxidantes no corpo. Isso inclui eliminadores de oxidantes, como a vitamina C e a vitamina E, bem como minerais quelantes, como Fe^{2+} e Cu^{+} , que ajudam a remover íons metálicos que podem catalisar a formação de radicais livres. Além disso, uma série de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, atuam para desativar os radicais livres e proteger as células do dano oxidativo. Esses sistemas antioxidantes são essenciais para manter o equilíbrio redox no organismo e prevenir danos celulares (ANRAKU *et al.*, 2013).

Manter um equilíbrio adequado entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as moléculas protetoras é fundamental para a sobrevivência celular e a preservação dos tecidos saudáveis. Um excesso de ERO pode levar ao estresse oxidativo, danificando as biomoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e contribuindo para o desenvolvimento de várias doenças. Portanto, a

regulação cuidadosa do equilíbrio redox é essencial para a homeostase celular e a saúde geral do organismo (FERRONI et al., 2012).

Evidências recentes sugerem que o ozônio pode ser utilizado para aumentar a capacidade antioxidante do sangue e seus derivados. Isso levanta a possibilidade de que o ozônio possa ser uma ferramenta útil no tratamento de várias doenças infecciosas crônicas, distúrbios imunológicos ou neurodegenerativos. No entanto, ainda há muito a ser entendido sobre como o método de tratamento com ozônio e sua concentração específica podem afetar as propriedades da terapia biológica e seus resultados clínicos. Mais pesquisas são necessárias para determinar o potencial terapêutico do ozônio e otimizar sua utilização em diferentes condições médicas (ANITUA et al., 2014).

A Declaração de Madrid na Ozonoterapia indica a proporção de 1:1 de sangue e ozônio, na auto-hemoterapia menor. Seguindo este conceito, será aplicada a mesma proporção, uma vez que para L-PRF não existe padronização (DECLARAÇÃO DE MADRID SOBRE TERAPIA OZÔNICA; ISCO3, 2010).

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral:

Verificar a influência da ozonização nas matrizes leucoplaquetárias

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Esse estudo tem por objetivos específicos:

1. Quantificar as plaquetas e leucócitos de matrizes leucoplaquetárias com e sem ozonização, testando a hipótese nula de que o processo de ozonização não afeta o número desses elementos nas matrizes;

2. Quantificar as plaquetas e leucócitos do sangue com e sem ozonização, testando a hipótese nula de que o processo de ozonização não afeta o número desses elementos no sangue;

3. Comparar a quantidade de plaquetas e leucócitos do sangue e das matrizes leucoplaquetárias, testando a hipótese de que o processo de centrifugação interfere nesses elementos;

4. Quantificar o VEGF-A em matrizes leucoplaquetárias com e sem ozonização, testando a hipótese de que o processo de ozonização aumenta os valores de VEGF-A;

5. Comparar duas concentrações de ozônio do processo (40µg/mL 60µg/mL), testando a hipótese nula de que a concentração não afeta nos valores de leucócitos, plaquetas e VEGF-A.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Previamente ao início deste estudo, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo e foi aprovado sob o número 6.547.726. Todos os pacientes envolvidos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo).

A coleção sanguínea para obtenção de agregados leucoplaquetários autólogos para uso não transfusional no âmbito da Odontologia pode ser realizada pelo cirurgião-dentista em território brasileiro. Tal prática está regulamentada pela resolução 158/2015 do Conselho Federal de Odontologia.

4.2 Delineamento e grupos do estudo

Trata-se de um estudo cego laboratorial que avaliou a quantidade de plaquetas, leucócitos e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGF-A) de matrizes leucoplaquetárias obtidas pela coleta de sangue venoso de voluntários, ozonização das amostras e posterior centrifugação.

4.2.1 Seleção dos pacientes e critérios de inclusão e exclusão

Foram coletadas amostras de sangue de 8 doadores voluntários, com idade entre 30 e 51 anos. Foram incluídos homens e mulheres saudáveis, que não faziam uso de anticoagulantes ou drogas ilícitas.

Foram excluídos da amostra gestantes, lactantes, alcoólatras e fumantes.

As análises de plaquetas e leucócitos foram realizadas em parceria com um laboratório comercial da cidade de Passo Fundo. Para análise do VEGF, as amostras foram coletadas no mesmo dia e enviadas a um laboratório externo parceiro.

4.2.2 Obtenção das amostras

As amostras de sangue foram obtidas em tubos de plástico de 4 mL com anticoagulante (EDTA) (Greiner Bio-One, Brasil). Foi realizada antissepsia das tampas previamente a coleta. A antissepsia do local foi realizada com *swaab* de álcool 70% (Labor Import, Índia), em único movimento ascendente. A flebotomia deu-se através do garroteamento do braço e identificação da veia mais calibrosa (preferencialmente a veia intermédia antecubital). A agulha do dispositivo venopuntor (Greiner Bio-One, Brasil) foi introduzida com bisel voltado para cima, em angulação de 15° a 30°, em movimento único. O tubo foi apoiado no interior do adaptador de agulhas e comprimido para perfuração da tampa de borracha até seu completo

enchimento (Figura 1). Foram coletadas 9 amostras para cada voluntário.



Figura 1. Sequência da venopunção para obtenção das amostras. A) Antissepsia da tampa do tubo. B) Escolha do braço com melhor visualização das veias. C) Garroteamento do braço e palpção digital. D) Inserção do dispositivo venopuntor. E) Inserção e compressão do tubo sobre a tampa para seu completo enchimento. F) Remoção do dispositivo venopuntor. G) Compressão digital do local da punção e remoção do garrote.

Na troca de tubos o procedimento foi repetido e, após remoção do último tubo, realizou-se a compressão da veia puncionada com rolo de algodão estéril para remoção da agulha. A coleta não ultrapassou 2 minutos para as 9 amostras de cada voluntário.

Dessas amostras, três não foram ozonizadas, para controle. Outros seis tubos passaram pelo processo de ozonização com 4 mL de gás de ozônio, três deles na concentração de $40\mu\text{g/mL}$ e três com $60\mu\text{g/mL}$, introduzidos ao tubo com auxílio de uma seringa de 5mL (BD, Brasil) e agulha 21G (BD, Brasil) e realizada a homogeneização com movimento de pêndulo. O gás foi gerado através de um gerador de ozônio específico Medplus MX (Philozon, Brasil) (Figura 2).



Figura 2. Gerador de ozônio medicinal Medplus MX, Philozon, Brasil.

Um tubo do grupo controle, um tubo com ozônio a 40µg/mL e outro a 60µg/mL, não passaram pelo processo de centrifugação, visando realizar a análise do sangue total.

4.2.3 Centrifugação

A centrifugação foi realizada utilizando a centrífuga Fibrinfuge25® (Montserrat, Brasil) (Figura 3), com força centrífuga relativa (FCR) de 200g, durante 5 minutos, iniciando imediatamente após a coleta e preparo das amostras ozonizadas.



Figura 3. Centrífuga Fibrin Fuge 25, Montserrat, Brasil

Para avaliar a quantidade celular das matrizes leucoplaquetárias e o fator VEGF-A, foram utilizados 9 grupos (n=8), dispostos da seguinte forma (Figuras 4 e 5):

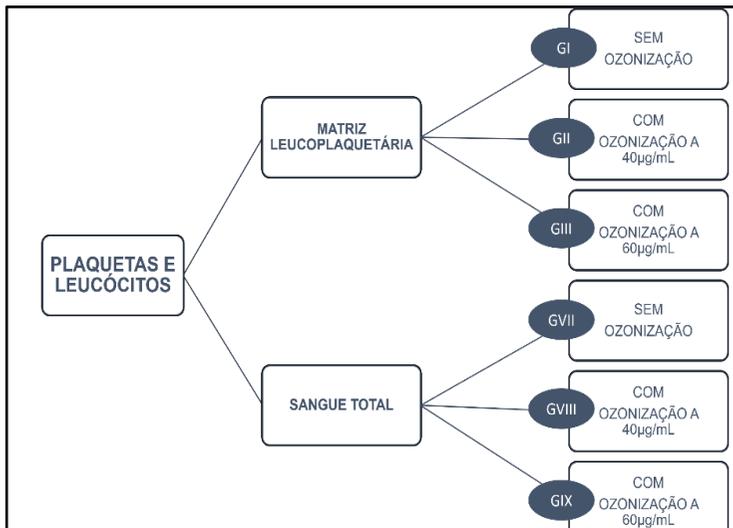


Figura 4. Fluxograma dos grupos para contagem de plaquetas e leucócitos.

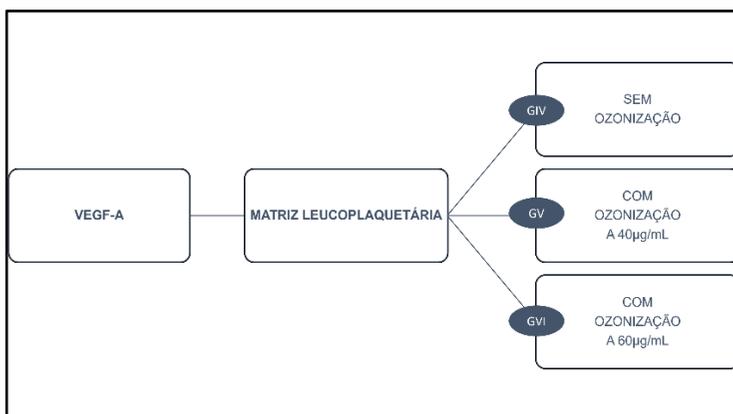


Figura 5. Fluxograma dos grupos para análise do VEGF-A.

4.2.4 Obtenção do plasma sanguíneo

Para viabilizar a contagem das plaquetas e leucócitos por contador hematológico eletrônico, a coleta das amostras sanguíneas foi realizada com tubos contendo EDTA. Deste modo, obteve-se o plasma sanguíneo, caracterizado experimentalmente como plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP). Essa contagem foi feita no sangue total (sem centrifugação) e nas duas frações sobrenadantes obtidas após a centrifugação, o PPP e L-PRP, conjuntamente (Figura 6).

Imediatamente após o ciclo de centrifugação, pode-se observar a divisão dos produtos, separados em cada tubo nas seguintes frações: superior do sobrenadante, o PPP; inferior do sobrenadante, o L-PRP e o sedimentos de eritrócitos. As frações do PPP e L-PRP, que formam a matriz de fibrina quando não é utilizado o anticoagulante, foram aspiradas e transferidas para um tubo isento de aditivos, com auxílio de uma pipeta automática e realizado pelo mesmo operador para todas as amostras.

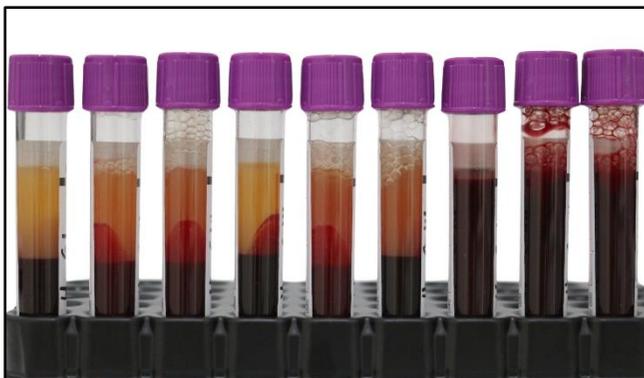


Figura 6. Amostras coletadas de um doador voluntário. Os tubos contêm, da esquerda para a direita, os seguintes elementos: 1° Matriz leucoplaquetária não ozonizada; 2° Matriz leucoplaquetária ozonizada com 40 μ g/mL; 3° Matriz leucoplaquetária ozonizada com 60 μ g/mL; 4° Matriz leucoplaquetária não ozonizada; 5° Matriz leucoplaquetária ozonizada com 40 μ g/mL; 6° Matriz leucoplaquetária ozonizada com 60 μ g/mL; 7° Sangue total não ozonizado; 8° Sangue total ozonizado com 40 μ g/mL; 9° Sangue total ozonizada com 60 μ g/mL

Para a análise celular, as amostras foram centrifugadas de acordo com a proposta experimental, fracionadas e processadas no contador eletrônico automático Icounter 5D (Diagno, Hungria) (Figura 7). O equipamento foi calibrado de acordo com os padrões preconizados pelo fabricante para a contagem das séries eritrocitária, leucocitária com diferencial e plaquetária.



Figura 7. Contador hematólogo eletrônico Icounter 5D, Diagno, Hungria.

Já para o exame do Fator de Crescimento Endotelial Vascular A nas matrizes, as amostras alocadas nos tubos sem aditivos (Figura 8) foram diretamente para o ultrafreezer e enviadas para realização do exame em laboratório externo, seguindo todos os padrões de logística para transporte de material biológico. A análise foi realizada através de um espectrofotômetro SpectraMAX 340 (California, EUA).

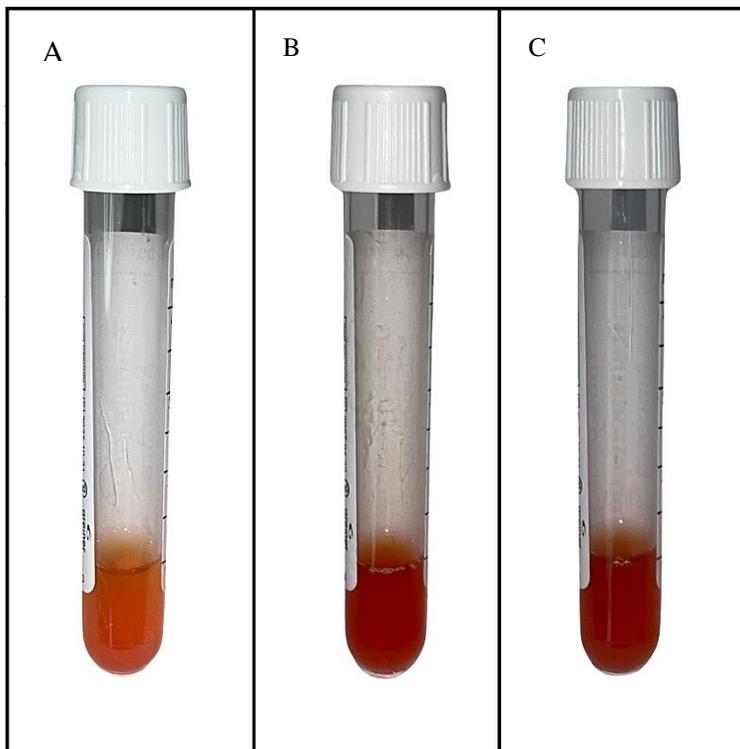


Figura 8. Amostras das matrizes leucoplaquetárias armazenadas nos tubos para congelamento e transporte. A) Matriz leucoplaquetária não ozonizada. B) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 40µg/mL. C) Matriz leucoplaquetária ozonizada com 60µg/mL.

5. RESULTADOS

Os resultados quantitativos das análises por contador eletrônico e a comparação estatística de Tukey entre os grupos estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 1. Valores das plaquetas presentes nas matrizes de PRF e sangue total, antes e após a ozonização (p/mm³).

	PRF	Sangue
Sem Ozonização	343,3 ± 76,5 Aa	229,6 ± 54,5 Ab
40	345,6 ± 76,7 Aa	226,1 ± 57,1 Ab
60	318,4 ± 123,8 Aa	226,3 ± 54,5 Ab

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (RM ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$).

** Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística (Teste t, $\alpha=0,05$).

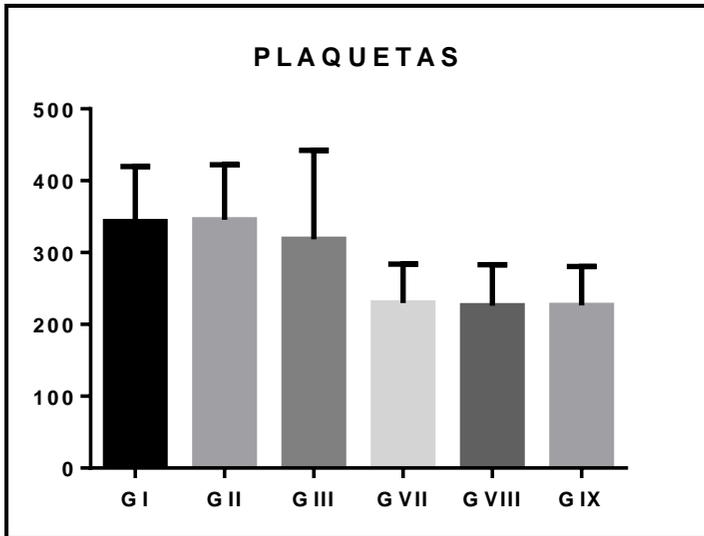


Figura 9. Análise da quantidade de plaquetas entre os grupos das matrizes e sangue total, antes e após a ozonização. GI – Matriz leucoplaquetária sem ozonização, GII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 40µg/mL, GIII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 60µg/mL, GVII – Sangue total sem ozonização, GVIII – Sangue total ozoniado a 40µg/mL e GIX – Sangue total ozonizado a 60µg/mL

A FRC de 200/5min gerou concentrações de plaquetas de modo suprafisiológico quando comparada a do sangue total ($p < 0,032$ para todos os testes t), correspondendo a um aumento de 49,52% para o grupo sem ozonização; 52,85% para o grupo com ozonização a 40µg/mL e 40,69% com ozonização a 60µg/mL. Entre os grupos, tanto de sangue total ($p = 0,5684$), quanto das matrizes ($p = 0,4570$), não houve diferença estatística entre as amostras com e sem ozônio.

Tabela 2. Valores dos leucócitos presentes nas matrizes de PRF e sangue total, antes e após a ozonização. Unidade de medida p/mm³.

	PRF	Sangue
Sem Ozonização	1,409 ± 1,770 Aa	9,52 ± 3,60 Ab
40	1,204 ± 0,544 Aa	9,45 ± 3,84 Ab
60	1,649 ± 1,837 Aa	9,41 ± 3,69 Ab

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (RM ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$).

** Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística (Teste t, $\alpha=0,05$).

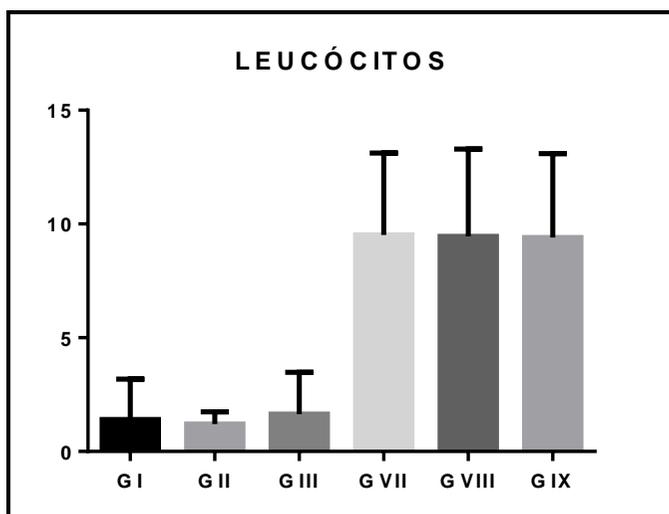


Figura 10. Análise da quantidade de leucócitos entre os grupos de PRF e sangue total, antes e após a ozonização. GI – Matriz leucoplaquetária sem ozonização, GII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 40µg/mL, GIII – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 60µg/mL, GVII – Sangue total sem ozonização, GVIII – Sangue total ozonizado a 40µg/mL e GIX – Sangue total ozonizado a 60µg/mL

Não houve diferença na contagem de leucócitos entre os grupos sem ozonização, 40 e 60, tanto para as matrizes de PRF ($p=0,7607$) como para sangue total ($p=0,6446$). Comparando sangue total com matrizes, houve uma redução na contagem ($p<0,002$) em todas as situações.

A contagem de leucócitos totais revelou que cerca de 84,98% dos leucócitos ficou na porção sedimentada, indicando que o tempo de 5 minutos não foi suficiente para favorecer a difusão – propulsão de partículas de menor densidade para a fração sobrenadante ou limitante.

Tabela 3. Valores do VEGF-A presentes nas matrizes de PRF antes e após a ozonização. Unidade de medida pg/mL.

	PRF
Sem Ozonização	440,9 ± 244,8 a
40	431,0 ± 302,0 a
60	400,6 ± 208,5 a

** Letras iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (RM ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$).*

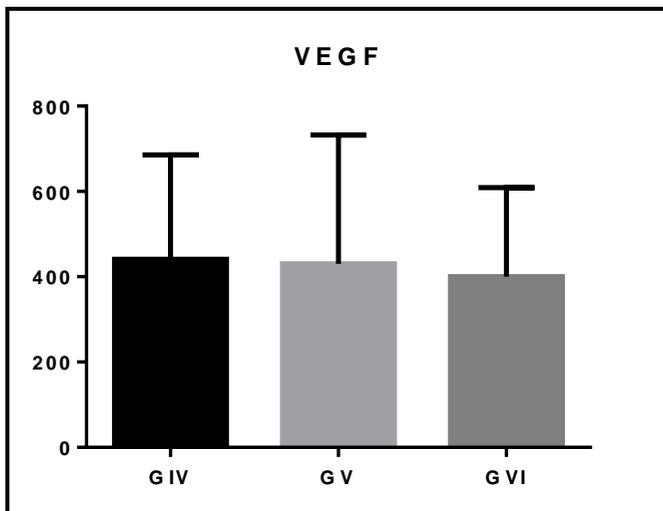


Figura 11. Análise da quantidade de VEGF-A entre os grupos das matrizes leucoplaquetárias antes e após a ozonização. GIV – Matriz leucoplaquetária sem ozonização, GV – Matriz leucoplaquetária ozonizada a 40µg/mL, GVI– Matriz leucoplaquetária ozonizada a 60µg/mL.

Os valores de liberação do VEGF foram descritos em pg/mL e não houve diferença estatística ($p=0,7882$) entre os grupos analisados: matriz sem ozonização, ozonizada com 40µg/mL e 60µg/mL de concentração de ozônio. Quando esses valores são comparados ao valor de referência laboratorial, que é de 129pg/mL, houve um aumento suprafisiológico do fator de crescimento analisado.

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade de plaquetas, leucócitos e a presença de VEGF nas matrizes leucoplaquetárias formadas após a centrifugação e ozonização. Os resultados do estudo mostraram que não houve diferença estatística na utilização do ozônio, o que confirma a primeira hipótese do estudo. Em contrapartida, confirmou que o método de centrifugação utilizado foi eficaz para aumentar os valores de plaquetas e VEGF, em comparação com o sangue total. Contrariamente, o número de leucócitos sofreu redução em relação ao sangue total.

Os métodos para obtenção de matrizes disponíveis na literatura trazem diferenças conceituais e denominativas, confundindo, muitas vezes, método com produto. No entanto, a matriz gerada no presente estudo trata-se da mesma matriz formada para o uso odontológico (KIM et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2012; OLIVEIRA, 2020). O que diferencia, neste estudo, a nomenclatura, é que ao utilizar o anticoagulante no tubo de coleta, a fim de viabilizar a contagem das plaquetas e leucócitos por contador hematológico; há o impedimento da coagulação do sangue. Logo, a formação da fibrina é impedida. O produto formado a ser analisado será o plasma. Na ausência de anticoagulante, o mesmo método utilizado formará a L-PRF.

Em um estudo sobre matrizes plasmáticas, foi constatado que a FRC de 200g, por 5 minutos, apresentou significativa elevação na concentração de leucócitos no L-PRP, atingindo níveis acima de

100%, porém sedimentados na zona do *buffy coat* (OLIVEIRA, 2020). No presente estudo, a quantidade de leucócitos não alcançou níveis elevados, apontando que apenas 15% dessas células estavam presentes na matriz formada. Essa perda pode ter sido em razão do tempo ser insuficiente para favorecer a difusão – empuxo de partículas de menor densidade para a fração sobrenadante ou limitante, como sugerido por OLIVEIRA, 2020.

Por outro lado, o número de plaquetas no L-PRP foi superior quando comparado ao grupo de sangue total, chegando a 49,52% no grupo sem ozonização, 52,85% e 40,69% com ozonização a 40µg/mL e 60µg/m, respectivamente.

Muitos estudos tem sido desenvolvidos com objetivo de compreender e padronizar os métodos de centrifugação para que haja melhor eficácia na obtenção das matrizes de fibrina para finalidade terapêutica autóloga (GHANAATI, S. et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016). A maior concentração nesses estudos é em relação as células presentes nas matrizes, uma vez que o concentrado leucoplaquetário influencia na quantidade de exossomos e fatores de crescimento (DOHAN EHRENFEST et al., 2010). No presente estudo, a matriz formada teve um aumento significativo no número de plaquetas e VEGF, componentes essenciais para o aumento dos fatores de crescimento. Essa variação nos elementos confirma a terceira hipótese do estudo.

A terapêutica da L-PRF se concentra na polimerização adequada do fibrinogênio e na sedimentação seletiva por centrifugação de baixa rotação, em contraste com a coleta laboratorial, que se concentra na sorologia. Como resultado, traumas endoteliais causados

por mau posicionamento e inserção inadequada das agulhas podem levar à formação precoce de coágulos, o que leva à polimerização precoce da rede de fibrina em contato com os eritrócitos. Estes eventos podem resultar em coágulos pequenos, cheios de eritrócitos ou mesmo sem matriz de fibrina na porção sobrenadante. Por isso, a coleta deve ser com o mínimo de trauma possível e o tempo exigido de 3 a 4 minutos do início da coleta até o início da centrifugação deve ser cuidadosamente observado (OLIVEIRA et al., 2018). Neste estudo, a fim de minimizar possíveis erros metodológicos, utilizou-se apenas um profissional para a venopunção, não ultrapassando 2 minutos para a coleta, e um profissional para a ozonização e centrifugação, cuidando para não ultrapassar os 2 minutos para esse processo.

Dohan et al. 2017, avaliaram diferentes centrífugas para a obtenção das matrizes de L-PRF e apontaram alterações na configuração das células presentes nessas matrizes, associando este evento ao impacto que elas sofrem durante a centrifugação. É muito importante manter a integridade celular após os ciclos de centrifugação, pois a degradação prematura pode impossibilitar respostas biológicas previstas. Este estudo utilizou a FibrinFuge25, desenvolvida especificamente para a produção de matrizes de PRF nas suas variadas formas.

As células responsáveis pela atividade biológica do PRF são principalmente leucócitos e plaquetas (ANDRADE ALDANA et al., 2022; PAVLOVIC et al., 2021). Os glóbulos brancos, incluindo neutrófilos, monócitos e linfócitos, participam dos processos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios iniciados pelo concentrado de plaquetas ativadas (PRF). A angiogênese, o recrutamento celular, a

diferenciação celular, a mineralização e a regeneração tecidual são todos os estágios da cicatrização de feridas e os fatores de crescimento derivados de plaquetas (GFs) são armazenados na rede de fibrina (TEMMERMAN et al., 2016; YUAN et al., 2021). Além dos GFs, o PRF também é enriquecido com leucócitos e citocinas imunológicas, como a interleucina. Os leucócitos e citocinas imunológicas são os principais impulsionadores da regeneração óssea e de tecidos moles (YUAN et al., 2021).

Wu et al., 2012, descobriram que a PRF aumenta a regeneração óssea pós-operatória, através do estímulo à proliferação de PDGF, assim como a proliferação de osteoblastos e fibroblastos e regulando positivamente, a produção de proteínas relacionadas ao colágeno. Além de reduzir o tempo geral de cicatrização das feridas. Outros estudos mostram a existência de evidências biológicas convincentes para o uso de PRF como agente bioativo para melhorar a regeneração tecidual e o reparo de lesões. Numerosos estudos bioquímicos demonstraram que o PRF contém elevadas concentrações de proteínas de matriz biologicamente ativas e fatores de crescimento (GF), que são gradualmente libertados pela estrutura tridimensional das glicoproteínas no interior do coágulo de fibrina. Além disso, acredita-se que o PRF desempenhe um papel nas respostas imunológicas ósseas resultantes de interações entre o osso e o sistema imunológico. Os fatores de crescimento são expressivos em matrizes de PRF e contribui para o aumento da angiogênese e para a cicatrização precoce de feridas (AL-MAAWI et al., 2021; CLARK et al., 2018). No presente estudo, os valores de VEGF-A das matrizes analisadas foram maiores que os

valores fisiológicos, o que pode justificar a utilização do PRF associado aos biomateriais.

Estudos mostram que o ozônio, em concentração de aproximadamente 30µg/mL, melhora a oxigenação e reduz a resposta inflamatória aos mediadores causadores de dor nos locais da doença, proporcionando a redução da isquemia e o edema da raiz nervosa (GAUTAM et al., 2011; MURPHY et al., 2016). Também, o tratamento com ozônio, por ter propriedades anti-inflamatórias e moduladora do sistema imune, pode efetivamente aliviar dor crônica (BOCCI et al., 2015; WANG et al., 2023). Na presente pesquisa, o ozônio foi utilizado na forma de gás, sendo introduzido no tubo, com auxílio de uma seringa, adicionado a fração de sangue já coletada e realizada a homogeneização. Como constado por Anitua et al. (2014) em um estudo que mostrou que o protocolo para tratamento da matriz com ozônio pelo método da seringa não altera os resultados biológicos autólogos. Após apurada busca na literatura, aparentemente, o presente estudo é o primeiro a aplicar a terapia com ozônio associado ao sangue para avaliar a quantidade de plaquetas, leucócitos e VEGF-A nas matrizes leucoplaquetárias formadas após a centrifugação.

O ozônio, em doenças com estresse oxidativo crônico, tem um significado especial. Quando utilizado em baixas concentrações e dosagens, vai atuar como biorregulador, enquanto a regulação é bloqueada quando são utilizadas altas concentrações. Os autores acreditam que a faixa de concentração de ozônio para ser utilizado sistemicamente, na forma de auto-hemoterapia maior, não deve exceder 10-40µg/mL. Acima de 50µg/mL pode ter efeito tóxico e deve

ser levado em conta e que 80µg/mL não deveria ser utilizado (VIEBAHN-HAENSLER; FERNÁNDEZ, 2021). Neste estudo, foi optado por utilizar 40µg/mL e 60µg/mL, sendo o primeiro valor a janela máxima para biorregulação e o segundo ultrapassando-a, para analisarmos se essa diferença implicaria em perda na quantidade celular das matrizes. Neste estudo, as diferentes concentrações de ozônio não implicaram em alterações significativas. Os valores mantiveram-se equilibrados em todos os grupos, confirmando a quinta hipótese proposta.

Um estudo com o objetivo de quantificar os fatores de crescimento presentes nas matrizes líquidas e sólidas de L-PRF, produzidas sob FRC de 177g, por 8 minutos, a 1200 rpm, constatou que o VEGF foi liberado nas duas matrizes, tendo a maior concentração no sétimo dia, com valores de 142pg/mL e 380pg/mL, líquida e sólida, respectivamente. No atual estudo, a concentração média de VEGF nas matrizes de fibrina ficou em 424pg/mL. A referência laboratorial para amostra em sangue total é de 129pg/mL. Isso demonstra que a centrifugação gerou um aumento significativo desses fatores de crescimento.

Segundo BOCCI; ZANARDI; TRAVAGLI, 2011a, 2011b, o ozônio pode ativar a produção de fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento transformador beta na cicatrização de feridas e inibir a formação de fator necrótico tumoral alfa, reduzindo a inflamação. Neste estudo, tivemos um aumento significativo do VEGF-A em todas as matrizes analisadas em comparação com os

valores de referência, sem sofrerem influência do ozônio, rejeitando a quarta hipótese.

Apesar das evidências emergentes sobre o potencial terapêutico do ozônio, ainda não há um consenso generalizado sobre sua eficácia como técnica terapêutica (BOCCI, 2004). A literatura científica sobre utilização de L-PRF associado a ozonização é praticamente nula, o que nos mostra uma limitação em comparação de dados e a necessidade de mais estudos para padronizar um protocolo e direcionar os profissionais. Os resultados do presente estudo demonstram que a aplicação do ozônio nas matrizes não gera um efeito deletério nas células e na produção do VEGF. Porém, são necessários mais estudos para determinar com clareza o papel do tratamento com ozônio em várias condições terapêuticas e estabelecer seu lugar na prática clínica.

7. CONCLUSÕES

A utilização do gás de ozônio não interfere na migração das plaquetas e leucócitos para a camada sobrenadante e limitante, bem como não mostra prejuízos a matriz leucoplaquetária formada. A ozonização também não interferiu na quantidade de plaquetas e leucócitos do sangue total. A centrifugação a uma FRC de 200g, por um período de 5 minutos, é suficiente para aumentar o número de plaquetas de forma expressiva na matriz. A liberação de fator de crescimento endotelial vascular é muito superior após a centrifugação, e não sofre influência do processo de ozonização.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos são necessários para comprovar a ação do ozônio no sangue, com concentrações menores e maiores, garantir a melhor forma de associar a ozonioterapia ao PRF, comparar com outras substâncias adicionais ao sangue (apenas oxigênio, por exemplo), além de protocolos com maior tempo de centrifugação.

9. REFERÊNCIAS

A. ZUMSTEIN, M.; BERGER, S.; SCHOBER, M.; BOILEAU, P.; W. NYFFELER, R.; HORN, M.; A. DAHINDEN, C. Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) for Long-Term Delivery of Growth Factor in Rotator Cuff Repair: Review, Preliminary Results and Future Directions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 13, n. 7, p. 1196–1206, 2012.

AL-MAAWI, S.; BECKER, K.; SCHWARZ, F.; SADER, R.; GHANAATI, S. Efficacy of platelet-rich fibrin in promoting the healing of extraction sockets: a systematic review. *International Journal of Implant Dentistry*, v. 7, n. 1, dez. 2021.

AMELI, J.; BANKI, A.; KHORVASH, F.; SIMONETTI, V.; JAFARI, N. J.; IZADI, M. Mechanisms of pathophysiology of blood vessels in patients with multiple sclerosis treated with ozone therapy: A systematic review. *Acta Biomedica*, Mattioli 1885, 3 out. 2019.

ANDRADE C.A., AMENABAR, F.U.; SILVA, C.I.; CALDERON, A.D; MESSINA, D.R.; CARRASCO, N.P.; QUIRYNEN, M. The impact of gender and peripheral blood parameters on the characteristics of L-PRF membranes. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, v. 12, n. 6, p. 753–759, 1 nov. 2022.

ANITUA, E.; ZALDUENDO, M. M.; TROYA, M.; ORIVE, G. Ozone dosing alters the biological potential and therapeutic outcomes of plasma rich in growth factors. *Journal of Periodontal Research*, v. 50, n. 2, p. 240–247, 1 abr. 2014.

ANRAKU, M.; CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Redox properties of serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 2013.

GOMES, J. A. D.; MACIEL, A. C. C.; ANZOLIN, A. P. Ozone therapy for neuralgia-inducing cavitation osteonecrosis: case report. *Ozonoterapia para la inducción de osteonecrosis*

neuralgia: reporte de caso. *Official Journal of Aepromo (Spanish Association of Medical Professionals in Ozone Therapy)*. Madrid, v. 13, n. 1, p. 117–133, 2023.

AROCA, S.; KEGLEVICH, T.; BARBIERI, B.; GERA, I.; ETIENNE, D. Clinical Evaluation of a Modified Coronally Advanced Flap Alone or in Combination With a Platelet-Rich Fibrin Membrane for the Treatment of Adjacent Multiple Gingival Recessions: A 6-Month Study. *Journal of Periodontology*, v. 80, n. 2, p. 244–252, 2009.

BABIOR, B. M.; TAKEUCHI, C.; RUEDI, J.; GUTIERREZ, A.; WENTWORTH, P. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0530251100>.

BAGDADI, K. EL *et al.* 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*, v. 45, n. 3, p. 467–479, 2019.

BETTEGA, G.; BRUN, J. P.; BOUTONNAT, J.; CRACOWSKI, J. L.; QUESADA, J. L.; HEGELHOFER, H.; DRILLAT, P.; RICHARD, M. J. Autologous platelet concentrates for bone graft enhancement in sinus lift procedure. *Transfusion*, v. 49, n. 4, p. 779–785, 2009.

BOCCI, V. Autohaemotherapy After Treatment of Blood with Ozone. A Reappraisal. *J Int Med Res*.

BOCCI, V. Ozone as Janus: This controversial gas can be either toxic or medically useful: Mediators of Inflammation, fev. 2004.

BOCCI, V. OZONE A New Medical Drug.

BOCCI, V. Ozone A New Medical Drug. 2. ed.

BOCCI, V. A. Tropospheric Ozone Toxicity vs. Usefulness of Ozone Therapy. *Archives of Medical Research*, v. 38, n. 2, p. 265–267, fev. 2007.

BOCCI, V.; ALDINUCCI, C.; MOSCI, F.; CARRARO, F.; VALACCHI, G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators of Inflammation*, v. 2007, 2007.

BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal Research Reviews*, jul. 2009.

BOCCI, V.; BORRELLI, E.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. The usefulness of ozone treatment in spinal pain. *Drug Design, Development and Therapy. Dove Medical Press Ltd.*, 15 maio 2015.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical Gas Research. BioMed Central Ltd.*, 2011a.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Ozone: A New Therapeutic Agent in Vascular Diseases.
BOLUKBASI, N.; ERSANLI, S.; KEKLIKOGU, N.; BASEGMEZ, C.; OZDEMIR, T. Sinus augmentation with platelet-rich fibrin in combination with bovine bone graft versus bovine bone graft in combination with collagen membrane. *Journal of Oral Implantology*, v. 41, n. 5, p. 586–595, 1 out. 2015.

BOORA, P.; RATHEE, M.; BHORIA, M. Effect of Platelet Rich Fibrin (PRF) on peri-implant soft tissue and crestal bone in one-stage implant placement: A randomized controlled trial. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, n. 4, p. ZC18–ZC21, 1 abr. 2015.

CALABRESE, E. J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Human and Experimental Toxicology*, abr. 2010.

CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M.-O.; SCHOEFLER, C.; DOHAN, S. L.; DOHAN, A. J. J.;

MOUHYI, J.; DOHAN, D. M. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 101, n. 3, p. 56-60, mar. 2006.

CHOUKROUN, J.; MIRON, R. J. Platelet Rich Fibrin: A Second-Generation Platelet Concentrate. *Em: MIRON, R. J.; CHOUKROUN, J. Platelet rich fibrin in regenerative dentistry: biological background and clinical indications. 1. ed. Oxford: JohnWiley & Sons Ltd. v. 1, p. 1–14, 2017.*

CLARK, D.; RAJENDRAN, Y.; PAYDAR, S.; HO, S.; COX, D.; RYDER, M.; DOLLARD, J.; KAO, R. T. Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*, v. 89, n. 4, p. 379–387, 2018.

CLAVERO, J.; LUNDGREN, S. Ramus or Chin Grafts for Maxillary Sinus Inlay and Local Onlay Augmentation: Comparison of Donor Site Morbidity and Complications. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 5, n. 3, p. 154–160, 2003.

CLAVO, B.; RODRÍGUEZ-ESPARRAGÓN, F.; RODRÍGUEZ-ABREU, D.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; LLONTOP, P.; AGUIAR-BUJANDA, D.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, L.; SANTANA-RODRÍGUEZ, N. Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: Review and prospects. *Antioxidants*. MDPI, 1 dez. 2019.

DAVÌ, G.; PATRONO, C. Mechanisms of Disease Platelet Activation and Atherothrombosis. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nejm.org>.

DECLARAÇÃO DE MADRID SOBRE TERAPIA OZÔNICA (3 rd e). *Documento oficial do ISCO3*.

DELGADO-ROCHE, L.; RIERA-ROMO, M.; MESTA, F.; HERNÁNDEZ-MATOS, Y.; BARRIOS, J. M.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; AL-DALAIEN, S. M. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *European Journal of Pharmacology*, v. 811, p. 148–154, 2017.

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 Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 101, n. 3, 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 I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 101, n. 3, 2006b.

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 and tendons journal*, v. 4, n. 1, p. 3–9, jan. 2014.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; CORSO, M. DEL; DISS, A.; MOUHYI, J.; CHARRIER, J.-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*, v. 81, n. 4, p. 546–555, abr. 2010.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; PINTO, N. R.; PEREDA, A.; JIMÉNEZ, P.; CORSO, M. DEL; KANG, B. S.; NALLY, M.; LANATA, N.; WANG, H. L.; QUIRYNEN, M. 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, 17 fev. 2017.

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 in Biotechnology*, mar. 2009.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; SAMMARTINO, G.; SHIBLI, J. A.; WANG, H.-L.; ZOU, D.-R.; BERNARD, J.-P. POSEIDO. 2013;1(1) Classification of platelet concentrates Special Review: Consensus Conference Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, or Platelet-Rich Fibrin-PRF): the international classification of the POSEIDO. 2013.

EKSTRÖM, K.; OMAR, O.; GRANÉLI, C.; WANG, X.; VAZIRISANI, F.; THOMSEN, P. Monocyte Exosomes Stimulate the Osteogenic Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, 18 set. 2013.

FANALI, G.; MASI, A. DI; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: From bench to bedside Molecular Aspects of Medicine. *Elsevier Ltd*, 2012.

FERRONI, P.; VAZZANA, N.; RIONDINO, S.; CUCCURULLO, C.; GUADAGNI, F.; DAVÌ, G. Platelet function in health and disease: From molecular mechanisms, redox considerations to novel therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15 nov. 2012.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; MIRON, R. J. Biological Components of Platelet Rich Fibrin: Growth Factor Release and Cellular Activity. *Em*: MIRON, R. J.; CHOUKROUN, J. *Platelet rich fibrin in regenerative dentistry: biological background and clinical indications*. 1. ed. Oxford: JohnWiley & Sons Ltd, 2017. v. 1p. 15–32.

FURSEL, K. DE A.; OLIVEIRA NETO, J. L. DE; SOUSA, M. J. DE; MOREIRA, V. H. L. DE O.; SILVEIRA, R. J. Propriedades da fibrina rica em plaquetas (PRF) aplicada a cirurgia oral - protocolo Choukroun. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 5, p. e59510515338, 7 maio 2021.

GAUTAM, S.; RASTOGI, V.; JAIN, A.; SINGH, A. P. Comparative Evaluation of Oxygen-Ozone Therapy and Combined Use of Oxygen-Ozone Therapy with Percutaneous Intradiscal Radiofrequency Thermocoagulation for the Treatment of Lumbar Disc Herniation. *Pain Practice*, v. 11, n. 2, p. 160–166, 2011.

GHANAATI, S. *et al.* Fifteen years of platelet rich fibrin (PRF) in dentistry and oromaxillofacial surgery: How high is the level of scientific evidence? *Journal of Oral Implantology*, v. XLIV, n. 6, p. 471–492, 2018.

GHANAATI, SHAHRAM; BOOMS, P.; ORLOWSKA, A.; KUBESCH, A.; LORENZ, J.; RUTKOWSKI, J.; LANDES, C.; SADER, R.; KIRKPATRICK, C.; CHOUKROUN, J. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *The Journal of oral implantology*, v. 40, n. 6, p. 679–689, dez. 2014.

GHANAATI, S.; FUCHS, S.; WEBBER, M. J.; ORTH, C.; BARBECK, M.; GOMES, M. E.; REIS, R. L.; JAMES KIRKPATRICK, C. Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 5, n. 6, 2011.

GHANAATI, S.; KIRKPATRICK, C.; KUBESCH, A.; LORENZ, J.; SADER, R.; UDEABOR, S.; BARBECK, M.; CHOUKROUN, J. Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss™) results in an enhanced early implantation bed vascularization. *Annals of Maxillofacial Surgery*, v. 4, n. 2, p. 150, 2014.

GIANNINI, S.; CIELO, A.; BONANOME, L.; RASTELLI, C.; DERLA, C.; CORPACI, F.; FALISI, G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar bus different protocols. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 19, p. 927–930, 2015.

IZADI, M.; KHEIRJOU, R.; MOHAMMADPOUR, R.; ALIYOLDASHI, M. H.; MOGHADAM, S. J.; KHORVASH, F.; JAFARI, N. J.; SHIRVANI, S.; KHALILI, N. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, v. 13, n. 1, p. 822–825, 1 jan. 2019.

J. SMITH, A.; OERTLE, J.; WARREN, D.; PRATO, D. Ozone Therapy: A Critical Physiological and Diverse Clinical Evaluation with Regard to Immune Modulation, Anti-Infectious Properties, Anti-Cancer Potential, and Impact on Anti-Oxidant Enzymes. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, v. 05, n. 03, p. 37–48, 2015.

JAMES C, A.; SUMEET, B. Current Applications of Platelet Gels in Facial Plastic Surgery. *Facial Plastic Surgery*, v. 18, n. 1, p. 27–33, 2002.

JUCHNIEWICZ, H.; LUBKOWSKA, A. Oxygen-ozone (O₂-o₃) therapy in peripheral arterial disease (pad): A review study. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. Dove Medical Press Ltd., 2020.

KIM, T. H.; KIM, S. H.; SÁDOR, G. K.; KIM, Y. D. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of Oral Biology*, v. 59, n. 5, p. 550–558, 2014.

KIRAN, N. K.; MUKUNDA, K. S.; TILAK RAJ, T. N. Platelet Concentrates: A Promising Innovation In Dentistry. *Journal of Dental Sciences and Research Journal of Dental Sciences & Research*, v. 21, n. 1, p. 50–61, 2011.

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. *Clinical Oral Investigations*, v. 20, n. 9, p. 2353–2360, 1 dez. 2016.

KOBAYASHI, M.; KAWASE, T.; HORIMIZU, M.; OKUDA, K.; WOLFF, L. F.; YOSHIE, H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*, v. 40, n. 5, p. 323–329, set. 2012.

KOTSAKIS, G. A.; BOUFIDOU, F.; HINRICHS, J. E.; PRASAD, H. S.; ROHRER, M.; TOSIOS, K. I. Extraction socket management utilizing platelet rich fibrin: A proof-of-principle study of the “accelerated-early implant placement” concept. *Journal of Oral Implantology*, v. 42, n. 2, p. 164–168, 1 abr. 2016.

KUBESCH, A.; BARBECK, M.; AL-MAAWI, S.; ORLOWSKA, A.; BOOMS, P. F.; SADER, R. A.; MIRON, R. J.; KIRKPATRICK, C. J.; CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets*, v. 30, n. 3, p. 329–340, 2019.

KUSHMAKOV, R.; GANDHI, J.; SEYAM, O.; JIANG, W.; JOSHI, G.; SMITH, N. L.; KHAN, S. A. Ozone therapy for diabetic foot. *Medical Gas Research*. Wolters Kluwer Medknow Publications, 1 jul. 2018.

LEÓN, O. S.; MENÉNDEZ, C. S.; MERINO, N.; CASTILLO, R.; SAM, S.; PÉREZ, L.; CRUZ, E.; BOCCI, V. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals.

LITVINOV, R. I.; PIETERS, M.; LANGE-LOOTS, Z. DE; WEISEL, J. W. Fibrinogen and Fibrin. *Subcellular Biochemistry*, v. 96, n. 04, p. 471–501, 2021.

LUCARELLI, E. *et al.* Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*, v. 24, n. 18, p. 3095–3100, 2003.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; AL-DALAIN, S. M.; MENÉNDEZ, S.; RE, L.; GIULIANI, A.; CANDELARIO-JALIL, E.; ÁLVAREZ, H.; FERNÁNDEZ-MONTEQUÍN, J. I.; LEÓN, O. S. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*, v. 523, n. 1–3, p. 151–161, 31 out. 2005.

MASLENNIKOV, O. V.; KONTORSHCHIKOVA, C. N.; GRIBKOVA, I. A.; NOVGOROD, N. O3 Ministry of Health Service of the Russian Federation the State Medical Academy of Nizhny Novgorod Ozone Therapy in Practice Health Manual.

MASUKI, H.; ISOBE, K.; KAWABATA, H.; TSUJINO, T.; YAMAGUCHI, S.; WATANABE, T.; SATO, A.; AIZAWA, H.; MOURÃO, C. F.; KAWASE, T. Acute cytotoxic effects of silica microparticles used for coating of plastic blood-collection tubes on human periosteal cells. *Odontology*, v. 108, n. 4, p. 545–552, out. 2020.

MEHRABAN, F.; SEYEDARABI, A. Molecular effects of ozone on amino acids and proteins, especially human hemoglobin and albumin, and the need to personalize ozone concentration in major ozone autohemotherapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. Taylor and Francis Ltd., 2023.

MIJIRITSKY, E.; DRORA ASSAF, H.; PELEG, O.; SHACHAM, M.; CERRONI, L.; MANGANI, L. biology Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review. 2021.

MIRON, R. J. *et al.* Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical oral investigations*, v. 21, n. 6, p. 1913–1927, jul. 2017.

MIRON, R. J. *et al.* Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both

high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. *Clinical Oral Investigations*, v. 24, n. 3, p. 1171–1182, 1 mar. 2020.

MORENO-FERNÁNDEZ AM; MACÍAS-GARCÍA L; VALVERDE-MORENO R; ORTIZ T; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ A; MOLINÍ-ESTRADA A; DE-MIGUEL M. Autohemotherapy with ozone as a possible effective treatment for Fibromyalgia.

MOUSAVY, S. J.; RIAZI, G. H.; KAMAREI, M.; ALIAKBARIAN, H.; SATTARAHMADY, N.; SHARIFIZADEH, A.; SAFARIAN, S.; AHMAD, F.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Effects of mobile phone radiofrequency on the structure and function of the normal human hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 44, n. 3, p. 278–285, 1 abr. 2009.

MURPHY, K.; ELIAS, G.; STEPPAN, J.; BOXLEY, C.; BALAGURUNATHAN, K.; VICTOR, X.; MEADERS, T.; MUTO, M. Percutaneous Treatment of Herniated Lumbar Discs with Ozone: Investigation of the Mechanisms of Action. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v. 27, n. 8, p. 1242–1250.e3, 1 ago. 2016.

NAZARI, L.; SARATHY, S.; SANTORO, D.; HO, D.; RAY, M. B.; XU, C. C. 3 - Recent advances in energy recovery from wastewater sludge. *Direct Thermochemical Liquefaction for Energy Applications*. s.l. Elsevier, 2018. p. 67–100.
OLIVEIRA, L. A. Caracterização Morfológica e Bioquímica da Fibrina Leucoplaquetária Autóloga. Perspectivas na Aplicação Clínica.

OLIVEIRA, L. A. DE; BORGES, T. K.; SOARES, R. O.; BUZZI, M.; KUCKELHAUS, S. A. S. Methodological variations affect the release of VEGF in vitro and fibrinolysis' time from platelet concentrates. *PLoS ONE*, v. 15, n. 10 October, p. 1–12, 2020.

OLIVEIRA, L.; BUZZI, M.; LEÃO, M.; ANDRADE, P.; KUCKELHAUS, SS. Ultrastructural morphological characterization of the autologous leuko-platelet fibrin matrix in association with xenogenic and alloplastic biomaterials for bone grafting. Fibrin® Protocol. *Revista Catarinense de Implantodontia*, v. 18, p. 24–33, 2018.

ÖNCÜ, E.; ALAADDINOĞLU, E. The Effect of Platelet-Rich Fibrin on Implant Stability. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 30, n. 3, p. 578–582, maio 2015.

ONYANGO, A. N. Alternatives to the ‘water oxidation pathway’ of biological ozone formation. *Journal of Chemical Biology*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2016.

OZLER, M.; AKAY, C.; OTER, S.; AY, H.; KORKMAZ, A. Similarities and differences of hyperbaric oxygen and medical ozone applications. *Free Radical Research*, nov. 2011.

PAVLOVIC, V.; CIRIC, M.; JOVANOVIC, V.; TRANDAFILOVIC, M.; STOJANOVIC, P. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Medicine (Poland)*, v. 16, n. 1, p. 446–454, 1 jan. 2021.

PERUT, F.; FILARDO, G.; MARIANI, E.; CENACCHI, A.; PRATELLI, L.; DEVESCOVI, V.; KON, E.; MARCACCI, M.; FACCHINI, A.; BALDINI, N.; GRANCHI, D. Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*, v. 15, n. 7, p. 830–839, jul. 2013.

ROWEN, R. J.; ROBINS, H. Ozone Therapy for Complex Regional Pain Syndrome: Review and Case Report. *Current Pain and Headache Reports*. Current Medicine Group LLC 1, 1 jun. 2019.

SAGAI, M.; BOCCI, V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research*. BioMed Central Ltd., 2011.

SCASSELLATI, C.; CIANI, M.; GALOFORO, A. C.; ZANARDINI, R.; BONVICINI, C.; GEROLDI, C. Molecular mechanisms in cognitive frailty: potential therapeutic targets for oxygen-ozone treatment. *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier Ireland Ltd, 1 mar. 2020.

SCHIMIDT, H. Oxyvenierungstherapie nach Regelsberger – eine Interpretation von Praxisergebnissen aus biochemischer und physiologischer Sicht. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd*. v. 9, p. 7–18, 2002.

SCONZA, C.; RESPIZZI, S.; VIRELLI, L.; VANDENBULCKE, F.; IACONO, F.; KON, E.; MATTEO, B. DI. Oxygen–Ozone Therapy for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. W.B. Saunders, 1 jan. 2020.

SIMONPIERI, A.; CHOUKROUN, J.; CORSO, M. DEL; SAMMARTINO, G.; EHRENFEST, D. M. D. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: A six-year experience. *Implant Dentistry*, v. 20, n. 1, p. 2–12, 2011.

SMITH, N.; WILSON, A.; GANDHI, J.; VATSIA, S.; KHAN, S. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Medical Gas Research*. Medknow Publications, 1 jul. 2017.

STUMBRAS, A.; KULIESIUS, P.; DARINSKAS, A.; KUBILIUS, R.; ZIGMANTAITE, V.; JUODZBALYS, G. Bone regeneration in rabbit calvarial defects using PRGF and adipose-derived stem cells: histomorphometrical analysis. *Regenerative medicine*, v. 15, n. 4, p. 1535–1549, abr. 2020.

TAMIMI, F. M.; MONTALVO, S.; TRESGUERRES, I.; BLANCO JEREZ, L. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. *Official journal of the American Association of Oral*

and Maxillofacial Surgeons, v. 65, n. 6, p. 1084–1093, jun. 2007.

TARTARI, A. P. S.; MOREIRA, F. F.; PEREIRA, M. C. D. S.; CARRARO, E.; CIDRAL-FILHO, F. J.; SALGADO, A. I.; KERPPERS, I. I. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*, v. 43, n. 3, p. 985–993, 1 jun. 2020.

TEMMERMAN, A.; VANDESSEL, J.; CASTRO, A.; JACOBS, R.; TEUGHELS, W.; PINTO, N.; QUIRYNEN, M. The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 43, n. 11, p. 990–999, 1 nov. 2016.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; SILVIETTI, A.; BOCCI, V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, n. 5, p. 504–511, 1 dez. 2007.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BOCCI, V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: A review. *Mediators of Inflammation*, 2010.

TROEDHAN, A.; WAINWRIGHT, M.; KURREK, A.; SCHLICHTING, I. Biomechanical stability of dental implants in augmented maxillary sites: Results of a randomized clinical study with four different biomaterials and PRF and a biological view on guided bone regeneration. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

VALACCHI, G.; FORTINO, V.; BOCCI, V. The dual action of ozone on the skin. *British Journal of Dermatology*, dez. 2005.

VALDENASSI, L.; ROSSI, E.; CORSETTI, M. T.; SARLI R; BELLARDI, D.; CHIRUMBOLO, S.; SIMONETTI, V.; PANDOLFI, S.; FRANZINI, M. Sjögren syndrome successfully treated with oxygen-ozone auto-hemotherapy (O2-O3-AHT): a

case report. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 26, n. 5911–5917, 2022.

VIEBAHN-HAENSLER, R.; FERNÁNDEZ, O. S. L. Ozone in medicine. The low-dose ozone concept and its basic biochemical mechanisms of action in chronic inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 15, 1 ago. 2021.

VIEBAHN-HÄNSLER, R.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S.; FAHMY, Z. Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept-Guidelines and Treatment Strategies. *Ozone: Science and Engineering*, v. 34, n. 6, p. 408–424, nov. 2012.

WANG, X.; YU, J.; HAN, C. F.; HE, J. D.; YANG, W. Q.; WANG, Q.; CHEN, J. P. The Effect of CT-Guided Pulsed Radiofrequency Combined with Ozone Injection on Zoster-Associated Pain: A Retrospective Study. *Journal of Pain Research*, v. 16, p. 1321–1332, 2023.

WEN, Q.; CHEN, Q. *An Overview of Ozone Therapy for Treating Foot Ulcers in Patients With Diabetes*. Disponível em: <www.amjmedsci.com>.

WEND, S. *et al.* Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 28, n. 12, 2017.

WILTFANG, J.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; NKENKE, E.; THORWARTH, M.; NEUKAM, F. W.; SCHLEGEL, K. A. Onlay augmentation versus sinuslift procedure in the treatment of the severely resorbed maxilla: A 5-year comparative longitudinal study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 34, n. 8, p. 885–889, 2005.

WU, C. L.; LEE, S. S.; TSAI, C. H.; LU, K. H.; ZHAO, J. H.; CHANG, Y. C. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human

osteoblasts. *Australian Dental Journal*, v. 57, n. 2, p. 207–212, jun. 2012.

YUAN, S.; LI, Q.; CHEN, K.; MU, Z.; CHEN, T.; WANG, H.; JI, P. Ridge preservation applying a novel hydrogel for early angiogenesis and osteogenesis evaluation: an experimental study in canine. *Journal of Biological Engineering*, v. 15, n. 1, 1 dez. 2021.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V., 1 mar. 2018.

10. APÊNDICE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Qualidade das matrizes de PRF produzidas sob diferentes velocidades e tempos de centrifugação”, de responsabilidade do pesquisador Pedro Henrique Corazza. **JUSTIFICATIVA:** O processo biológico de cicatrização das feridas é complexo, envolvendo muitos eventos celulares, levando simultaneamente à reparação ou regeneração dos tecidos danificados. A fibrina rica em plaquetas (PRF) pertence a uma nova geração de concentrados de plaquetas, com um processo simplificado e sem manipulação bioquímica do sangue. A liberação dos fatores de crescimento prolongada, sustentada e lenta de todos os grupos PRF pode apoiar a migração e a proliferação celular, além de oferecer vantagens no processo de cicatrização de feridas. No entanto, a liberação significativamente aumentada em protocolos baseados no conceito LSCC associado a variação de tempo, pode tornar essas matrizes superiores ao PRF convencional em indicações clínicas específicas. **OBJETIVOS:** Avaliar a velocidade de centrifugação, testando a hipótese de que diferentes velocidades resultam em membranas com contagem celular distinta e avaliar dois tempos de centrifugação, testando a hipótese de que diferentes tempos resultam em membranas com contagem celular distinta. **PROCEDIMENTOS:** Será realizada a antisepsia do local com swab de álcool 70%, em único movimento ascendente. A coleta sanguínea será através do garroteamento do braço e identificação da veia mais calibrosa (preferencialmente a veia intermédia antecubital). A agulha do cateter será introduzida com bisel voltado para cima, em angulação de 15° a 30°. O tubo será apoiado no interior do adaptador de agulhas e comprimido para perfuração da tampa de borracha até seu completo enchimento. Na troca de tubos o procedimento será repetido e, após remoção do último tubo, será realizada a compressão da veia puncionada com rolo de algodão estéril para remoção da agulha. A coleta não deverá ultrapassar 2 minutos para as 6 amostras. Imediatamente após a coleta, as amostras serão centrifugadas para obtenção das matrizes de fibrina. **POSSÍVEIS DESCONFORTOS E RISCOS:** Pode sentir dor leve no momento da punção e sensação de tontura. O processo de coleta sanguínea não traz riscos à saúde. **BENEFÍCIOS:** Ao participar da pesquisa, você estará ajudando a definir um protocolo eficaz para otimizar os resultados de cicatrização de feridas em cirurgias orais.

Os riscos são mínimos, mas se ocorrer algum dano (desconforto ou hematoma), comprovado, decorrente da sua participação na pesquisa, você terá o direito à assistência gratuita pelo tempo que for necessário. Se ocorrerem danos decorrentes da pesquisa, você terá direito à indenização. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre a pesquisa, e poderá ter acesso aos seus dados em qualquer etapa do estudo. Sua participação nessa pesquisa não é obrigatória e você pode desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento. Você não terá qualquer despesa para participar da presente pesquisa e não receberá pagamento pela sua participação. O seu nome, dados pessoais e relacionados à sua identificação não serão divulgados. Os resultados da pesquisa serão divulgados, mas você terá a garantia do sigilo e da confidencialidade dos dados. Caso você tenha dúvidas sobre o comportamento dos pesquisadores e caso se considera prejudicado (a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com os pesquisadores: Pedro Henrique Corazza, telefone (54)996980088, Ângela Vezaro Vanz, telefone (54)999880634, ou com o PPGOdonto, telefone (54)3316-8395. Pode também entrar em contato com os pesquisadores pelo endereço: Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Prédio A7, 3º andar, Universidade de Passo Fundo, Campus I - BR 285, Bairro São José - CEP 99052-900, Passo Fundo/RS.

Também pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFPA, pelo telefone (54) 3316-8157, no horário das 08h às 12h e das 13h30min às 17h30min, de segunda a sexta-feira. O Comitê está localizado no Campus I da Universidade de Passo Fundo, na BR 285, Bairro São José, Passo Fundo/RS. O Comitê de Ética em pesquisa exerce papel consultivo e, em especial, educativo, para assegurar a formação continuada dos pesquisadores e promover a discussão dos aspectos éticos das pesquisas em seres humanos na comunidade. Dessa forma, se você concorda em participar da pesquisa como consta nas explicações e orientações acima, coloque seu nome no local indicado abaixo. Desde já, agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com o (a) pesquisador (a).

Passo Fundo, ____ de ____ de ____.

Nome do (a) participante: _____
Assinatura: _____

Nome do (a) pesquisador (a): _____
Assinatura: _____

ARTIGO A SER SUBMETIDO

**ANÁLISE DAS MATRIZES
LEUCOPLAQUETÁRIAS PRODUZIDAS COM E
SEM OZONIZAÇÃO**

**ANALYSIS OF LEUKOPLATELET MATRICES
PRODUCED WITH AND WITHOUT OZONATION**

Ângela Vezaro Vanz, especialista, PPGOUPF, Passo
Fundo, RS, Brasil

João Paulo de Carli, Dr., PPGOUPF, Passo Fundo, RS,
Brasil

Pedro Henrique Corazza, Dr., PPGOUPF, Passo Fundo,
RS, Brasil

Resumo

Objetivos: Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do ozônio medicinal na contagem de células dentro de matrizes leucoplaquetárias usando amostras de sangue humano.

Métodos: Amostras de sangue humano foram centrifugadas para obter matrizes de plasma sanguíneo. Foram realizadas contagens de plaquetas e leucócitos, e os níveis do fator de crescimento VEGF-A foram medidos. As amostras foram divididas em grupos: sem ozonização, ozonização com concentrações de 40µg/mL e 60µg/mL, tanto para o sangue total quanto para as matrizes leucoplaquetárias.

Resultados: A ozonização não alterou a contagem de plaquetas, a contagem de leucócitos ou a concentração de VEGF-A dentro das matrizes. A ozonioterapia não impediu a formação das matrizes. A centrifugação aumentou significativamente a contagem de plaquetas sem afetar a contagem de leucócitos.

Conclusão: A ozonioterapia mostra-se promissora como terapia adjuvante para regeneração e cicatrização de feridas, especialmente quando combinada com fibrina rica

em plaquetas. Apesar do aumento na contagem de plaquetas por meio da centrifugação, a ozonioterapia não teve efeitos adversos na contagem de leucócitos ou na formação da matriz. Mais pesquisas sobre os efeitos sinérgicos da ozonioterapia e da fibrina rica em plaquetas na regeneração tecidual são necessárias

Palavras-chave: Regeneração, Cicatrização, Ozonioterapia, Fibrina Rica em Plaquetas.

Introdução

O processo de cicatrização de feridas envolve eventos celulares complexos, compreendendo estágios de hemostasia, inflamação, proliferação e maturação. Embora muitas tentativas tenham sido realizadas para obter uma previsibilidade de resposta na regeneração tecidual, incluindo materiais sintéticos, poucos promovem o fornecimento direto de sangue e angiogênese (Choukroun & Miron, 2017).

+*O uso de concentrados de plaquetas, como plasma rico em plaquetas (PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF), foi desenvolvido com o objetivo de utilizar as proteínas do sangue humano como fonte de fatores de crescimento capazes de apoiar a angiogênese e o crescimento tecidual

(CHOUKROUN et al., 2006; KIRAN; MUKUNDA; TILAK RAJ, 2011), além de influenciar na integração do biomaterial no tecido circundante, fornecendo uma conexão eficaz com a rede de vasos sanguíneos do tecido periimplantar do hospedeiro (GHANAATI et al., 2011). O PRF oferece vantagens como fácil manipulação e ausência de aditivos (Choukroun et al., 2006), além de baixo custo (DOHAN EHRENFEST et al., 2014) e eficiente em para aplicações orais (DOHAN EHRENFEST et al., 2013).

O processo para obtenção da PRF é simplificado e sem manipulação bioquímica do sangue (Choukroun et al., 2006). A matriz celular da PRF é rica em plaquetas e leucócitos contendo fatores de crescimento e citocinas, apoiando a regeneração tecidual (Kobayashi et al., 2016). Velocidades mais baixas de centrifugação aumentam a concentração celular dentro do PRF (Ghanaati et al., 2014). A liberação sustentada de fatores de crescimento do PRF facilita a migração e proliferação celular, auxiliando na cicatrização de feridas (El Bagdadi et al., 2019).

No método de ozonização, o ozônio dissolvido no plasma reage imediatamente com biomoléculas para

formar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e produtos de oxidação lipídica (LOPs), que atuam como moléculas de sinalização de ozônio, resultando nos efeitos biológicos e terapêuticos da ozonização. Essas moléculas sinalizadoras afetam a hemoglobina e a albumina, que são as proteínas mais abundantes nos glóbulos vermelhos e no plasma, respectivamente. Por estas proteínas desempenharem funções fisiológicas importantes, mudanças estruturais resultantes de intervenções e procedimentos terapêuticos adicionais podem causar disfunção em concentrações incorretas (Mehraban & Seyedarabi, 2023).

Tendo em vista a crescente utilização da ozonioterapia em associação com o sangue e com os concentrados sanguíneos, faz-se necessária uma padronização da obtenção desta agregação devido à escassez de literatura sobre sua combinação com concentrados sanguíneos.

Materiais e método

Aspectos éticos

Previamente ao início deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo e aprovado sob o número 6.547.726. Todos os

pacientes envolvidos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 Delineamento e grupos de estudo****

Trata-se de um estudo cego laboratorial que avaliou a quantidade de plaquetas, leucócitos e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGF-A) de matrizes leucoplaquetárias obtidas pela coleta de sangue venoso de voluntários, ozonização das amostras e posterior centrifugação.

Seleção dos pacientes e critérios de inclusão e exclusão

A amostra continha 8 doadores voluntários, com idade entre 30 e 51 anos, homens e mulheres saudáveis, que não faziam uso de anticoagulantes ou drogas ilícitas. Foram excluídos da amostra gestantes, lactantes, alcoólatras e fumantes. As análises de plaquetas e leucócitos foram realizadas em parceria com um laboratório comercial da cidade de Passo Fundo. Para análise do VEGF, as amostras foram coletadas no mesmo dia e enviadas a um laboratório externo parceiro.

Obtenção das amostras e grupamento

As amostras de sangue foram coletadas somente por um operador externo treinado, estas foram obtidas em

tubos plásticos de 4 mL com anticoagulante (EDTA) (Greiner Bio-One, Brasil). Foi realizada antissepsia das tampas, previamente a coleta, com álcool 70°. A antissepsia do local a ser feita a coleta foi realizada com swaab de álcool 70% (Labor Import, Índia), em único movimento ascendente. A flebotomia deu-se através do garroteamento do braço e identificação da veia mais calibrosa da região selecionada (veia intermédia antecubital). A agulha do dispositivo venipuntor (Greiner Bio-One, Brasil) foi introduzida com bisel voltado para cima, em angulação de 15° a 30°, em movimento único. O tubo foi apoiado no interior do adaptador de agulha e comprimido para perfuração da tampa de borracha até seu completo enchimento (Figura 1). Foram coletadas 9 amostras (tubos) para cada voluntário.



Figura 1. Sequência da venopunção para obtenção das amostras. A) Antissepsia da tampa do tubo. B) Garroteamento do braço e palpação digital. C) Antissepsia do local a ser puncionado D) Inserção do dispositivo venipuntor. E) Inserção e compressão do tubo sobre a tampa para seu completo enchimento. F) Remoção do dispositivo venopuntor e compressão do local

Na troca de cada tubo o procedimento de inserção no adaptador foi repetido e após remoção do último tubo, realizou-se a compressão da veia puncionada com rolo de algodão estéril e remoção da agulha. A coleta não ultrapassou 2 minutos para as 9 amostras de cada voluntário.

Dessas amostras (n=9), três foram separadas aleatoriamente, para controle, e não passaram pelo processo de ozonização; sendo matriz leucoplaquetária

sem ozonização (GI), matriz leucoplaquetária sem ozonização VEGF-A (GIV) e sangue total sem ozonização (GVII). Os outros seis tubos foram selecionados aleatoriamente e passaram pelo processo de ozonização com 4 mL de gás de ozônio introduzidos ao tubo com auxílio de uma seringa de 5mL (BD, Brasil) e agulha 21G (BD, Brasil). A homogeneização foi realizada manualmente com movimento pendular por 30 segundos: três deles na concentração de 40µg/mL; matriz leucoplaquetaria 40µg/mL (GII), matriz leucoplaquetaria VEGF-A 40µg/mL (GV) e sangue total 40µg/mL (GVIII); e três com 60µg/mL: matriz leucoplaquetaria 60µg/mL (GIII), matriz leucoplaquetaria VEGF-A 60µg/mL (GVI) e sangue total 60µg/mL (GIX). Os grupos de sangue total não passaram pelo processo de centrifugação. O gás de Ozônio medicinal foi gerado através de um gerador de ozônio específico Medplus MX (Philozon, Brasil).

Centrifugação

Foi realizada utilizando centrífuga Fibrinfuge25® (Montserrat, Brasil), com força centrífuga relativa (FCR) de 200g, durante 5 minutos, iniciando imediatamente após a coleta e preparo das amostras ozonizadas.

Obtenção do plasma sanguíneo

Para viabilizar a contagem das plaquetas e leucócitos por contador hematológico eletrônico, a coleta das amostras sanguíneas foi realizada com tubos contendo EDTA. Deste modo, obteve-se o plasma sanguíneo, caracterizado experimentalmente como plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP). Essa contagem foi feita no sangue total (sem centrifugação) e nas duas frações sobrenadantes obtidas após a centrifugação, o PPP e L-PRP, conjuntamente.

Imediatamente após o ciclo de centrifugação, pode-se observar a divisão dos produtos, separados em cada tubo nas seguintes frações: superior do sobrenadante, o PPP; inferior do sobrenadante, o L-PRP e o sedimentos de eritrócitos. As frações do PPP e L-PRP, que formam a matriz de fibrina quando não é utilizado o anticoagulante, foram aspiradas e transferidas para um tubo isento de aditivos, com auxílio de uma pipeta automática e realizado pelo mesmo operador para todas as amostras.

Para a análise celular, as amostras foram centrifugadas de acordo com a proposta experimental, fracionadas e processadas no contador eletrônico

automático Icounter 5D (Diagno, Hungria). O equipamento foi calibrado de acordo com os padrões preconizados pelo fabricante para a contagem das séries eritrocitária, leucocitária com diferencial e plaquetária.

Já para o exame do Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGF-A) nas matrizes, as amostras alocadas nos tubos sem aditivos foram diretamente para o ultrafreezer e enviadas para realização do exame em laboratório externo, seguindo todos os padrões de logística para transporte de material biológico. A análise foi realizada através de um espectrofotômetro SpectraMAX 340 (California, EUA).

Resultados

Os resultados quantitativos das análises por contador eletrônico e a comparação estatística de Tukey entre os grupos estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 4. Valores das plaquetas presentes nas matrizes de PRF e sangue total, antes e após a ozonização (p/mm³).

	PRF	Sangue
Sem Ozonização	343,3 ± 76,5 Aa	229,6 ± 54,5 Ab
40	345,6 ± 76,7 Aa	226,1 ± 57,1 Ab

60	318,4 ± 123,8 Aa	226,3 ± 54,5 Ab
----	------------------	-----------------

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (RM ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$).

** Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística (Teste t, $\alpha=0,05$).

A FRC de 200/5min gerou concentrações de plaquetas de modo suprafisiológico quando comparada a do sangue total ($p<0,032$ para todos os testes t), correspondendo a um aumento de 49,52% para o grupo sem ozonização; 52,85% para o grupo com ozonização a 40 μ g/mL e 40,69% com ozonização a 60 μ g/mL. Entre os grupos, tanto de sangue total ($p=0,5684$), quanto das matrizes ($p=0,4570$), não houve diferença estatística entre as amostras com e sem ozônio.

Tabela 5. Valores dos leucócitos presentes nas matrizes de PRF e sangue total, antes e após a ozonização. Unidade de medida p/mm³.

	PRF	Sangue
Sem Ozonização	1,409 ± 1,770 Aa	9,52 ± 3,60 Ab
40	1,204 ± 0,544 Aa	9,45 ± 3,84 Ab
60	1,649 ± 1,837 Aa	9,41 ± 3,69 Ab

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (RM ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$).

*** Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística (Teste t, $\alpha=0,05$).*

Não houve diferença na contagem de leucócitos entre os grupos sem ozonização, 40 e 60, tanto para as matrizes de PRF ($p=0,7607$) como para sangue total ($p=0,6446$). Comparando sangue total com matrizes, houve uma redução na contagem ($p<0,002$) em todas as situações.

A contagem de leucócitos totais revelou que cerca de 84,98% dos leucócitos ficou na porção sedimentada, indicando que o tempo de 5 minutos não foi suficiente para favorecer a difusão – propulsão de partículas de menor densidade para a fração sobrenadante ou limitante.

Os valores de liberação do VEGF foram descritos em pg/mL e não houve diferença estatística ($p=0,7882$) entre os grupos analisados: matriz sem ozonização, ozonizada com 40 μ g/mL e 60 μ g/mL de concentração de ozônio. Quando esses valores são comparados ao valor de referência laboratorial, que é de 129pg/mL, houve um aumento suprafisiológico do fator de crescimento analisado.

Tabela 6. Valores do VEGF-A presentes nas matrizes de PRF antes e após a ozonização. Unidade de medida pg/mL.

	PRF
Sem Ozonização	440,9 ± 244,8 a
40	431,0 ± 302,0 a
60	400,6 ± 208,5 a

* Letras iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (RM ANOVA e Tukey, $\alpha=0,05$).

Os dados foram tabulados e analisados através do software Minitab® 18 e GraphPad Prism 6. Inicialmente, foi feita a análise descritiva dos dados. Foi efetuada a análise de igualdade de variância ($\alpha=0,05$), seguido pelo teste de ANOVA para medidas repetidas (Repeated measures ANOVA), seguida por Tukey ($\alpha=0,05$). Também foi efetuada uma comparação por teste t pareado ($\alpha=0,05$).

Discussão

A avaliação da quantidade de plaquetas, leucócitos e a presença de VEGF nas matrizes leucoplaquetárias formadas após a centrifugação e ozonização. Os resultados indicaram que o ozônio não teve um efeito estatisticamente

significativo, enquanto a centrifugação aumentou os valores de plaquetas e VEGF, mas reduziu o número de leucócitos em relação ao sangue total.

Estudos anteriores sobre matrizes plasmáticas apresentam diferenças conceituais e metodológicas. Neste estudo, a matriz formada foi semelhante àquela usada em odontologia, com a nomenclatura variando de acordo com a presença ou ausência de anticoagulante (Kim et al., 2014; Kobayashi et al., 2012). O que diferencia, neste estudo, a nomenclatura, é que ao utilizar o anticoagulante no tubo de coleta, a fim de viabilizar a contagem das plaquetas e leucócitos por contador hematológico; há o impedimento da coagulação do sangue. Logo, a formação da fibrina é impedida. O produto formado a ser analisado será o plasma. Na ausência de anticoagulante, o mesmo método utilizado formará a L-PRF.

Em um estudo sobre matrizes plasmáticas, foi constatado que a FRC de 200g, por 5 minutos, apresentou significativa elevação na concentração de leucócitos no L-PRP, atingindo níveis acima de 100%, porém sedimentados na zona do buffy coat (OLIVEIRA, 2020). No presente estudo, a quantidade de leucócitos não

alcançou níveis elevados, apontando que apenas 15% dessas células estavam presentes na matriz formada. Essa perda pode ter sido em razão do tempo ser insuficiente para favorecer a difusão – empuxo de partículas de menor densidade para a fração sobrenadante ou limitante, como sugerido por OLIVEIRA, 2020.

Por outro lado, o número de plaquetas no L-PRP foi superior quando comparado ao grupo de sangue total, chegando a 49,52% no grupo sem ozonização, 52,85% e 40,69% com ozonização a 40µg/mL e 60µg/m, respectivamente.

Muitos estudos tem sido desenvolvidos com objetivo de compreender e padronizar os métodos de centrifugação para que haja melhor eficácia na obtenção das matrizes de fibrina para finalidade terapêutica autóloga (GHANAATI, S. et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016). A maior concentração nesses estudos é em relação as células presentes nas matrizes, uma vez que o concentrado leucoplaquetário influencia na quantidade de exossomos e fatores de crescimento (DOHAN EHRENFEST et al., 2010). No presente estudo, a matriz formada teve um aumento significativo no número de plaquetas e VEGF,

componentes essenciais para o aumento dos fatores de crescimento.

Dohan et al. 2017, avaliaram diferentes centrífugas para a obtenção das matrizes de L-PRF e apontaram alterações na configuração das células presentes nessas matrizes, associando este evento ao impacto que elas sofrem durante a centrifugação. É muito importante manter a integridade celular após os ciclos de centrifugação, pois a degradação prematura pode impossibilitar respostas biológicas previstas. Este estudo utilizou a FibrinFuge25, desenvolvida especificamente para a produção de matrizes de PRF nas suas variadas formas.

Wu et al., 2012, descobriram que a PRF aumenta a regeneração óssea pós-operatória, através do estímulo à proliferação de PDGF, assim como a proliferação de osteoblastos e fibroblastos e regulando positivamente, a produção de proteínas relacionadas ao colágeno. Além de reduzir o tempo geral de cicatrização das feridas. Outros estudos mostram a existência de evidências biológicas convincentes para o uso de PRF como agente bioativo para melhorar a regeneração tecidual e o reparo de lesões.

Numerosos estudos bioquímicos demonstraram que o PRF contém elevadas concentrações de proteínas de matriz biologicamente ativas e fatores de crescimento (GF), que são gradualmente libertados pela estrutura tridimensional das glicoproteínas no interior do coágulo de fibrina. Além disso, acredita-se que o PRF desempenhe um papel nas respostas imunológicas ósseas resultantes de interações entre o osso e o sistema imunológico. Os fatores de crescimento são expressivos em matrizes de PRF e contribui para o aumento da angiogênese e para a cicatrização precoce de feridas (AL-MAAWI et al., 2021; CLARK et al., 2018). No presente estudo, os valores de VEGF-A das matrizes analisadas foram maiores que os valores fisiológicos, o que pode justificar a utilização do PRF associado aos biomateriais.

Estudos mostram que o ozônio, em concentração de aproximadamente 30µg/mL, melhora a oxigenação e reduz a resposta inflamatória aos mediadores causadores de dor nos locais da doença, proporcionando a redução da isquemia e o edema da raiz nervosa (GAUTAM et al., 2011; MURPHY et al., 2016). Também, o tratamento com ozônio, por ter propriedades anti-inflamatórias e

moduladora do sistema imune, pode efetivamente aliviar dor crônica (BOCCI et al., 2015; WANG et al., 2023). Na presente pesquisa, o ozônio foi utilizado na forma de gás, sendo introduzido no tubo, com auxílio de uma seringa, adicionado a fração de sangue já coletada e realizada a homogeneização. Como constatado por Anitua et al. (2014) em um estudo que mostrou que o protocolo para tratamento da matriz com ozônio pelo método da seringa não altera os resultados biológicos autólogos. Após apurada busca na literatura, aparentemente, o presente estudo é o primeiro a aplicar a terapia com ozônio associado ao sangue para avaliar a quantidade de plaquetas, leucócitos e VEGF-A nas matrizes leucoplaquetárias formadas após a centrifugação.

O ozônio, em doenças com estresse oxidativo crônico, tem um significado especial. Quando utilizado em baixas concentrações e dosagens, vai atuar como biorregulador, enquanto a regulação é bloqueada quando são utilizadas altas concentrações. Os autores acreditam que a faixa de concentração de ozônio para ser utilizado sistemicamente, na forma de auto-hemoterapia maior, não deve exceder 10-40µg/mL. Acima de 50µg/mL pode ter

efeito tóxico e deve ser levado em conta e que 80µg/mL não deveria ser utilizado (VIEBAHN-HAENSLER; FERNÁNDEZ, 2021). Neste estudo, foi optado por utilizar 40µg/mL e 60µg/mL, sendo o primeiro valor a janela máxima para biorregulação e o segundo ultrapassando-a, para analisarmos se essa diferença implicaria em perda na quantidade celular das matrizes. Neste estudo, as diferentes concentrações de ozônio não implicaram em alterações significativas. Os valores mantiveram-se equilibrados em todos os grupos, confirmando a quinta hipótese proposta.

Segundo BOCCI; ZANARDI; TRAVAGLI, 2011a, 2011b, o ozônio pode ativar a produção de fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento transformador beta na cicatrização de feridas e inibir a formação de fator necrótico tumoral alfa, reduzindo a inflamação. Neste estudo, tivemos um aumento significativo do VEGF-A em todas as matrizes analisadas em comparação com os valores de referência laboratoriais, independentemente da utilização do ozônio.

Embora o potencial terapêutico do ozônio seja reconhecido, ainda não há consenso sobre sua eficácia. A literatura científica sobre a associação de L-PRF e ozonização é escassa, destacando a necessidade de mais estudos para estabelecer um protocolo padronizado e esclarecer seu papel na prática clínica (Viebahn-Haensler & Fernández, 2021).

Por fim, os resultados deste estudo indicam que a aplicação do ozônio nas matrizes não prejudica as células nem a produção de VEGF, mas mais pesquisas são necessárias para entender completamente o papel do tratamento com ozônio em diversas condições terapêuticas.

Conclusão

A utilização do gás de ozônio não afeta a formação da matriz leucoplaquetária nem interfere na migração das plaquetas e leucócitos. Além disso, não há impacto na quantidade de plaquetas e leucócitos presentes no sangue total. A centrifugação a uma Força Relativa Centrífuga (FRC) de 200g por 5 minutos é eficaz para aumentar significativamente o número de plaquetas na matriz. A liberação do fator de crescimento endotelial vascular é

notavelmente maior após a centrifugação e não é afetada pela ozonização.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade de Passo Fundo pela bolsa auxílio.

Conflito de interesse

Este estudo não apresenta conflito de interesse.

Referências

1. Choukroun J, Miron RJ. Wound healing: the role of leukocyte-platelet matrix. *Rev Odontol Clin Pesq.* 2017;20(4):410-415.
2. Choukroun J, et al. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin: clinical applications in dentistry. *Implant Dent.* 2006;15(1):56-62.
3. Kobayashi E, et al. PRF therapy: a literature review. *Rev Bras Cir Plast.* 2016;18(2):307-314.
4. Ghanaati S, et al. Cell concentration and growth factor release in platelet-rich fibrin matrices after centrifugation at different speeds. *Rev Odontol Cienc Biomed.* 2014;18(3):213-219.

5. *El Bagdadi K, et al. Effect of growth factor release on wound healing with platelet-rich fibrin. J Biomater Eng Tissue. 2019;15(3):281-289.*
6. *Mehraban F, Seyedarabi A. Biological effects of ozonized plasma: a review. Rev Ozone Ther. 2023;30(1):45-52.*
7. *Viebahn-Haensler R, Fernández OL. Ozonotherapy in medicine: a comprehensive review. J Int Ozone Ther. 2021;27(2):89-96.*
8. *Anitua E, et al. Influence of centrifugation and ozonation on the composition and bioactivity of leukocyte-platelet matrices. Biomater Eng Tissue. 2014;20(1):120-129.*
9. *Kim S, et al. Comparison of composition and efficacy of different leukocyte-platelet matrices in wound healing. J Biol Cell Tissue. 2014;25(3):210-218.*
10. *Oliveira LS. Influence of centrifugation speed on the composition of leukocyte-platelet matrices. Rev Bras Eng Biom. 2020;23(4):302-310.*

11. *Bocci V. Ozonotherapy as an integrative medical system: an overview and future perspectives. Rev Ozone Ther. 2004;21(3):175-185*

Endereço para correspondência:

Ângela Vezaro Vanz

Rua Benjamin Constant, nº412, apto 302 Bairro Centro
CEP 99010-130 – Passo Fundo, Rio Grande do Sul,
Brasil

Telefone: 54999880634

E-mail: angevezaro@hotmail.com