



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ ESCOLA DE
MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

MARIANA MARTINS JUGLAIR

**USO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS COMO UM MEIO BIOLÓGICO PARA
VIABILIDADE DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE DENTES EXPOSTOS A UM
AMBIENTE EXTRA-ALVEOLAR SECO DE 3 HORAS: UM ESTUDO IN VITRO.**

**Curitiba
2024**



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA

MARIANA MARTINS JUGLAIR

USO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS COMO UM MEIO BIOLÓGICO PARA VIABILIDADE DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE DENTES EXPOSTOS A UM AMBIENTE EXTRA-ALVEOLAR SECO DE 3 HORAS: UM ESTUDO IN VITRO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada (Subárea endodontia)

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vânia Portela Ditzel Westphalen
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Lorena Bortolini Navarro

Curitiba
2024

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB-9 /1636

J93u
2024

Juglair, Mariana Martins
Uso da fibrina rica em plaquetas como um meio biológico para viabilidade do ligamento periodontal de dentes expostos a um ambiente extra-alveolar seco de 3 horas : um estudo in vitro / Mariana Martins Juglair ; Orientadora: Vânia Portela Ditzel Westphalen ; coorientadora: Lorena Bortolini Navarro. -- 2024
37 f. ; il. : 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2024
Inclui bibliografias

1. Odontologia. 2. Avulsão dentária. 3. Fibrina rica em plaquetas. 4. Ligamento periodontal. 5. Reimplante dentário. I. Westphalen, Vânia Portela Ditzel. II. Navarro, Lorena Bortolini. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título

CDD. 20. ed. – 617.7



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Escola de Medicina e Ciências da Vida

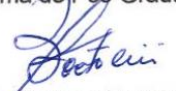
TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA MARTINS JUGLAIR

USO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS COMO UM MEIO BIOLÓGICO PARA VIABILIDADE DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE DENTES EXPOSTOS A UM AMBIENTE EXTRA-ALVEOLAR SECO DE 3 HORAS: UM ESTUDO IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Clínica Odontológica Integrada - Endodontia**.


Orientador(a): Profª Drª Vânia Portela Ditzel Westphalen
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Lorena Bortolini Navarro (PUCPR)
Curso de Odontologia, PUCPR


Profª Drª Profª Drª Flávia Sens Fagundes Tomazinho (UP)
Curso de Odontologia, UP

Curitiba, 11 de outubro de 2024.



AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que me possibilitou viver toda essa jornada, me guardou e iluminou durante toda a trajetória. Aos meus pais, Mário Celso Juglair e Tânia Pereira Martins, que sempre me apoiaram em minhas escolhas, me permitiram desfrutar dessa oportunidade e não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Ao meu noivo, Giovanni Gomes Mangini, aquele que me inspirou a fazer parte do mundo acadêmico, que compartilhou e viveu os dias difíceis junto a mim, me apoiou quando estive frágil e lutou cada batalha ao meu lado. Aos meus sogros, Christian Mangini e Solange Terezinha Gomes Mangini, que foram como meus “segundos pais”, me apoiaram, incentivaram e estiveram comigo em todos os momentos. A minha parceira de pesquisa, Tatiana Carvalho Kowaltschuk, que viveu junto comigo cada incerteza, cada negativa e cada conquista durante a pesquisa, agradeço imensamente pela parceria e amizade. A aquela que tornou possível a realização dessa pesquisa e foi minha salvação durante todo o projeto, Fabiane Barchiki, obrigada por todo o auxílio e orientação no início, meio e fim de toda a caminhada. A minha orientadora Vânia Portela Ditzel Westphalen, pessoa ímpar, que ganhou meu coração, me acolheu e mesmo sem me conhecer direito, confiou a mim aquilo que ela denomina como “o trabalho da minha vida”, não mediu esforços, me apoiou e me inspirou. Apenas obrigada não traduz a imensa gratidão que tenho por cada um de vocês, essa conquista, é nossa!

SUMÁRIO

ARTIGO 1 - VERSÃO EM PORTUGUÊS 7

PÁGINA TÍTULO.....	7
RESUMO	7
INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	18

ANEXOS 21

PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA	21
TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	21
ANÁLISE ESTATÍSTICA	24

ARTIGO 1 - VERSÃO EM PORTUGUÊS

Página título

Uso da fibrina rica em plaquetas como um meio biológico para viabilidade do ligamento periodontal de dentes expostos a um ambiente extra-alveolar seco de 3 horas: um estudo in vitro.

Mariana Martins Juglair¹, Msc Tatiana Carvalho Kowaltschuk¹, Dra Fabiane Barchiki², Dra Lorena Bortolini Navarro¹, Dra Vânia Portela Ditzel Westphalen¹

1. Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina e Ciências da Vida, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
2. Laboratório Experimental de Cultivo Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina e Ciências da Vida.

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) autólogo na manutenção e recuperação da viabilidade celular do ligamento periodontal (PDL) de dentes extraídos que foram submetidos a tempo extra alveolar seco de 3h. **Materiais e métodos:** 26 dentes humanos foram extraídos e distribuídos aleatoriamente entre dois grupos (n=26): PRF e seco. Todos os dentes foram mantidos secos no tempo extra-alveolar de 3 horas, após esse período, os dentes do grupo PRF ficaram imersos em PRF por 45 min. As células do PDL foram isoladas por digestão enzimática com collagenase tipo II e dispase, contadas e analisadas quanto a viabilidade com corante vital azul de Tripano em câmara de Neubauer. **Resultados:** Os resultados das variáveis analisadas indicaram que a taxa de viabilidade celular no grupo PRF apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação com a viabilidade celular do grupo seco. Em relação à concentração celular, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p > 0,005$). **Conclusão:** O PRF autólogo se mostrou eficaz na conservação e na recuperação do PDL de dentes extraídos e mantidos seco por tempo extra-alveolar de 3 horas.

Palavras-chaves: avulsão dentária, fibrina rica em plaquetas, meio de armazenamento, ligamento periodontal, reimplante dentário.

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the efficacy of autologous Platelet-Rich Fibrin (PRF) in maintaining and restoring cell viability in the periodontal ligament (PDL) of extracted teeth that were subjected to a 3-hour dry extra-alveolar time. **Materials and methods:** Twenty-six human teeth were extracted and randomly distributed into two groups (n = 26): PRF and dry. All teeth were kept dry for the 3-hour dry extra-alveolar time. After this period, the teeth in the PRF group were immersed in PRF for 45 min. PDL cells were isolated by enzymatic digestion with collagenase type II and dispase, counted, and analyzed for viability with Trypan blue vital dye in a Neubauer chamber. **Results:** The results of the analyzed variables indicated that the cell viability rate in the PRF group showed a statistically significant difference ($p < 0.001$) compared to the cell viability of the dry group. Regarding cell concentration, there was no statistically significant difference between the two groups ($p > 0.005$). **Conclusion:** Autologous PRF was effective in preserving and recovering the PDL of extracted teeth kept dry for an extra-alveolar period of 3 hours.

Keywords: tooth avulsion, platelet-rich fibrin, storage medium, periodontal ligament, tooth reimplantation.

1. Introdução

A avulsão dentária consiste no completo deslocamento do dente para fora de seu alvéolo. Após o trauma, as células do ligamento periodontal (PDL) ficam isquêmicas, não recebem mais irrigação e entram em contato com bactérias. Por isso, em casos de avulsão a morte das células do PDL ocorre mesmo após um curto período extra-alveolar [1, 2].

O tratamento e o prognóstico de cada caso, depende diretamente do tempo extra-alveolar e das condições de armazenamento do dente. Uma solução de armazenamento ideal deve apresentar-se asséptica ou com baixa quantidade de bactérias, pH entre 6,6 e 7,8, biocompatibilidade e fácil acessibilidade [3]. A solução salina balanceada de Hank's (HBSS), o leite e a clara de ovo podem servir como meios de armazenamento [4, 5].

Nos casos de avulsão dental, o reimplante imediato é o tratamento de escolha e o ideal é ser realizado em dentes com tempo extra-alveolar de até 1h. Caso não seja possível realizá-lo dentro desse período, o reimplante tardio se torna a opção mais viável. Entretanto, quanto maior o tempo extra-alveolar, maior a degeneração das células do PDL e consequentemente maiores as chances de ocorrer reabsorção radicular após o reimplante dentário [1, 2]. Por isso, uma substância que possa impedir ou retardar a reabsorção em dentes avulsionados, com tempo extra-alveolar seco maior que 1 hora, é necessária.

A fibrina rica em plaquetas (PRF) autólogo é uma matriz que comporta todas as moléculas e células que otimizam a cicatrização [6]. Na odontologia, o uso da PRF para correção de defeitos intraósseos, combinado com enxertos ósseos ou preenchendo o alvéolo após as exodontias, mostrou resultados satisfatórios no reparo de feridas, na osseointegração dos enxertos, na redução da perda óssea e preservação do volume ósseo, respectivamente [7, 8].

O PRF, diferente dos outros agregados plaquetários, pode ser capaz de liberar progressivamente citocinas durante a remodelação da matriz de fibrina. Além disso, possui capacidade de reter proteínas dentro do agregado e libera os fatores de crescimento no ambiente circundante. Isso explica as propriedades curativas clinicamente observadas no PRF [9, 10].

Navarro *et al.* 2019, realizou um estudo testando o PRF como um meio biológico para manutenção e recuperação da viabilidade do PDL em dentes expostos a um

ambiente seco de 2 horas. Os resultados apresentados mostraram que o PRF foi eficaz na recuperação da viabilidade celular das células do ligamento periodontal [11].

Tais características presentes na fibrina e resultados obtidos em outros estudos, estimulam a possibilidade do uso do PRF autólogo na preservação e reparo da viabilidade das células do ligamento periodontal quando expostas a um tempo extra-alveolar seco considerado crítico.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso do PRF autólogo na manutenção e recuperação da viabilidade celular do PDL de dentes extraídos que foram submetidos a tempo extra alveolar seco de 3h. As hipóteses nulas testadas foram de que o uso do PRF autólogo não tem efeito na manutenção e recuperação celular e de que não há diferença significativa na viabilidade celular do PDL entre dentes tratados com PRF autólogo e dentes que não receberam qualquer tratamento.

2. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado sob o número CAEE N°: 69663917.0.0000.0020 do Comitê de Ética em Pesquisa. Todos os participantes foram informados de forma simples e clara sobre o objetivo da pesquisa previamente ao procedimento de exodontia e coleta de sangue, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A amostra foi de 26 dentes terceiros molares de doadores saudáveis que possuíam idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, com indicação de exodontia dos dentes terceiros molares em virtude de indicação ortodôntica, mal posicionamento ou ainda por estar em uma área de difícil higienização. Os dentes estavam hígidos, ou com restaurações pequenas (classe I), vitais, com rizogênese completa e periodonto saudável.

Exodontia

A exodontia foi realizada na Clínica de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Os pacientes realizaram assepsia intrabucal com bochecho de clorexidina 2% (PERIOGARD – Colgate, Nova York – EUA), seguida de anestesia local com Mepivacaína 2% com epinefrina

(MEPIVALEM AD – DLA Pharma, Catanduva - BRA). A exodontia ocorreu de maneira menos traumática possível com a utilização de alavancas e fórceps odontológico. Imediatamente após as exodontias, os dentes foram lavados com soro fisiológico 0,9% e raspados aproximadamente 3mm de PDL da porção cervical das raízes (Figura 1) com o auxílio de uma lâmina de bisturi n° 15 C, para o descarte das células esmagadas durante a exodontia por ação do fórceps. Em seguida, os dentes foram acondicionados em placas de vidro e mantidos secos em contato com o ar, sendo processados posteriormente conforme o grupo de análise.

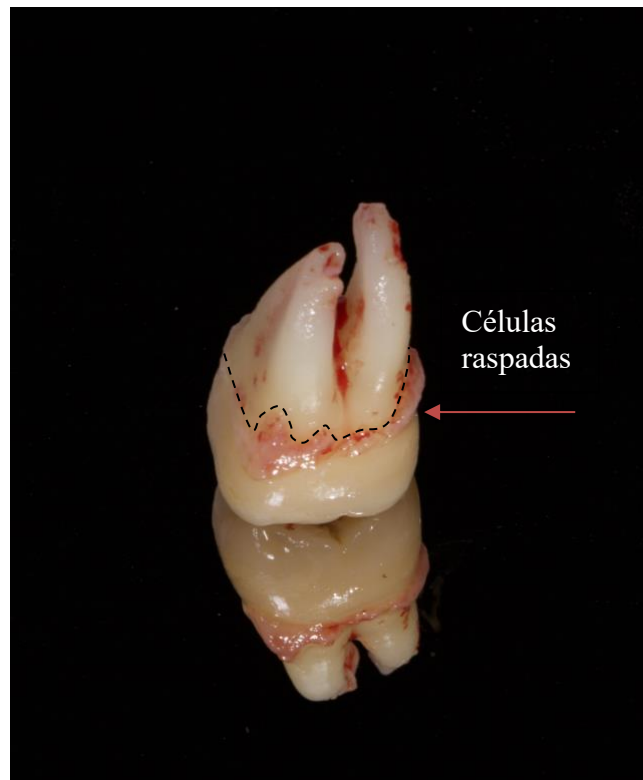


Figura 1 – Dente após a exodontia com a demarcação das células que foram raspadas.

Grupos de análise

Todos os dentes extraídos foram mantidos em temperatura ambiente a seco no tempo extra alveolar de 3 horas. Posteriormente, os 26 dentes foram distribuídos de maneira aleatória, e em igualdade, nos grupos: PRF e seco. O grupo PRF foi seguido de imersão em PRF por 45 min.

Preparo do PRF

Os doadores dos dentes foram submetidos a uma única coleta de sangue da veia mediana cubital, em tubos de plástico sem aditivos para o preparo do PRF. A quantidade de tubos para a coleta de sangue total variou, entre 1 e 4 tubos de 9ml, de acordo com o número de dentes extraídos de cada doador, que variou entre 1 e 4 terceiros molares. A PRF foi produzida usando um protocolo de 2100 rotações por minuto (rpm) por minutos (RFC-coágulo= 394 g) por 8 minutos, usando um dispositivo de centrifugação Spinplus 5000 (MONTSERRAT – São Bernardo do Campo, BRA) [8]. A escolha de tubos de plástico, sem aditivos, teve como objetivo a obtenção de um tempo ideal de trabalho, retardando a formação do coágulo de fibrina. Isso permitiu que o PRF fosse coletado e depositado sobre o dente, deixando-o imerso por completo na solução.

A coleta foi realizada por um único enfermeiro habilitado em venopunção, conforme resolução 158/2015 do Conselho Federal de Odontologia que regulamenta o uso de agregados plaquetários autólogos para fins não transfusionais no âmbito da Odontologia, e ocorreu nos 15 minutos que antecederam o tempo seco extra-alveolar de 3h. Imediatamente após a centrifugação dos tubos de sangue, foi coletado da porção intermediária do plasma aproximadamente 3ml da solução (Figura 2A), que posteriormente foi dispensada, com auxílio de seringa e agulha 22G, em tubos estéreis com capacidade para 15mL (Figura 2B). Os dentes do grupo PRF ficaram imersos na fibrina pelo tempo de 45 minutos.

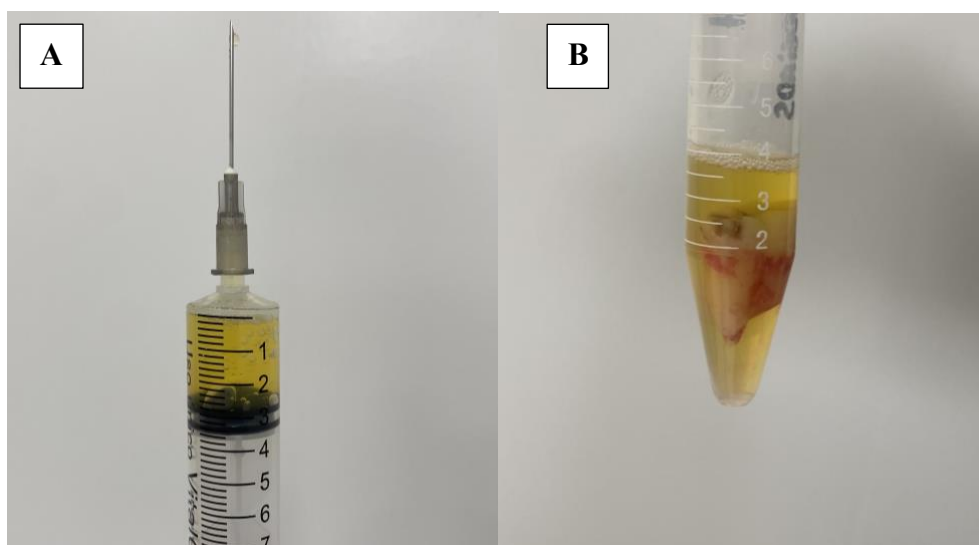


Figura 2 – (A) 3ml de PRF coletados e **(B)** dente imerso no PRF.

Isolamento PDL e análise da viabilidade

Imediatamente após as exodontias, coleta do sangue e preparo do PRF, os dentes foram encaminhados ao Laboratório Experimental de Cultivo Celular (LECC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná para realização do isolamento das células do PDL.

As células do PDL foram isoladas de cada um dos dentes seguindo o protocolo de Pillegi et al. [12], e Navarro et al. [11], pelo método de digestão enzimática contendo collagenase tipo II (INVITROGEN – Massachussets, EUA) (0,2 mg/mL) e dispase (GIBCO - Massachussets, EUA) (2,4 mg/mL). Os dentes foram acondicionados em um tubo com capacidade para 15 mL contendo a solução enzimática (2,5 mL), permanecendo sob agitação do tipo gangorra a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado aos tubos contendo os dentes e a solução enzimática, 50 µl de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO - Massachussets, EUA) para inativação enzimática. Seguida de centrifugação (Centrífuga 5810R – EPPENDORF) a 1000 rpm (50.17xg) por 5 min. Após a centrifugação os dentes foram removidos dos tubos com o auxílio de uma pinça estéril e a solução sobrenadante descartada. O pellet de células foi suspenso em tampão fosfato salina (PBS) e então contadas as células em câmara de Neubauer. Para análise da viabilidade celular foi utilizado o corante Azul de tripan (GIBCO - Massachussets, EUA) (0.4 %) na proporção de 1:1. As células mortas apresentaram a coloração azul possibilitando a análise da taxa de sobrevivência celular (figura 3).

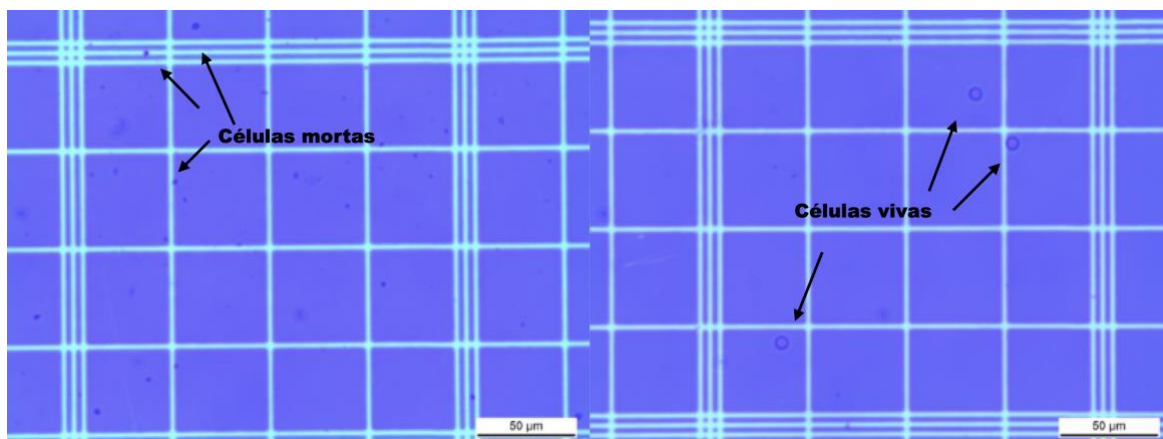


Figura 3 – Células na câmara de Neubauer após aplicação do corante.

3. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo software IBM (SPSS) Statistics 25.0. O teste de normalidade adotado foi o de Shapiro-Wilk. A análise não paramétrica foi feita pelo teste não-paramétrico U de Mann Whitney. Os resultados também foram analisados quanto a correlação entre as variáveis. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

Foram analisadas amostras de células do ligamento periodontal de um total de 26 dentes em relação concentração e viabilidade. Contabilizaram-se apenas células com membranas íntegras, sendo desconsideradas aquelas com membranas irregulares. Para a análise da viabilidade celular, consideraram-se viáveis as células translúcidas (não coradas), enquanto as coradas em azul foram classificadas como mortas.

Os resultados das duas variáveis analisadas demonstraram que os grupos PRF e seco apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação a viabilidade celular ($p < 0,001$), no entanto a variável de concentração celular, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$) (Tabela 1).

As correlações não paramétricas da amostra total e do grupo PRF apresentaram $p > 0,05$, indicando que não há uma relação estatisticamente

significativa entre viabilidade (%) e concentração celular nesses grupos. Isso significa que variações na viabilidade celular não estão associadas a mudanças na concentração celular nesses casos. Em contraste, no grupo seco, a correlação foi significativa ($p < 0,05$), sugerindo que, nesse contexto, um aumento ou diminuição da concentração celular está diretamente relacionado a alterações na viabilidade celular (Tabela 2).

A diferença entre os grupos PRF e seco confirma que o PRF proporcionou maior viabilidade celular em comparação ao tempo extra-alveolar seco analisado.

Tabela 1 – Mediana, máximo e mínimo das variáveis viabilidade (%) e concentração celular dos grupos PRF e seco

Grupo	Variável	Viabilidade (%)	Concentração celular
PRF	Mediana	100	250000
	Mínimo	94	30000
	Máximo	100	1350000
Seco	Mediana	35	180000
	Mínimo	0	0
	Máximo	100	1340000
P Valor		0,000	0,527

Teste não paramétrico U de Mann-Whitney, valor de significância $p < 0,05$.
 Fonte: dados da pesquisa

Tabela 2 – Múltiplas correlações não paramétricas entre grupos

Grupo	Variável	Viabilidade (%)	Concentração celular
Amostra total	Coeficiente de correlação	1,000	0,269
	Valor de p		0,184
	N		26
PRF	Coeficiente de correlação	1,000	-0,529
	Valor de p		0,116
	N		13
Seco	Coeficiente de correlação	1,000	0,595
	Valor de p		0,015
	N		13

Teste rho de Spearman, valor de significância $p < 0,05$.
 Fonte: dados da pesquisa

5. Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso do PRF autólogo na manutenção e recuperação da viabilidade celular do PDL de dentes extraídos submetidos a tempo extra-alveolar seco de 3 horas. As hipóteses nulas testadas foram rejeitadas, demonstrando que o PRF autólogo teve efeito significativo na manutenção e recuperação celular, além de haver diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular do PDL entre dentes tratados com PRF autólogo e aqueles que não receberam tratamento.

O tempo extra-alveolar seco é um fator crítico no prognóstico de dentes avulsionados, já que períodos prolongados aumentam o desafio imposto ao meio de armazenamento. Soluções que favoreçam a manutenção e recuperação celular, como o PRF, podem melhorar substancialmente os resultados clínicos [3]. O PRF possui propriedades regenerativas importantes, favorecendo a vascularização, migração de células epiteliais e aceleração da cicatrização [4]. Sua matriz de fibrina oferece suporte para elementos celulares e moleculares essenciais à regeneração, incluindo a proliferação e diferenciação de osteoblastos, células endoteliais, condrócitos e fibroblastos [5].

Neste estudo, dentes submetidos a tempo extra-alveolar seco de 3 horas e posteriormente imersos em PRF por 45 minutos apresentaram maior manutenção e recuperação da viabilidade celular do PDL. Achados semelhantes foram reportados por Navarro et al. [11], que observaram aumento significativo na viabilidade celular e no número total de células do PDL em dentes tratados com PRF após diferentes períodos de exposição ao ambiente seco. Isso reforça a eficácia do PRF como meio de manutenção biológica para dentes avulsionados em condições críticas.

O método utilizado para a obtenção das células do PDL neste estudo seguiu o protocolo com collagenase e dispase descrito por Pillegi et al. [10], amplamente validado por estudos anteriores [11, 13]. A avaliação da viabilidade celular foi realizada com Azul de Tripiano, técnica que permite distinguir células viáveis de necrosadas com base na integridade da membrana celular [11, 14, 15]. Embora

essa técnica não forneça informações sobre o estado metabólico ou fisiológico das células, ela se mostrou eficaz para os objetivos deste estudo.

Shetty et al. [16] compararam o PRF com a solução salina balanceada de Hank's (HBSS) em tempos considerados não críticos e encontraram resultados semelhantes na viabilidade celular do PDL. Apesar disso, os resultados do presente estudo sugerem que o PRF também é eficaz em condições críticas, como tempos extra-alveolares superiores a 3 horas, consolidando sua aplicação como uma alternativa viável ao HBSS.

Uma nova abordagem realizada neste estudo inclui o uso do PRF como um modelo biológico inovador e a avaliação em condições críticas de tempo extra-alveolar seco, que simulam situações clínicas desafiadoras. No entanto, limitações incluem a ausência de avaliação das propriedades metabólicas e funcionais das células viáveis, o que seria relevante para confirmar o potencial regenerativo a longo prazo. Estudos futuros devem investigar o prognóstico clínico de dentes avulsionados tratados com PRF e reimplantados, avaliando os desfechos após períodos prolongados.

Conclusão

O PRF autólogo se mostrou eficaz na manutenção e recuperação celular do PDL de dentes extraídos e mantidos a seco por 3 horas.

Referências

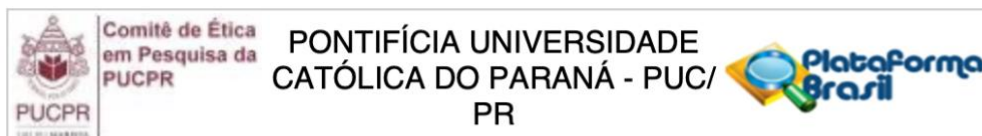
1. Andreasen, JO., Bakland, LK., Flores, MT., Andreasen, FM., and Andersson, L. Traumatic Dental Injuries: A Manual, Third Edition. (Ed. Blackwell Publishing Ltd) (2011)
2. Diangelis, AJ *et al.* International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations of permanent teeth [published correction appears in Dent Traumatol. *Dent Traumatol.* 10.1111/j.1600-9657.2011.01103.x (2012).

3. De Brier, NOD *et al.* Storage of an avulsed tooth prior to replantation: A systematic review and meta-analysis. *Dent Traumatol.* **36**, 453–476; [10.1111/edt.12564](https://doi.org/10.1111/edt.12564) (2020).
4. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol.* (2012).
5. Singletary EM, Zideman DA, De Buck EDJ, Chang W-T, Jensen JL, Swain JM, *et al.* Part 9: First Aid: 2015 international consensus on first aid science with treatment recommendations. *Circulation.* 2015.
6. Choukroun, J *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; **101**, e56-e60. [10.1016/j.tripleo.2005.07.011](https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011) (2006).
7. Miron, RJ *et al.* Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.* **21**, 1913-1927. [10.1007/s00784-017-2133-z](https://doi.org/10.1007/s00784-017-2133-z) (2017).
8. Hauser, F *et al.* Histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study. *Implant Dent.* **22**, 295-303. [10.1097/ID.0b013e3182906eb3](https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182906eb3) (2013).
9. Fujioka-Kobayashi, M. Miron, RJ. Hernandez, M. Kandam, U. Zhang, Y. Choukroun, J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol.* **88**, 112-121. [10.1902/jop.2016.160443](https://doi.org/10.1902/jop.2016.160443) (2017).
10. Dohan, DM *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **101**, 45-e50. [10.1016/j.tripleo.2005.07.009](https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009) (2006).
11. Navarro, LB *et al.* Assessment of platelet-rich fibrin in the maintenance and recovery of cell viability of the periodontal ligament. *Sci Rep.* **9**, 19476. [10.1038/s41598-019-55930-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-55930-0) (2019).
12. Pileggi, R. Dumsha, TC. Nor, JE. Assessment of post-traumatic PDL cells viability by a novel collagenase assay. *Dent Traumatol.* **18**, 186-189. [10.1034/j.1600-9657.2002.00092](https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2002.00092) (2002).

13. Pitzurra, L. Jansen, IDC. de Vries, TJ. Hoogenkamp, MA. Loos, BG. Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. *J periodontal res.* **55**, 287–295. 10.1111/jre.12714 (2020).
14. Miron, RJ. Pinto, NR. Quirynen, M. Ghanaati, S. Standardization of relative centrifugal forces in studies related to platelet-rich fibrin. *J Periodontol.* doi:10.1002/JPER.18-0553 (2019).
15. Mahal, NK. Singh, N. Thomas, AM. Kakkar, N. Effect of three different storage media on survival of periodontal ligament cells using collagenase-dispase assay. *Int endod J.* **46**, 365–370. [10.1111/j.1365-2591.2012.02129.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02129.x) (2013).
16. Shetty, A *et al.* Comparative Evaluation of Efficacy of Platelet-Rich Fibrin and Hank's Balanced Salt Solution as a Storage Medium for Avulsed Teeth: An In Vitro Study. *Eur Endod J.* **21**, 118-121. 10.14744/eej.2019.24633. (2019)

ANEXOS

Parecer de comitê de ética



Continuação do Parecer: 6.026.513

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2050580_E1.pdf	06/04/2023 12:59:32		Aceito
Outros	CARTA.docx	05/04/2023 17:44:12	LORENA BORTOLINI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	05/04/2023 17:40:20	LORENA BORTOLINI NAVARRO	Aceito
Declaração de concordância	declaracao.pdf	05/04/2023 17:39:15	LORENA BORTOLINI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	05/04/2023 17:36:32	LORENA BORTOLINI NAVARRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_PDF.pdf	08/06/2017 10:25:04	LORENA BORTOLINI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 27 de Abril de 2023

Assinado por:
Cilene da Silva Gomes Ribeiro
(Coordenador(a))

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

() Via Participante () Via Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do estudo “AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFETIVIDADE DO PRF AUTÓLOGO PARA A MANUTENÇÃO E RESTABELECIMENTO CELULAR DO LIGAMENTO PERIODONTAL EM DENTES AVULSIONADOS”, que tem como objetivo otimizar o tratamento de dentes Avulsionados (dentes que são deslocados para fora da boca acidentalmente) , através da inovação de protocolos clínicos para que, ao serem recolocados no seu local de origem , que é o alvéolo

dentário, possam apresentar uma maior chance de cura das células do ligamento periodontal (sistema que liga o osso ao dente). Acreditamos que esta pesquisa seja importante porque poderá representar um aumento no tempo de manutenção do dente que foi perdido ou seja, o indivíduo que sofrer uma batida na boca e perder dente ou dentes, poderá reimplantá-los e estes serem mantidos em boca por muitos anos de forma saudável, diminuindo assim as complicações que atualmente os dentes avulsionados sofrem após o reimplante, as quais levam a perdas precoces.

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua participação no referido estudo será devido a sua necessidade remover de 1 a 4 dentes terceiros molares permanentes hígidos (saudáveis) para a correção de problemas de arcos dentais ou dentes mal posicionados. Os dentes removidos serão cedidos para essa pesquisa. Para participar deste estudo você precisará se submeter a uma coleta de 10 ml sangue, através de punção. O tempo médio que, como participante da pesquisa, você terá que permanecer no ambulatório (clínica Odontológica da PUCPR), poderá ser de aproximadamente 3 ou 4 horas. A sua participação não é obrigatória, e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar, ou retirar a sua participação a qualquer momento durante a pesquisa. Você, como sujeito da pesquisa, não será penalizado de nenhuma maneira, caso decida não participar ou desistir de participar. Contudo, gostaria de enfatizar que sua participação é muito importante para a execução da pesquisa.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Através deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está sendo alertado de que, da pesquisa a se realizar, pode se esperar alguns benefícios, tais como: O benefício direto para você participante, é o de extrair (remover) gratuitamente (sem custos), no mínimo 1 e no máximo 4 dentes, desde que estes tenham indicação de extração. Indiretamente, haverá benefícios relacionados a sua participação em um estudo que poderá gerar inovação nos protocolos Clínicos para o tratamento de dentes avulsionados (dentes que foram perdidos por trauma). Bem como, também que é possível que aconteçam os seguintes desconfortos ou riscos em sua participação, tais como riscos físicos inerentes a coleta de sangue, que são mínimos, considerando que os participantes da pesquisa que forem selecionados a se submeter a coleta de sangue, serão atendidos por um profissional habilitado e treinado para este fim. Excluindo o desconforto que pode ser variável de acordo com sua sensibilidade e também, casos de situações físicas pré-existent desconhecidas ou não relatadas, o risco físico desse procedimento, é de inteira responsabilidade do pesquisador. Para minimizar tais riscos, nós pesquisadores tomaremos as seguintes medidas: manter a cadeia asséptica durante todos os procedimentos, seguir fielmente as orientações para venopunção, bem como estar preparadas para uma eventual intercorrência durante a sua participação nesta pesquisa.

SIGILO E PRIVACIDADE

Nós pesquisadores garantiremos a você que sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, lhe identificar, será mantido em sigilo. Nós pesquisadores nos responsabilizaremos pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição de quaisquer informações em qualquer formato que possa indicar sua identidade.

AUTONOMIA

Nós lhe asseguramos assistência durante toda pesquisa, bem como garantiremos seu livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que você queira saber antes, durante e depois de sua participação. Também informamos que você pode se recusar a participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar e sem qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

Caso tenha qualquer despesa decorrente da participação nesta pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, bem como de seu acompanhante (se for o caso), haverá ressarcimento dos valores gastos. Também informamos que, na ocorrência de algum dano decorrente de sua participação no estudo, você será devidamente indenizado, conforme determina a lei.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Mariana Martins Juglair e Tatiana Carvalho Kowaltschuk, alunas de Mestrado e Doutorado em Odontologia, respectivamente, área de concentração em Endodontia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob orientação da Professora Dra. Vânia Portela Ditzel Westphalen e Lorena Bortollini Navarro e com eles você poderá manter contato pelos telefones: Mariana (41 99621-0416); Tatiana (41 988003450); Vânia (41 99962-5110); Lorena (41 99907-3099); e/ou através de seus respectivos e-mails: juglairmariana@hotmail.com; tatiana.kowa@gmail.com; vania.westphalen@pucpr.br; odonto.lorenanavarro@gmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CEP) pelo telefone (41) 3271-2103 entre segunda e sexta-feira das 08h00 às 17h30 ou pelo e-mail nep@pucpr.br.

DECLARAÇÃO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e **tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Receberei uma via assinada e datada deste documento e igual a via assinada e datada que será arquivada pelo pesquisador responsável do estudo.** Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Dados do participante da pesquisa	
Nome:	
Telefone:	
e-mail:	

Curitiba, ____ de ____ de ____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Análise estatística

Resumo de processamento de caso

Tipo x Grupo		Válido		Casos Omisso		Total	
		N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
Viabilidade (%)	PRF 3 horas	13	100,0%	0	0,0%	13	100,0%
	Seco 3 horas	13	100,0%	0	0,0%	13	100,0%
Concentração celular	PRF 3 horas	13	100,0%	0	0,0%	13	100,0%
	Seco 3 horas	13	100,0%	0	0,0%	13	100,0%

Estatísticas descritivas

Tipo x Grupo				Estatística	Erro Padrão
Viabilidade (%)	PRF 3 horas	Média		99,10	0,640
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	97,65	
			Limite superior	100,55	
		5% da média aparada		99,33	
		Mediana		100,00	
		Variância		4,100	
		Desvio Padrão		2,025	
		Mínimo		94	
		Máximo		100	
		Intervalo		6	
		Amplitude interquartílica		1	
		Assimetria		-2,277	0,687
		Curtose		4,765	1,334
	Seco 3 horas	Média		44,75	11,726
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	19,76	
			Limite superior	69,74	
		5% da média aparada		44,17	

		Mediana	35,00	
		Variância	2200,067	
		Desvio Padrão	46,905	
		Mínimo	0	
		Máximo	100	
		Intervalo	100	
		Amplitude interquartilica	96	
		Assimetria	0,090	0,564
		Curtose	-2,174	1,091
Concentração celular	PRF 3 horas	Média	459000,00	155259,281
		95% Intervalo de Confiança para Média	107779,10	
		Limite inferior	810220,90	
		Limite superior		
		5% da média aparada	433333,33	
		Mediana	250000,00	
		Variância	24105444444,444	
		Desvio Padrão	490972,957	
		Mínimo	30000	
		Máximo	1350000	
		Intervalo	1320000	
		Amplitude interquartilica	997500	
		Assimetria	0,981	0,687
		Curtose	-0,718	1,334
	Seco 3 horas	Média	423187,50	124122,561
		95% Intervalo de Confiança para Média	158626,52	
		Limite inferior	687748,48	
		Limite superior		
		5% da média aparada	395763,89	
		Mediana	180000,00	
		Variância	246502562500,000	
		Desvio Padrão	496490,244	
		Mínimo	0	
		Máximo	1340000	
		Intervalo	1340000	
		Amplitude interquartilica	716750	
		Assimetria	0,928	0,564
		Curtose	-0,661	1,091

Teste de normalidade

Tipo x Grupo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Valor p	Estatística	df	Valor p
Viabilidade (%)	PRF 3 horas	0,472	13	0,000	0,532	13	0,000
	Seco 3 horas	0,330	13	0,000	0,722	13	0,000
Concentração celular	PRF 3 horas	0,304	13	0,010	0,801	13	0,015
	Seco 3 horas	0,229	13	0,025	0,799	13	0,003

a. Correlação de significância de Lilliefors

Teste não paramétrico U de Mann-Whitney

Postos

Tipo x Grupo		N	Posto Médio	Soma de Classificações
Viabilidade (%)	PRF 3 horas	13	20,00	200,00
	Seco 3 horas	13	9,44	151,00
	Total	26		
Concentração celular	PRF 3 horas	13	14,70	147,00
	Seco 3 horas	13	12,75	204,00
	Total	26		

Estatística de teste^a

	Viabilidade (%)	Concentração celular
U de Mann-Whitney	15,000	68,000
Estatísticas de testea	-3,583	-0,633
Valor p	0,000	0,527

a. Variável de agrupamento tipo x grupo

b. Não corrigido para vínculos

Valor $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa nos valores médios (medianos) da variável Viabilidade (%) entre Tipo x Grupo.

Sendo que PRF 3 horas apresentou média (mediana) maior que Seco 3 horas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre Concentração celular.

Correlações não paramétricas amostra total

rô de Spearman	Viabilidade (%)		Concentração celular	
	Viabilidade (%)	Coeficiente de Correlação	1,000	0,269
		Valor p		0,184
		N	26	26
	Concentração celular	Coeficiente de Correlação	0,269	1,000
		Valor p	0,184	
		N	26	26

Valor $p > 0,05$ indica ausência de correlação entre as duas variáveis

O coeficiente de correlação de Spearman mede o grau de associação entre as duas variáveis ordinais ou quando uma ou ambas as variáveis contínuas não apresentam distribuição normal:

0,00 |----- 0,30 – Fraca

0,30 |----- 0,60 – Regular

0,60 |----- 0,90 – Forte

0,90 |----- 1,00 - Muito Forte

1,00 |----- - Perfeita

Bioestatística: Princípios e aplicações - Sídia Callegari-Jacques. Artmed. 2003. 256 p.

Correlações não paramétricas por tipo x grupo

Tipo x grupo = PRF 3 horas

Correlações^a

			Viabilidade (%)	Concentração celular
rô de Spearman	Viabilidade (%)	Coeficiente de Correlação	1,000	-0,529
		Valor p		0,116
		N	13	13
	Concentração celular	Coeficiente de Correlação	-0,529	1,000
		Valor p	0,116	
		N	13	13

a. Tipo x Grupo = PRF 3 horas

Valor p > 0,05 indica ausência de correlação entre as duas variáveis

Correlações não paramétricas por tipo x grupo

Tipo x grupo = PRF 3 horas

Correlações^a

			Viabilidade (%)	Concentração celular
rô de Spearman	Viabilidade (%)	Coeficiente de Correlação	1,000	,595*
		Valor p		0,015
		N	13	13
	Concentração celular	Coeficiente de Correlação	,595*	1,000
		Valor p	0,015	
		N	13	13

*. A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

a. Tipo x Grupo = Seco 3 horas

Valor p < 0,05 indica correlação entre as duas variáveis, sendo que ocorreu correlação positiva regular.

O coeficiente de correlação de Spearman mede o grau de associação entre as duas variáveis ordinais ou quando uma ou ambas as variáveis contínuas não apresentam distribuição normal:

0,00 |----- 0,30 – Fraca

0,30 |----- 0,60 – Regular

0,60 |----- 0,90 – Forte

0,90 |----- 1,00 - Muito Forte

1,00 |----- - Perfeita

Bioestatística: Princípios e aplicações - Sídia Callegari-Jacques. Artmed. 2003. 256 p.