

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA  
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

**Bruna Somilio da Fonseca**

**AÇÃO ANTIBACTERIANA E REGENERATIVA DA FIBRINA RICA EM  
PLAQUETAS E LEUCÓCITOS: um estudo *in vitro***

Araraquara-SP  
2023

**Bruna Somilio da Fonseca**

**AÇÃO ANTIBACTERIANA E REGENERATIVA DA FIBRINA RICA  
EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS: um estudo *in vitro***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Prof. Dr. André Capaldo Amaral  
Orientador

Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí  
Coorientador

Araraquara-SP  
2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

F742a Fonseca, Bruna Somilio da  
Ação antibacteriana e regenerativa da fibrina rica em plaquetas e leucócitos: um estudo in vitro/Bruna Somilio da Fonseca. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2023.  
71f.

Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Biotecnologia, Medicina Regenerativa e Química Medicinal - UNIARA

Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

1. Medicina regenerativa. 2. Terapia celular. 3. Biomodulação.  
4. Fibrina. 5. Cicatrização. 6. Antibacteriana. I. Título.

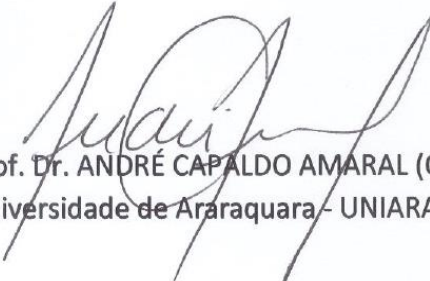
CDU - 57.089

## BRUNA SOMILIO DA FONSECA


Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023

### BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL (Orientador)  
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. RODRIGO BEZERRA DE MENEZES REIFF  
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar



Profª Drª Fernanda de Freitas Anibal  
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe Marta, ao meu esposo Ricardo, e aos meus filhos Raul e Vincenzo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela saúde e oportunidade de realizar esse trabalho;

A minha mãe Marta, gratidão pelo seu amor, apoio, ensinamentos e solidificação de valores humanos;

Ao meu marido Ricardo, gratidão por sua compreensão nas horas de ausência para a realização do trabalho. Sem seu apoio jamais seria possível.

Aos meus amados filhos, Raul e Vincenzo, amor incondicional;

Minhas amigas Jéssica e Janaína, pela parceria e companheirismo;

Telma e Natália, por toda dedicação e amizade;

A equipe do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) e Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, pela parceria e acolhimento, em especial Profa. Dra. Fernanda Anibal, Dra. Fernanda Duarte, Dra. Bruna e Dra. Krissia;

Ao meu orientador Prof. Dr. André Capaldo Amaral e coorientador Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri pela paciência, e por acreditarem em mim durante todo o percurso;

Ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA.

Bruna Somilio da Fonseca

## RESUMO

A medicina regenerativa envolve, entre outras estratégias bioestimuladoras, a utilização de derivados sanguíneos com a finalidade de regular e acelerar o processo cicatricial. A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), é uma resultante plaquetária com 3 subprodutos: soro acelular sobrenadante (SAS), coágulo e exsudato. Apesar de promissora, são escassas as pesquisas que caracterizam a real influência deste concentrado das plaquetas sobre o reparo das feridas cutâneas. Esta pesquisa tem a finalidade de avaliar, dentro de uma abordagem investigativa *in vitro*, através da análise antibacteriana e da dosagem de citocinas e fator de crescimento, a influência imunomodulatória da L-PRF. Para tal, foram selecionadas 10 voluntárias, clinicamente saudáveis e em bom estado nutricional, com a soma dos seguintes critérios de inclusão: sem uso de anticoagulante e antibioticoterapia nos últimos 15 dias, abstração de doenças crônicas ou autoimunes e hábito tabagista inexistente. A faixa etária foi de 22 a 48 anos, com idade média, portanto, de 35,1 anos. Algumas mulheres praticavam atividade física diária e outras semanais. Para a obtenção dos derivados da L-PRF, foi realizada coleta de amostra de sangue, através de punção venosa simples, de cada indivíduo. Com este objetivo, houve o montante de 4 tubos de 5 mL de sangue de cada candidata. Os 3 primeiros tubos, com ativador de plaqueta e gel separador de coágulo, foram destinados para centrifugação, com o intuito do fracionamento dos subprodutos plaquetários. No quarto tubo, foi acrescido anticoagulante e destinado à realização de hemograma completo, velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR), para verificação da ausência de qualquer processo patológico em atividade. A avaliação do potencial de propriedades antibacterianas das voluntárias, no *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciou ação positiva em 40% do total dos subprodutos da L-PRF. Houve seletividade e diferenciação, na individualidade intrínseca de cada voluntária, ao compararmos os 3 elementos da L-PRF na inibição do halo de crescimento. Em seguida, veio mais uma etapa do presente estudo, a dosagem das citocinas e fator de crescimento, respectivamente: fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) no SAS e exsudato. Diante da determinação do efeito antibacteriano dos subprodutos da L-PRF, exsudato e coágulo, evidencia-se resultados também promissores, em relação ao efeito biomodulatório evidenciado nesta última etapa, ao comparar o SAS e exsudato.

**Palavras-chave:** Medicina regenerativa. Terapia celular. Biomodulação. Fibrina. Cicatrização. Feridas. Antimicrobiano.

## ABSTRACT

Regenerative medicine involves, among other biostimulating strategies, the use of blood derivatives in order to regulate and accelerate the healing process. Fibrin rich in platelets and leukocytes (L-PRF) is a resultant platelet with 3 by-products: acellular supernatant serum (SAS), clot and exudate. Despite being promising, there are few studies that characterize the real influence of this platelet concentrate on the repair of cutaneous wounds. This research aims to evaluate, within an *in vitro* investigative approach, through antibacterial analysis and the dosage of cytokines and growth factor, the immunomodulatory influence of L-PRF on the skin healing process. For this, 10 volunteers were selected, clinically healthy and in good nutritional status, with the sum of the following inclusion criteria: no use of anticoagulants and antibiotics in the last 15 days, abstraction of chronic or autoimmune diseases and non-existent smoking habit. The age range was from 22 to 48 years, with an average age, therefore, of 35 years. Some women practiced physical activity daily and others weekly. To obtain L-PRF derivatives, a blood sample was collected from each individual through simple venipuncture. For this purpose, there was the amount of 4 tubes of 5 ml of blood for each candidate. The first 3 tubes, with platelet activator and clot separator gel, were destined for centrifugation, in order to fractionate the platelet by-products. In the fourth tube, anticoagulant was added and destined to perform a complete blood count, erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP), to prove the absence of any pathological process in activity. The evaluation of the volunteers' potential antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* showed positive action in 40% of the total L-PRF by-products. There was selectivity and differentiation, in the intrinsic individuality of each volunteer, when comparing the 3 elements of L-PRF in the inhibition of the growth halo. Then came another stage of the present study, the dosage of cytokines and growth factor, respectively: tumor necrosis factor (TNF), interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor b (TGF- $\beta$ ) in SAS and exudate. In view of the determination of the antibacterial effect of the L-PRF by-products, exsudate and clot, promising results are also evident, in relation to the biomodulatory effect evidenced in this last step when comparing SAS and exsudate.

**Keywords:** Regenerative medicine. Cell therapy. Biomodulation. Fibrin. Healing. Wounds. Anti-bacterial.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Representação esquemática dos 3 estratos de centrifugação obtidos após o processamento sanguíneo (1- soro acelular sobrenadante, 2- coágulo L-PRF, 3- células vermelhas) 16

**Figura 2** - Tubo utilizado para armazenamento e centrifugação da coleta de sangue, com ativador de coágulo, e visualização do fracionamento dos subprodutos da técnica de L-PRF 25

**Figura 3** – Ensaio antimicrobiano baseado no método de difusão com SAS depositados em poços nas culturas bacterianas de *P. aeruginosa* (A) e *S. aureus* (B), exsudato colocado sobre discos de papel Whatman nº 3 nas culturas bacterianas (C, D) e fibrina como complemento final encimada na superfície das placas de ágar Mueller Hinton nas culturas demonstradas (E, F) 31

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
FC	Fator de Crescimento
IL-10	Interleucina 10
L-PRF	Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos
PCR	Proteína C Reativa
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
SAS	Soro Acelular Sobrenadante
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador $\beta$
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
RPM	Rotações por minuto
PMPs	Polipeptídeos derivados de Plaquetas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de Plaquetas
IL-6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
IgE	Imunoglobulina E
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
BHI	Brain Heart Infusion
CLSI	Clinical and Laboratory Standart Institute
CR3	C3 receptor

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	12
2.1 Pele .....	12
2.2 Reparo de Feridas.....	13
2.3 Medicina regenerativa .....	13
2.4 L-PRF .....	15
2.5 Concentrados plaquetários.....	18
3 OBJETIVO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODO .....	23
4.1 Sujeitos.....	23
4.2 Experimentos <i>in vitro</i> .....	23
4.2.1 Obtenção da L-PRF.....	23
4.2.2 Potencial antibacteriano da L-PRF.....	25
4.2.3 Potencial regenerativo da L-PRF .....	25
4.3 Análise estatística .....	27
5 RESULTADOS .....	28
5.1 Caracterização da Amostra – sujeitos.....	28
5.2 Obtenção da L-PRF.....	29
5.3 Potencial antibacteriano da L-PRF .....	29
5.4 Potencial Regenerativo da L-PRF .....	31
5.4.1 TGF- $\beta$ .....	32
5.4.2 IL-10 .....	32
5.4.3 TNF .....	33
6 DISCUSSÃO .....	35
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	40
8 REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE A – Análise de dados .....	46
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP .....	63
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e um dos principais envoltórios protetores corporais. Juntamente com o pericárdio que envolve o coração, a pleura que protege o pulmão e o peritônio que reveste o interior do abdômen, exercem em conjunto o recobrimento dos órgãos em agrupamentos anatômicos, colaborando com a homeostase do meio. Quando há o rompimento da barreira cutânea, o desafio de um bom reparo é acionado imediatamente, com uma cascata coordenada de eventos celulares e bioquímicos no processo de reparo tecidual (AIRES et al., 2009).

A reparação é o nome genérico do processo para restabelecer a estrutura e função do tecido. Ocorre de duas formas distintas: a cicatrização e a regeneração. A cicatrização de feridas consiste em fases que culminam na inflamação, proliferação, granulação e epitelização. Assim, ocorre a reconstrução tecidual, que depende do processo intrínseco de cada indivíduo, com limites estabelecidos de acordo com a dimensão do dano. A polarização ocorre desde uma queimadura de primeiro grau, com a adoção de técnicas terapêuticas através de curativos, até acometimentos de terceiro grau ou perda tecidual significativa com necessidade da abordagem cirúrgica, com o uso de enxertos ou rotações de retalhos cutâneos (BILGEN et al., 2021).

A regeneração é o estímulo do processo de reparo, ao agregar técnicas para otimizar as condições do leito da ferida que auxilia na reparação. O grande destaque é para a medicina regenerativa, que acompanhou a revolução científica e tecnológica e vem incorporando novos recursos terapêuticos ao longo das últimas décadas. Conduz vigorosamente os princípios da tecnologia de células tronco e engenharia de tecidos, substituindo ou regenerando tecidos e órgãos e restaurando suas funções (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

Uma das estratégias consiste no uso de fatores de crescimentos autólogos, projetando descobertas que contribuem para sua relevância no cenário médico da atualidade. Demonstra significativas singularidades na esfera orçamental, pois a baixa onerosidade é ilustrada ao ser abordada uma técnica na fração de concentrados plaquetários derivada do próprio sangue do indivíduo, como por exemplo, o plasma rico em plaquetas (PRP) que usa anticoagulante no seu processamento, e a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) que absente o

impedimento da formação de coágulo no sangue. Ambos atuam como matriz regenerativa autóloga (CHOUKROUN et al. 2006a).

A medicina regenerativa, portanto, não se limita ao uso de células tronco, mas também inclui a aplicação terapêutica de diversos fatores estimuladores, tais como fatores de crescimento, hormônios, citocinas e outros elementos solúveis e biodegradáveis que intervêm nos mais variados processos biológicos de cicatrização (PEGORARO; FREDBERG; CHEN, 2017). Assim, ocorre a contribuição para a neoformação tecidual, que intervém muitas vezes, no desafio da velocidade na história natural da ferida e atina a qualidade dos tratamentos, com impacto no bem-estar do paciente, e projeção no combate sequencial das sequelas sociais e econômicas, principalmente (NGUYEN; PHAM, 2018). Apesar de promissora, são escassas as pesquisas que determinam a real influência desta técnica sobre o reparo das feridas cutâneas *in vitro*. Considerando as circunstâncias, a potencialidade atribuída na técnica de L-PRF, na projeção do desvio do retardo de cicatrização em feridas cutâneas, seu efeito antibacteriano e regenerativo requer maiores estudos para sua aplicação terapêutica (CHOUKROUN et al., 2006b).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Pele

A principal função da pele é ser uma barreira física que protege todos os órgãos e tecidos internos. O tegumento é constituído por três camadas, sendo a primeira camada a epiderme, a segunda camada a derme e a terceira camada denominada de hipoderme/tecido subcutâneo. Todo o tecido epitelial contém células, fatores de crescimento e matriz extracelular que são estruturas essenciais para a restauração da pele após uma lesão (SHPICHKA et al., 2019; XIONG et al., 2021).

A epiderme, por sua vez, está subdividida em 5 estratos. A camada córnea é composta por células anucleadas que fazem contato direto com o meio externo. Em seguida vem a camada lúcida, presente apenas em determinadas topografias, como regiões acrais. A seguir, a camada granulosa se apresenta como uma faixa protetora por conter inúmeras células apresentadoras de antígenos, chamadas Langerhans. Abaixo, a camada espinhosa se caracteriza por apresentar estruturas intercelulares denominadas desmossomos, que são responsáveis pelas trocas de íons e nutrientes. Por fim, a camada basal faz a interface com a derme e possui uma única fileira de células com um citoplasma abundante para fazer o papel protetor do DNA celular (BRAGHIROLI et al., 2022).

Os vasos sanguíneos são visualizados no plexo vascular superficial que se localiza entre a derme papilar e a derme reticular. Esse é o primeiro contato da pele com a vascularização corporal, portanto, vale ressaltar que a epiderme é uma estrutura avascular (SHARMA, 2021).

Um dano tecidual pode ser causado por agentes de natureza física, térmica ou química gerando a exposição dos tecidos subjacentes, resultando em uma ferida. A gravidade da lesão depende do comprometimento gerado no revestimento epitelial que pode ser classificado quanto ao grau, local, extensão e a sua profundidade que pode ser superficial ou profunda (TOTTOLI et al., 2020).

## **2.2 Reparo de Feridas**

A pele é o maior órgão do corpo humano e, portanto, também o maior alvo de fenômenos patológicos. As doenças cutâneas seguem um curso progressivo e constante, pois, em sua grande maioria, são projeções externas na pele, através de sinalizações na forma de lesões elementares, com origem interna de um evento do organismo (FERREIRA; WEBER; BONAMIGO, 2021).

Feridas agudas são lesões cutâneas com tempo de duração inferior a 6 semanas que, em determinadas topografias e algumas situações, precisam de agilidade no tempo cicatricial. A perda tecidual das úlceras cutâneas, com as mais variadas etiologias, pode estender desde a epiderme até a fáscia muscular com inevitáveis efeitos que potencializam os riscos aos pacientes de infecções, impactos diretos na qualidade de vida pelo desconforto da dor, além de gerar consequência indesejável psicossocial, social e econômica, por inevitavelmente adiar o retorno do paciente ao cotidiano habitual (JESUS, 2019).

Tal espectro desencadeia a necessidade de alternativas para otimizar o tempo de reparo tecidual desde o uso de cosméticos avançados com nanotecnologia, curativos inteligentes com materiais bio sintéticos, biocompatíveis e biodegradáveis até procedimentos cirúrgicos (HYNDS; BONFANTI; JANES, 2018).

A infecção da ferida é um dos principais contribuintes para atrasos na cicatrização de lesões de pele e regeneração de tecidos. O controle de infecções é, portanto, um importante pré-requisito para a cicatrização bem sucedida de lesões cutâneas evitando, assim, a fase crônica que seria classificada com o prolongamento do limite para acima de 6 semanas no quesito cronológico de cicatrização (BURNOUF et al., 2013).

## **2.3 Medicina regenerativa**

A medicina regenerativa é um campo vasto e amplo da ciência, com aplicação em multidisciplinaridade, no intuito de acelerar e encurtar a cascata natural de reparação tecidual e seu processo regenerativo. O processo de cicatrização é uma resposta da imunidade inata, regulado por um padrão de eventos que inclui

coagulação, inflamação, granulação e epitelização, dentre outros. A diferença entre cicatrização e regeneração está, respectivamente, na substituição do tecido prévio à injúria e a sua recuperação com reestabelecimento das estruturas originais (CLARKE et al. 2018).

Avaliando a tríplice regenerativa da medicina, foi percebida a composição celular e biomolecular com efeito modulatório no microambiente através de um suporte fibrinogênico. Na medicina regenerativa, temos o destaque das moléculas bioativas que sinalizam e modulam a atividade celular. Citocinas e fatores de crescimento são exemplos que promovem a adesão e sinalização com a maximização da migração celular, induzindo a viabilidade e o desenvolvimento do tecido (D'ASTA et al. 2018).

Os fatores de crescimento (FC) podem ser obtidos a partir da técnica de L-PRF, que é o aumento da concentração de plaquetas no plasma sanguíneo. Na perspectiva clínica, podem ter grande potencial cicatricial de feridas, por promover a expansão do fibrinogênio, que é solúvel, em fibrina insolúvel, agilizando assim, a formação de coágulo na topografia danificada (MITCHELL et al. 2016).

Com o avanço da medicina regenerativa, técnicas promissoras transformaram a engenharia de tecidos com outras possibilidades de potencializar a terapêutica dermatológica, aperfeiçoando diagnósticos pela sua extensão, exposição e na percepção de sintomas na pele de doenças sistêmicas em diferentes órgãos. Este estudo avaliou e comparou em um primeiro tempo, o potencial antibacteriano em diferentes indivíduos da L-PRF, descrita na literatura desde o final dos anos 1990 (EVANS; IRUELA-ARISPE; AHAO, 2020).

Alterações cutâneas devido a trauma ou contaminação com microrganismos, evocam respostas plaquetárias que exibem resultados positivos de defesa aos estímulos presentes no contexto da infecção. As deficiências clínicas na quantidade ou qualidade das plaquetas são cada vez mais reconhecidas como correlatas do risco de gravidade do leito cutâneo contaminado. A partir desta perspectiva, as plaquetas participam da defesa do hospedeiro com desempenho eficiente antibacteriano e multifuncional (MEDEIROS; DANTAQS-FILHO, 2016).

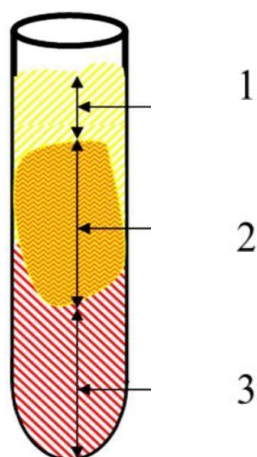


## 2.4 L-PRF

A obtenção autóloga do L-PRF é segura, simples, acessível e economicamente viável, além da facilidade de manipulação clínica e sua versatilidade para a eficácia na medicina regenerativa. A avaliação do potencial antibacteriano na técnica de L-PRF traz benefícios e faz o elo entre a imunidade adaptativa e inata do hospedeiro contra as infecções. Além disso, as plaquetas atuam no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização. As estruturas e funções das plaquetas no que se refere à defesa do hospedeiro, têm sido o foco das revisões literárias da atualidade (ABREU, 2018).

A L-PRF pertence a uma nova geração de concentrados de plaquetas, com processamento simplificado e sem manipulação bioquímica do sangue. É um preparado orgânico, atóxico e com baixa morbidade. Os componentes são separados por gradiente de densidade após sua centrifugação em 3 fases distintas: soro acelular sobrenadante (SAS) na camada superior, o coágulo de fibrina rico em plaquetas e leucócitos (L-PRF) no nível intermediário do tubo e, por fim, os glóbulos vermelhos (Figura 1). O processo mecânico de centrifugação fraciona a porção mais nobre na parte superior e intermediária do tubo (SU et al., 2009).

**Figura 1** – Representação esquemática das 3 fases obtidas após a centrifugação sanguínea (1- soro acelular sobrenadante, 2- coágulo de L-PRF, 3- células vermelhas).



**Fonte:** Modificado de DOHAN et al., 2006

As plaquetas não se distribuem da mesma forma nos 3 produtos da centrifugação. O coágulo de L-PRF contém 97% de plaquetas e mais de 50% dos leucócitos da coleta venosa, dando origem a uma forte matriz de fibrina com uma distribuição tridimensional específica capaz de liberar fatores de crescimento e proteínas envolvidas na cicatrização de feridas por mais de 7 dias *in vitro*, promovendo a proliferação e a diferenciação celular (MAZZUCCO; BORZINI; GOPE, 2010).

Concentrado de plaquetas são obtidos pela centrifugação do sangue do paciente que podem variar de acordo com as rotações por minuto e tempo de atividade na centrífuga (PORTO, 2022).

É importante que sejam relatados nas publicações todos os dados obtidos, incluindo volume de sangue colhido, as concentrações obtidas de plaquetas, leucócitos e hemácias, aditivos, tipo de ativação, quantificações de substâncias, tanto de fatores de crescimento como de produtos do processo inflamatório, volume de L-PRF colhido e equipamentos utilizados. Esses dados são primordiais para a avaliação da sua eficácia e reprodutibilidade da técnica (ARENAS; VASCONCELOS; SILVA, 2021).

O sucesso da técnica é dependente da forma tempestiva e ágil da passagem da coleta do sangue para a centrífuga por causa da rapidez de polimerização da fibrina e obtenção de uma matriz resistente e rica em soro e plaquetas (SAVINA et al., 2018).

O material rico em fibrinas, fibroblastos e fatores de crescimento, vem se mostrando promissor quanto a sua aplicabilidade por ter obtenção autóloga, segura, simples, acessível e economicamente viável. (PINTO; PIZANI, 2015).

A fibrina é a forma ativada de uma molécula plasmática chamada fibrinogênio e está maciçamente presente tanto no plasma quanto nas plaquetas. Desempenha um papel determinante na agregação plaquetária durante a hemostasia, pois secreta fatores de crescimento, realiza adesão de moléculas e libera quimiocinas que interagem com o ambiente local para promover a diferenciação celular, proliferação e regeneração. As quiniocinas são quimiocinas que exercem atividade antibacteriana de forma direta, com domínios funcionais distintos e autônomos. Sua implantação e processamento são de expressiva significância frente aos sinais do hospedeiro em resposta aos fatores de virulência dos microorganismos (HESSELER

et al., 2019).

Em seguida, consolida o aglomerado de plaquetas inicial, constituindo uma parede protetora ao longo de brechas vasculares durante a coagulação. Na verdade, o fibrinogênio é o substrato final de todas as reações de coagulação. Por ser uma proteína solúvel, o fibrinogênio é transformado em uma fibrina insolúvel pela trombina, enquanto o gel de fibrina polimerizada constitui a primeira matriz cicatricial do local da lesão (ARENAS; VASCONCELOS; SILVA 2021).

O fato de a trombina ser gerada em locais de infecção endovascular, através da estimulação da tromboplastina (que transforma a protrombina em trombina), e ser conhecida pela sua considerável e potente estimulação da degranulação plaquetária, se torna indispensável para a liberação de polipeptídeos derivados de plaquetas (PMPs). Os PMPs são induzidos pela trombina e sua liberação também pode ser estimulada por  $\alpha$  toxinas estafilocócicas. Durante o processamento da L-PRF por centrifugação, as plaquetas são ativadas e a sua degranulação maciça implica em uma sinalização de citocinas. Essas observações fornecem base contextual para maior reconhecimento das exatas atividades antibacterianas plaquetárias (ETIENNE; VIEGAS, VIEGAS JUNIOR, 2021).

Estudos *in vitro* demonstraram que as plaquetas, após estimulação com trombina, são capazes de liberar proteínas com atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, vírus e, inclusivamente de protozoários (YEAMAN, 2010).

Análises iniciais revelaram que a L-PRF poderia ter regulação imunológica com habilidades de retrocontrole da inflamação. Esses achados apoiam o conceito de que as interações plaquetárias com bactérias detectam padrões moleculares que ocorrem por meio de interações específicas entre receptor e ligante (BURNOUF et al., 2018).

As aplicações clínicas conhecidas da L-PRF destacam uma cicatrização tecidual acelerada devido ao desenvolvimento de neovascularização efetiva, fechamento acelerado de feridas com remodelação rápida do tecido cicatricial e praticamente ausência de eventos infecciosos. Sustenta, assim, a informação do potencial antibacteriano inato em trabalhos na literatura, com o foco na relação direta entre a concentração de plaquetas e o efeito antimicrobiano, além evidentemente, do poder hemostático (SU et al., 2019).

Vale ressaltar que o processo de cicatrização é uma resposta da imunidade

inata, ou seja, independente de estímulo prévio. Seus mecanismos abrangem barreiras das mais variadas naturezas: físicas, químicas e biológicas (componentes celulares e moléculas solúveis) e são regulados por um padrão de eventos que incluem coagulação, inflamação, granulação e epitelização (MARTÍNEZ PÉREZ, 2018).

Este estudo procurou avaliar e comparar em um primeiro tempo, o potencial antibacteriano em diferentes indivíduos da L-PRF. Apesar dos 30 anos desde o seu primeiro relato, os mecanismos subjacentes do efeito antibacteriano nos concentrados de plaquetas ainda não estão claros. O impacto e ação de cada componente, bem como seus possíveis efeitos no combate à infecção, ainda são pouco conhecidos, apesar da L-PRF se mostrar promissora quanto a sua aplicabilidade e resultado (COSTA; SANTOS; SANTOS, 2021).

A literatura científica foi revisada acerca do mecanismo de ação e possíveis aplicabilidades clínicas da L-PRF. Pesquisas surgiram para apontar ação antibacteriana dos concentrados autólogos de plaquetas (LANATA-SELINGUE, 2021).

## **2.5 Concentrados plaquetários**

As plaquetas medem cerca de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são fragmentos celulares citoplasmáticos derivados basicamente de megacariócitos da medula óssea. Possuem forma de discos, anucleados, que, na fase inflamatória da cicatrização, degranulam e auxiliam a mobilização celular para a produção de coágulo. Após a ativação, mudam rapidamente de forma, passam de discóides para amebóides e trafegam para os locais de infecção. Patógenos bacterianos são capazes de se ligar, agregar e induzir a degranulação de plaquetas, que passam de células discóides lisas para formas amebóides com pseudópodes (YEAMAN, 2019).

As plaquetas contêm três tipos distintos de grânulos citoplasmáticos. Dentre todos os grânulos presentes nas plaquetas, os grânulos  $\alpha$  são considerados reservatórios intracelulares de proteínas vitais para a cicatrização de feridas, medem de 200 a 500 nm de diâmetro e cada um é envolto por uma membrana unitária (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009).

Essas proteínas incluem fatores de crescimento derivados de plaquetas

(PDGF), fator de crescimento transformador ( $TGF-\beta$ ) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). Tais proteínas apresentam 2 funções: hemostática e imunológica. A função hemostática corresponde a adesão, modulação da coagulação e reparo das células endoteliais. A adesão tem a participação do fibrinogênio, trombospondina, vitronectina, laminina e fator de von Willebrand. A modulação da coagulação é marcada pelo plasminogênio e o reparo das células endoteliais salienta no elenco o PDGF e o  $TGF-\beta$ .

A função imunológica contém um arsenal de proteínas antibacterianas e quinocidinas. Os grânulos densos armazenam mediadores de tônus vascular (adenosina difosfato (ADP), serotonina, cálcio e fosfato). Os grânulos lipossômicos (lipossomais) produzem enzimas que fazem a mediação da dissolução do trombo (AHMAD, 2015).

Na ativação, esses grânulos se fundem com a membrana da célula plaquetária e são transformadas em estado bioativo, se ligando a receptores transmembrana de células-alvo. Quando são ativadas, amplificam a sinalização, projetando maior alcance com o sucesso de seu auxílio, conduzindo a fase inflamatória para a fase proliferativa de reparação tecidual cutânea (ARENAS; VASCONCELOS; SILVA, 2021).

As plaquetas, por armazenarem fatores de crescimento, impactam diretamente na regeneração, cicatrização e angiogênese do tecido. Portanto, a L-PRF é utilizada na atualidade para otimizar reparos teciduais com fornecimento adicional de fatores de crescimento e citocinas (ARENAS; VASCONCELOS; SILVA, 2021).

É importante conhecer o mecanismo de ação da cicatrização tecidual ou cicatrização de feridas, no qual podemos distinguir várias fases. Primeiro, ocorre a hemostasia para prevenir o sangramento, mediada pela vasoconstrição e agregação plaquetária. As plaquetas contêm uma série de grânulos denominados  $\alpha$ , que são reservatórios de proteínas ativas, com mais de 30 fatores de crescimento e peptídeos com atividade antibacteriana. A liberação lenta de moléculas como a trombospondina 1, explica as propriedades anti-hemorrágicas imediatas do coágulo de L-PRF, essa fase formará a fibrina que levará à formação do trombo (COSTA et al., 2021).

A L-PRF utilizada pela primeira vez por Choukroun, é uma malha de fibrina

que tem como principal função a estrutural, para as substâncias envolvidas na regeneração, como as células mesenquimais indiferenciadas, facilitando sua diferenciação e chegada na fase inflamatória. Neste momento, a fibrina expressa receptores CD11c que, quando ligados a receptores CD18, formam integrinas que facilitam a adesão de leucócitos ao endotélio vascular. Tal processo é essencial para a migração e ativação de muitos leucócitos, como neutrófilos, que produzem citocinas e fatores de crescimento no local da lesão, como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e TNF- $\alpha$ , que apresentam um possível efeito pró-inflamatório (COSTA et al., 2021).

Com o objetivo de reparar sua arquitetura e restabelecer o dano tecidual, a L-PRF atua como barreira biológica facilitando o fechamento primário do leito danificado, protegendo-o das agressões externas e acelerando a cicatrização, principalmente com a chegada dos monócitos que se diferenciam em macrófagos e produzem collagenases. Segue-se a reepitelização, a formação de novos vasos sanguíneos e a síntese de colágeno através do remodelamento os fibroblastos se tornam miofibroblastos e tracionam o leito da ferida para sua diminuição (COSTA et al., 2021).

As plaquetas expressam uma série de reconhecimento de patógenos e receptores de sinal do hospedeiro que as tornam sentinelas do sistema vascular para detectar e responder à inflamação e à infecção tecidual. São as primeiras e mais numerosas células que se acumulam nos locais de infecção. Expressam uma ampla gama de potenciais receptores bacterianos, podendo internalizar bactérias e são capazes de liberar grande variedade de moléculas que fornecem uma série de funções de defesa do hospedeiro. Além da liberação de peptídeos antimicrobianos, as plaquetas também são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, ligar e internalizar microrganismos e participar da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (BALOUIR; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

As plaquetas compartilham receptores de superfície com fagócitos (neutrófilos e monócitos) que incluem o receptor para imunoglobulina E (IgE) e o da PCR, expressam o receptor CR3 do complemento, respondem a citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. São achados que implicam ainda mais as plaquetas na coordenada navegação para locais de infecção ou lesão tecidual. Essas relações demonstram que as plaquetas possuem características estruturais consistentes com um papel na

defesa antibacteriana do hospedeiro. Na presença de IgE ou PCR, as plaquetas aumentam sua citotoxicidade. Em conjunto, o conhecimento precedente apoia fortemente o conceito de que as plaquetas possuem funções antibacterianas sem dúvidas (SHARMA et al., 2021).

Os mecanismos antibacterianos dos leucócitos são aumentados contra microrganismos expostos às quimiocinas. Estudos recentes demonstram na literatura o papel direto das plaquetas no reconhecimento, sequestro e neutralização de patógenos invasores, bem como sua contribuição indireta no recrutamento de leucócitos para locais de infecção e inflamação. Na modulação de seu comportamento, aumenta significativamente a sua capacidade de fagocitar e eliminar microrganismos desencadeando diferentes tipos das vias de sinalização (YEAMAN, 2019).

### **3 OBJETIVO**

Este trabalho tem a finalidade de avaliar, dentro de uma abordagem translacional, a influência antibacteriana e regenerativa biomodulatória dos subprodutos da técnica de L-PRF: SAS, exsudato e coágulo.



## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Sujeitos**

Para o desenvolvimento da presente pesquisa, foram selecionadas 10 voluntárias, que se apresentaram elegíveis considerando como critérios de inclusão: higidez com ausência de qualquer processo patológico ativo, bom estado nutricional, abstração de doenças crônicas ou autoimunes, hábito tabagista inexistente e a negativa no uso de qualquer droga anticoagulante ou que alterasse parâmetros hemodinâmicos, em geral, nas últimas duas semanas que antecederam sua participação na pesquisa.

Para a confirmação da inclusão na pesquisa, estas voluntárias assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) que explicava todo o procedimento a serem submetidas, assim como seus riscos e benefícios, em linguagem coloquial e na presença do pesquisador para elucidar possíveis dúvidas a respeito (ANEXO A).

Previamente ao início do estudo, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIARA sob o parecer de número 5.331.192. (ANEXO B).

### **4.2 Experimentos *in vitro***

#### **4.2.1 Obtenção da L-PRF**

Para a obtenção das L-PRF, amostras de sangue foram colhidas via punção venosa simples, com Scalp 21G para evitar lise ou alteração de quaisquer componentes sanguíneos. Foram coletados 3 tubos de 5 mL contendo ativador de plaqueta e gel separador de coágulo dentro deles. Além disso, foi coletado 1 tubo de sangue, também de 5 mL, porém com anticoagulante, destinado à realização de um hemograma completo para obtenção dos valores basais sanguíneos de plaquetas, leucócitos e hematócrito, assim como os respectivos VHS (velocidade de hemossedimentação) e PCR (proteína C reativa) para avaliar as atividades inflamatórias. Os exames bioquímicos foram avaliados pelo laboratório de análises

clínicas São Lucas, com referendado controle e exigência através do Programa de Qualidade exigido pelo Conselho Federal de Biomedicina.

Imediatamente após a coleta de sangue, os tubos destinados à obtenção dos subprodutos da L-PRF foram centrifugados a força  $G$  de 1.473 (Centrífuga Excelsa II modelo 206 BL) por 12 minutos.

Terminada a centrifugação, foi aguardado repouso no período de 60 minutos, em temperatura climatizada a 22°C, para a progressão do processo de ativação plaquetária, Figura 2.

**Figura 2** – Tubo utilizado para armazenamento e centrifugação da coleta de sangue, com ativador de coágulo, e visualização do fracionamento dos subprodutos da técnica de L-PRF



**Fonte:** Própria autora.

Após esta etapa, a remoção e o armazenamento em microtubos do SAS ocorreu com o auxílio de uma pipeta. Na sequência, houve a retirada do coágulo de L-PRF feita com a ajuda de uma pinça anatômica esterilizada e, para homogeneização vigorosa e extração de exsudato, o coágulo foi transferido em um outro tubo de coleta com ativador de coágulo de 4 mL (BD VACUTAINER referência 360053) e submetido a um processo de agitação mecânica por 5 minutos, em Vórtex Solab AP 56 em modo contínuo. Os subprodutos foram acondicionados e devidamente catalogados em microtubos para utilização a fresco em ensaio de ação antibacteriana.

O material destinado para dosagem de fator de crescimento e citocinas foi armazenado em condições estéreis, devidamente catalogado em microtubos e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

#### **4.2.2 Potencial antibacteriano da L-PRF**

As culturas das cepas *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram negativa aeróbia estrita (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram positiva anaeróbia facultativa (ATCC 25923) foram mantidas em estoque sob refrigeração, suspensas em meio Brain Heart Infusion (BHI) e reativadas mediante incubação em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 16-18 horas.

Para a realização destes ensaios foram utilizados os subprodutos do L-PRF: SAS, coágulo e exsudato. A referência elencada para o teste de difusão em ágar foi segundo os padrões da Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI). Para o estudo do SAS, o material foi introduzido em poços preparados com 6 mm no ágar Mueller Hinton das culturas bacterianas. Para a análise do exsudato, o teste de difusão em disco utilizando papel Whatman nº 3 foi selecionado. Os coágulos foram depositados sobre a superfície das placas de culturas das cepas através da utilização da lâmina de bisturi número 11, para a divisão em fragmentos com a variação de diâmetro entre 3 a 5 mm. A reprodutibilidade das 3 frações de L-PRF foi avaliada através de triplicata.

Após 16 horas, houve a leitura da atividade antibacteriana que teve a mensuração de ação estabelecida pela identificação e qualificação dos halos de inibição de crescimento formados ao redor do SAS, dos discos com exsudato e dos fragmentos de coágulo.

#### **4.2.3 Potencial regenerativo da L-PRF**

Para estabelecer o potencial regenerativo dos subprodutos da L-PRF, foram selecionadas 3 biomoléculas para dosagem, reconhecidamente relacionadas com os concentrados plaquetários e leucocitários: TGF- $\beta$ , IL-10 e TNF. As análises

referentes ao potencial regenerativo, foram realizadas no laboratório de inflamação e doenças infecciosas (LIDI) do Departamento de morfologia e patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) sob coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda de Freitas Anibal.

Para a análise das citocinas inflamatórias IL-10 e TNF e fator de crescimento TGF- $\beta$  foi utilizado o Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) direto, seguindo o protocolo abaixo descrito.

Para este procedimento, foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços para ELISA (Kit OptEIATM, BDBiosciences). Entre cada etapa as placas foram lavadas com 300  $\mu$ L/poço de solução de lavagem (PBS 1X [Tampão fosfato salino: 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1 L de água destilada] + tween 20 a 0,05%, pH7,4). Após a sensibilização das placas com 100  $\mu$ L/poço de anticorpo de captura específico em tampão carbonato (7,13 g de NaHCO<sub>3</sub> e 1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para 1 L de água mili-q) na proporção 1:250, passou-se pela incubação por 16 horas a 4 °C.

Em seguida, foi efetuada a etapa de bloqueio com 200  $\mu$ L/poço com albumina 1%, seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, foram introduzidos 50  $\mu$ L das amostras e da curva de titulação dos padrões de citocinas com incubação de 2 horas em temperatura climatizada a 22°C.

O anticorpo de captura conjugado com a enzima peroxidase foi em seguida adicionado em 100  $\mu$ L/poço ao abrigo de luz por 1 hora e 30 minutos e incubação a temperatura climatizada 22°C em albumina 1X na proporção 1:250 de enzima e anticorpo. Ademais, o próximo passo foi realizado ao abrigo de luz, no qual, foi aplicado 100  $\mu$ L/poço do substrato da enzima TMB (3,3'; 5,5' – Tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas de 15 a 30 minutos aproximadamente em temperatura climatizada a 22°C.

Em seguida, a reação enzimática foi interrompida com a aplicação de 50  $\mu$ L/poço de ácido sulfúrico 2M e a leitura das placas foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, pelo espectrofotômetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), sendo as concentrações calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em  $\mu$ L/mL. Similarmente, os controles brancos com os anticorpos de detecção e captura foram diluídos em albumina 1X.

### 4.3 Análise estatística

Os dados deste estudo foram analisados através de métodos quantitativos, usando metodologia estatística descritiva, testes de hipóteses. O experimento resultou em dados contínuos em amostras pequenas, com 10 voluntárias cada.

Para cada voluntária, algumas respostas foram reportadas considerando para a análise estatística, diferentes variáveis de interesse, com pares consistindo de duas réplicas para duas medidas em cada variável.

Com as medidas repetidas em cada unidade amostral e dada a grande variabilidade entre as respostas para cada voluntária, utilizaram-se testes pareados *t-student*. Os dados foram transformados para uma escala logarítmica, que levou à melhor normalidade dos dados.

A suposição de normalidade dos dados é necessária para validar os resultados dos testes estatísticos, especialmente para a situação de amostras pequenas, verificados a partir de gráficos de probabilidade normal.

Como foram realizadas duas leituras de cada amostra de cada molécula alvo bioquímica, inicialmente, foi feita uma análise entre as réplicas das amostras através de testes de hipóteses *t-student* pareados, entre as leituras para cada amostra, para verificar se as médias das réplicas para cada voluntária são estatisticamente iguais, tornando as leituras confiáveis para serem usadas nas médias finais de interesse tanto do SAS quanto do exsudato.

A seguir, as médias das duas réplicas para SAS e exsudato também foram testadas usando testes *t-student* pareados. Para todos os testes realizados (hipótese de nulidade: sem diferença de médias versus a hipótese alternativa: as médias são diferentes), consideramos um nível de significância igual a 5%, isto é, rejeitamos a hipótese de nulidade se  $\text{valor-p} < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da Amostra – Sujeitos

Embora a elegibilidade das voluntárias fosse estabelecida pelo TCLE, de que eram clinicamente saudáveis, optou-se por realizar exames laboratoriais bioquímicos que pudessem confirmar o *status* de saúde das voluntárias. A primeira etapa, portanto, consistiu em analisar os resultados dos exames bioquímicos das voluntárias. Os resultados estão inseridos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Resultados referentes aos exames bioquímicos das 10 voluntárias com as respectivas idades, valores de referência para hematócrito, leucócitos, VHS, PCR e plaquetas.

VOLUNTÁRIAS	IDADES (anos)	HEMATÓCRITO de 36,0 a 48,8 (x10 <sup>6</sup> células/mm <sup>3</sup> )	LEUCÓCITOS de 3,5 a 10,5 (x10 <sup>3</sup> células/mm <sup>3</sup> )	VELOCIDADE DE HEMOSSSEDIMENTAÇÃO até 20,0 (mm/h)	PROTEÍNA C REATIVA inferior a 6,0 (mg/L)	PLAQUETAS de 140,0 a 450,0 (x10 <sup>3</sup> células/mm <sup>3</sup> )
B	39	40,0	5,4	8,0	0,1	267,0
M	23	42,4	7,2	3,0	1,5	253,0
T	46	38,0	4,5	12,0	0,1	422,0
V	22	39,3	13,6	18,0	2,3	357,0
L	29	39,0	5,9	17,0	2,2	253,0
O	48	39,8	8,8	22,0	2,8	326,0
R	28	40,3	4,4	3,0	0,5	237,0
A	39	40,9	8,1	14,0	3,5	228,0
J	31	40,3	6,1	22,0	2,4	393,0
G	46	40,4	5,0	2,0	0,8	270,0

**Fonte:** Própria Autora.

Em relação aos valores obtidos de hematócrito, PCR e plaquetas, 100% das voluntárias apresentaram resultados dentro dos valores de referência. Uma das voluntárias apresentou leucocitose, em contrapartida, sem alterações nos parâmetros avaliados para atividades inflamatórias: VHS e PCR. Ademais, durante a

anamnese, negou hábitos ou condições inelegíveis, que foram fatores relevantes, portanto, para a sua permanência no grupo de voluntárias do estudo.

Os resultados demonstraram valores de VHS discretamente acima dos valores de referência em outras 2 voluntárias. Os demais parâmetros se mantiveram dentro da referência normal laboratorial. A anamnese e o *status* clínico das voluntárias fortaleceram a elegibilidade e continuidade na presente pesquisa.

## **5.2 Obtenção da L-PRF**

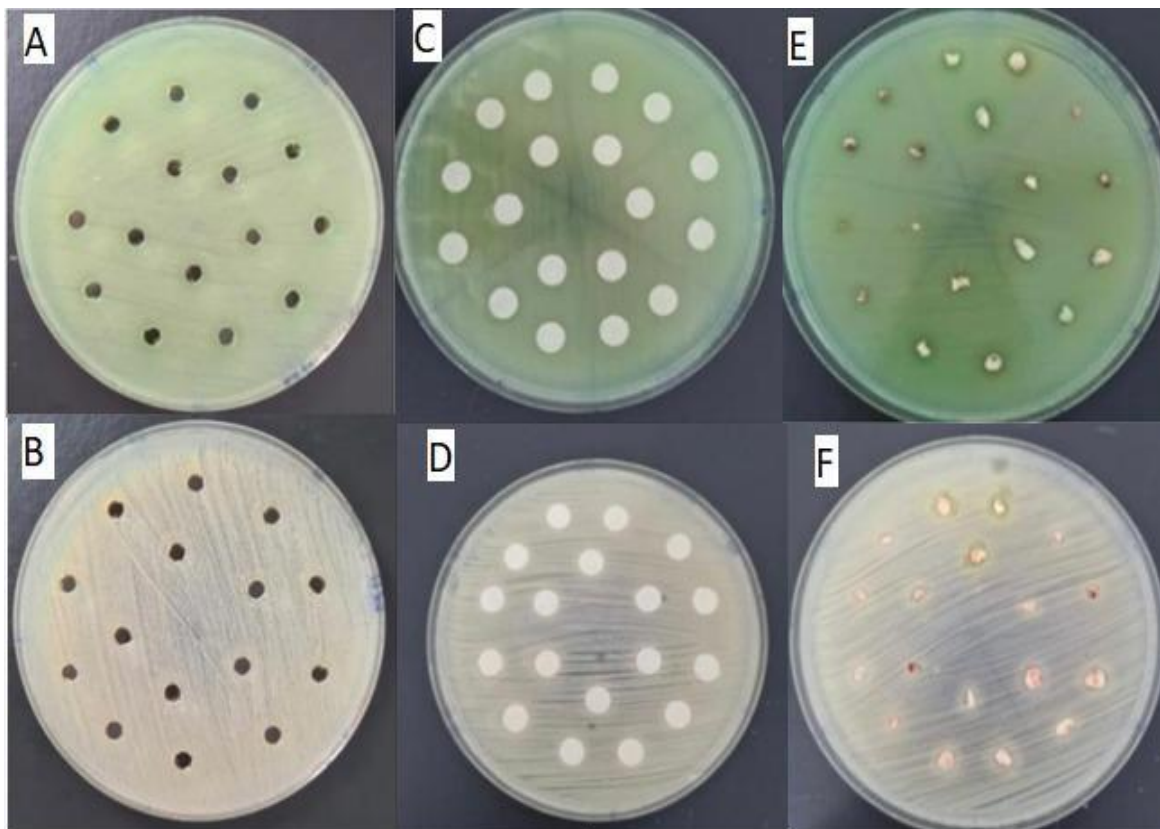
Embora todas as voluntárias tivessem condições clínicas semelhantes e tenham sido submetidas ao mesmo protocolo de coleta e centrifugação, foram identificadas diferenças significativas no material obtido após a centrifugação.

Em relação ao SAS, não foi evidenciada diferença significativa entre as voluntárias. Já em relação ao coágulo, foram evidenciadas características físico químicas distintas, tanto no que tange às dimensões quanto na consistência. Como consequência desta distinção, foi também notificada uma diferença no volume do exsudato obtido após o processo de extração.

## **5.3 Potencial antibacteriano da L-PRF**

A sequência de imagens da Figura 3 ilustra os resultados alcançados ao final do ensaio antibacteriano em suas respectivas frações de L-PRF: SAS, exsudato e coágulo.

**Figura 3** – Ensaio antibacteriano baseado no método de difusão com SAS depositados em poços nas culturas bacterianas de *P. aeruginosa* (A) e *S. aureus* (B), exsudato colocado sobre discos de papel Whatman nº 3 nas culturas bacterianas (C, D) e fibrina como complemento final encimada na superfície das placas de ágar Mueller Hinton nas culturas demonstradas (E, F).



Fonte: Própria autora.

A partir da interpretação dos resultados encontrados na referida análise, foi gerada a Tabela 2, que mostra os efeitos dos subprodutos da L-PRF de cada voluntária nas cepas bacterianas.



**Tabela 2** – Resultados do teste de difusão em ágar de inibição bacteriana referentes ao SAS, exsudato e coágulo das voluntárias para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A ausência de inibição bacteriana foi descrita com – e a evidência de inibição bacteriana foi descrita com +.

VOLUNTÁRIAS	SORO ACELULAR SOBRENADANTE		EXSUDATO		COÁGULO	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
B	-	-	+	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-
T	-	-	-	-	-	+
V	-	-	+	-	-	+
L	-	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	+	+
R	-	-	-	-	-	-
A	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-

**Fonte:** Própria autora.

Como identificado na tabela, os resultados permitem constatar que em 60% das voluntárias não houve nenhum tipo de ação antibacteriana.

Nos 40% que exibiram influência inibitória de crescimento bacteriano, foi possível identificar que não houve influência antibacteriana relacionada ao SAS em nenhuma voluntária. Houve ação apenas no exsudato e coágulo, tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*.

Levando em consideração apenas as voluntárias que apresentaram atividade antibacteriana do presente estudo, metade destas voluntárias apontaram ação antibacteriana na análise do exsudato exclusivamente para o *S. aureus*.

Já em relação ao coágulo, 2 voluntárias apresentaram ação antibacteriana apenas no *P. aeruginosa* e 1 voluntária para ambas bactérias.

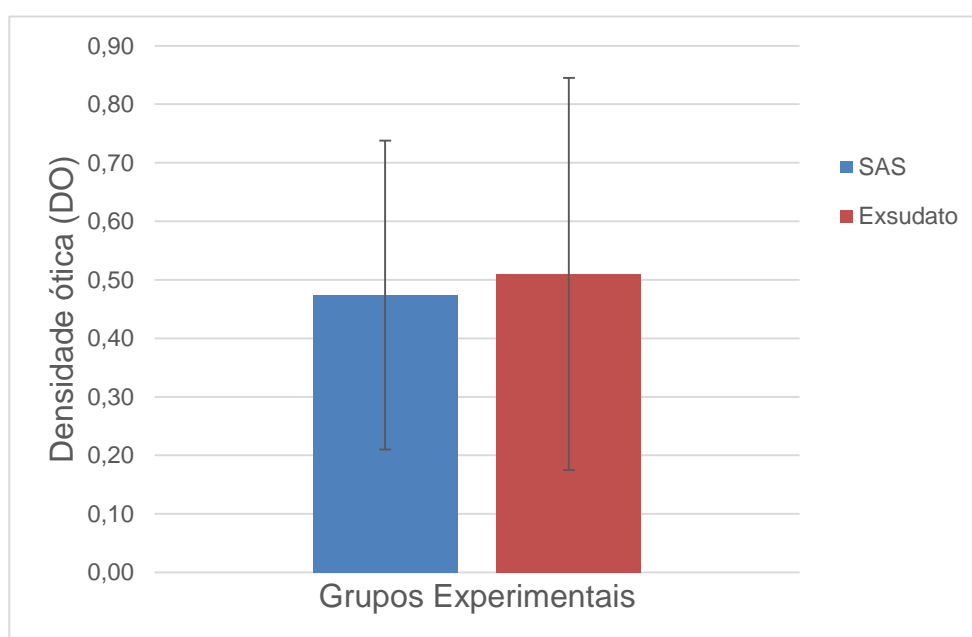
#### 5.4 Potencial Regenerativo da L-PRF

O processo de análise do potencial regenerativo, por meio da dosagem dos alvos bioquímicos, contempla apenas os subprodutos SAS e exsudato, considerando a incapacidade de realização do teste no coágulo da L-PRF.

### 5.4.1 TGF- $\beta$

Os resultados referentes às análises do TGF- $\beta$ , foram inicialmente submetidas ao procedimento estatístico através do teste *t-student* paramétrico para avaliar a consistência das duas leituras realizadas para cada amostra das voluntárias. Os resultados demonstraram a similaridade de dados dos valores das duas leituras realizadas para cada amostra, tanto para o SAS quanto para o exsudato ( $p = 0,829$ ). A partir desta interpretação, foi realizada a segunda etapa do método, a análise comparativa entre a identificação do TGF- $\beta$  entre os subprodutos da L-PRF: SAS e exsudato (Gráfico 1). Os resultados demonstraram que não há diferença estatística na concentração entre os 2 subprodutos.

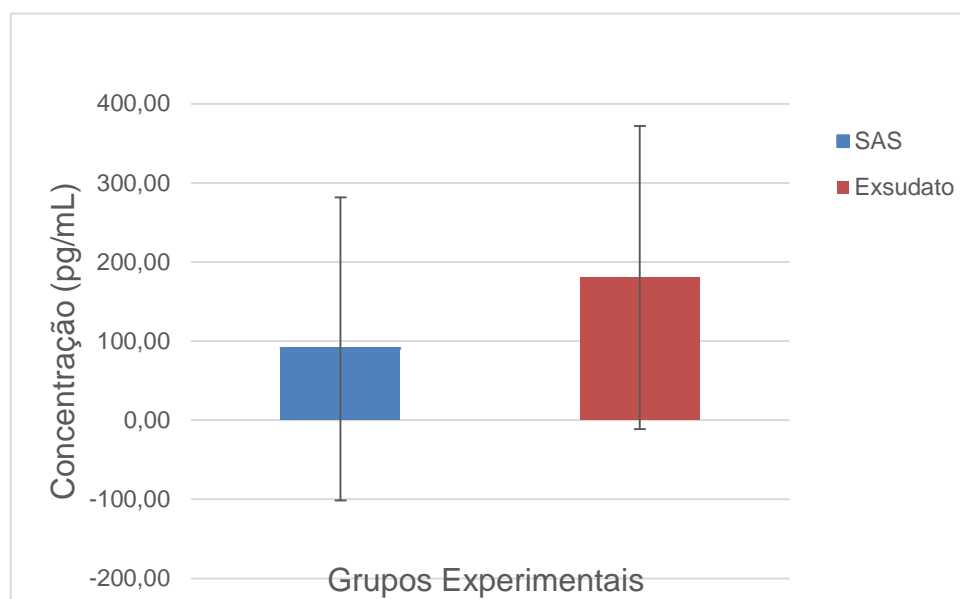
**Gráfico 1 - TGF- $\beta$**



**Fonte:** Própria autora.

### 5.4.2 IL-10

A análise referente a IL-10 demonstrou sua presença em ambos subprodutos testados. A partir da identificação destes alvos, foi realizada análise estatística inicialmente comparando as duas leituras, como feito na análise do TGF- $\beta$  (Gráfico 2). O resultado foi semelhante, tanto no SAS quanto no exsudato ( $p = 0,976$ ).

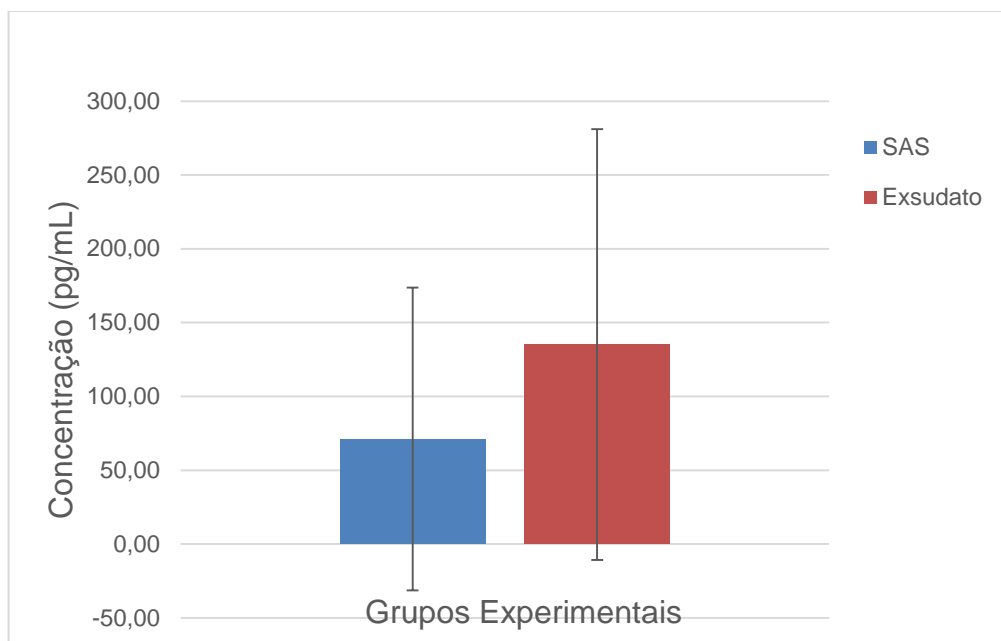
**Gráfico 2 - IL-10**

**Fonte:** Própria autora.

### 5.4.3 TNF

Diante da impossibilidade de estabelecer uma curva entre a concentração e a densidade, não foi possível obter os valores da concentração específica no TNF em cada um dos subprodutos. Em contrapartida, utilizou-se absorvância para comparação.

Assim como realizado no TGF- $\beta$  e IL-10, foram realizadas duas leituras para cada amostra das voluntárias para validar a análise estatística do presente estudo (Gráfico 3). Com um valor de  $p = 0,004$ , as médias SAS e exsudato foram consideradas estatisticamente diferentes, com 16,8% a mais no exsudato em relação ao SAS.

**Gráfico 3 – TNF**

**Fonte:** Própria autora.

## 6 DISCUSSÃO

As pesquisas realizadas, dentro da temática dos concentrados plaquetários, apresentaram uma grande diferença dentro do perfil da amostra em cada trabalho. Houve variação tanto no sexo quanto na faixa etária, condições clínicas e perfil da amostra. Predominam na literatura trabalhos utilizando ambos os sexos e número pequeno de voluntários, como Bilgen et al. que incluiu 9 homens e 7 mulheres. Tal fato pode estabelecer diferenças na pesquisa, considerando condições hormonais e metabólicas, com variações na amostra selecionada, além de interferir na característica dos subprodutos da L-PRF. Dohan et al. selecionou 15 voluntários do sexo masculino, priorizando a padronização do sexo para homogeneizar a amostra elencada.

Desde a concepção desta pesquisa, houve uma preocupação e cautela especial em relação à amostra a ser utilizada. Foi estabelecida a necessidade de controlar variáveis clínicas, considerando a evidência científica da literatura de que, fatores intrínsecos, são extremamente interferentes no resultado da utilização desta técnica de concentração plaquetária. No presente estudo, o sexo feminino foi um dos critérios de caracterização da amostra, assim como a faixa etária, sem influência do processo de envelhecimento e, assim, residir uma maior confiabilidade dos dados pela semelhança do perfil das voluntárias.

Trabalhos de concentrados plaquetários deixam claro em suas discussões o quanto as condições clínicas e hábitos de vida dos indivíduos influenciam na ativação plaquetária. O mais citado é o tabagismo, desde o primeiro protocolo, estabelecido por Choukroun et al., discutida sua interferência no número de hematócritos e plaquetas, reforçando a necessidade do cuidado no planejamento da seleção das amostras para o resultado ser confiável. Portanto, resultados bioquímicos reforçaram a manifestação das voluntárias em relação à higidez neste presente estudo.

A diversidade de produtos plaquetários depende dos critérios de processamento do sangue, há uma diversidade de métodos de obtenção e concentração de plaquetas que resultam em subprodutos e funções diversificadas. Ainda na atualidade, por esta razão, modificações têm sido propostas nas rotações por minuto (RPM), tempo de centrifugação, ou seja, a força  $g$  varia, pois são

elementos-chave para a alteração da estrutura e composição da L-PRF.

Desde o protocolo desenvolvido inicialmente por Choukron et al. no final da década de 1990, com centrifugação em torno de 2.700 a 3.000 RPM e 12 minutos, os trabalhos encontrados na literatura fazem mudanças na metodologia para a compreensão da diversidade de produtos plaquetários, que depende dos critérios de processamento do sangue.

Recentemente, há 2 anos, Castro et al. comparou diferenças do impacto da força  $G$  e do tempo nas características da L-PRF em um trabalho com 8 voluntários. Evidenciou que uma menor força  $G$  reduz a tração do coágulo e o tempo no processo de preparação é significativo. Destacou-se a relevância do tempo entre a coleta do sangue e a centrifugação, que influenciou fortemente a dimensão e estrutura da L-PRF. Ainda encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as comparações de coágulo imediatamente após a centrifugação e os preparados após 2 ou 3 horas. Segundo o autor, quanto maior o tempo de ativação, maior a dosagem de subprodutos plaquetários difundidos no exsudato.

No protocolo utilizado no presente estudo, o tempo de ativação após a centrifugação de 60 minutos foi levado em consideração pelos relatos colhidos na literatura, como citados anteriormente no texto. As alterações de tamanho e consistência dos coágulos também foram entendidas segundo o levantamento das publicações citadas nos parágrafos acima.

Em relação ao efeito antibacteriano dos concentrados plaquetários, conclui-se que os resultados referentes variaram de acordo com o microrganismo, foram seletivos em relação ao subproduto plaquetário e altamente dependentes de variáveis intrínsecas dos indivíduos.

Apenas 40% das voluntárias apresentaram positividade nas duas bactérias selecionadas para análise, entretanto, com diferentes respostas do SAS, coágulo e exsudato. Os resultados evidenciados em relação ao subproduto SAS, evidenciaram a inexistência de uma ação antibacteriana, independentemente do tipo de bactéria estudada. A inexistência de ação antibacteriana no SAS também foi descrita Leal et al. realizando um estudo com as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na cavidade oral de 16 cães, que também não evidenciou a ação antibacteriana do SAS, sugerindo a inexistência deste tipo de influência sobre determinados microrganismos. Ambos resultados, assim como relatado por

outros pesquisadores, permitem sugerir que a inexistência desta ação antibacteriana possa estar relacionada à menor concentração dos subprodutos difundidos no SAS, capazes de efetuar qualquer tipo de ação antibacteriana.

O exsudato demonstrou propriedades *in vitro* com halo de ação inibitório em 2 voluntárias no *S. aureus*, sem atividade observada deste subproduto no *P. aeruginosa*. Na análise da resposta antibacteriana do coágulo, ficou evidente que houve uma maior resposta da ação das voluntárias no *P. aeruginosa* em relação ao *S. aureus*. Em relação às considerações específicas de cada espécie bacteriana, os resultados também podem se diferenciar levando em questão as características intrínsecas das cepas utilizadas, que podem apresentar suscetibilidades contrapostas aos mesmos subprodutos plaquetários (JOANSON; SHANNON; RASMUSSEN, 2011).

Fato é que, uma diferença entre Gram positivo e Gram negativo relevante, está na abordagem da estrutura protetora das bactérias. Evidenciam-se duas membranas no *P. aeruginosa* contrapondo-se a uma parede de peptídeoglicanos ao redor do *S. aureus*. Contudo, atravessar paredes celulares implica mecanismos diferentes de permear membranas envoltórias (XIONG, et al., 2005). A maior apresentação de atividades antimicrobianas do *S. aureus*, pode ter embasamento nos estudos mais recentes, que demonstraram que as plaquetas exercem atividade antiestafilocócica significativa, tanto diretamente quanto por meio da potencialização de macrófagos (SHANNON, 2017; JOANSON; SHANNON; RASMUSSEN, 2011).

Outras razões para explicar a variabilidade observada nos resultados podem ser atribuídas aos tipos de subproduto de plaquetas utilizados, que podem particularizar resultância devido às individualidades no impacto e concentração de cada componente plaquetário. Apesar da ação direta entre plaquetas e *S. aureus* citada anteriormente, a liberação gradual de fatores de crescimento e citocinas são também essenciais para a sua atividade antimicrobiana.

Outro objetivo desta pesquisa foi caracterizar o potencial efeito regenerativo destes subprodutos plaquetários. Para tal, optou-se por avaliar um alvo correspondente ao fator de crescimento que, sabidamente, interfere no processo de reparo tecidual. Um destes ativos foi o TGF- $\beta$ , com demonstração na sua dosagem de quantidades muito semelhantes, sem diferença significativa na sua concentração

em relação aos subprodutos SAS e exsudato. Dohan et al. 2006 também observaram resultados semelhantes do TGF- $\beta$  nas quantificações ELISA.

De acordo com trabalho publicado por Rojas et al. 2022, o TGF- $\beta$  apresenta capacidade de converter fibroblastos em miofibroblastos, que se alinham nas bordas da matriz extracelular, gerando uma força constritiva fundamental para o fechamento da ferida. Entre outras ações descritas na literatura, está a mediação do TGF- $\beta$  na remodelação do tecido envolvendo a síntese de novo colágeno, representa uma importante rede de sinalização que permeia a função de muitos processos biológicos, desde a fase embrionária até a homeostase do adulto (TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020).

Outra molécula investigada na presente pesquisa foi a IL-10. Os resultados demonstraram a presença da interleucina nos 2 subprodutos avaliados, não havendo diferenças entre as concentrações no SAS e exsudato. A IL-10 tem uma ação de extrema importância, pois evita a exposição prolongada aos mediadores inflamatórios e limita um possível dano dos tecidos, seja por infecção ou por outras causas de respostas inflamatórias, dentre elas, as doenças autoimunes. Suas extensas atividades e ações, ora redundantes e ora antagônicas em relação ao seu comportamento com outras citocinas, são justificadas pelo objetivo final do processo, que é estabelecer a homeostasia. Alterações nesta fase, podem alterar o quadro clínico, pelo impacto no padrão fisiológico da resposta individual das voluntárias, estabelecendo, assim, a necessidade de um plano de tratamento individualizado (DA SILVA et al., 2019).

Como citocina pró-inflamatória, foi selecionado o TNF que, após sua prévia liberação, torna possível a síntese da IL-10, segundo Ouyang et al. 2011. O TNF, que possui ação regulatória diretamente dependente da IL-10, com habilidades de retrocontrole envolvidas na inflamação, apresentou diferenças entre os concentrados plaquetários, com maior quantidade no exsudato em comparação ao SAS. Tal fato é relatado em literatura no trabalho de Dohan, 2006a. Portanto, se torna mais válido, de acordo com o presente estudo, priorizar o SAS quando necessitamos da ação do TNF ao invés da utilização do exsudato pela maior concentração neste subproduto.

Considerando a evidência do efeito antibacteriano ser extremamente individualizada, não se pode antecipar o seu potencial, por mais que a literatura apresente os mecanismos de ação em cada subproduto. Trabalhos clínicos visam a



otimização do fechamento de feridas cutâneas, com o favorecimento da parte regenerativa sincronicamente à ação antibacteriana dos subprodutos da técnica de L-PRF, como apresentado nos resultados de Godoi et al. 2022, demonstrando a parte translacional do estudo em um relato de caso de uma mordida canina na face de uma paciente jovem e a sua evolução clínica.

Analisando os resultados, foi observado o potencial antibacteriano e regenerativo dos subprodutos da técnica de L-PRF. São necessários mais estudos para avaliar a sua atividade antibacteriana e, para além disso, os resultados obtidos poderão complementar outras diferentes pesquisas que estão por vir. Os resultados podem ser de interesse para outros pesquisadores que investigam os efeitos aditivos e sinérgicos de estratégias terapêuticas envolvendo os efeitos da L-PRF. Esta pesquisa serve como um recurso fundamental pelo binômio concentrados plaquetários e atividade antibacteriana somados ao potencial regenerativo.

## 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A avaliação dos resultados do potencial antibacteriano da L-PRF sugere a existência de um efeito antibacteriano proporcionado pela técnica de L-PRF;

O efeito antibacteriano apresenta um comportamento com características de seletividade em relação a cepa bacteriana e dependência do subproduto específico de L-PRF em cada indivíduo;

Em relação ao efeito biomodulatório dos subprodutos SAS e exsudato, embora o potencial regenerativo seja associado à técnica, sua mensuração é um grande desafio, assim como o potencial antibacteriano, ou seja, o que se administra não tem controle coletivo, destacando a individualidade biológica e regenerativa das voluntárias;

Novas pesquisas precisam ser conduzidas para a caracterização dos mecanismos envolvidos neste potencial antibacteriano, dos fatores envolvidos na seletividade do efeito e da influência dos parâmetros de obtenção da L-PRF.

## 8 REFERÊNCIAS

ABREU, A. M. **Plasma rico em plaquetas (PRP) em pacientes com úlceras venosas**: ensaio clínico randomizado. 2018. Tese (Doutorado em Ciências do Cuidado em Saúde) - Escola de Enfermagem Aurora de Afonso Costa, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.

AHMAD, Ejaj et al. Fibrin matrices: the versatile therapeutic delivery systems. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 121-136, 2015.

AIRES, F. T; BERNARDO, W. M. Tratamento do cisto pilonidal: cicatrização por segunda intenção ou sutura primária em linha média?. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 508-508, 2009.

ARENAS, G. C. F.; VASCONCELOS, R. C. F.; SILVA, C. R. Diferenças na constituição do plasma rico em plaquetas: influência nos resultados terapêuticos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 4, p. 146-159, 2021.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BIELECKI, T. M. et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. **The Journal of Bone and Joint Surgery British**, v. 89, n. 3, p. 417-420, 2007.

BILGEN, F.; URAL, A.; BEKERECIOGLU, M. Platelet-rich fibrin: an effective chronic wound healing accelerator. **Journal of Tissue Viability**, v. 30, n. 4, p. 616-620, 2021.

BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates. **Blood reviews**, v. 23, n. 4, p. 177-189, 2009.

BRAGHIROLI, N. F. *et al.* A pele através da microscopia confocal de reflectância: contexto histórico, princípios técnicos e sua correlação com a histopatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 6, p. 697-703, 2022.

BURNOUF, T. An overview of plasma fractionation. **Ann Blood**, v. 3, p. 33, 2018.

BURNOUF, T. *et al.* Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. **Transfusion**, v. 53, n. 1, p. 138-146, 2013.

CASTRO, A. B., et al. Impacto da força g e do tempo nas características de matrizes de fibrina rica em plaquetas. **Relatórios Científicos**, v. 11, p. 6038, 2021.

CECERSKA-HERYĆ, E. *et al.* Applications of the regenerative capacity of platelets in modern medicine. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 64, p. 84-94, 2022.

CHOUKROUN, J. *et al.* 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 Endodontology**, v. 101, n. 3, p. e56-e60, 2006a.

CHOUKROUN, J. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. 299-303, 2006b.

CLARKE, G. *et al.* Bench to bedside: Current advances in regenerative medicine. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 55, p. 59-66, 2018.

COSTA, K. L.; SANTOS, M. V.; SANTOS, M. D. S. A Fibrina rica em plaquetas e leucócitos-L-PRF na Odontologia: revisão de literature. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, e332101119473, 2021.

DA SILVA, Mayra Santos *et al.* Citocinas. **ACTA MSM**, v. 6, n. 4, p. 205-217, 2019.

D'ASTA, F. *et al.* The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: a systematic review. **Platelets**, v. 29, n. 1, p. 9-20, 2018.

DOHAN, D. M. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 3, p. e51-e55, 2006.

DOHAN, D. M. *et al.* 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, p. e45-e50, 2006b.

ETIENNE, R.; VIEGAS, F. P. D.; VIEGAS JR, C. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2021.

EVANS, C. E.; IRUELA-ARISPE, M. L.; ZHAO, Y. Y. Mechanisms of endothelial regeneration and vascular repair and their application to regenerative medicine. **The American Journal of Pathology**, v. 191, n. 1, p. 52-65, 2021.

FERREIRA, I. G.; WEBER, M. B.; BONAMIGO, R. R. History of dermatology: the study of skin diseases over the centuries. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 3, p. 332-345, 2021.

GODOI, V. R. F., *et al.* Platelet and leukocyte rich fibrin (L-PRF) applied in necrotizing Fasciitis treatment: case report: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-

PRF) aplicada ao tratamento de Fasceíte necrotizante: relato de caso. **Brazilian Journal of Development**, p. 58258-58273, 2022.

HESSELER, M. J.; SHYAM, N. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: a systematic review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 81, n. 3, p. 834-846, 2019.

HYNDS, R. E.; BONFANTI, P.; JANES, S. M. Regenerating human epithelia with cultured stem cells: feeder cells, organoids and beyond. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 139-150, 2018.

INTRAVIA, J. et al. In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 4, n. 1, p. 79, 2014.

JESUS, A. D. M. E. Intervenção e acompanhamento do grupo de pele no tratamento da deiscência de sutura em ferida operatória: relato de caso. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 15, n. 41, p. 114-124, 2019.

JOHANSSON, D.; SHANNON, O.; RASMUSSEN, M. Platelet and neutrophil responses to Gram positive pathogens in patients with bacteremic infection. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e26928, 2011.

LANATA-SELINGUE, N. *et al.* Antimicrobial effect of leukocyte-and platelet-rich fibrin against aggregatibacter actinomycetemcomitans mono-multiserotypes model. **International Journal of Odontostomatology**, v. 15, n. 4, p. 1035-1042, 2021.

LEAL, B. P. V. *et al.* Estudo da atividade antimicrobiana da fibrina rica em plaquetas (PRF) de origem canina. 2022. Tese (Doutorado) – Escola Universitária Vasco da Gama, 2022.

MARIANI, E. *et al.* Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2015.

MARTÍNEZ PÉREZ, L. *et al.* Aplicación del lisado de plaquetas en la fistula pilonidal. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 34, n. 1, p. 89-95, 2018.

MAZZUCCO, L.; BORZINI, P.; GOPE, R. Platelet-derived factors involved in tissue repair - from signal to function. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 24, n. 3, p. 218-234, 2010.

MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of surgical and clinical research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MITCHELL, Aaron C. *et al.* Engineering growth factors for regenerative medicine applications. **Acta biomaterialia**, v. 30, p. 1-12, 2016.

NGUYEN, P. A.; PHAM, Thuy Anh Vu. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration in vitro. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, 2018.

OUYANG, W. *et al.* Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*, v. 29, p. 71-109, 2011.

PEGORARO, A. F.; FREDBERG, J.; CHEN, Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.

PINTO, J. M. N.; PIZANI, Natássia Soares. Aplicabilidade em dermatologia do plasma rico em plaquetas. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, v. 7, n. 1, p. 61-64, 2015.

PORTO, G. M. A. *et al.* Mecanismo de ação e as possíveis aplicações da Fibrina Rica em Plaquetas na prática clínica: uma revisão narrativa. *Revista Eletrônica Acervo Médico*, v. 11, p. e10379-e10379, 2022.

SAMPOGNA, G.; GURAYA, S. Y.; FORGIONE, A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, v. 3, n. 3, p. 101-107, 2015.

SAVINA, D. **L-PRP, L-PRF, A-PRF. Impacto biológico e cirúrgico de Leucócitos e fibrina na evolução dos concentrados plaquetários.** 2018. Dissertação (Medicina Dentária) - Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

SHANNON, O. Determining platelet activation and aggregation in response to bacteria. *Methods Mol Biol.*, p. 267-273, 2017.

SHARMA, P. *et al.* Stem cells and growth factors-based delivery approaches for chronic wound repair and regeneration: a promise to heal from within. *Life Sciences*, v. 268, p. 118932, 2021.

SHPICHKA, Anastasia *et al.* Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem cell research & therapy*, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2019.

SILVA, J. A. C. *et al.* Uso do hormônio do crescimento associado à fibrina rica em plaquetas e leucócitos injetável (I-PRF). *Revista da Faculdade de Odontologia-UPF*, v. 24, n. 2, p. 309-315, 2019.

SU, C. Y. *et al.* In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 108, n. 1, p. 56-61, 2009.

TANG, Y. Q.; YEAMAN, M. R.; SELSTED, M. E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 6524-6533, 2002.

TOTTOLI, E. M. *et al.* Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 8, p. 735, 2020.

TZAVLAKI, K.; MOUSTAKAS, A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules*, v. 10, n. 3, p. 487, 2020.

XIONG, M. *et al.* The novel mechanisms and applications of exosomes in dermatology and cutaneous medical aesthetics. **Pharmacological Research**, v. 166, p. 105490, 2021.

XIONG, Y. Q. *et al.* Functional interrelationships between cell membrane and cell wall in antimicrobial peptide-mediated killing of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3114-3121, 2005.

YEAMAN M. R. The role of platelets in antimicrobial host defense. In: MICHELSON, A. D. **Plateles**. 4<sup>th</sup>. ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 523-546.

YEAMAN, M. R. Platelets in defense against bacterial pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 525-544, 2010.

## APÊNDICE A – Análise de dados

### (A) TGF-B

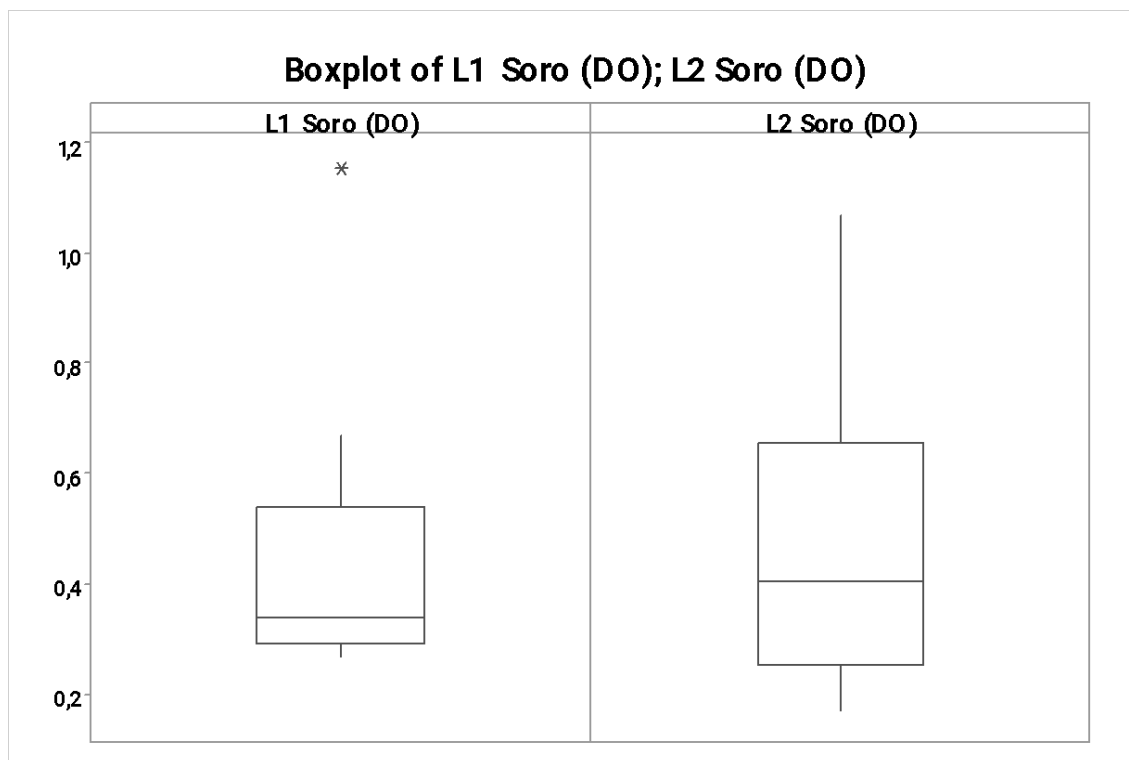
Row	L1 Soro Voluntária	L2 Soro (DO)	L2_1 Média Soro (DO)	L2_2 Exsudato (DO)	Média_1 Exsudato (DO)	Exsudato (DO)
1 B	0,3312	0,3491	0,3402	0,3275	0,4082	0,3679
2 M	0,3417	0,4611	0,4014	0,3703	0,4194	0,3949
3 T	0,2898	0,4345	0,3621	0,4380	0,4889	0,4635
4 V	0,3488	0,3705	0,3597	0,3875	0,4634	0,4254
5 L	0,6689	0,5235	0,5962	0,5084	0,5385	0,5234
6 O	0,4994	0,2540	0,3767	0,1862	0,2291	0,2077
7 R	0,2950	0,2532	0,2741	0,2746	0,1936	0,2341
8 A	0,2691	0,1728	0,2210	0,2834	0,2590	0,2712
9 J	1,1550	1,0540	1,1045	1,0590	0,8967	0,9779
10 G	0,3393	1,0690	0,7041	0,4085	2,0590	1,2338

**Nota:** dados repetidos para mesmo individuo (tamanho amostral pequeno – 10 observações)

#### (1) Comparar 2 medidas para soro (DO)

##### **Descriptive Statistics: L1 Soro (DO); L2 Soro (DO)**

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
L1 Soro (DO)	10	0,4538	0,2745	0,2691	0,3405	1,1550
L2 Soro (DO)	10	0,494	0,317	0,173	0,402	1,069



**Objetivo:** Verificar se as médias das duas medidas (Soro DO) são iguais; usar testes t de *Student* pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

**Paired T-Test and CI: log(L1 Soro); log(L2 soro)**



Paired T for log(L1 Soro) - log(L2 soro)

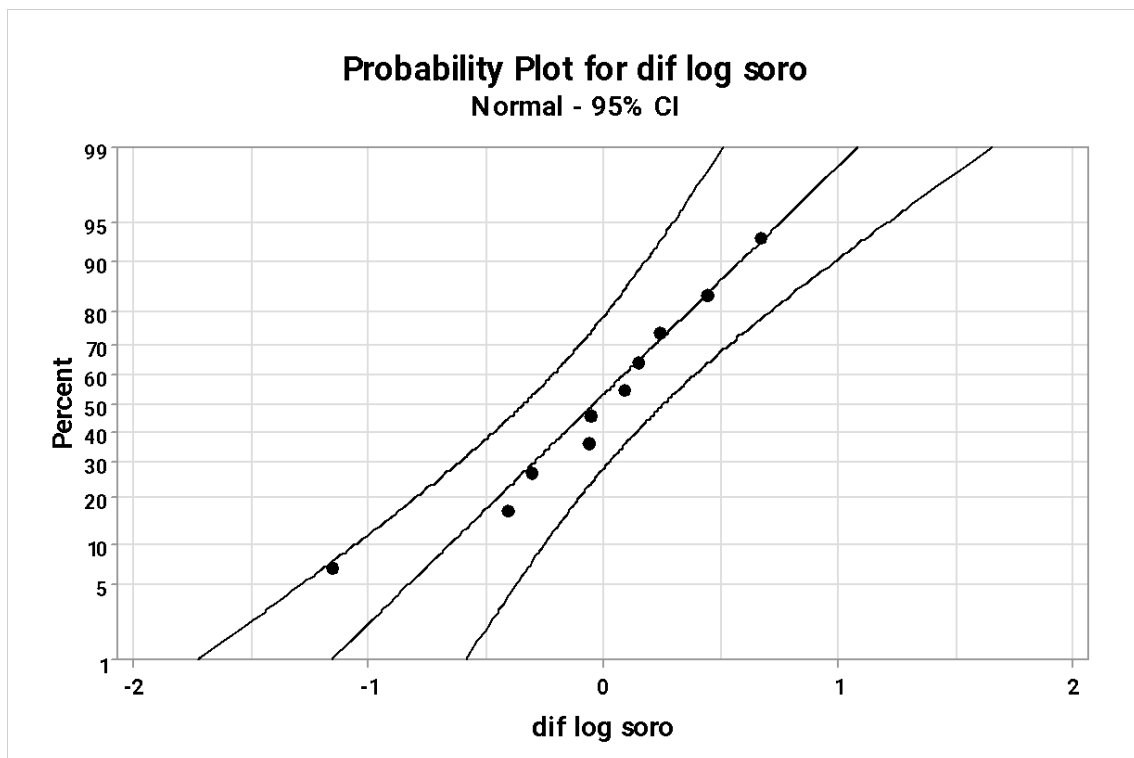
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(L1 Soro)	10	-0,904	0,459	0,145
log(L2 soro)	10	-0,868	0,589	0,186
Difference	10	-0,036	0,507	0,160

95% CI for mean difference: (-0,398; 0,327)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = -0,22 P-Value = 0,829

**Conclusão:** Como valor-p = 0,829 > 0,05 as medias são estatisticamente iguais.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.

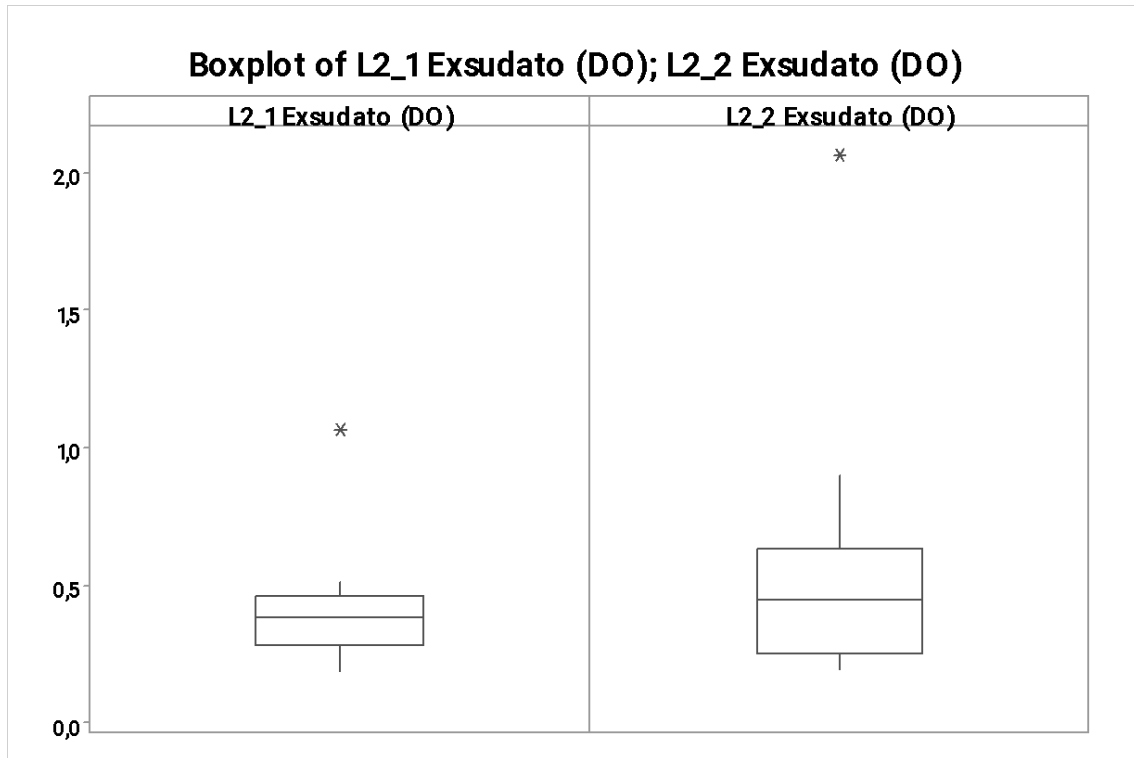


**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada

## (2) Comparar 2 medidas para Exsudato (DO)

### **Descriptive Statistics: L2\_1 Exsudato (DO); L2\_2 Exsudato (DO)**

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
L2_1 Exsudato (DO)	10	0,4243	0,2411	0,1862	0,3789	1,0590
L2_2 Exsudato (DO)	10	0,596	0,552	0,194	0,441	2,059



**Objetivo:** Verificar se as médias das duas medidas (Exsudato DO) são iguais; usar testes t de *Student* pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

### Paired T-Test and CI: log (L1 exsudato); log (L2 exsudato)

Paired T for log(L1 exsudato) - log(L2 exsudato)

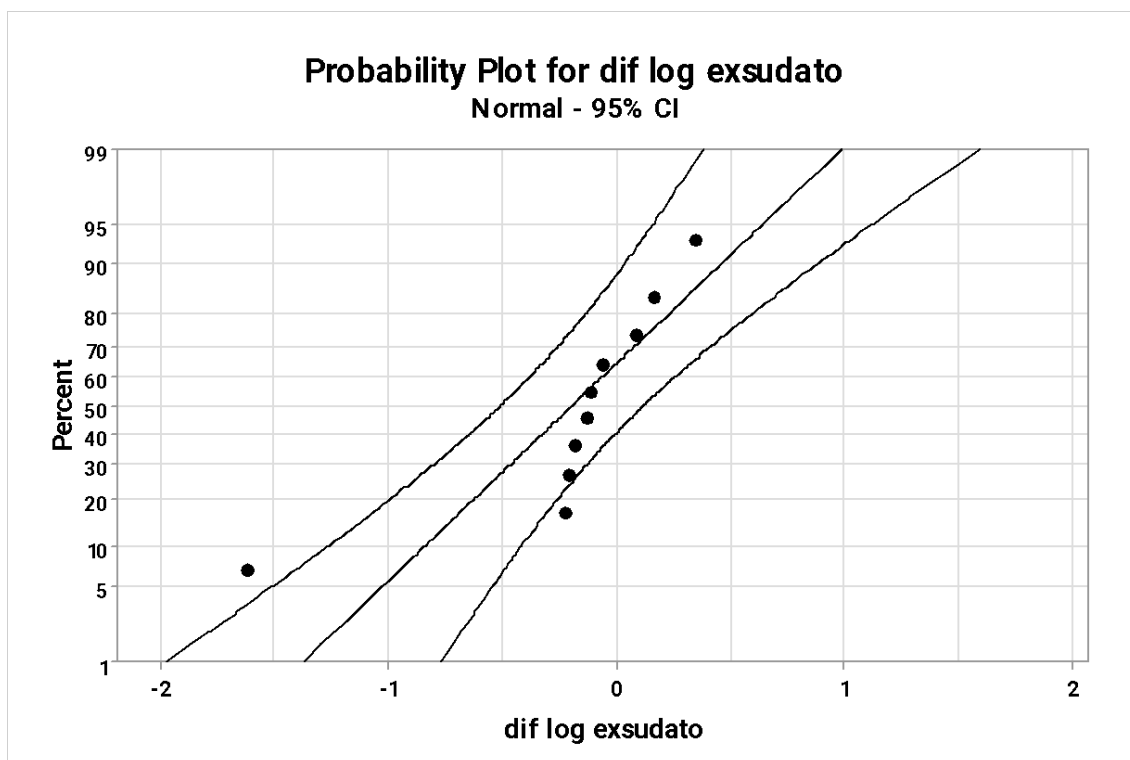
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(L1 exsudato)	10	-0,963	0,458	0,145
log(L2 exsudato)	10	-0,772	0,692	0,219
Difference	10	-0,191	0,534	0,169

95% CI for mean difference: (-0,573; 0,191)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = -1,13 P-Value = 0,287

**Conclusão:** Como valor-p = 0,287 > 0,05 as medias são estatisticamente iguais.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.



**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é aproximadamente verificada

**(3) Comparar 2 medias para Soro (DO) e Exsudato (DO) – medidas para mesmos indivíduos**

**Objetivo:** Comparar se as médias (Soro DO e Exsudato DO) são iguais; usar testes t de Student pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

**Paired T-Test and CI: log (media soro); log (media exsudato)**

Paired T for log(media soro) - log(media exsudato)

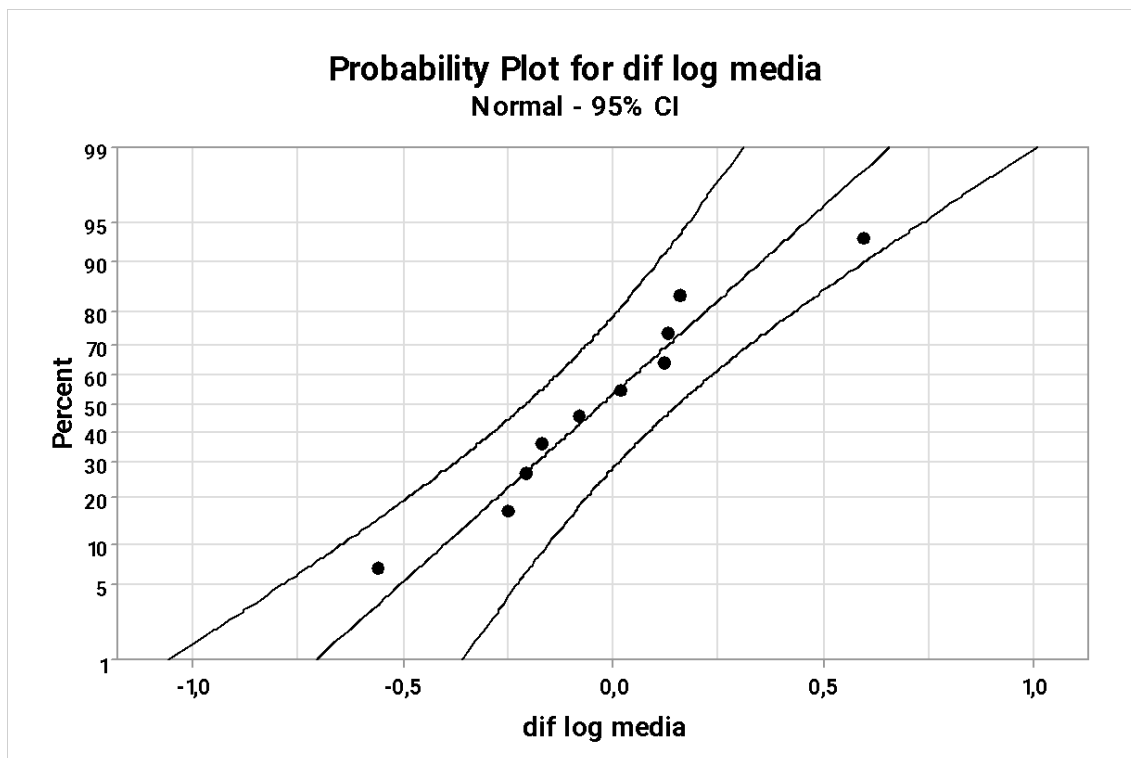
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(media soro)	10	-0,858	0,474	0,150
log(media exsudato)	10	-0,834	0,575	0,182
Difference	10	-0,0237	0,3087	0,0976

95% CI for mean difference: (-0,2445; 0,1971)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = -0,24 P-Value = 0,814

**Conclusão:** Como valor-p = 0,814 > 0,05 as medias são estatisticamente iguais.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.



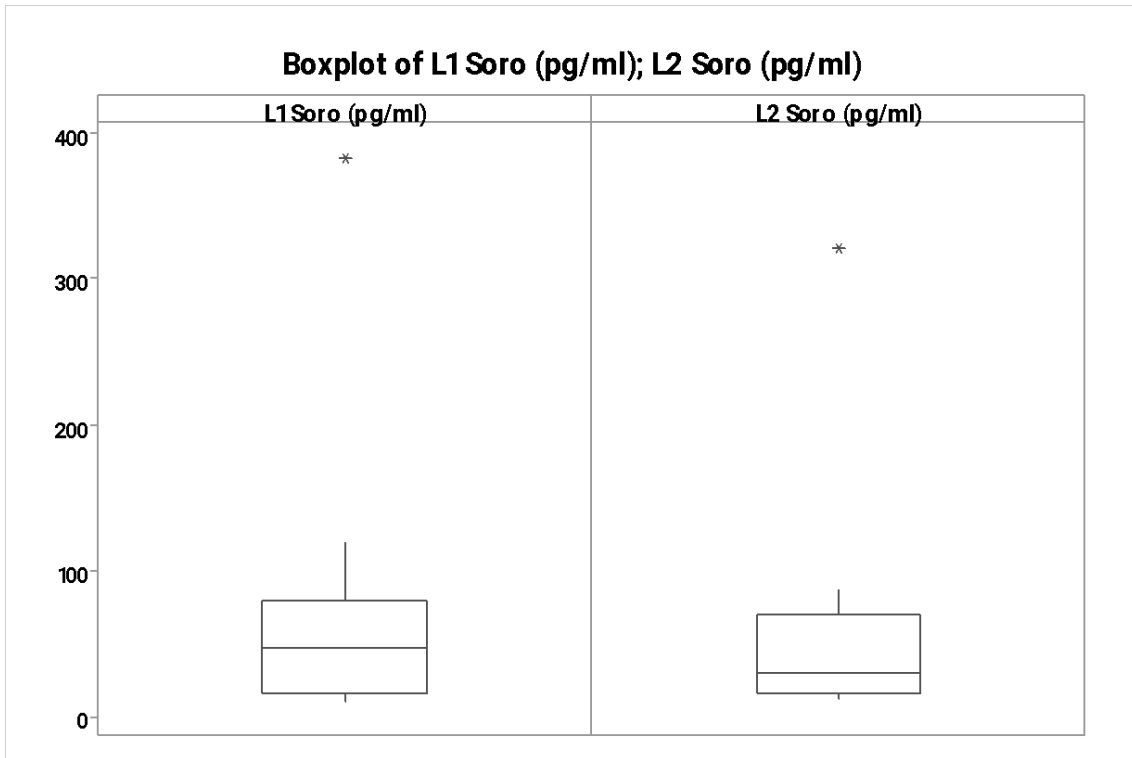
**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada.

## (B) TNF

Row	Voluntária	L1 Soro (pg/ml)	L2 Soro (pg/ml)	L1 exsudato Média (pg/ml)	L2 exsudato Média_1 (pg/ml)
1 B	14,9100	21,6800	18,2950	34,61	35,59 35,1000
2 M	9,7900	12,1700	10,9800	20,10	10,03 15,0650
3 T	45,1000	12,7800	28,9400	106,09	34,73 70,4100
4 V	20,9500	17,0500	19,0000	38,39	0,00 19,1950
5 L	15,8300	24,9800	20,4050	36,56	0,00 18,2800
6 O	66,4500	63,4000	64,9250	41,44	267,72 154,5800
7 R	119,5100	86,5800	103,0450	28,03	339,08 183,5550
8 A	54,8600	50,5900	52,7250	42,05	458,01 250,0300
9 J	382,3800	321,3900	351,8850	240,27	722,10 481,1850
10 G	48,7600	34,1300	41,4450	73,16	174,40 123,7800

### **Descriptive Statistics: L1 Soro (pg/ml); L2 Soro (pg/ml)**

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
L1 Soro (pg/ml)	10	77,9	111,9	9,8	46,9	382,4
L2 Soro (pg/ml)	10	64,5	93,5	12,2	29,6	321,4



(1) **Comparar 2 medidas para soro**

**Paired T-Test and CI: log (L1 soro); log (L2 soro)**

Paired T for log(L1 soro) - log(L2 soro)

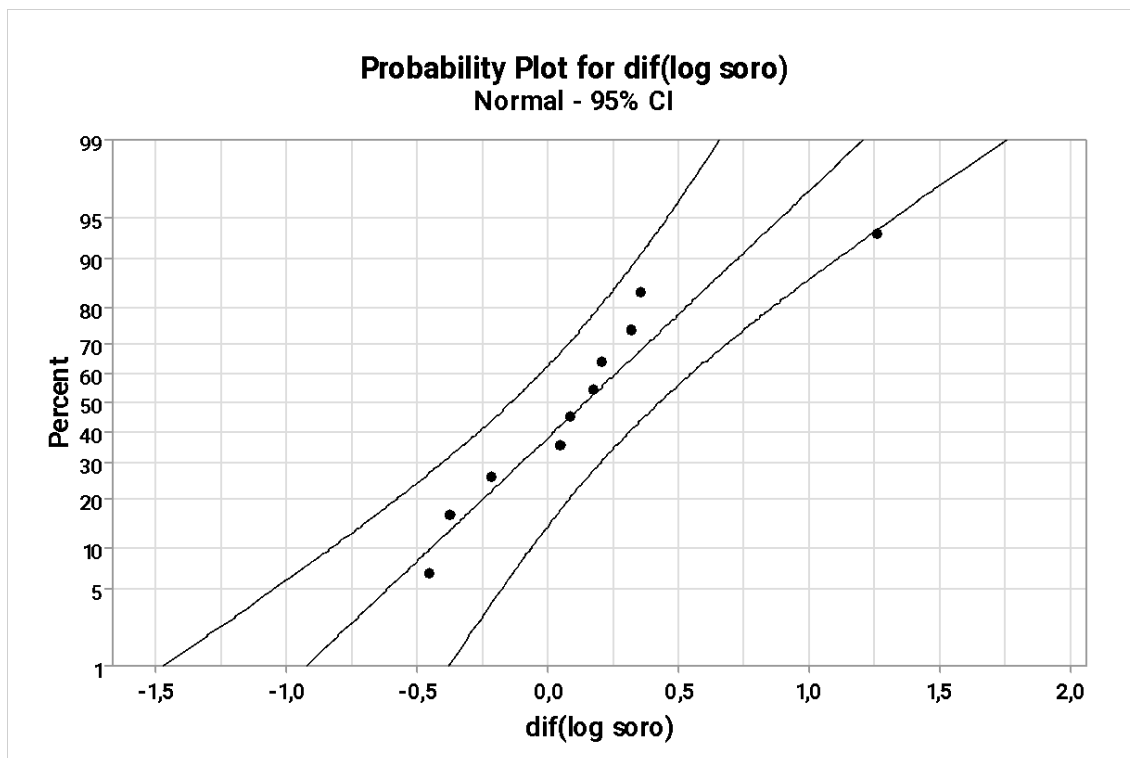
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(L1 soro)	10	3,741	1,101	0,348
log(L2 soro)	10	3,601	1,011	0,320
Difference	10	0,140	0,483	0,153

95% CI for mean difference: (-0,206; 0,486)

T-Test of mean difference = 0 (vs ≠ 0): T-Value = 0,92 P-Value = 0,384

**Conclusão:** Como valor-p = 0,384 > 0,05 as medias são estatisticamente iguais.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.

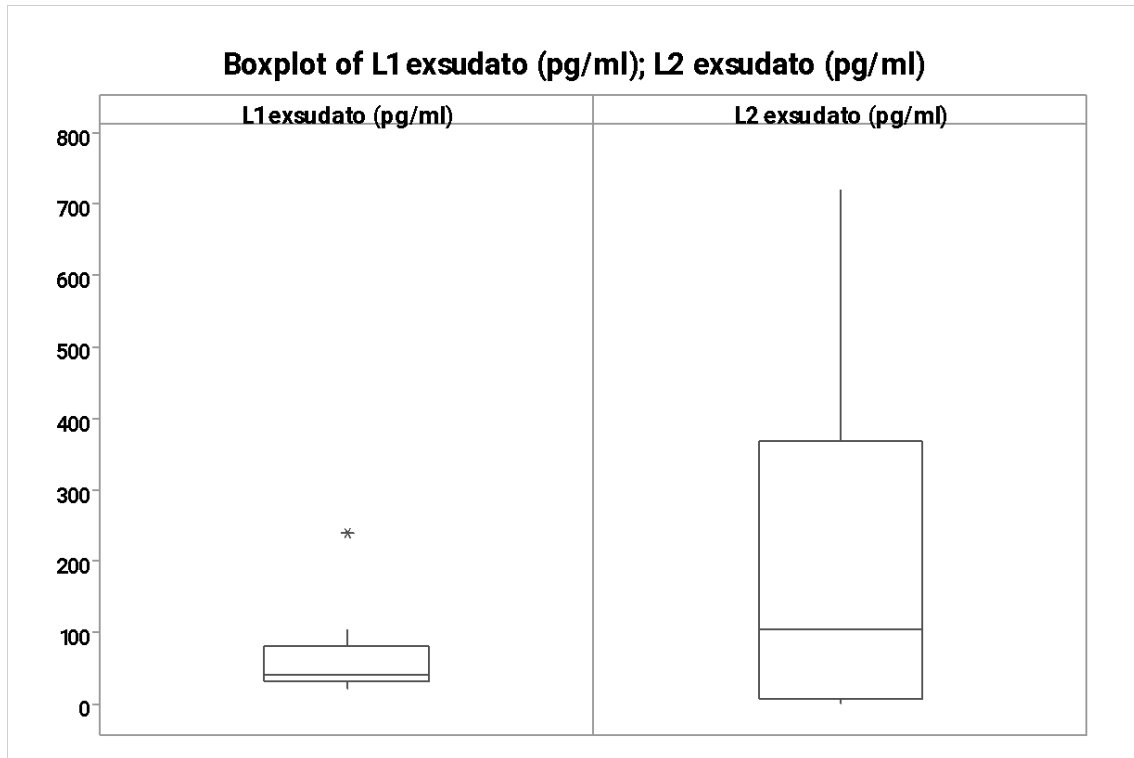


**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada

(2) **Comparar 2 medidas para exsudato**

**Descriptive Statistics: L1 exsudato (pg/ml); L2 exsudato (pg/ml)**

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
L1 exsudato (pg/ml)	10	66,1	66,1	20,1	39,9	240,3
L2 exsudato (pg/ml)	10	204,2	243,6	0,0	105,0	722,1



**Objetivo:** Verificar se as médias das duas medidas (Exsudato DO) são iguais; usar testes t de *Student* pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

**Paired T-Test and CI: log(L1 exsudato); log(L2 exsudato)**

Paired T for log(L1 exsudato) - log(L2 exsudato)

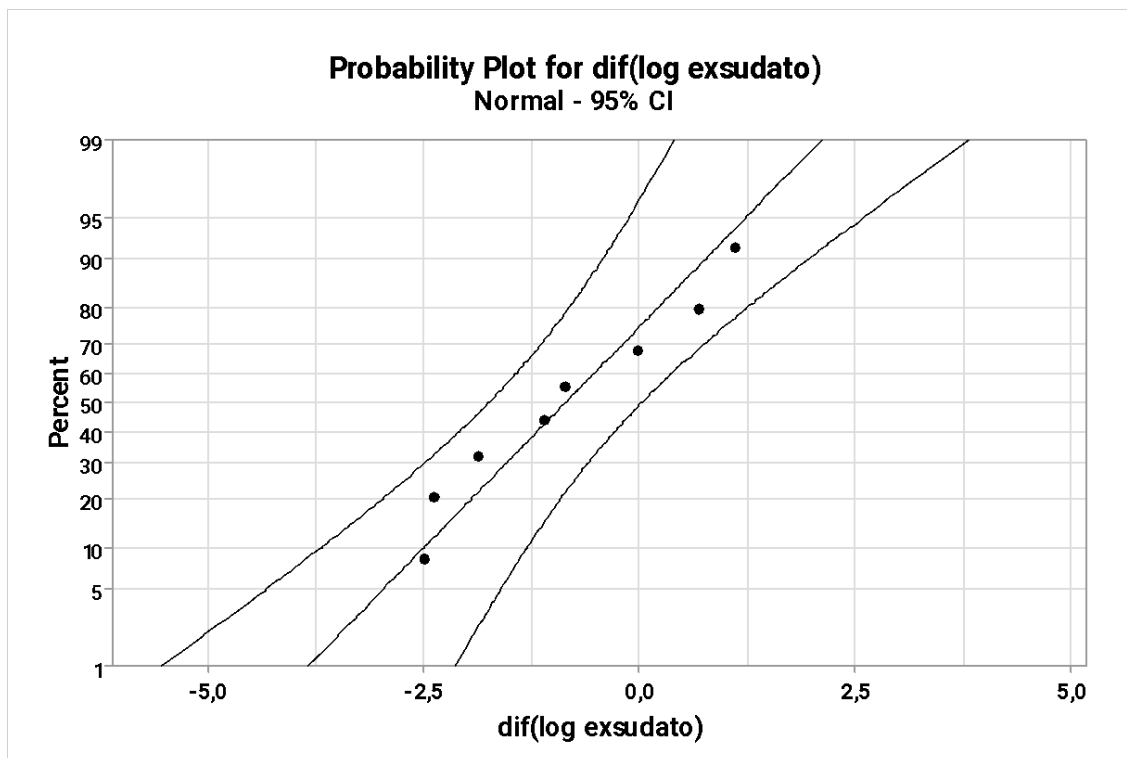
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(L1 exsudato)	8	3,972	0,803	0,284
log(L2 exsudato)	8	4,839	1,513	0,535
Difference	8	-0,866	1,367	0,483

95% CI for mean difference: (-2,010; 0,277)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = -1,79 P-Value = 0,116

**Conclusão:** Como valor-p = 0,116 > 0,05 as medias são estatisticamente iguais.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.



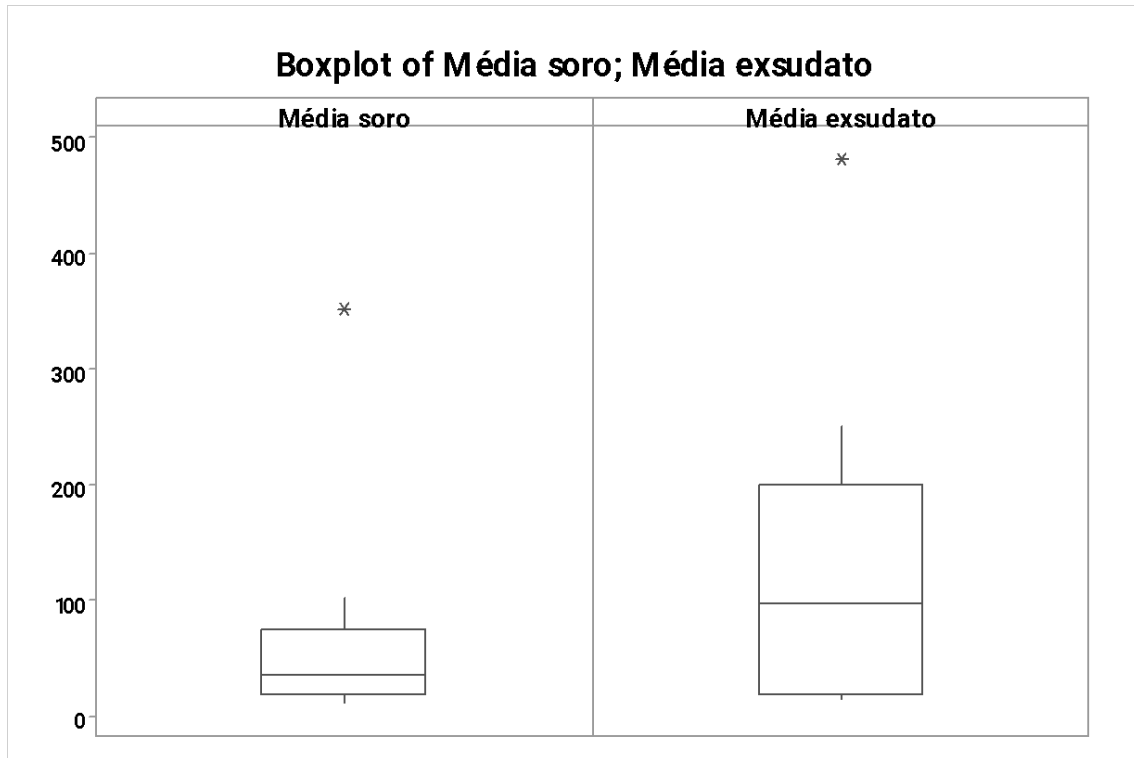
**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada

(3) **Comparar as medias para soro e exsudato**

**Descriptive Statistics: Média soro; Média exsudato**

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Média soro	10	71,2	102,5	11,0	35,2	351,9
Média exsudato	10	135,1	145,9	15,1	97,1	481,2





Row	log(media soro)	log(media exsudato)	dif log medias
1	2,90663	3,55820	-0,65157
2	2,39608	2,71237	-0,31630
3	3,36522	4,25434	-0,88911
4	2,94444	2,95465	-0,01021
5	3,01578	2,90581	0,10997
6	4,17323	5,04071	-0,86748
7	4,63517	5,21251	-0,57735
8	3,96509	5,52158	-1,55649
9	5,86330	6,17625	-0,31295
10	3,72437	4,81851	-1,09414

**Objetivo:** Comparar se as médias (Soro DO e Exsudato DO) são iguais; usar testes t de Student pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

### Paired T-Test and CI: log (media soro); log (media exsudato)

Paired T for log(media soro) - log(media exsudato)

	N	Mean	StDev	SE Mean
log(media soro)	10	3,699	1,018	0,322
log(media exsudato)	10	4,315	1,224	0,387
Difference	10	-0,617	0,509	0,161

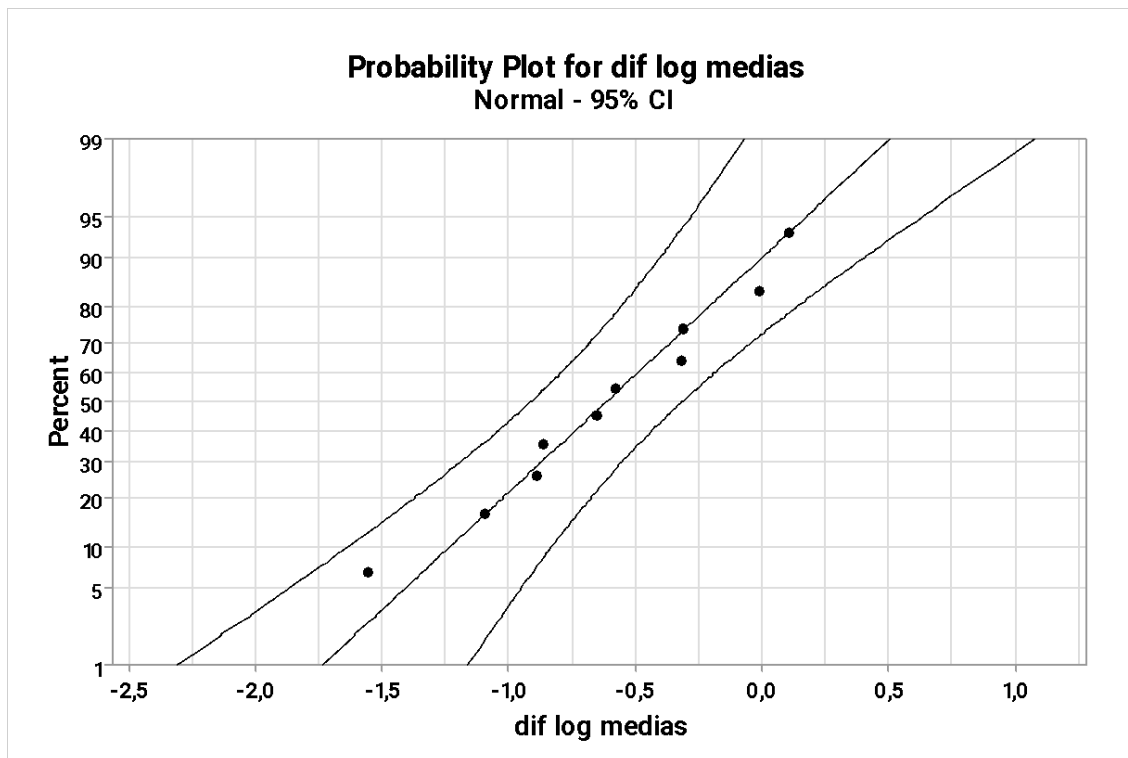
95% CI for mean difference: (-0,980; -0,253)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = -3,83 P-Value = 0,004

**Conclusão:** Como valor-p = 0,004 < 0,05 as medias (soro e exsudato são

estatisticamente diferentes.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.



**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada.

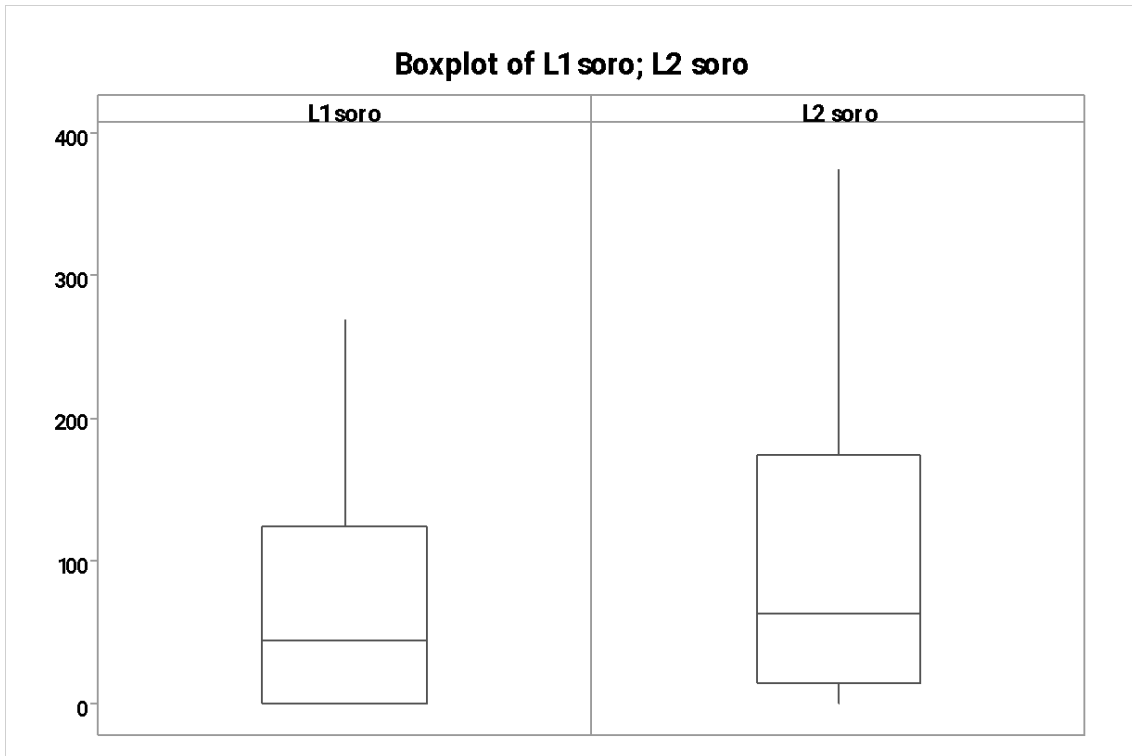
### (C) IL - 10

Row	Voluntária	L1 soro	Média L1	L2 soro soro(pg/ml)	Média exsudato L2	exsudato(pg/ml)
1	B	0	7,2300	3,6150	129,14	214,67
2	M	0	0,0000	0,0000	0,00	0,00
3	T	44	16,8100	30,2100	56,38	93,40
4	V	106	32,1300	69,1450	120,20	42,34
5	L	44	55,1000	49,3550	109,99	75,53
6	O	0	84,4600	42,2300	129,14	214,67
7	R	100	70,4200	85,1000	109,99	145,73
8	A	33	374,2300	203,8150	201,30	1147,79
9	J	270	149,5800	209,5650	246,58	366,57
10	G	175	245,3000	210,1950	92,12	112,55

#### (1) Comparar 2 medidas para soro

##### **Descriptive Statistics: L1 soro; L2 soro**

Variable	N	Mean	St Dev	Minimum	Median	Maximum
L1 soro	10	77,1	88,2	0,0	43,6	269,6
L2 soro	10	103,5	121,1	0,0	62,8	374,2



**Objetivo:** Verificar se as médias das duas medidas (Soro) são iguais; usar testes t de *Student* pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

### Paired T-Test and CI: log(L1 soro); log(L2 soro)

Paired T for log(L1 soro) - log(L2 soro)

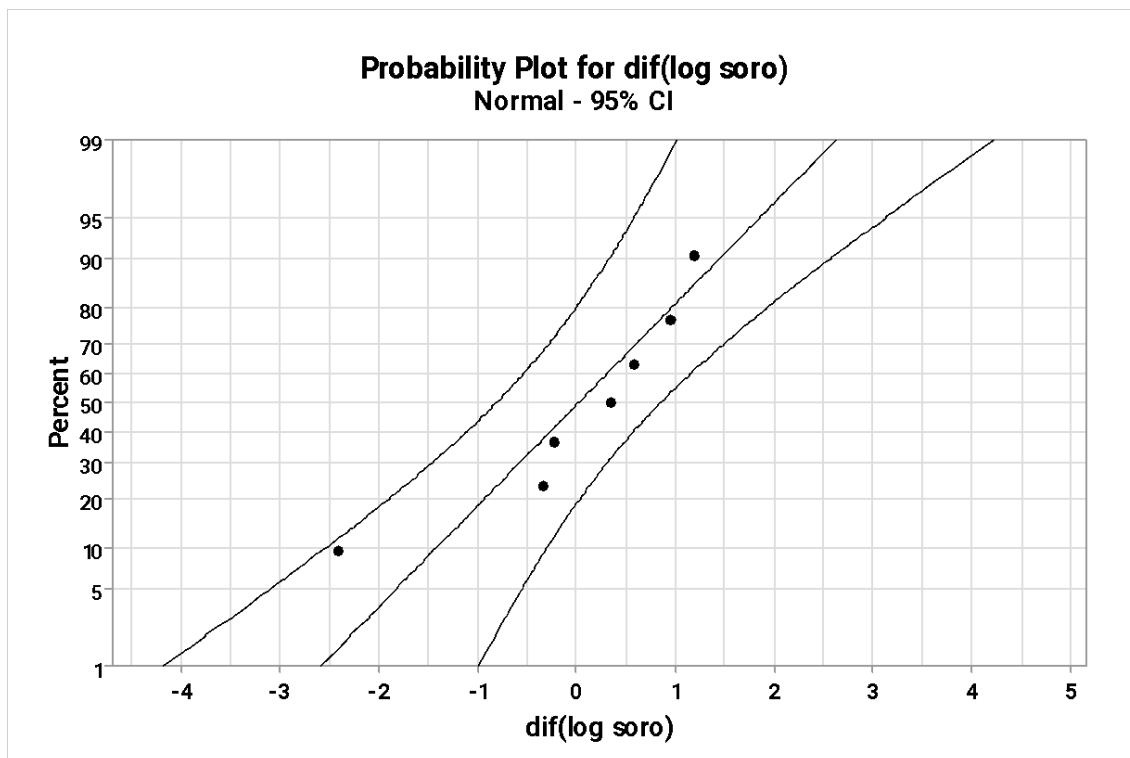
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(L1 soro)	7	4,441	0,784	0,297
log(L2 soro)	7	4,427	1,113	0,421
Difference	7	0,014	1,212	0,458

95% CI for mean difference: (-1,107; 1,135)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = 0,03 P-Value = 0,976

**Conclusão:** Como valor-p = 0,976 > 0,05 as medias são estatisticamente iguais.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.

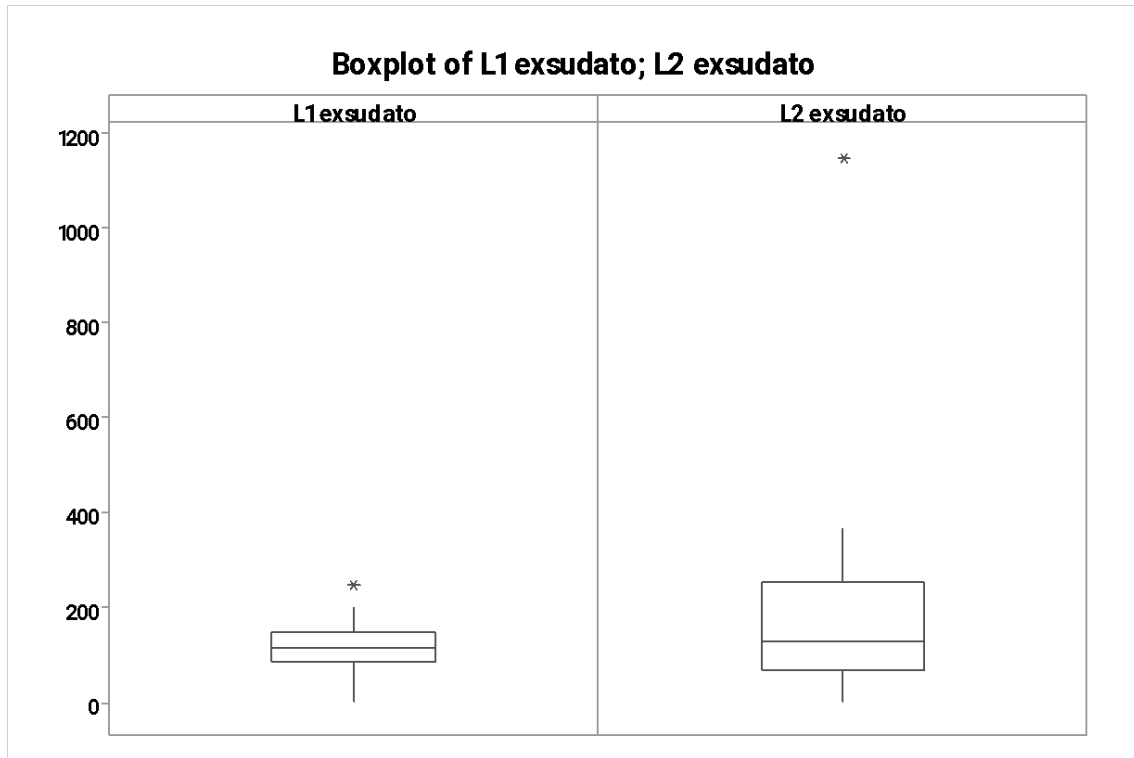


**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada

(2) **Comparar 2 medidas para Exsudato**

**Descriptive Statistics: L1 exsudato; L2 exsudato**

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
L1 exsudato	10	119,5	68,5	0,0	115,1	246,6
L2 exsudato	10	241	335	0	129	1148



**Objetivo:** Verificar se as médias das duas medidas (Exsudato DO) são iguais; usar testes t de *Student* pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

### Paired T-Test and CI: log(L1 exsudato); log(L2 exsudato)

Paired T for log(L1 exsudato) - log(L2 exsudato)

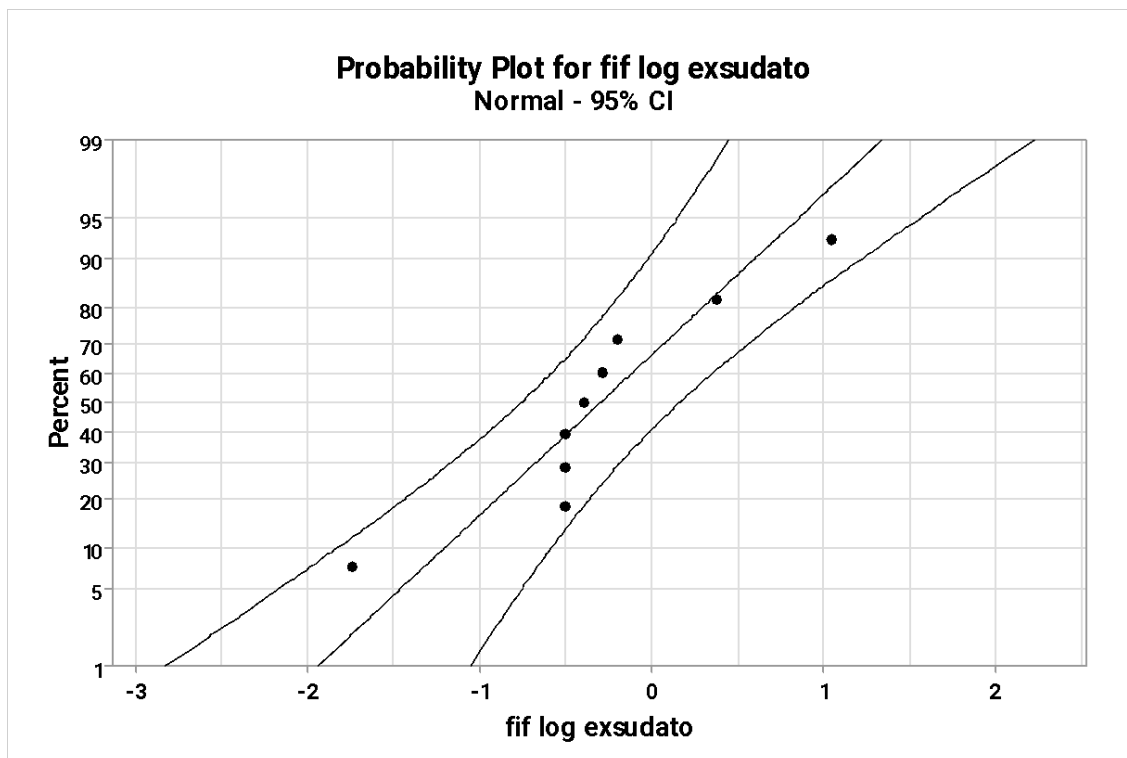
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(L1 exsudato)	9	4,809	0,426	0,142
log(L2 exsudato)	9	5,111	0,967	0,322
Difference	9	-0,302	0,749	0,250

95% CI for mean difference: (-0,878; 0,273)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = -1,21 P-Value = 0,260

**Conclusão:** Como valor-p = 0,260 > 0,05 as medias são estatisticamente iguais.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.

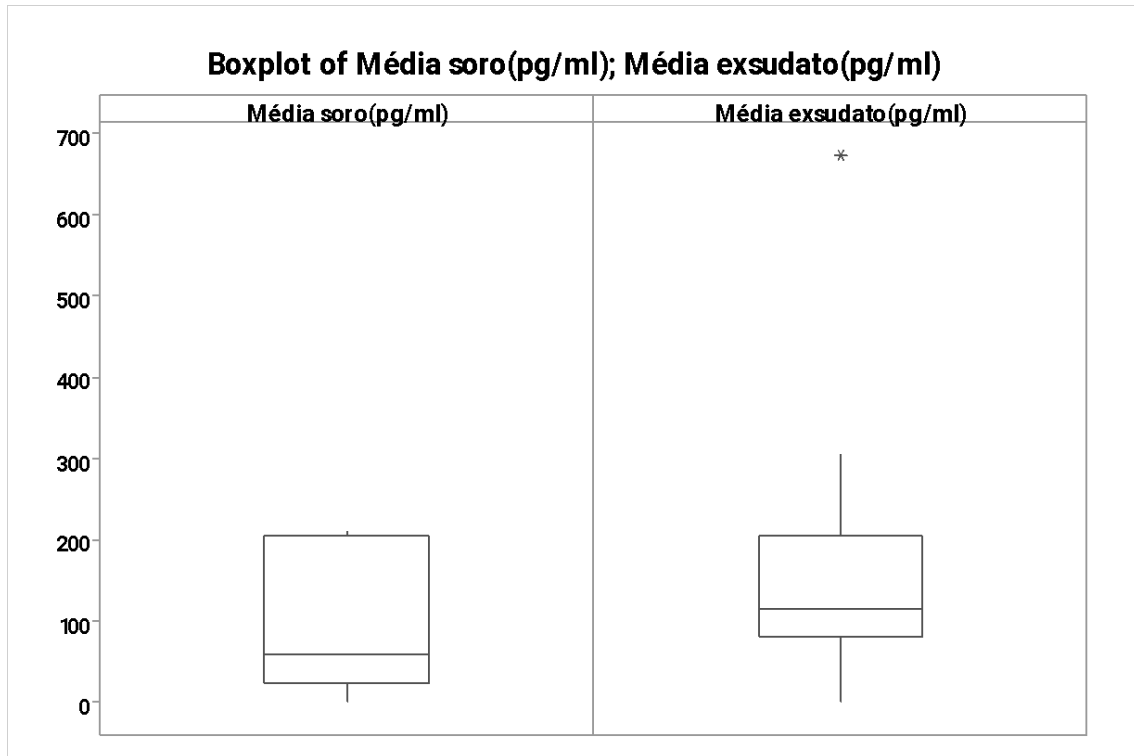


**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada

(1) **Comparar as medias para soro e exsudato**

**Descriptive Statistics: Média soro (pg/ml); Média exsudato (pg/ml)**

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Média soro(pg/ml)	10	90,3	85,1	0,0	59,3	210,2
Média exsudato(pg/ml)	10	180,4	191,6	0,0	115,1	674,5



Row	log(soro)	log(exsudato)	dif log medias
1	1,28509	5,14694	-3,86185
2	*	*	*
3	3,40817	4,31602	-0,90785
4	4,23621	4,39778	-0,16157
5	3,89904	4,53002	-0,63098
6	3,74313	5,14694	-1,40381
7	4,44383	4,85094	-0,40711
8	5,31721	6,51404	-1,19683
9	5,34503	5,72546	-0,38043
10	5,34804	4,62825	0,71978

**Objetivo:** Comparar se as médias (Soro DO e Exsudato DO) são iguais; usar testes t de *Student* pareados considerando dados transformados para escala logarítmica (melhor distribuição normal)

### Paired T-Test and CI: log (soro); log (exsudato)

Paired T for log (soro) – log (exsudato)

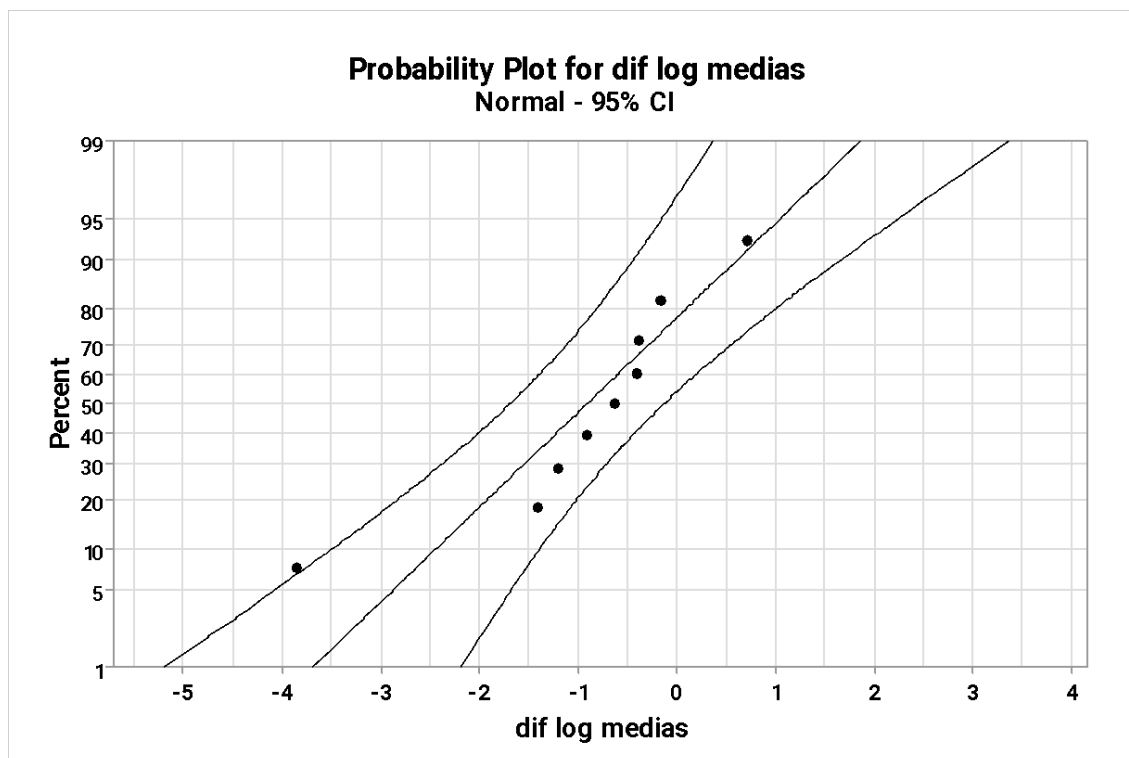
	N	Mean	StDev	SE Mean
log(soro)	9	4,114	1,289	0,430
log(exsudato)	9	5,028	0,713	0,238
Difference	9	-0,915	1,268	0,423

95% CI for mean difference: (-1,889; 0,060)

T-Test of mean difference = 0 (vs  $\neq$  0): T-Value = -2,16 P-Value = 0,062

**Conclusão:** Como valor-p = 0,062 > 0,05 as médias (soro e exsudato) são estatisticamente iguais. Considerando um nível de significância igual a 0,10, o valor-p = 0,062 < 0,10, assim concluir que as medias são estatisticamente diferentes.

**Nota:** como a amostra é pequena, precisamos verificar se as diferenças das respostas transformadas (log) têm distribuição normal.



**Conclusão:** a suposição de normalidade para as diferenças é verificada.

### Apêndice (testes t de *Student* pareados)

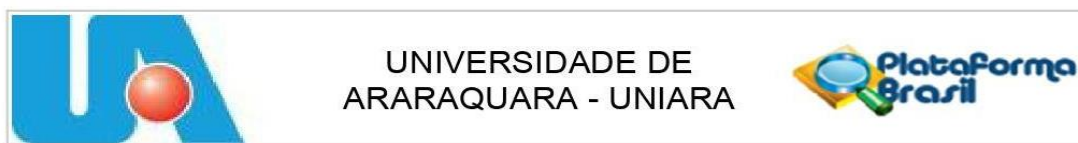
Considerar  $D_1, D_2, \dots, D_n$  como uma amostral aleatória de diferenças  $D_i = X_i - Y_i$  de tamanho  $n$  (dados medidos para mesmo indivíduo). As estatísticas descritivas para essa amostra são: média amostral dada por  $\bar{D} = \frac{\sum_{i=1}^n D_i}{n}$  e variância amostral dada por  $(SD)^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (D_i - \bar{D})^2}{n}$ . Observar que  $(X_i, Y_i)$  são independentes entre os pares, mas usualmente são dependentes dentro de cada par ou bloco. Sejam,  $E(D_i) = \delta$  e  $\text{var}(D_i) = \sigma^2$ ,  $i=1,2,\dots,n$ . Para amostras pequenas, supor que  $D_i = X_i - Y_i$ ,  $i = 1,2,\dots,n$ , seja uma amostra aleatória de uma distribuição normal  $N(\delta, \sigma^2)$ . Com amostras pequenas é necessário verificar a normalidade dos dados. Um teste de hipóteses da forma  $H_0 : \delta = \delta_0$  é baseado na estatística  $t = (\bar{D} - \delta_0) / (SD/\sqrt{n})$  onde  $t$  tem distribuição  $t$  de *Student* com  $n-1$  graus de liberdade Pagano e Gauvreau, 2004).

### Referência

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Princípios de bioestatística. Tradução da 2. ed. norte-americana. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.



## ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Fibrina rica em plaquetas e leucócitos para cicatrização de feridas cutâneas agudas

**Pesquisador:** BRUNA SOMILIO DA FONSECA

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 52835421.6.0000.5383

**Instituição Proponente:** ASSOCIACAO SAO BENTO DE ENSINO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.331.192

**Apresentação do Projeto:**

De acordo com a pesquisadora:

"Os 10 voluntários que participarão da presente pesquisa apresentarão idade acima de 18 anos, serão hígidos (ausentes de qualquer processo patológico ativo e com bom estado nutricional), não serão portadores de doenças crônicas ou autoimunes, não serão tabagistas e também não terão feito uso de qualquer droga anticoagulante, ou que afete a hemodinâmica em geral, nas últimas duas semanas. Para a confirmação da inclusão na pesquisa, estes voluntários deverão assinar um termo de consentimento livre esclarecido, no qual estará explicitado todo o procedimento que será submetido, assim como seus benefícios que superam os riscos, em linguagem coloquial, e na presença do pesquisador para elucidar possíveis

dúvidas a respeito. Previamente ao início do estudo, o projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIARA para apreciação, de acordo com os termos da Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 e da Norma Operacional nº 001/2013 de 30 de setembro de 2013, do

Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Experimentos in vitro. A primeira etapa do projeto será destinada aos experimentos in vitro para a determinação do potencial de cicatrização e atividade antimicrobiana da mL-PRF. Participarão desta etapa 10 voluntários. Obtenção da mL-PRF. Para a obtenção das mL-PRF, as amostras de sangue serão conduzidas via punção venosa simples, realizada pelo Profº Dr. Orivaldo Pereira Ramos

CRBD: 3158, com Scalp 21G para evitar lise ou alteração de quaisquer componentes sanguíneos.

**Endereço:** Rua Voluntários da Pátria nº1309

**Bairro:** Centro

**CEP:** 14.801-320

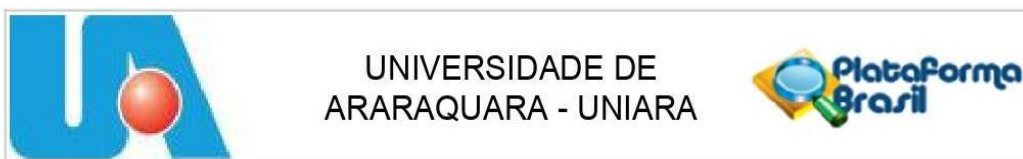
**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-7263

**Fax:** (16)3301-7144

**E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br



Continuação do Parecer: 5.331.192

Serão coletados 3 tubos de 5ml contendo ativador de plaqueta e gel separador de coágulo dentro deles, facilitando, após a centrifugação, a separação do sangue em 3 fases distintas: o SAS, o coágulo de fibrina rico em plaquetas e leucócitos intermediário e, ao fundo, um componente sedimentado correspondente às células vermelhas.

Além disso, será coletado 1 tubo de sangue com anticoagulante destinado à realização de um hemograma completo para obtenção dos valores basais sanguíneos de plaquetas e leucócitos, assim como o respectivo hematócrito. Imediatamente após a coleta de sangue, os tubos destinados à obtenção das mL-PRF serão centrifugados a 2.800 rpm por um período de 12 minutos. Após a centrifugação, o coágulo de L-PRF será retirado com o auxílio de uma pinça esterilizada e será prensado por uma chapa de aço inox, também estéril, para obtenção das mL-PRF. Ensaio de ação antimicrobiana Para a obtenção destes ensaios, os coágulos de L-PRF serão obtidos utilizando o mesmo procedimento do item 4.2.1. Para a identificação da ação antimicrobiana, serão utilizadas as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), mantidas em estoque sob refrigeração, serão suspensas em meio BHI e reativadas mediante incubação em estufa a 37°C por 16-18 horas. Para a avaliação da atividade antimicrobiana da mL-PRF será utilizado o método de difusão em disco de Kirby-Bauer.

Para tal, faremos cilindros da mL-PRF em formato padrão de 5 mm de diâmetro e aplicaremos nas placas contendo as culturas bacterianas previamente determinadas e as mesmas serão, então, incubadas em uma temperatura de 37°C durante um período de 16-18 horas. A ação antimicrobiana será estabelecida pela identificação e quantificação das zonas de inibição de crescimento formada ao redor dos cilindros. Como controle positivo serão utilizados os antibióticos Amicacina, Ceftriaxona e Oxacilina. Ensaio de Wound-Healing Para o ensaio de proliferação e migração celular in vitro, será utilizada uma linhagem de fibroblastos humanos (GM07492), cultivados em garrafas com meio de cultura de Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM – Vitrocell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell). Penicilina (100 g/mL - Vitrocell) e Estreptomina (100g/mL - Vitrocell), e mantidas em estufa de cultivo celular (Panasonic – Co<sup>2</sup> incubator MOC -19 AIC-UV) à temperatura de 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico".

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Este projeto de pesquisa tem a finalidade de avaliar, dentro de uma abordagem investigativa in vitro, a influência modulatória da membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos sobre o

<b>Endereço:</b> Rua Voluntários da Pátria nº1309	<b>CEP:</b> 14.801-320
<b>Bairro:</b> Centro	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> ARARAQUARA
<b>Telefone:</b> (16)3301-7263	<b>Fax:</b> (16)3301-7144
	<b>E-mail:</b> comiteeetica@uniara.com.br



Continuação do Parecer: 5.331.192

processo de cicatrização de feridas cutâneas agudas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Há possibilidade de ocorrência de algum desconforto no local da punção no momento da coleta ou formação de equimose algumas horas após o procedimento, que serão solucionadas espontaneamente com o passar dos dias. Os riscos serão minimizados como a eleição de um biomédico capacitado e tecnicamente experiente na realização do procedimento.

**Benefícios:**

Os benefícios que o voluntário terá com a participação nesta pesquisa são: primeiramente, a contribuição com a ciência para desenvolvimento de técnicas de medicina regenerativa com a descoberta de ferramentas terapêuticas e, no futuro, poder ser beneficiado dos recursos proporcionados por esta nova técnica de maneira direta ou indireta. Além disso, receberá por laudo o resultado da análise do hemograma da amostra de sangue.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Critério de Inclusão:**

Idade acima de 18 anos, hígidos (ausentes de qualquer processo patológico ativo e com bom estado nutricional), não ser portador de doença crônica ou autoimune, não ser tabagista e também não ter feito uso de qualquer droga anticoagulante, ou que afete a hemodinâmica em geral nas duas semanas que antecedem a coleta sanguínea.

**Metodologia de Análise de Dados:**

Para análise estatística dos resultados in vitro, serão utilizados procedimentos de estatística qualitativa descritiva básica, teste t-student e o teste de análise de variância (ANOVA), complementado pelo pós-teste de Tukey, ambos com nível de significância de 5% (p 0.05).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

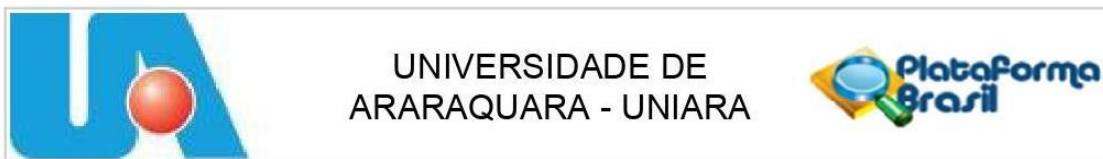
Todas as "Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória" estão apresentadas no campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações" deste parecer.

**Recomendações:**

Recomenda-se que sigam os objetivos e a metodologia proposta neste projeto.

**Endereço:** Rua Voluntários da Pátria nº1309  
**Bairro:** Centro **CEP:** 14.801-320  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-7263 **Fax:** (16)3301-7144 **E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br





Continuação do Parecer: 5.331.192

Qualquer dúvida no decorrer do projeto este colegiado se coloca disposição e recomendamos que consulte a Resolução 466/12 CNS, (disponível no site do CEP) que seguimos para as análises éticas dos trabalhos endereçados a este CEP.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Segue abaixo as pendências apresentadas em parecer emitido em 21 de março de 2022 (PB\_PARECER\_CONSUBSTANCIADO\_CEP\_ 5301377.pdf) e a forma como foram ou não atendidas:

**PENDÊNCIA 1**

Quem de sua equipe de pesquisa é o profissional biomédico que realizará e assinará os procedimentos de coleta e análise do sangue (hemograma)?

CONSIDERAÇÕES: "Tal como descrito no item materiais e métodos que se encontra na Plataforma Brasil, o profissional biomédico será o Profº Dr. Orivaldo Pereira Ramos CRBD: 3158. Tal informação não constava no projeto anexado à referida plataforma. Já efetuamos a inclusão na versão atual do projeto recentemente anexado".

PENDÊNCIA ATENDIDA

**PENDÊNCIA 2**

Não encontramos mais o hemograma em sua metodologia, mas está descrito no item 4 do TCLE. Além da verificação dos padrões de qualidade do sangue, seria um exame importante como devolutiva para os participantes que estão sendo convocados por vocês para doar o sangue.

CONSIDERAÇÕES: Trechos no Projeto detalhado e Projeto PB - [...] "Além disso, será coletado 1 tubo de sangue com anticoagulante destinado à realização de um hemograma completo para obtenção dos valores basais sanguíneos de plaquetas e leucócitos, assim como o respectivo hematócrito".

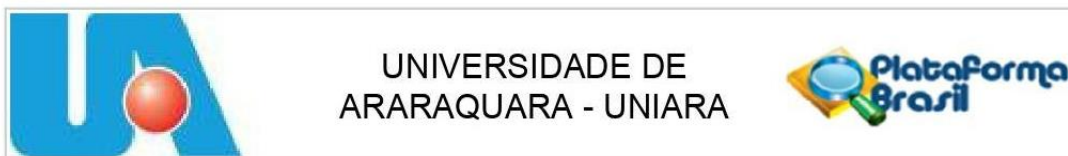
CARTA RESPOSTA: "Reconhecemos a importância da devolutiva ao voluntario do resultado do seu hemograma, motivo pelo qual incluímos no item 4 do TCLE (última frase) como um dos benefícios da sua participação na presente pesquisa. O compromisso da entrega do resultado do referido exame fica evidente pela sua inclusão no TCLE".

PENDÊNCIA ATENDIDA

**PENDÊNCIA 3**

Item 3 TCLE: independente do profissional ser ou não "gabaritado" o risco de lesão no local da

**Endereço:** Rua Voluntários da Pátria nº1309  
**Bairro:** Centro **CEP:** 14.801-320  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-7263 **Fax:** (16)3301-7144 **E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br



Continuação do Parecer: 5.331.192

coleta poderá ocorrer, e se vier a ocorrer o que será feito, qual orientação?

CONSIDERAÇÕES: "Foi acrescentada no item 3 do TCLE a informação de que o surgimento da mancha roxa não exige a tomada de nenhuma medida por parte do voluntario, tendo em vista a resolução espontânea do quadro".

PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 4

Os benefícios apresentados no TCLE não são os mesmos apresentados no Projeto da Plataforma Brasil.

CONSIDERAÇÕES: "Foi realizada a adequação do texto benefícios na plataforma Brasil, tornando-o adequado ao texto presente no TCLE".

PENDÊNCIA ATENDIDA

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Uniara, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº466 de 2012 e na Norma Operacional nº001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do Protocolo de pesquisa.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

O Projeto de pesquisa encontra-se adequado e aprovado, de acordo com colegiado e com as normativas vigentes. Qualquer alteração que venha ocorrer, em especial Eventos Adversos, pedimos a gentileza de informar este CEP por meio de Emenda e/ou Notificação, junto a Plataforma Brasil e, no decorrer do desenvolvimento da pesquisa solicitamos o encaminhamento do Relatório Parcial, e após a conclusão do mesmo o envio do Relatório Final, procedimentos esses de cunho obrigatório

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1829834.pdf	25/03/2022 15:10:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PDF.doc	25/03/2022 15:09:54	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.docx	25/03/2022 15:08:06	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito

**Endereço:** Rua Voluntários da Pátria nº1309

**Bairro:** Centro

**CEP:** 14.801-320

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-7263

**Fax:** (16)3301-7144

**E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br



Continuação do Parecer: 5.331.192

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOMESTRADO_PDF.docx	25/03/2022 15:06:29	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito
Orçamento	Orcamento_mestrado.doc	29/11/2021 11:45:18	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	consentimento_departamento2.pdf	25/10/2021 18:17:02	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_laboratorio.pdf	24/10/2021 09:19:35	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Pesquisador_responsavel.pdf	24/10/2021 09:16:52	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.PDF	24/10/2021 08:08:44	BRUNA SOMILIO DA FONSECA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARARAQUARA, 05 de Abril de 2022

---

**Assinado por:**  
**Andréa Corrêa Carrascosa**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Voluntários da Pátria nº1309  
**Bairro:** Centro **CEP:** 14.801-320  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-7263 **Fax:** (16)3301-7144 **E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br



## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA

Rua Voluntários da Pátria, 1309 Bloco C, Centro – Araraquara SP – CEP: 14801-320 – Telefone: (16) 3301.7263  
www.uniara.com.br/comite-de-etica

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto de pesquisa: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos para cicatrização de feridas cutâneas agudas

Pesquisador Responsável: Bruna Somilio da Fonseca

Nome do participante:

Data de nascimento:

Você está sendo convidado (a) para ser participante do Projeto de pesquisa intitulado “Fibrina rica em plaquetas e leucócitos para cicatrização de feridas cutâneas agudas” de responsabilidade dos pesquisadores Bruna Somilio da Fonseca (mestranda) e pelo Prof. Dr. André Capaldo Amaral (orientador).

Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Caso se sinta esclarecido (a) sobre as informações que estão neste Termo e aceite fazer parte do estudo, peço que assine ao final deste documento, em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável pela pesquisa. Saiba que você tem total direito de não querer participar.

1. O trabalho tem por finalidade avaliar a influência dos constituintes do sangue em uma pesquisa a ser realizada no Laboratório de Imunologia e Hematologia Clínica do Departamento de Biomedicina da UNIARA com células laboratoriais.

2. A participação nesta pesquisa consistirá em uma coleta de 20 ml de sangue realizada por um biomédico devidamente capacitado. O único encontro será promovido no Laboratório de Imunologia e Hematologia Clínica do Departamento de Biomedicina da UNIARA.

3. Durante a execução da pesquisa poderá aparecer mancha roxa no local da coleta do sangue e um leve desconforto no momento da introdução da agulha. Serão minimizados pelo profissional biomédico devidamente gabaritado para desenvolver a técnica correta, selecionado para fazer o procedimento em ambiente higienizado, seguindo os protocolos padrões de biomedicina.

4. Os benefícios com a participação nesta pesquisa serão: primeiramente a contribuição com a ciência para desenvolvimento de técnicas de medicina regenerativa com a descoberta de ferramentas terapêuticas e, no futuro, poder ser beneficiado dos recursos proporcionados por esta nova técnica de maneira direta ou indireta. A participação neste projeto deverá ter a duração de no máximo 30 minutos em um único encontro, tempo estimado para leitura, esclarecimentos e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). Além disso, receberei por laudo o resultado da análise do hemograma feito na minha amostra de sangue.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_ Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

Página 1 de 2



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA

Rua Voluntários da Pátria, 1309 Bloco C, Centro – Araraquara SP – CEP: 14801-320 – Telefone: (16) 3301.7263  
[www.uniara.com.br/comite-de-etica](http://www.uniara.com.br/comite-de-etica)

5. Os participantes não terão nenhuma despesa ao participar da pesquisa e poderão retirar sua concordância na continuidade da pesquisa a qualquer momento.
6. Não há nenhum valor econômico a receber ou a pagar aos voluntários pela participação, no entanto, caso haja qualquer despesa decorrente desta participação haverá o seu ressarcimento pelos pesquisadores.
7. Caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente da participação no estudo, os voluntários poderão pleitear indenização, segundo as determinações do Código Civil (Lei nº 10.406 de 2002) e das Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde.
8. O nome dos participantes será mantido em sigilo, assegurando assim a sua privacidade, e se desejarem terão livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que queiram saber antes, durante e depois da sua participação.
9. Os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente, para fins desta pesquisa, e os resultados poderão ser publicados.

Qualquer dúvida, pedimos a gentileza de entrar em contato com Bruna Somilio da Fonseca, pesquisadora e mestranda responsável pela pesquisa, telefone: 017-98115-3296, e-mail: [bruna.fonseca@uniara.edu.br](mailto:bruna.fonseca@uniara.edu.br), com o pesquisador e orientador da pesquisa André Capaldo Amaral, 016-99769-0095, [acamaral@uniara.edu.br](mailto:acamaral@uniara.edu.br), com o Comitê de Ética em Pesquisa da Uniara, localizado na Rua Voluntários da Pátria nº 1309 - bloco C, no Centro da cidade de Araraquara-SP, telefone: (16) 3301.7263, e-mail: [comitedeetica@uniara.com.br](mailto:comitedeetica@uniara.com.br), atendimento de segunda a sexta-feira das 08h00min. – 13h00min. - 14h00min – 17h00min, e/ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, telefone (61) 3315.5877, e-mail: [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br).

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ declaro ter sido informado e concordo em ser participante do Projeto de pesquisa acima descrito.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
 Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_ Rubrica do participante: \_\_\_\_\_.

Página 2 de 2