

LEONEL ALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA FIBRINA
LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA. PERSPECTIVAS NA APLICAÇÃO
CLÍNICA**

**BRASÍLIA
2020**

LEONEL ALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA FIBRINA
LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA. PERSPECTIVAS NA APLICAÇÃO
CLÍNICA**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina,
Universidade de Brasília.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Selma Aparecida Souza Kuckelhaus

**BRASÍLIA
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

DO48fla
C

de Oliveira, Leonel Alves

Caracterização Morfológica e Bioquímica da Fibrina
Leucoplaquetária Autóloga. Perspectivas na Aplicação Clínica /
Leonel Alves de Oliveira; orientador (a) Selma Aparecida Souza Kuckelhaus. - -
Brasília, 2020.
221 p.

Tese (Doutorado – Doutorado em Ciências Médicas) - – Universidade de
Brasília, 2020.

1. fibrina. 2. Centrifugação. 3. Força g. 4. Fatores de crescimento. 5.
Ultraestrutura. I. Kuckelhaus, Selma Aparecida Souza, oriente. II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO*

LEONEL ALVES DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA. PERSPECTIVAS NA APLICAÇÃO CLÍNICA

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora assinada eletronicamente SEI
(Relatório de Defesa de Pós-Graduação 23106.057978/2020-12)

Presidente: Prof^a. Dr^a. Selma Aparecida Souza Kuckelhaus
Universidade de Brasília

Membro Interno: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite
Universidade de Brasília

Membro Externo: Prof. Dr. Gustavo Lara Rezende
Hospital de Base de Brasília

Membro: Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo
Universidade de Brasília

Membro Suplente: Prof. Dr. André Luiz Vieira Cortez
Universidade de Brasília

Brasília, 31 de julho de 2020

Isso eu trouxe dos sábios!

“É sábio ouvir de tudo, tanto o elogio como a afronta, reter deles o que há de bom e seguir focado de modo justo, digno e lícito o caminho de uma construção. É sábio esquivar-se da sedução do elogio e responder à intimidação da afronta com inteligência.”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de pesquisa aplicável à saúde humana às pessoas que me ensinaram princípios fundamentais para enfrentar os desafios da vida e exerceram grandes influências sobre a minha conduta na carreira acadêmica. À Minha mãe Nadir, a resiliência; à minha vó Maria Felina (in memorian), a força e a sabedoria da mansidão; ao Reverendo Hugo Costa, que na pregação do evangelho mostrou-me de forma brilhante e inspiradora a importância da educação na quebra de paradigmas e mudança de “destinos”; ao querido amigo Dr. Marcelo Buzzzi, PhD por inspirar-me na caminhada científica a buscar e fazer uma ciência além de si mesma.

AGRADECIMENTOS

A Deus sobre todas as coisas.

À professora Selma Kuckelhaus pela generosa disposição em orientar-me neste projeto.

À mestre Maria da Glória da Silva do laboratório de morfologia pelo apoio técnico histológico deste trabalho.

À professora Sônia Nair Bao e toda equipe do laboratório de microscopia e microanálise do Instituto de Biologia pelos ricos ensinamentos em microscopia eletrônica e por todo apoio técnico durante a realização dos experimentos.

À professora Tatiana Karla Borges do laboratório de imunologia médica da Faculdade de Medicina pelo apoio nos imunoenaios por CBA.

À equipe do laboratório de emergência do Hospital Universitário de Brasília pelo apoio nos ensaios de citometria de fluxo.

Ao professor Marcus Girão e Mestrando Samuel Gustavo da Faculdade de Tecnologia da UNB pelos ensaios de metrologia dinâmica.

À Dra Edilene Oliveira pelo estímulo tão importante na reta final deste trabalho.

Aos inesquecíveis colegas do laboratório de patologia clínica do Hospital Sarah do Aparelho Locomotor, lugar onde os meus primeiros passos científicos começaram há mais de 20 anos.

À Professora Moira Leão pela caminhada profícua e sinérgica na contribuição da Resolução CFO 158/2015.

À Montserrat Import & Export por todo apoio e credibilidade dispensada.

Aos membros da banca de defesa de tese que contribuíram sobremaneira para a qualificação deste trabalho de pesquisa.

À minha esposa Simone Oliveira e filhos Davi Oliveira, Luísa Oliveira e Sarah Oliveira pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, cooperaram para o progresso deste trabalho.

PREFÁCIO

Em 1985, aos 10 anos de idade eu fui atendido em um serviço odontológico na minha cidade, Ceilândia, e fiquei impressionado com a limpeza do ambiente, a vestimenta, o sapato branco brilhante do dentista e a eficiência no atendimento. Foi assim que me interessei em ter a odontologia como minha profissão. Em 1994, recém terminado o ensino médio ingressei na Universidade de Brasília para cursar bacharelado em estatística. A minha intenção era tentar uma transferência, mas isto não ocorreu e em 1995 eu decidi fazer o que a maioria dos jovens da minha geração faziam, estudar para passar em um concurso público. Passei em 28º lugar no concurso da Polícia Civil para o cargo de auxiliar de necropsia e deixei de lado o “sonho” de ser dentista. Com o novo trabalho fui estudar biologia como uma construção para a perícia criminal. No ano de 1998 cursando ciências biológicas um novo emprego de técnico de anatomia humana no Hospital Sarah do Aparelho Locomotor me afastou das ciências forenses e um novo caminho se científico se abria sem que eu percebesse. Entretanto neste mesmo ano fui acometido de um grave processo alérgico que me levou a uma readaptação funcional no Laboratório de Patologia Clínica, onde o primeiro treinamento recebido foi em venopunção e separação do soro sanguíneo por centrifugação. O soro é a fração líquida residual do sangue expulso do coágulo por um mecanismo de retração após a coagulação completa. No segundo dia de trabalho, logo cedo, ao realizar o primeiro ciclo de centrifugação notei que alguns tubos de sangue apresentaram uma estrutura sólida na porção sobrenadante ao invés do líquido citrino e cristalino esperado. Eu havia cometido o erro metodológico de ter centrifugado o sangue desrespeitando o tempo da retração do coágulo. Em virtude disto fui advertido e orientado a estudar a fisiologia da coagulação para evitar isto. Este fato, ocorrido em dezembro de 1998 marcou o meu primeiro encontro com uma matriz de fibrina humana isenta de eritrócitos que eu não supunha tornar-se uma acertada e promissora linha de pesquisa científica anos depois. Permaneci neste setor laboratorial por mais dois anos, quando então fui transferido para o Laboratório de Bioquímica Analítica, certamente a maior escola da minha vida! Neste laboratório eu tive a enriquecedora vivência profissional com o Dr. Marcelo Buzzi, que de chefe tornou-se um grande amigo e meu orientador de mestrado na linha de análises lipídicas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GCMS). Dali eu saí apenas em 2004 após a conclusão do mestrado em bioquímica nutricional na Universidade de Brasília. Neste mesmo ano iniciei uma nova jornada profissional como docente no ensino superior lecionando fisiologia e anatomia humana compondo o corpo docente do curso de

nutrição juntamente com colegas especiais como a Prof^a Dr^a Selma Kuckelhaus, o Prof Dr. José Roberto Godoy e o Prof Dr. José Roberto Leite, na Faculdade JK em Taguatinga-DF. Motivado pela recente obtenção do grau de mestre, o próximo passo seria um doutoramento em uma linha de pesquisa afim. Sob orientação da Prof^a Dr^a Egle Machado de Almeida Siqueira do Instituto de Biologia iniciamos um projeto de pesquisa sobre a ferroterapia e o estresse oxidativo em pacientes renais crônicos em agosto de 2004 com a intenção de ingressar formalmente no programa de biologia molecular do Instituto de Biologia com aluno de doutorado. Em meados de 2005, a ponto a formalizar o ingresso, recebi um convite para lecionar anatomia em uma faculdade particular denominada UNIPLAC (União Educacional do Planalto Central). Esta faculdade, anteriormente chamava-se FOPLAC (Faculdade de Odontologia do Planalto Central). Que grata surpresa! Eu acabara de me tornar um professor de área básica da odontologia. No ato da minha contratação fui confrontado pelo então fundador da instituição, o Dr. Aparecido dos Santos (*in memoriam*), a realizar o meu “sonho” de ser dentista. Fiquei muito reflexivo com a sua provocação e após compartilhar com minha esposa decidimos postergar o doutoramento e cursar juntos a graduação em odontologia. Nesta nova empreitada acadêmica tive esta companhia valorosa da minha amada companheira da vida conjugal que se tornou colega de turma e dupla de atividades práticas na clínica integrada, a minha esposa Simone Oliveira. Ter cursado a odontologia ao lado dela foi um presente divino para ambos. Muitas noites mal dormidas, distâncias percorridas, desafios técnicos, acadêmicos e três filhos pequenos para cuidar, amar e educar nos fortaleceram na nossa caminhada e assim colamos grau em setembro de 2009. Novos desafios vieram, montar consultório, conquistar pacientes e cursar uma especialidade foram alguns deles. Na escolha da minha pós-graduação lato sensu em odontologia optei pela implantodontia por ser uma das principais demandas no nosso consultório e em 2011 ingressei na especialização. Eu estava muito feliz, motivado e vivendo intensamente esta nova fase profissional, mas a pesquisa deixada outrora me incomodava e eu queria encontrar algo que me fizesse voltar à instrumentação analítica. No final da especialização tive contato com uma nova ciência ligada à medicina regenerativa que despertara a atenção da classe odontológica mundial, especialmente as áreas cirúrgicas. Em meados de 2013 ouvi falar pela primeira vez sobre o emprego terapêutico de uma matriz biológica sanguínea denominada L-PRF (Leukocyte Platelet-Rich Fibrin) durante uma aula onde foi-me apresentada como uma “membrana” capaz de melhorar respostas nos enxertos ósseos. Contudo, tratava-se de uma técnica promissora mas pouco acessível devido aos poucos profissionais credenciados, as especificidades técnicas e custo financeiro

relativamente alto do equipamento utilizado para a centrifugação do sangue. Ainda durante a aula fiz uma retrospectiva de 15 anos sobre a experiência da retração do coágulo que me deixou em estado de exaltação. Ao final da apresentação eu inquietamente disse na sala em alta voz: - Professor, isto é fibrina, o produto final da coagulação! É uma matriz sanguínea isenta de hemácias e a centrífuga servirá apenas para promover esta separação, o segredo não está na máquina! Não consigo equalizar em palavras o olhar reprovador do ministrador, mas percebi que havia provocado uma quebra de paradigma sobre este tema. Na aula houve uma defesa vigorosa sobre os princípios do protocolo de obtenção onde o uso exclusivo de um modelo centrífuga era imperativo com principal fundamento do método. Isto despertou-me a atenção e passei a fazer uma intensa busca sobre o tema. Em poucos meses eu já havia desenhado um projeto de pesquisa para investigar o efeito de diferentes tipos de centrífuga e parâmetros de centrifugação sobre as principais características biológicas desta matriz sanguínea e passei a referi-la como Fibrina Leucoplaquetária Autóloga como um artifício didático definidor e autoexplicativo sobre a sua natureza biológica, origem e indicação restrita de emprego terapêutico. Incentivado pelos meus professores da especialização comecei a ministrar cursos de imersão e capacitação sobre este tema. Em novembro de 2013 fiz uma postagem em um grupo profissional da odontologia no *Facebook* falando um pouco sobre o meu trabalho, minha pesquisa e a possibilidade de obtenção da matriz de L-PRF utilizando diferentes modelos de centrifugas desde que fossem respeitados os parâmetros de centrifugação. O meu propósito foi promover a acessibilidade da metodologia. Essa postagem chamou a atenção de muitas pessoas, agradou a muitos pelo caráter esclarecedor e desagradou a alguns por divergências conceituais e interesses pessoais. Assim vieram algumas críticas, por vezes afrontosas e provocativas sobre validação e comprovação científica daquilo que eu falava. Sempre tive o fundamento na ciência básica, isto me levou ao ingresso no doutorado em ciências médicas no ano de 2015, onde foquei na aquisição de conhecimento em técnicas instrumentais de microscopia e citometria para a realização dos experimentos. Os capítulos que integram esta tese de doutoramento trazem mais que comparações protocolares, eles descrevem de modo aprofundado os efeitos de variações metodológicas que servem com fundamentos para o desenvolvimento de novos métodos para indicações clínicas específicas. Isto está representado no título deste trabalho, “CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA. PERSPECTIVAS NA APLICAÇÃO CLÍNICA.”

Dentre os vários desdobramentos do meu estudo com a matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga, seguem quatro deles que considero de grande relevância:

1) a regulamentação da atuação profissional da odontologia; 2) a provocação quanto ao amadurecimento científico na graduação de medicina; 3) a ressignificação da atuação na odontologia para centenas de dentistas; 4) a implicação na relação comercial lícita e transparente.

“Era fevereiro de 2015. A odontologia lutava pelo reconhecimento do uso não-transfusional do sangue autólogo em sua prática clínica. Muitas questões técnicas e legais estavam sendo levantadas, quando um amigo comum, Marco Antonio Pontual, fez a ponte entre mim e Leonel. Conheci o Prof Leonel Aves de Oliveira pessoalmente na véspera de uma reunião decisiva na sede do Conselho Federal de Odontologia em Brasília junto com representantes do Ministério da Saúde e da Anvisa. Nesta reunião o Prof Leonel apresentou a fundamentação para a aplicação clínica da fibrina e pode auxiliar substancialmente no entendimento da legitimidade de tal prática no âmbito da Odontologia. A reunião terminou com detalhes exaustivamente debatidos e um rascunho de resolução definido, porém, desde então, são incontáveis os momentos de discussão técnica, compartilhamento de informação e de inspiração mútua. Sou muito grata de ter encontrado este amigo de caminhada que além de ter um conhecimento científico como poucos no estudo do uso do sangue, também nos brinda com imensa sabedoria, didática impecável e disposição para ajudar. Não tenho dúvida que o fruto de sua tese terá desdobramentos que vão muito além da Odontologia, mas serão de grande utilidade em todas as áreas da medicina pois o sangue autólogo não tem outro dono senão o PACIENTE.”

Dr^a Moira Leão
Assessora Técnica do Conselho Federal de Odontologia
Resolução 158/2015 - CFO

“Steve Jobs uma vez disse que “os pontos só se conectam em retrospecto”. Se eu pudesse definir o significado da fibrina leucoplaquetária autóloga na minha vida, ela sem dúvidas representaria o traçado que conecta os pontos, como na construção de um gráfico num plano cartesiano ou ainda como uma matriz de colágeno que possibilita dentre outras coisas, que haja coesão celular (matriz esta que a fibrina mimetiza). Quando muito pequeno, tinha o sonho de ser cientista. Perdi minha avó aos 17 anos e por tê-la acompanhado em seus percalços do fim de vida, me surgiu um estranho interesse por lesões cutâneas crônicas. Ao final do ensino médio, entrei na tão almejada faculdade de medicina. Comemorei, iniciei uma nova jornada, reprovei, chorei, me frustrei. Mas se não tivesse vivido momentos difíceis, apenas os aprazíveis, não teria entrado em contato com o professor Leonel e com a fibrina. A fibrina desempenha na

minha vida, assim como age in vivo, um papel de agente indutor de reparação. Hoje ela faz com que muitos dos acontecimentos passados que vivi façam sentido, e me estimula diariamente a continuar pelo vislumbre das perspectivas e possibilidades de seu uso no futuro. No mesmo discurso que citei acima, Steve Jobs diz que “é necessário que se confie que os pontos estarão ligados no futuro, é necessário confiar em algo.” Termino este texto com muita gratidão pelas pessoas e oportunidades que tenho em minha vida. E acrescento que a fé é a manifestação da melhor forma de confiar. Sigo vivenciando os pontos, confiando que cada um deles têm seu propósito.”

David Nunes
7º período de Medicina – UNB
Projeto de Pesquisa em Estomaterapia –HUB

“Iniciei meu aprendizado na utilização de agregados leucoplaquetários em diversos procedimentos clínicos em 2015, onde participei de diversos cursos , e nesta jornada, em busca de proporcionar aos meus pacientes uma condição melhor de reparo tecidual , com previsibilidade de ótimos resultados e com baixa morbidade, conheci vários protocolos de obtenção, e dentre eles, me identifiquei com o Protocolo Fibrin, onde pude enriquecer meus conhecimentos com muita base científica, e de forma única e patognomônica humanizada! Na minha carreira como cirurgião dentista, sem dúvida foi o melhor aperfeiçoamento que fiz ao longo dos meus 30 anos de formado! Sou muito grato aos meus Mestres, por me tornarem um profissional melhor e em especial, ao Professor Leonel Oliveira que a cada dia me surpreende com sua sabedoria e caráter!”

Dr. Marcelo Gaspar
Cirurgião Dentista – São Paulo – SP
Fibrin Workshop

“Há pouco mais de 4 anos, graças a Deus acompanhei todo projeto desenvolvido pelo Professor Leonel Oliveira, com muito trabalho, conhecimento e cientificidade. Estive presente em muitos cursos onde adquiri experiência com a técnica da LPRF na odontologia. Estar ao lado da ciência, e com a verdade, é o melhor caminho para o sucesso pessoal, e graças a Deus eu posso dizer que fui premiado por estar neste caminho que tem um grande reflexo sobre a provisão para a minha família.

Mateus de Carvalho Bento
Representante Comercial – Montsserrat Import & Export
FibrinFuge²⁵

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1

FIGURAS

Figura 1. Diagrama do fluxo experimental

Figura 2. Diferentes raios

Figura 3. Centrífugas de bancada utilizadas para obtenção de coágulos de fibrina

Figura 4. Níveis de vibração radial total nas três centrífugas.

Figura 5. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 200 x g

Figura 6. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 200 x g

Figura 7. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 400 x g

Figura 8. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 400 x g

Figura 9. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 800 x g

Figura 10. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 800 x g

Figura 11. Níveis de ruído em dB nos ciclos de centrifugação

Figura 12. Níveis de ruído em dB nos ciclos de centrifugação

TABELAS

Tabela 1. Raios mínimo, médio e máximo em mm nos diferentes modelos de centrífugas

Tabela 2. Relação entre raio, velocidade e RCF nos diferentes modelos de centrífugas

Tabela 3. Variação térmica em ΔC e ΔS em $^{\circ}C$ – FibrinFuge25

Tabela 4. Variação térmica em ΔC e ΔS em $^{\circ}C$ – EBA200

Tabela 5. Variação térmica em ΔC e ΔS em $^{\circ}C$ – 80-2B

Tabela 6. Níveis de ruídos em funcionamento (dB)

CAPÍTULO 2

FIGURAS

Figura 1. Obtenção do plasma sanguíneo

Figura 2. A) Decomposição do vetor força (F); **B)** Zona central do corpo da matriz

Figura 3. Frações plasmáticas experimentais para contagem por hemocitometria

Figura 4. Citograma obtido pela contagem do sangue total por citometria de fluxo acoplada à citoquímica por peroxidase

Figura 5. Índices hematológicos na FCR de 200

Figura 6. Índices hematológicos na FCR de 400

Figura 7. Índices hematológicos na FCR de 800

TABELAS

- Tabela 1.** Índices hematológicos à centrifugação por FCR 200 por 5 minutos
Tabela 2. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 200 por 10 minutos
Tabela 3. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 200 por 15 minutos
Tabela 4. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 400 por 5 minutos
Tabela 5. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 400 por 10 minutos
Tabela 6. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 400 por 15 minutos
Tabela 7. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 800 por 5 minutos
Tabela 8. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 800 por 10 minutos
Tabela 9. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 800 por 15 minutos

CAPÍTULO 3

FIGURAS

- Figura 1.** Etapas da polimerização do fibrinogênio
Figura 2. Centrífugas de bancada utilizadas para obtenção de coágulos de fibrina
Figura 3. Regiões da matriz de LPRF avaliadas na caracterização morfológica
Figura 4. Macroscopia da matriz de LPRF
Figura 5. Matrizes de LPRF obtidas em diferentes angulações
Figura 6. Membranas de LPRF obtidas em diferentes angulações
Figura 7. Análises das áreas de superfície total e da ZPL das membranas de LPRF obtidas em diferentes angulações
Figura 8. Micrografia óptica da matriz de LPRF
Figura 9. Micrografias eletrônicas de varredura da matriz de fibrina obtida com aumentos de 500 a 45.000x
Figura 10. Micrografias ópticas comparativas com aumentos de 40x, 100x e 200x das matrizes de LPRF obtidas em FF25 (1, 2 e 3) e em 80-2B (4, 5 e 6)
Figura 11. Micrografias eletrônicas de varredura de fragmento do corpo da matriz de LPRF obtida em 80-2B
Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura da matriz de fibrina de um corte transversal do corpo obtida em FF25
Figura 13. Micrografias eletrônicas de varredura da zona de peletização leucoplaquetária (ZPL) da matriz de LPRF
Figura 14. Células mononucleares (A) espriadas aderidas sob a superfície da matriz de LPRF
Figura 15. Plaquetas e grânulos plaquetários por micrografias eletrônicas de transmissão a partir da ZPL de uma matriz de LPRF
Figura 16. Micrografias eletrônicas de varredura Micrografias da membrana compactada de LPRF
Figura 17. Micrografias eletrônicas de varredura de frústolas de diatomáceas planctônicas (arcabouços de dióxido de silício - SiO₂) entremeadas na matriz de LPRF
Figura 18. Micrografias eletrônicas de varredura com cristais de sílica entremeados na matriz de LPRF
Figura 19. Micrografias eletrônicas de varredura de coágulo total e coágulo retraído

Figura 20. Micrografia óptica obtida da LPRF entremeada em membrana de colágeno

Figura 21. Micrografias eletrônicas de varredura obtidas da LPRF entremeada em membrana de colágeno

Figura 22. Fibrinólise da matriz de LPRF em função do método

Figura 23. 1. Diâmetro dos feixes de fibras de fibrina em função do tempo e da FCR

Figura 24. 1. Diâmetro dos feixes de fibras de fibrina x concentração de VEGF no período experimental de 7 dias (B)

TABELA

Tabela 1. Comparação das áreas de superfície total e da ZPL das matrizes de LPRF obtidas em diferentes angulações de rotores

CAPÍTULO 4

FIGURAS

Figura 1. Concentrações de VEGF liberadas da matriz de LPRF

Figura 2. Concentrações de VEGF liberadas da matriz de LPRF agrupados por tempo de centrifugação

TABELAS

Tabela 1. Conteúdo dos α -grânulos plaquetários

Tabela 2. Ativadores e inibidores angiogênicos de origem plaquetária

Tabela 3. Diagrama experimental

Tabela 4. Valor teórico de VEGF acumulado *in vitro* durante 7 dias

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ΔC	–	variação de temperatura na câmara de centrifugação
ΔS	–	variação de temperatura no sangue
Δt	–	intervalo de tempo
A-PRF	–	advanced platelet rich fibrin
ANOVA	–	análise de variância
ANVISA	–	agência nacional de vigilância sanitária
BD	–	becton dickinson
C	–	câmara de centrifugação
CBA	–	cytometric bead array
CD	–	cluster differentiation
CE	–	certificação europeia de conformidade
CFM	–	conselho federal de medicina
CFO	-	conselho federal de odontologia
CGF	–	concentrated growth factors
CO₂	–	dióxido de carbono
CS	–	concentrados sanguíneos
dB	–	decibéis
dL	–	decilitro
DP	–	desvio padrão
EDTA	–	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	–	enzyme-linked immunosorbent assay
EU	–	união europeia
F	-	força
FC	–	fatores de crescimento
FCR	–	força centrífuga relativa
FDA	–	food and drug administration
FGFa	–	acid fibroblast growth factor
FGFb	–	basic fibroblast growth factor
g	–	grama
HE	–	hematoxilina e eosina
HGF	–	hepatocyt growth factor
HUB	–	hospital universitário de Brasília
HZ	–	hertz
IVD	–	in vitro device
L-PRP	–	plasma rico em plaquetas e leucócitos
LPRF	–	leukocyte platelet rich fibrin
M	–	molar
m/s²	–	metro por segundo ²
MD	–	medical device
MEC	–	matriz extracelular
MET	–	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	–	microscopia eletrônica de varredura
mL	–	mililitro
MO	–	microscopia óptica
n xg	–	n x a força gravitacional
nm	–	nanômetro
°C	–	grau Celsius
OsO₄	–	tetróxido de ósmio
PBS	–	phosphate bufferid-saline
PCT	–	proteína de choque térmico
PDGF	-	platelet derived growth factor
pg	-	picogramas

pH	–	potencial hidrogeniônico
PPP	–	plasma pobre em plaquetas
PRGF	–	plasma rich in growth factors
PRP	–	plasma rico em plaquetas
RBC	–	red blood cell
rmax	–	raio máximo
rmed	–	raio médio
rmin	–	raio mínimo
rpm	–	rotações por minuto
S	–	espécime de sangue
ST	–	sangue total
t-PA	–	plasmina tecidual
TCLE	–	termo de consentimento livre e esclarecido
TGFb	–	transforming growth factor
u-PA	–	plasmina uroquinase
UnB	–	Universidade de Brasília
USA	–	United States of America
VEGF	–	vascular endothelial growth factor
ZPL	–	zona leucoplaquetária
µL	–	microlitro
µm	–	micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO	20
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO GERAL	22
CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CENTRÍFUGAS	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1. Delineamento do Estudo	32
2.2. Participantes	32
2.3. Modelos de Centrífugas de Bancada	32
2.4. Nível de Vibração	32
2.5. Preparação das Matrizes de LPRF	35
2.6. Variação Térmica e Nível de Ruído	36
2.7. Análise Estatística	36
3. RESULTADOS	37
4. DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 2. CONTAGEM CELULAR x FORÇA G	61
RESUMO	62
ABSTRACT	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAIS E MÉTODOS	69
2.1. Aspectos Éticos	69
2.2. Participantes	69
2.3. Coleta Sanguínea	69
2.4. Centrifugação	71
2.5. Obtenção do Plasma Sanguíneo	72
2.6. Contagem Celular	73
2.7. Análise Estatística	75
3. RESULTADOS	76
4. DISCUSSÃO	88
CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	95
CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	100
RESUMO	101
ABSTRACT	102
1. INTRODUÇÃO	103
2. MATERIAIS E MÉTODOS	110
2.1. Aspectos Éticos	110
2.2. Participantes	110
2.3. Obtenção dos Espécimes de LPRF	111
2.4. Coleta Sanguínea	112
2.5. Centrifugação	114
2.6. Avaliação Morfológica das matrizes de LPRF	115
3. RESULTADOS	120
3.1. Avaliação Macroscópica	120
3.2. Avaliação Microscópica	124

4.	DISCUSSÃO	146
4.1.	Avaliação Macroscópica	146
4.2.	Avaliação Microscópica	147
4.3.	Organização Estrutural da Matriz de LPRF	147
4.4.	Integridade Celular e Plaquetária	148
4.5.	Densidade da Matriz com e sem Compactação	149
4.6.	Artefatos Exógenos	149
4.7.	Eritrócitos Poliédricos e Retração do Coágulo	151
4.8.	Comparação Estrutural entre Fibrina e Matriz de Colágeno	153
4.9.	Fibrinólise <i>in vitro</i>	155
	CONCLUSÃO	157
	REFERÊNCIAS	158
CAPÍTULO 4. LIBERAÇÃO DE VEGF		159
	RESUMO	164
	ABSTRACT	165
1.	INTRODUÇÃO	166
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	174
2.1.	Aspectos Éticos	174
2.2.	Participantes	174
2.3.	Coleta Sanguínea	175
2.4.	Centrifugação	176
2.5.	Preparo das Matrizes de LPRF	179
2.6.	Preparo e Quantificação de VEGF	179
2.7.	Análise Estatística	181
3.	RESULTADOS	182
4.	DISCUSSÃO	186
	CONCLUSÃO	197
	REFERÊNCIAS	198
CAPÍTULO 5. CONTRIBUIÇÕES		202
1.	APRESENTAÇÃO	203
	REFERÊNCIAS	207
ANEXOS		208
I	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	208
II	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	209
III	ARTIGOS CIENTÍFICOS	210
IV	TÍTULO HONORÍFICO	213
V	NOMEAÇÃO DE ASSESSORIA TÉCNICA AO CFO	214
VI	RESOLUÇÃO CFO 158/2015	215
VII	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	217
VIII	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	218
IX	RELATÓRIO DE DEFESA DE DOUTORADO	219

RESUMO

Os concentrados sanguíneos (CS), tanto a forma líquida anticoagulada de plasma rico em plaquetas (PRP) como a forma polimérica de fibrina rica em plaquetas (PRF) são preparações terapêuticas autólogas não-transfusionais com propriedades biológicas aplicáveis na regeneração tecidual. Esses CS diferem na forma de preparo, na arquitetura da rede de fibrina, na liberação dos fatores de crescimento e no conteúdo de plaquetas e células. Considerando que as alterações metodológicas podem resultar em matrizes distintas e possíveis comprometimentos de sua eficácia clínica, este trabalho avaliou a influência de variações na força g, tempo de rotação, ângulo do rotor e tipos de tubos sobre o conteúdo celular, organização morfológica, tempo de fibrinólise e liberação do *vascular endothelial growth factor* (VEGF) em matrizes sanguíneas experimentais. Amostras de sangue humano foram utilizadas para obter matrizes experimentais de PRF e plasma sanguíneo em três modelos de centrifugas com distintos rotores de ângulo 80-2B (45°), EBA200 (33°) e FibrinFuge25 (25°); três forças g (200, 400 e 800 por 10 minutos); três tipos de tubos (tubos de plasma EDTA, vidro puro e plástico com SiO₂). A contagem de células e plaquetas foi realizada por citometria de fluxo, utilizando um contador hematológico automático; As análises morfológicas dos espécimes experimentais de PRF foram realizadas por macroscopia (MA), microscopia óptica (LM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A análise de VEGF foi realizada por Cytometric Bead Array (CBA), um imunensaio quantitativo. Os resultados da contagem de plaquetas em amostras experimentais de plasma mostraram que as maiores concentrações na fração sobrenadante foram obtidas com 200 x g e com forças de 400 a 800 x g somente na zona de *buffy coat*. A análise macroscópica das matrizes de PRF apresentou membranas maiores e aumento da área de *buffy coat* com a utilização do ângulo reduzido. A análise por microscopia de luz apresentou um conteúdo mais dispersivo de plaquetas no corpo das matrizes com a redução do ângulo do rotor combinado à baixa força de g, bem como diferenças no aumento das concentrações de plaquetas no *buffy coat* (800 xg) e no corpo da matriz (200 xg). A análise por microscopia eletrônica de varredura reafirmou os achados da microscopia óptica a partir de cortes transversais do coágulo de PRF. Os aumentos de 20 a 40.000x esclareceram a ultraestrutura tridimensional da matriz de PRF, durante a fibrinólise, permitiu a visualização de fragmentos de óxido de silício utilizados como ativador de coágulo em tubos de plástico e a presença de eritrócitos poliédricos na porção terminal da PRF. As maiores concentrações de VEGF foram observadas nas matrizes obtidas em tubos de vidro submetidos às menores faixas de força g. Os resultados desse estudo elucidaram a estrutura da matriz de fibrina, a dispersão dos elementos figurados do sangue ao longo da matriz e a variação morfológica sofrida pela fibrina durante o processo de fibrinólise, e no conjunto, esses resultados contribuirão para o entendimento dos efeitos dos diferentes parâmetros na forma e nos elementos que compõem a matriz de PRF.

Palavras-Chave: fibrina, centrifugação, força g, fatores de crescimento, ultraestrutura

ABSTRACT

Blood Concentrates (BC) such as Platelet Rich Plasma (PRP) liquid anticoagulated form and Platelet Rich Fibrin (PRF) polymeric form are autologous non-transfusional therapeutical preparations with biological properties applied to tissue regeneration. These BC differ in the way of preparation in fibrin network architecture, growth factors release as well in platelet/cells content. Although, methodological changes can result in distinct matrix that can compromise their clinical effectiveness. This work evaluated the influence of variations in g force, spin time, rotor angle and tubes type in platelet/cells content, morphological organization, time of fibrinolysis, vascular endothelial growth factor (VEGF) release, in experimental blood matrices. Blood samples were used to obtain experimental PRF matrices and blood plasma in three centrifuges models with distinct rotors angle 80-2B (45°), EBA200 (33°) and FibrinFuge25 (25°); three g forces (200, 400, and 800 during 10 minutes); three tubes type (EDTA plasma tubes, pure glass and plastic with SiO₂). Cell and platelets count were flow cytometry performed using an automatic hematology counter; to morphologic analysis of PRF experimental specimens were performed by macroscopic (MA), light microscopy (LM), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). For VEGF release a quantitative immunoassay by Cytometric Bead Array (CBA). The platelets count in experimental plasma specimens showed highest concentrations of platelets in supernatant fraction with 200 xg and with 400-800 xg ratio only in buffy coat zone. Macroscopic analysis of PRF matrices showed larger membranes and increase in buffy coat area with reduced angle. LM analysis show more dispersive platelet content with rotor angle reduction and low g force combination in matrices body, as well differences in increase platelet concentrations in buffy coat (800g) and matrix body (200g). SEM analysis reaffirmed the last findings in MO with cross sectional of PRF clot and with increases of 20 to 40,000x enlighten many particularities about the 3D structure of the PRF matrix, fibrinolysis, contamination with fragments of silicon oxide used as a clot activator in plastic tubes and presence of polyhedral erythrocytes in terminal portion of PRF. The results of this study elucidated the structure of the fibrin matrix, the dispersion of the cells and platelets throughout the matrix and the morphological variation suffered by fibrin during the fibrinolysis process, and as a whole, these results will contribute to understand the effects of different parameters in the morphology and components of the PRF matrix.

Key-words: fibrin, centrifugation, g – force, growth factors, ultrastructure

Introdução Geral

O uso terapêutico dos concentrados sanguíneos autólogos, especialmente o plasma rico em plaquetas (PRP) e a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF) fez surgir várias e distintas metodologias de centrifugação como fundamento para sua obtenção a partir da separação seletiva dos elementos sanguíneos em um determinado volume. Essa matriz biológica foi caracterizada como um tecido de natureza temporária e substitutiva com aplicações terapêuticas exclusivamente autólogas. Portanto, trata-se de fato de uma matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga isenta de eritrócitos produzidas a partir do sangue humano.

Alterações protocolares na obtenção desta matriz têm sido frequente na literatura. Conceitos como a utilização de diferentes tubos para coleção sanguínea à vácuo, variações de velocidades durante o ciclo de centrifugação, redução da força centrífuga relativa (FCR), desidratação, liofilização das matrizes e até mesmo variações de tipos de centrífugas são apresentados como propostas metodológicas com a intenção de melhorar suas características biológicas e conseqüentemente potenciais respostas clínicas no prognóstico terapêutico.

O presente estudo é uma tese de doutorado e constitui-se em um compilado experimental onde foram observados os efeitos de variações paramétricas diversas sobre a constituição da matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga. Neste trabalho constam experimentos sobre o funcionamento operacional de diferentes modelos de centrífugas, o efeito de diferentes forças

de centrifugação sobre a concentração celular e plaquetária na matriz, seu grau de fibrinólise *in vitro*, sua organização estrutural e ultraestrutural e a cinética na liberação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). A abordagem experimental deste trabalho converge ao seu próprio título: Caracterização Morfológica e Bioquímica da Fibrina Leucoplaquetária Autóloga.

Os resultados desse estudo elucidaram a estrutura da matriz de fibrina, a dispersão dos elementos figurados do sangue ao longo da matriz e a variação morfológica sofrida pela fibrina durante o processo de fibrinólise, e no conjunto, esses resultados contribuirão para o entendimento dos efeitos dos diferentes parâmetros na forma e nos elementos que compõem a matriz de LPRF.

Capítulo 1
Avaliação Funcional das Centrífugas

**VIBRAÇÃO, VARIAÇÃO TÉRMICA E NÍVEL DE RUÍDO EM TRÊS
MODELOS DE CENTRÍFUGAS DE BANCADA UTILIZADAS
PARA OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES DE FIBRINA
LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA.**

RESUMO

A centrifugação é uma metodologia capaz de proporcionar a estratificação seletiva de elementos de diferentes densidades corpusculares presentes em um mesmo meio fluido muito comum nos laboratórios de análises clínicas e unidades de pesquisa para separação do sangue humano. Com o advento dos concentrados sanguíneos (CS), preparações terapêuticas autólogas não-transfusionais com propriedades biológicas aplicáveis na regeneração tecidual, houve um grande interesse acerca do emprego clínico desta metodologia no âmbito da medicina regenerativa. Os CS são obtidos por centrifugação, onde as características operacionais das centrífugas podem influenciar na arquitetura ultra estrutural da matriz de fibrina destes CS, na composição celular e conseqüentemente sobre o efeito clínico esperado. Considerando que variações metodológicas indiscriminadas podem comprometer a eficácia clínica dos concentrados sanguíneos, este trabalho foi dedicado à verificação do comportamento funcional de vibração, variação térmica e nível de ruído de três modelos de centrífugas com distintos rotores de ângulo fixo: a. 80-2B (45°), EBA200 (33°) e FibrinFuge25 (25°), em distintas condições parametrizadas de força g (200, 400 e 800 x g) e tempo de centrifugação (5, 10 e 15 minutos). As três centrífugas apresentaram os padrões funcionais pretendidos dentro dos parâmetros preconizados para o método. As centrífugas EBA200 e FF25 apresentaram características funcionais muito próximas. Foram observados baixo nível de vibração e estabilidade térmica em ambas. A FF25, projetada exclusivamente para a obtenção dos CS, apresentou maior facilidade operacional pela disponibilidade de reprodução de programações protocolares em função da força g e criação de rampas de aceleração e desaceleração para redução de impactos sobre o conteúdo centrifugado. A centrífuga 80-2B apresentou o maior nível de vibração, bem como a maior variação térmica observada. Entretanto, o nível de aquecimento sofrido na sua câmara de centrifugação não influenciou o comportamento natural de resfriamento do sangue durante os diferentes ciclos observados em todas as análises. Neste conjunto de experimentos foram avaliadas três máquinas com distintos níveis de qualidade técnica e precificação de mercado e todas apresentaram características funcionais adequadas à obtenção dos CS. O desenvolvimento ético e responsável dessa ciência deve promover a fundamentação científica, tanto metodológica quanto clínica, de modo que seja reprodutível e torne-se acessível às diversas áreas da saúde.

Palavras-Chave: centrífuga, centrifugação, força g, vibração, variação térmica.

ABSTRACT

The centrifugation can provide a selective stratification of blood elements. With the advent of blood concentrates (BC), autologous non-transfusion therapeutic preparations with biological properties applicable to tissue regeneration, there was great interest in the clinical use of this methodology in the field of regenerative medicine. The operational characteristics of the centrifuges can influence the ultrastructural architecture of the fibrin matrix of these BC, the cell composition, and consequently, the expected clinical effect. Considering those methodological variations can compromise the clinical effectiveness of BC, aimed at the verification of the functional behavior of vibration, thermal variation, and noise level of three models of centrifuges with different fixed-angle rotors: a. 80-2B (45°), EBA200 (33°) and FibrinFuge25 (25°), in different parameterized conditions of g force (200, 400 and 800 x g) and centrifugation time (5, 10 and 15 minutes). The three centrifuges presented the intended functional standards within the parameters recommended for the method. The EBA200 and FF25 centrifuges had very similar functional characteristics. Low vibration and thermal stability were observed in both. The FF25, designed exclusively for obtaining the BC, presented greater operational ease due to the availability of reproduction of protocol programs according to the g-force and the creation of acceleration and deceleration ramps to reduce impacts on the centrifuged content. The 80-2B centrifuge showed the highest level of vibration, as well as the highest thermal variation observed. However, the level of heating experienced in your centrifuge chamber did not influence the natural blood cooling behavior during the different cycles observed in all analyzes. In this set of experiments, three machines with different levels of technical quality and market pricing were evaluated, and all of them presented functional characteristics suitable for obtaining BC. The ethical and responsible development of this science must promote a scientific basis, both methodological and clinical, so that it is reproducible and becomes accessible to different areas of health.

Key-words: *centrifuge, centrifugation, g-force, vibration, thermal variation.*

1. Introdução

O entendimento do uso terapêutico de um concentrado sanguíneo que agregasse plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento em concentrações supra-fisiológicas fez surgir várias e distintas metodologias de centrifugação como fundamento para sua obtenção a partir da concentração seletiva dos elementos sanguíneos em um determinado volume¹⁻³. Essa matriz biológica foi denominada, por proposição convencional, como fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF), onde foi caracterizada como um produto biológico autólogo para fins terapêuticos exclusivamente autólogos. Portanto, trata-se de fato de uma matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga, conforme descrito por Oliveira *et al.* 2018⁴.

Alterações protocolares na obtenção da matriz LPRF têm sido frequentemente sugeridas na literatura⁵⁻⁹. Conceitos como a utilização de diferentes tubos para coleção sanguínea à vácuo^{10,11}, variações de velocidades durante um único ciclo de centrifugação¹², redução da força centrífuga relativa (FCR)¹³, desidratação, liofilização das matrizes⁹ e até mesmo variações de tipos de centrífugas^{14,15} são apresentados em propostas metodológicas com a intenção de melhorar suas características biológicas e conseqüentemente potenciais respostas clínicas no prognóstico terapêutico.

Neste particular, alterações paramétricas como tipos e angulações de rotores, níveis de vibração em funcionamento, variações térmicas durante o ciclo de centrifugação e até níveis de ruídos podem exercer influências sobre as características morfológicas e bioquímicas da matriz de LPRF^{6,16} por causar diferentes graus de impacto na mobilidade e condicionamento celular no volume

sanguíneo contido no interior dos tubos¹⁷. Deste modo, avaliar as características funcionais de diferentes modelos de centrífugas de bancada poderá prover informações para a validação de futuros métodos para obtenção desta matriz de fibrina.

Centrífugas são equipamentos comumente destinados ao fracionamento de soluções diversas para fins diagnósticos e de pesquisa¹⁸. As centrífugas utilizadas para tais finalidades são classificadas como *in vitro device (IVD)*¹⁰. Na ciência hematológica transfusional, na obtenção de hemoderivados – frações sanguíneas reinsertas terapêuticamente na circulação sanguínea – são utilizadas centrífugas especiais com controle de aceleração e forças aplicadas. Estas possuem classificação sanitária como *medical device (MD)*¹⁵.

Desde que surgiram os agregados sanguíneos não-transfusionalis, inicialmente empregados terapêuticamente no âmbito da cirurgia odontológica¹⁹, a centrífuga passou a ser um equipamento de especial interesse para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)²⁰ que representa a 1ª geração e posteriormente da LPRF²¹ classificada como a 2ª geração dos concentrados plaquetários²².

Desde os pioneiros destas metodologias houve uma preocupação especial com a qualidade dos equipamentos destinados para este fim^{3,15}. Especialmente referente à estabilidade térmica e aos níveis de vibração exercidos por eles^{14,15}. Variações significativas de tais características poderiam diminuir sua potencialidade biológica pela redução do conteúdo leucoplaquetário e conseqüentemente de fatores de crescimento (FC)¹⁵. Definiu-se, conforme consenso internacional²³ que a matriz de LPRF deveria apresentar

concentrações supra-fisiológicas de plaquetas, rede densa de fibrina rica em junções fibrilares do tipo equilaterais²⁴, conteúdo leucoplaquetário com integridade morfológica e liberação lenta e crescente do conteúdo de FC e citocinas²⁵⁻²⁷. Estas características fundamentais tornaram-se parâmetros comparativos entre os principais métodos e seus respectivos produtos gerados^{5,28,29}, que apesar da grande diversidade de nomenclatura relacionadas à propriedade comercial e intelectual, representam a mesma matriz autóloga de fibrina rica em plaquetas para fins terapêuticos exclusivamente autólogos^{4,6}.

Dohan *et al.* 2017¹⁵, avaliaram o impacto da centrifugação sobre a organização morfológica da matriz de fibrina, bem como a liberação dos FC comparando dois modelos de centrífugas de laboratório comumente utilizadas para a obtenção da LPRF, A-PRF12 (Process, China) e EBA-20 (Hettich, Alemanha), onde foram observados aspectos macroscópicos, ultraestruturais e bioquímicos sobre as matrizes produzidas. Este estudo comparou as matrizes obtidas por morfometria onde identificou-se diferenças significativas de dimensões macroscópicas. Também analisou a ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando alterações morfológicas em plaquetas e hemácias em função de uma possível variação nos níveis de vibração encontrados em um dos modelos de centrífuga. Neste mesmo estudo a liberação lenta de fatores de crescimento demonstrou maiores concentrações nos intervalos de tempo finais (7-10 dias) associando-os ao baixo nível de vibração exercido pela centrífuga EBA-20.

Entretanto, Kubesch *et al.* 2018³⁰ apresentaram o efeito da centrifugação de baixa velocidade sobre a distribuição celular *in vitro* e a resposta fisiológica *in vivo* comparando amostras de LPRF obtidas por aplicação de força FCR de 222

x g e 719 x g, onde observaram que a tal redução proporcionou, *in vivo*, maior penetração celular concluindo que o principal efeito foi a variação de FCR.

Borsani *et al.* 2015¹², apresentaram uma metodologia baseada na variação de velocidades em ciclo contínuo (30" de aceleração, 2' a 2.700 rpm, 4' 2.400 rpm, 4' 2.700 rpm, 30" 3.000 rpm, 36" desaceleração e parada) identificada pelo método *concentrated growth fator (CGF™)* executado exclusivamente na centrífuga Medifuge MF200 (Silfradent, Itália). Este estudo identificou concentrações suprafisiológicas de VEGF e alto nível de densidade e resistência mecânica da matriz de fibrina.

Miron *et al.* 2018⁶ e Miron *et al.* 2019¹⁶ publicaram trabalhos sobre controvérsias na literatura acerca da referência paramétrica da centrifugação para descrição metodológica propondo que a FCR fosse calculada na porção terminal dos tubos para acompanhar a padronização internacional para centrifugações laboratoriais ou que houvesse ao menos a discriminação da zona de eleição do tubo em rotores de ângulos fixos para a escolha do cálculo de FCR.

Lourenço *et al.* 2018⁸ demonstraram a presença de concentrações suprafisiológicas de citocinas e fatores de crescimento liberados lentamente em matrizes de LPRF centrifugadas em posição horizontal, a 90° em relação ao eixo do rotor em centrífugas de rotor basculante.

De certo modo, a centrifugação, muito conhecida dos laboratórios de diagnóstico, é uma novidade no âmbito da odontologia e gera muitas dúvidas

relacionadas à sua influência sobre as características *in vitro* e seus efeitos *in vivo* sobre as respostas terapêuticas das matrizes de LPRF^{6,15}.

Diante destas questões propusemos investigar o nível de vibração nos eixos X, Y e Z, a variação térmica na matriz centrifugada e no interior do equipamento e os níveis de ruídos durante o ciclo de centrifugação em três modelos de centrífugas submetidas a variações de FCR e tempo. Os achados deste experimento servirão para correlacioná-los às possíveis variações morfológicas e bioquímicas das matrizes de LPRF produzidas nos experimentos conseguintes sobre morfologia, citometria leucoplaquetária e liberação de FC angiogênicos na matriz de LPRF constantes dos capítulos 2, 3 e 4 deste manuscrito, respectivamente.

2. Materiais e Métodos

2.1. Delineamento do estudo

Este estudo foi proposto para comparar as características funcionais de três modelos de centrífugas de bancada utilizadas para a obtenção das matrizes de *L-PRF*. As características avaliadas foram os níveis de vibração, de ruído em funcionamento e as variações térmicas sofridas na câmara de centrifugação e também no espécime. Todos estes itens foram mensurados em três faixas de FCR 200, 400 e 800 x g utilizando como referência o raio na região central do tubo (*r_{med}*), correspondente à zona de maior concentração leucoplaquetária segundo o diagrama experimental. Figura 1.

2.2. Participantes

Participaram voluntariamente deste estudo cinco indivíduos adultos jovens, 2 do gênero feminino e 3 do gênero masculino dos quais foram obtidos 90ml de sangue total após leitura e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os mesmos declararam-se saudáveis, não tabagistas e não portadores de doenças infecto contagiosas. Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com seres humanos foram rigorosamente obedecidas, em concordância com a lei 6.638/79 e conforme a declaração de Helsinque (World Medical Association Recommendation 2011). Este estudo (CAAE nº 46109215.9.0000.5558) foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB). As amostras sanguíneas foram coletadas mediante assinatura do TCLE.

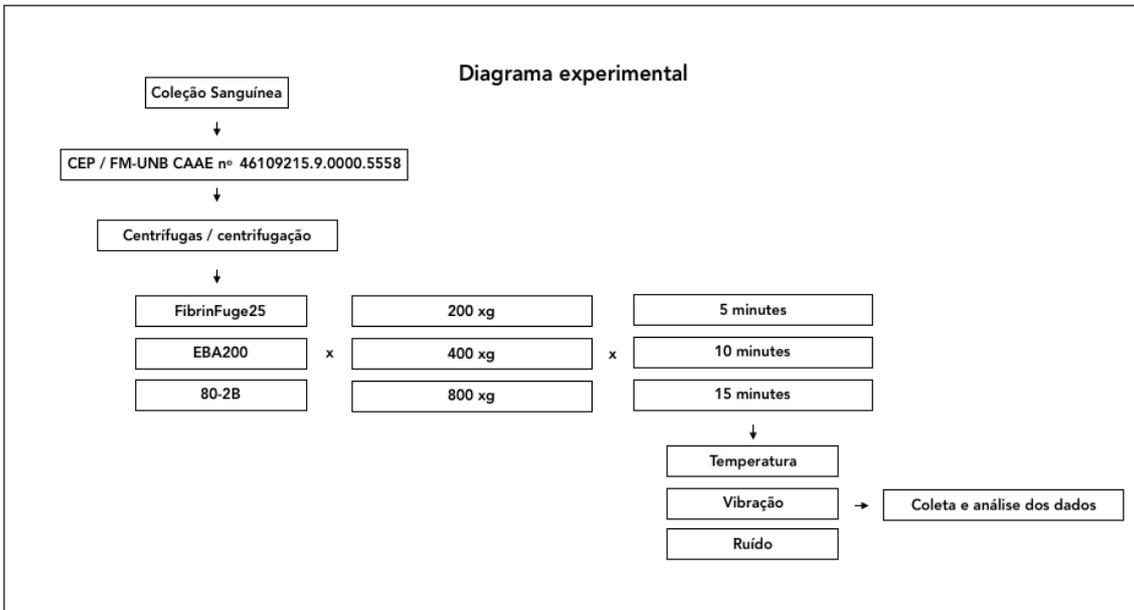


Figura 1. Diagrama do fluxo experimental para a avaliação funcional dos três modelos de centrifugas de bancada. Cada centrífuga foi submetida à centrifugação em três faixas de FCR: 200, 400 e 800 x g em intervalos de 5, 10 e 15 minutos

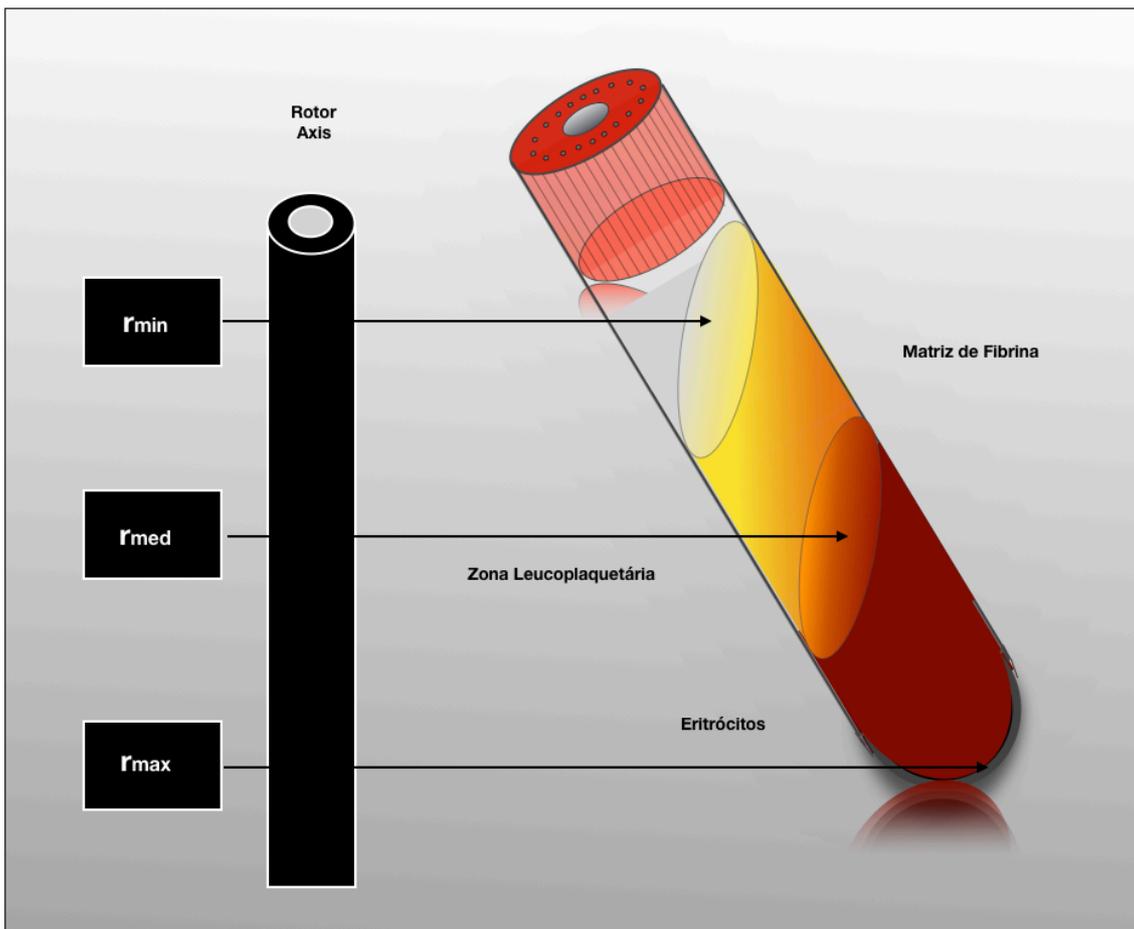


Figura 2. Diferentes raios (distância entre o centro longitudinal do tubo e o eixo do rotor) criados pelo posicionamento inclinado do tubo. r = raio. r_{min} = raio na ponta do tubo, menor distância; r_{med} = raio no centro do longo eixo do tubo, corresponde à região do *buffy coat*; r_{max} = raio na ponta do tubo, maior distância do eixo do rotor. A FCR é diretamente proporcional ao raio.

2.3. Modelos de centrífugas de bancada

Os modelos de centrífugas de rotores fixos avaliados foram 80-2B (Montserrat, China) cujo rotor de 45° possui carga máxima de 12 tubos de 10mL; EBA200 (Hettich, Alemanha) com rotor de 33° e capacidade para 8 tubos de 10mL e Fibrinfuge25 (FF25) (Montserrat, China) com rotor para 8 tubos com ângulo de 25°. Figura 3.



Figura 3. Centrífugas de bancada utilizadas para obtenção de coágulos de fibrina. FibrinFuge25 (FF25) (Montserrat, China), rotor de raio médio de 65 mm e ângulo fixo de 25° com capacidade para 8 tubos de 10mL; EBA200 (Hettich, Alemanha), rotor com raio médio de 50 mm de 33° com capacidade para 8 tubos de 10mL e 80-2B (Montserrat, China), rotor de raio médio de 95mm e ângulo de 45° com capacidade para 12 tubos de 10mL. O raio médio do rotor de cada centrífuga foi utilizado para o cálculo da FCR. O raio médio é considerado no meio do tubo, na região do *buffy coat*.

2.4. Nível de vibração

A três centrífugas foram avaliadas quanto aos níveis de vibração em 3 faixas de FCR aplicadas: 200, 400 e 800 x g. Durante um ciclo experimental de centrifugação de 3 minutos, os níveis de vibração foram mensurados em unidades de aceleração, metros por segundo ao quadrado (m/s^2), utilizando o acelerômetro Bosch BMC150 (Bosch Sensortec, USA) com sensores de leitura nos eixos X, Y e Z. As análises foram realizadas sob duas configurações de carregamento dos seus rotores: vazios ou sem carga (A) e carregados com 8 tubos de vidro de 10mL completamente preenchidos com água filtrada (B).

2.5. Preparação das matrizes de LPRF

As amostras de sangue foram coletadas de cada participante em uma das veias periféricas da fossa antecubital (cefálica, basílica ou intermédia cubital) em tubos de vidro de 10mL FibrinTubes (Montsserat, China) - estes tubos são isentos de aditivos e possuem registro sanitário na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sob o número 80153030126 para obtenção da matriz de LPRF - utilizando o sistema de coleta à vácuo com agulha 21G (Greiner Bio-One, Brasil). Cada tubo apresenta tempo médio de preenchimento de 20,0 ± 2,0 segundos. As amostras sanguíneas foram centrifugadas imediatamente após a coleta do último tubo. Os parâmetros de rpm e tempo em EBA200 e 80-2B foram devidamente ajustados para reproduzir os níveis de FCR eleitos para a realização deste experimento. A FF25 possui parametrização em função da FCR. As matrizes sanguíneas obtidas de acordo com as variações paramétricas deste experimento foram utilizadas para reproduzir a realidade do método durante os testes de vibração, variação térmica e nível de ruído.

Tabela 1. Raios mínimo, médio e máximo em mm nos diferentes modelos de centrífugas

equipamento	ângulo Fixo	Raio em mm		
		rmin	rmed	rmax
FF25	25°	37	65	84
EBA200	33°	31	51	85
80-2B	45°	55	95	120

Os dados constantes desta tabela foram obtidos das informações técnicas de cada equipamento e os raios mínimo (rmin), médio (rmed) e máximo (rmax) foram medidos em mm, pois as informações dos fabricantes não apresentam a discriminação dos diferentes raios.

2.6. Variação térmica e nível de ruído

Para a avaliar a estabilidade térmica, em cada centrifugação foram medidas as temperaturas em unidades de graus Celsius (°C) utilizando o termômetro digital infravermelho MT-320 laser classe II (Minipa Electronics, USA) nos espécimes contidos nos tubos e nas câmaras de centrifugação no interior das centrífugas, antes e imediatamente após o ciclo. O nível de ruído foi mensurado em unidades de decibéis (dB) utilizando o decibelímetro Decibel X (Apple, USA) durante cada ciclo de centrifugação nas seguintes configurações paramétricas: 200, 400 e 800 x g nos intervalos de 5, 10 e 15 min.

Todos estes experimentos funcionais foram realizados por instrumentação no laboratório de metrologia dinâmica da faculdade de tecnologia da Universidade de Brasília.

2.7. Análise Estatística

O comportamento funcional das centrífugas foram mensurados a partir das variações de FCR e tempo. Os dados dos níveis de vibração medidos em m/s^2 , variação térmica em °C e ruído em dB foram expressos pela média \pm DP. Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade das variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a variância da amostra pelo teste de Bartlett. Nas comparações de médias foi aplicado o teste T pareado. Nas análises multigrupos para comparar a distribuição em amostras independentes foi utilizado o teste ANOVA para a análise de variância e utilizado Kruska-Wallis como pós-teste. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O *software* Prism 8 (GraphPad, USA) foi utilizado para as análises, geração e edição dos gráficos.

3. Resultados

Inicialmente foi calculado o valor de revoluções por minuto (rpm) necessário para gerar as referidas faixas ideais de FCR nas centrífugas eleitas para este experimento. Para tal foi utilizada a equação $FCR = 1,12 \times r \times (rpm/1000)^2$ tendo como referência o raio médio (rmed) dos rotores.

Tabela 2. Relação entre raio, velocidade e RCF nos diferentes modelos de centrífugas

	FF25			EBA200			80-2B		
	rpm			rpm			rpm		
raio	200xg	400xg	800xg	200xg	400xg	800xg	200xg	400xg	800xg
rmin	2899	3110	4398	2114	2991	4230	1804	2550	3607
rmed	1659	2346	3318	1891	2675	3783	1373	1940	2745
rmax	1459	1940	2745	1495	2115	2991	1220	1727	2441

As velocidades em RPM foram calculadas segundo a equação $RCF = 1,12 \times r \times (RPM/1000)^2$ demonstrando que FCR e rpm são grandezas diretamente proporcionais e que o raio e a rpm em função da mesma faixa de FCR são inversamente proporcionais. A mesma rpm gera diferentes FCR quando exercida em rotores com diferentes raios.

3.1. Avaliação Funcional das centrífugas

Esta análise foi feita para avaliar o nível de vibrações, de variação térmica e de ruídos durante o ciclo de centrifugação pelos três modelos de centrífugas de bancada eleitas para produção da LPRF neste experimento. A tabela 3 exhibe os resultados dos níveis de vibração em m/s^2 . Os três equipamentos sob análise exibiram baixos níveis de vibração radial nas três faixas de FCR investigadas. O nível de vibração no eixo Z exhibe possíveis movimentos de subida e descida, do rotor e da amostra, e apresenta nesta análise valores elevados em função do somatório à força gravitacional de $9,806m/s^2$. Nos eixos X e Y os valores expressam a vibração radial real exercida pelos equipamentos. Deste modo, consideramos como vibração total o somatório de X e Y.

Com a avaliação de variação térmica pretendeu-se conhecer o efeito sofrido no sangue e diferenciá-lo do comportamento térmico na câmara de

centrifugação. O terceiro aspecto funcional avaliado foi o nível de ruído em dB produzido por cada máquina em cada configuração paramétrica.

3.1.1. Níveis de vibração

Para determinar o nível de vibração foram feitas mensurações comparativas com os rotores vazios e completamente carregados. Inicialmente foi possível observar que todas as centrífugas apresentaram elevação nos níveis de vibração à medida que a FCR foi aumentada. A centrífuga Hettich EBA200, em função do alto padrão de qualidade fabril, foi utilizada como parâmetro comparativo de vibração pois a mesma foi eleita para a composição do protocolo Intraspin *L-PRF*[™], amplamente referenciado na literatura internacional como o único *FDA Cleared*. Esta exibiu valores baixos nas duas configurações do rotor, vazio e carregado, $0,81 \pm 0,23$ a $1,11 \pm 0,22$ m/s², respectivamente. Entretanto, as outras duas centrífugas apresentaram comportamento semelhante nas faixas de FCR eleitas para o estudo, inclusive a FF25 apresentou valores significativamente mais baixos em todas as FCR aplicadas ($p < 0,05$; teste t pareado). As faixas de FCR dos principais protocolos para obtenção de LPRF descritos na literatura variam entre 70 e 600 xg, deste modo os extremos, mínimo e máximo, dos níveis de vibração observados neste estudo comparativo de FCRs entre 200 e 800 xg foram 0,25 e 1,55 m/s², respectivamente nas centrífugas FF25 a 200 xg e 80-2B a 800 xg. Os níveis de vibração foram significativamente maiores (ANOVA; $p < 0,0001$) quando as centrífugas estavam carregadas. Os resultados deste experimento demonstraram claramente que houve similaridade em termos de vibração entre as três centrífugas avaliadas.

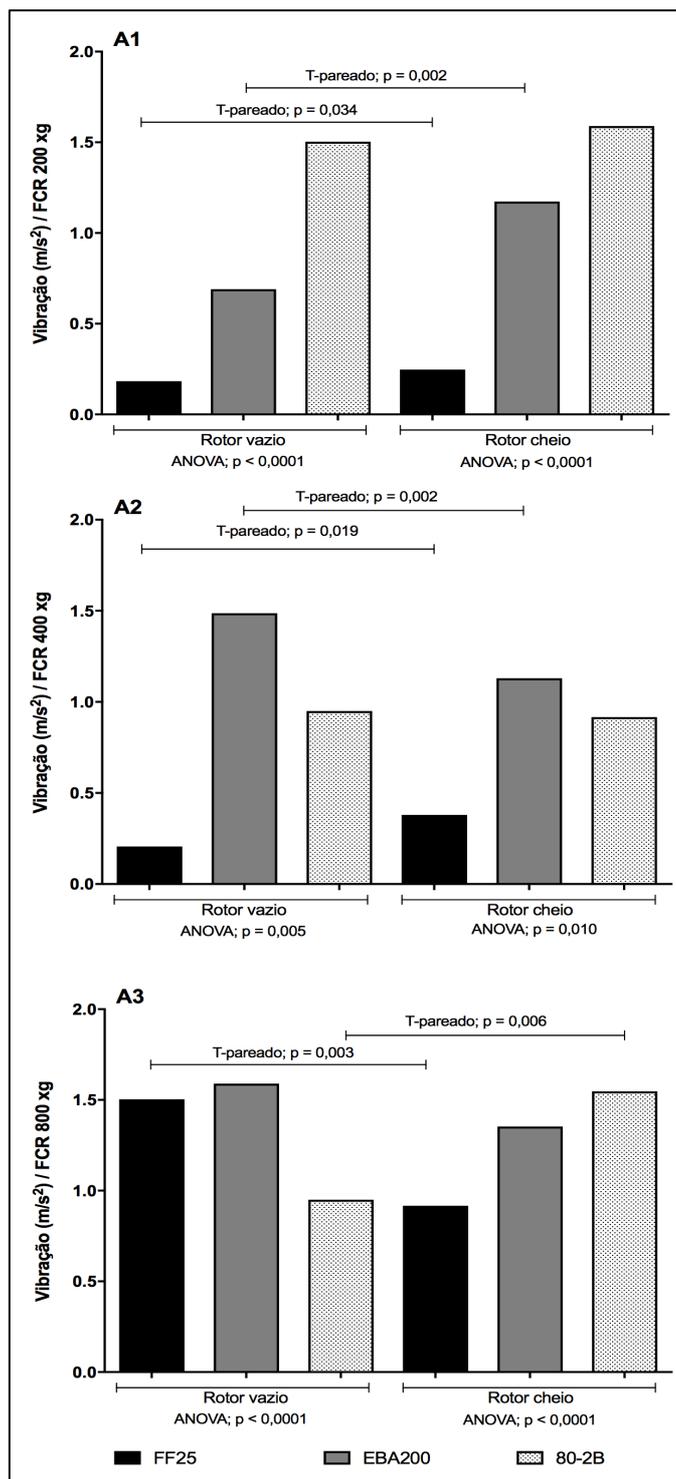


Figura 4. Níveis de vibração radial total nas três centrífugas, 80-2B, FibrinFuge25 e EBA200. Os resultados analisados pelos testes de correlação ANOVA fator único e teste T pareado indicaram a mínima variação observada nos grupos organizados em função da FCR aquecimento discreto nas câmaras de centrifugação e resfriamento da amostra ($p < 0,0001$). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e valores discrepantes.

3.1.2. Níveis de vibração

A variação de temperatura foi considerada importante na avaliação funcional das centrífugas em função do possível aquecimento durante o ciclo de centrifugação e seu efeito sobre as características biológicas da amostra sanguínea. Neste aspecto a qualidade dos materiais utilizados na fabricação dos rotores e especialmente dos motores podem exercer grande influência. O presente estudo avaliou duas centrífugas que possuem motor de indução magnética, FF25 e EBA200, e uma de motor induzido por escovas de carvão, a 80-2B. Esta diferença fabril pode ser significativa na geração de “névoa” de carvão na câmara de centrifugação. Deste modo, podendo gerar maior elevação da temperatura no interior da máquina durante seu funcionamento.

A nossa avaliação de comportamento térmico fez-se na câmara interna da centrífuga (C), onde encontra-se posicionado o rotor, em que C_1 foi a temperatura inicial e C_2 a temperatura após a finalização do ciclo, logo $\Delta C = C_2 - C_1$; e também no tubo contendo o espécime sanguíneo (S), onde S_1 foi a temperatura inicial medida na superfície do tubo contendo o sangue antes da centrifugação e S_2 a sua temperatura medida ao final do ciclo, logo $\Delta S = S_1 - S_2$; isto para distinguir o comportamento térmico nestes dois ambientes, no interior do equipamento e na amostra biológica.

Em alguns espécimes a temperatura inicial do sangue apresentou significativo resfriamento após a coleta sanguínea em função da logística do teste e da quantidade de amostras a serem mensuradas e centrifugadas ao mesmo tempo, apresentando valores variáveis entre $23,3 \pm 0,03$ e $35,38 \pm 0,3^\circ\text{C}$.

Os resultados integrais desta experimentação estão apresentados nas tabelas 3, 4 e 5 onde as variações paramétricas foram distribuídas em função do tipo de centrífuga.

Tabela 3. Variação térmica em ΔC e ΔS em $^{\circ}C$ – FibrinFuge25

FibrinFuge 25	Temperatura $^{\circ}C$			
	Câmara		Tubo	
	FCR/min	inicial	Final	inicial
200/5	24,00 \pm 0,3	23,12 \pm 0,6	34,84 \pm 1,7	28,20 \pm 0,7
200/10	23,38 \pm 0,2	25,52 \pm 0,3	34,06 \pm 0,3	27,40 \pm 0,6
200/15	25,22 \pm 0,2	27,98 \pm 0,3	33,70 \pm 0,2	28,92 \pm 0,3
400/5	35,88 \pm 0,4	28,24 \pm 0,6	24,20 \pm 0,3	24,34 \pm 0,3
400/10	24,30 \pm 0,2	24,64 \pm 0,2	32,46 \pm 0,5	27,04 \pm 0,2
400/15	24,12 \pm 0,3	26,62 \pm 0,1	33,08 \pm 0,3	27,48 \pm 0,3
800/5	24,44 \pm 0,2	25,08 \pm 0,2	33,84 \pm 0,2	28,38 \pm 0,2
800/10	24,96 \pm 0,4	27,34 \pm 0,2	32,60 \pm 0,3	26,68 \pm 0,5
800/15	27,40 \pm 0,2	29,84 \pm 0,2	32,26 \pm 0,4	29,74 \pm 0,1

Os dados são médias \pm desvio-padrão (n=5). As variações térmicas medidas em m/s^2 foram reproduzidas em nas FCR de 200, 400 e 800 x g nos intervalos de 5, 10 e 15 minutos de centrifugação

Tabela 4. Variação térmica em ΔC e ΔS em $^{\circ}C$ – EBA200

EBA200	Temperatura $^{\circ}C$			
	Câmara		Tubo	
	FCR/min	inicial	Final	inicial
200/5	23,48 \pm 0,3	22,98 \pm 0,4	32,30 \pm 0,9	26,58 \pm 0,3
200/10	22,64 \pm 0,2	23,94 \pm 0,3	34,94 \pm 0,3	26,36 \pm 0,1
200/15	24,64 \pm 0,6	27,06 \pm 0,4	32,70 \pm 0,2	27,26 \pm 0,3
400/5	26,56 \pm 1,1	25,16 \pm 0,3	35,38 \pm 0,3	28,14 \pm 0,5
400/10	25,10 \pm 0,3	24,92 \pm 0,1	31,62 \pm 0,4	25,46 \pm 0,2
400/15	25,06 \pm 0,2	27,18 \pm 0,3	31,96 \pm 0,2	26,56 \pm 0,2
800/5	27,80 \pm 0,3	24,94 \pm 0,2	33,96 \pm 0,2	27,10 \pm 0,3
800/10	24,90 \pm 0,1	24,76 \pm 0,3	31,08 \pm 0,2	25,80 \pm 0,3
800/15	23,58 \pm 1,6	27,02 \pm 0,2	32,28 \pm 0,4	26,90 \pm 0,1

Os dados são médias \pm desvio-padrão (n=5). As variações térmicas medidas em m/s^2 foram reproduzidas em nas FCR de 200, 400 e 800 x g nos intervalos de 5, 10 e 15 minutos de centrifugação

Tabela 5. Variação térmica em ΔC e ΔS em $^{\circ}C$ – 80-2B

80-2B	Temperatura $^{\circ}C$			
	Câmara		Tubo	
	FCR/min	inicial	Final	inicial
200/5	24,42 \pm 0,4	24,28 \pm 0,4	31,94 \pm 0,3	27,78 \pm 0,3
200/10	24,00 \pm 0,3	25,82 \pm 0,3	33,92 \pm 1,7	28,24 \pm 0,6
200/15	25,76 \pm 0,5	28,04 \pm 0,4	33,14 \pm 0,5	27,78 \pm 0,5
400/5	25,58 \pm 0,2	25,82 \pm 0,2	34,84 \pm 0,2	26,98 \pm 0,5
400/10	25,76 \pm 0,2	26,94 \pm 0,1	32,22 \pm 0,4	27,10 \pm 0,2
400/15	28,12 \pm 0,3	29,48 \pm 0,2	32,18 \pm 0,2	29,46 \pm 0,3
800/5	27,12 \pm 0,3	26,94 \pm 0,2	34,00 \pm 0,2	28,58 \pm 0,2
800/10	27,10 \pm 0,1	29,12 \pm 0,2	31,92 \pm 0,1	28,88 \pm 0,1
800/15	29,08 \pm 0,2	32,88 \pm 0,4	32,22 \pm 0,4	31,18 \pm 0,1

Os dados são médias \pm desvio-padrão (n=5). As variações térmicas medidas em m/s^2 foram reproduzidas em nas FCR de 200, 400 e 800 x g nos intervalos de 5, 10 e 15 minutos de centrifugação.

3.1.2.1. Centrifugação a 200 x g

As figuras 5 e 6 ilustram as análises de correlação estatística dos ciclos de centrifugação nos 3 modelos com parâmetros de FCR de 200 x g durante 5, 10 e 15 minutos. Na configuração paramétrica de 5 minutos FF25 e EBA200 sofreram resfriamento ΔC , enquanto 80-2B apresentou leve aquecimento ($p=0,002$ Kruska-Wallis). Já em ΔS todas as amostras sofreram resfriamento ($p<0,0001$ Kruska-Wallis). Nos ciclos de 10 e 15 minutos as três centrífugas aqueceram $1,75\pm 0,59$ e $2,48\pm 0,24^{\circ}\text{C}$, respectivamente ($p<0,001$ ANOVA). Contudo, ΔS exibiu resfriamento de $-6,97\pm 1,47^{\circ}\text{C}$ ($p<0,0001$ Kruska-Wallis) e $-5,19\pm 0,36^{\circ}\text{C}$, respectivamente ($p<0,0001$ ANOVA) em todas as centrífugas.

3.1.2.2. Centrifugação a 400 x g

As figuras 7 e 8 ilustram a análise de correlação estatística nos ciclos com parâmetros de FCR de 400 x g durante 5, 10 e 15 minutos. Nos intervalos de 10 e 15 minutos a temperatura inicial da câmara apresentou mediana em torno de 25°C , o que demonstrou a significativa elevação de ΔC em 80-2B ($p=0,003$ Kruska-Wallis). As ΔS apresentaram resfriamento em todas as amostras, em FF25/5min ($p<0,04$ Kruska-Wallis), em EBA200/10 min ($p<0,0001$ Kruska-Wallis) e por 15 min, FF25 e EBA200 ($p<0,0001$ Kruska-Wallis). No ciclo 15 minutos a ΔC em 80-2B apresentou o menor nível de resfriamento $29,48 \pm 0,2$ e $29,46 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, respectivamente com valores aproximados a ΔS em 80-2B ($p<0,0001$ Kruska-Wallis)

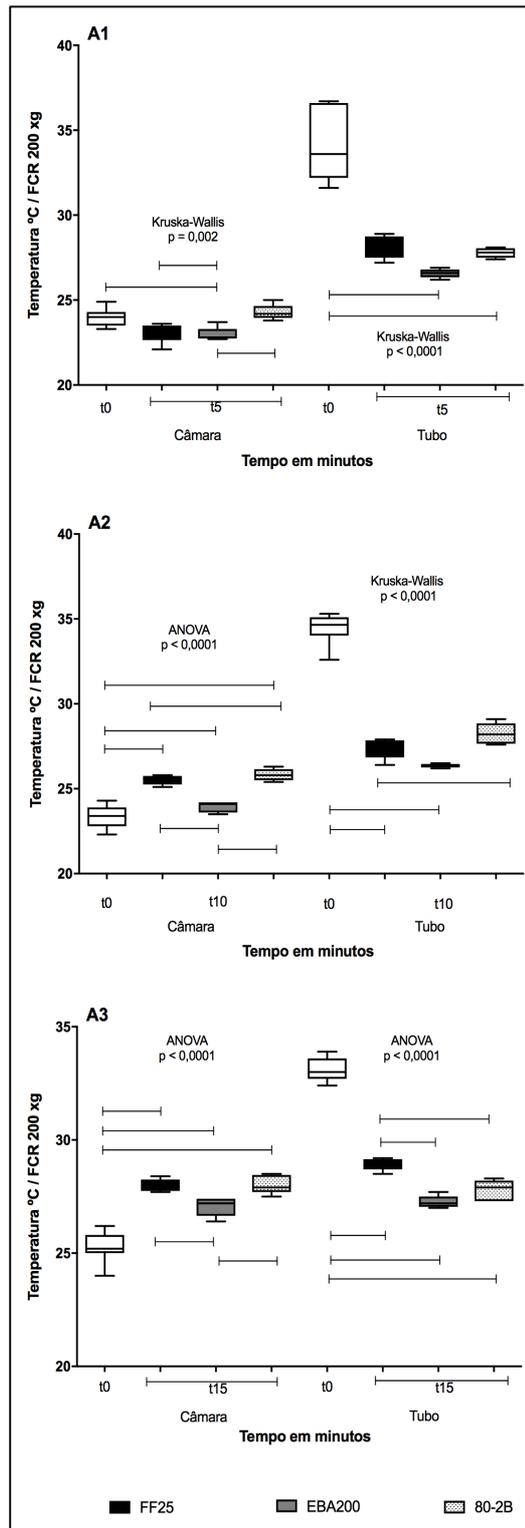


Figura 5. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 200 x g durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífugas, 80-2B, FibrinFuge25 e EBA200. Os resultados analisados pelos testes de correlação ANOVA fator único e Kruska-Wallis indicaram aquecimento discreto nas câmaras de centrifugação e resfriamento da amostra ($p < 0,0001$). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos, mínimos e discrepantes.

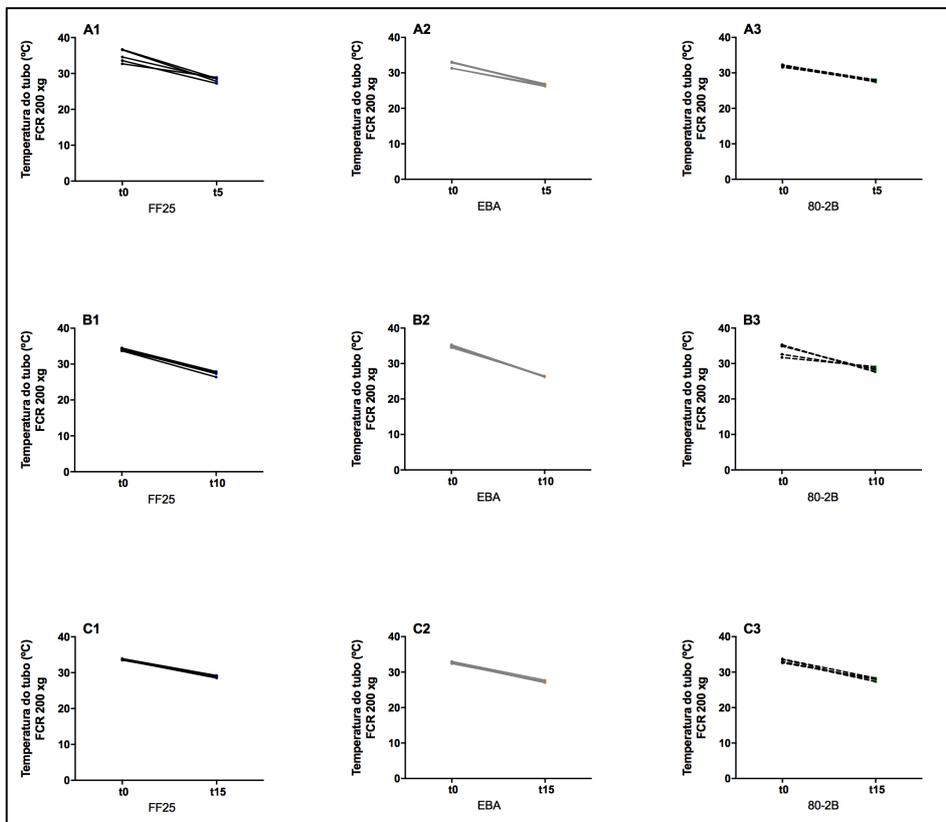


Figura 6. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 200 x g durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífugas, 80-2B, FibrinFuge25 e EBA200. Os resultados analisados pelos testes de correlação indicaram o resfriamento da amostra ($p < 0,0001$ ANOVA) e ($p < 0,0001$ Kruskal-Wallis) em todas configurações paramétricas. Estas representações gráficas demonstraram o resfriamento individualizado de toda a amostragem da experimentação $n=5$.

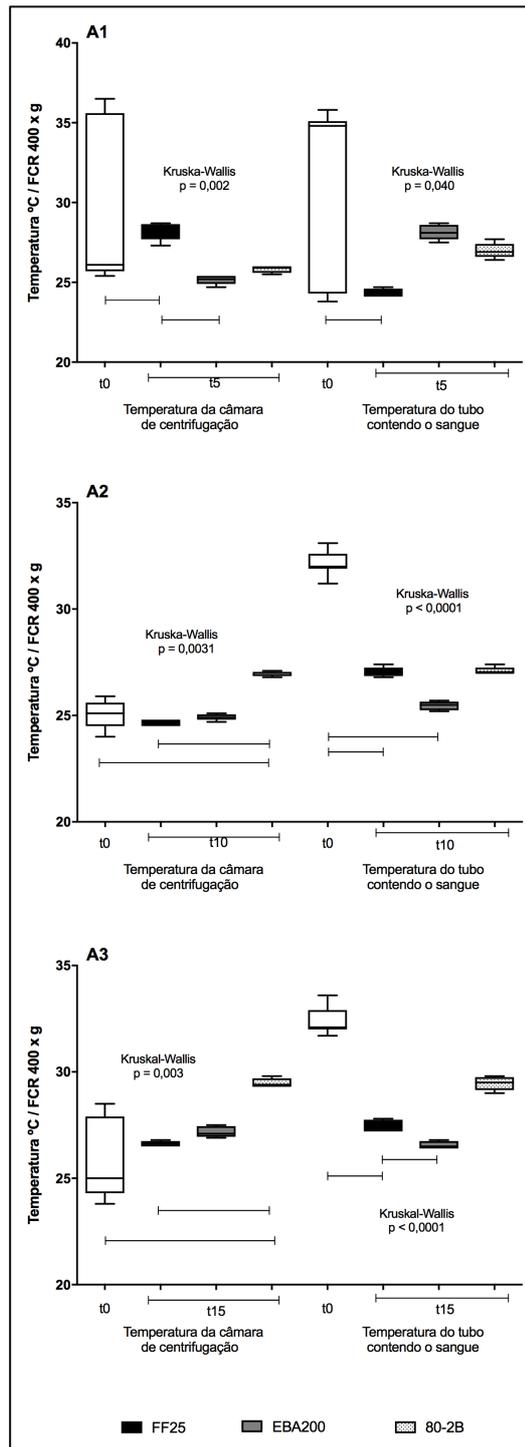


Figura 7. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 400 x g durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífugas, 80-2B, FibrinFuge25 e EBA200. Os resultados analisados pelo teste de correlação indicaram aquecimento nas câmaras de centrifugação e resfriamento da amostra ($p < 0,0001$ Kruska-Wallis). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e valores discrepantes.

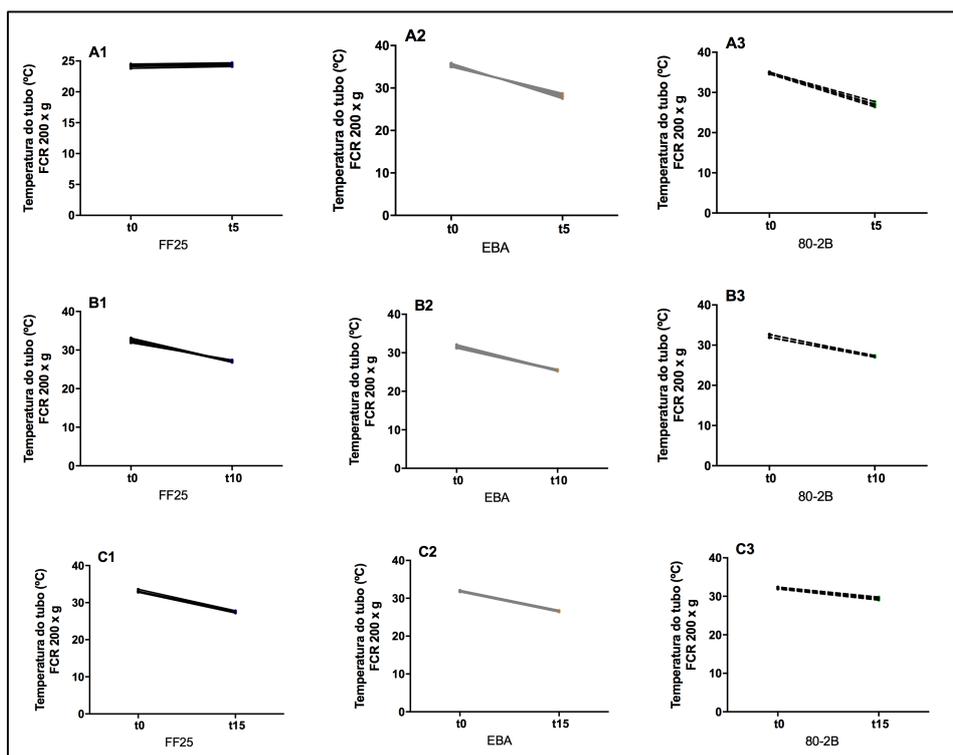


Figura 8. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 400 x g durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífugas, 80-2B, FibrinFuge25 e EBA200. Os resultados analisados pelo teste de correlação Kruska-Wallis indicaram o resfriamento da amostra ($p < 0,0001$) em todas configurações paramétricas. Estas representações gráficas demonstraram o resfriamento individualizado de toda a amostragem da experimentação $n=5$, exceto em A1(FF25/200 x g /5min) onde, em virtude da baixa temperatura inicial do sangue observou-se em 4 dos 5 testes discreta elevação de ΔS em FF25 e EBA200 ($p < 0,002$ Kruska-Wallis).

3.1.2.3. Centrifugação a 800 x g

As figuras 9 e 10 ilustram a análise de correlação estatística nos ciclos com parâmetros de FCR de 800 x g durante 5, 10 e 15 minutos. Exceto em 5 min, nos demais intervalos ΔC apresentou aquecimento em todas as centrífugas, sendo significativo em 80-2B, especialmente na configuração 80-2B/800/15min que elevou a temperatura em $+3,80 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,0001$ Kruska-Wallis). As variações de ΔC em FF25/800/15 e EBA/800/15 foram mais discretas e apresentaram aquecimento não significativo ($p > 0,05$ ANOVA). Em relação ao comportamento térmico do espécime, os resultados reproduziram o que foi observado nas outras faixas de FCR. Entretanto, o ΔS em EBA/800/15 apresentou resfriamento de apenas $1,02 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($p > 0,05$ Kruska-Wallis) demonstrando que a ΔC influenciou no comportamento de ΔS , unicamente neste parâmetro experimental.

3.1.3. Níveis de ruídos em funcionamento

Ruídos emitidos por máquinas em funcionamento estão associados ao seu estado vibracional e podem gerar desequilíbrios no ambiente resultando em efeitos sobre a salubridade do meio e do operador. Como parâmetro comparativo uma conversação normal apresenta ruídos entre 60 e 70dB e ruídos superiores a 80dB já oferecem potencial risco à saúde auditiva humana. Ruídos de máquinas exibem um padrão de frequência que podem ser mensuradas em decibéis (dB) ou hertz (HZ). A tabela 6 indica esta avaliação funcional dos três modelos de centrífugas deste experimento.

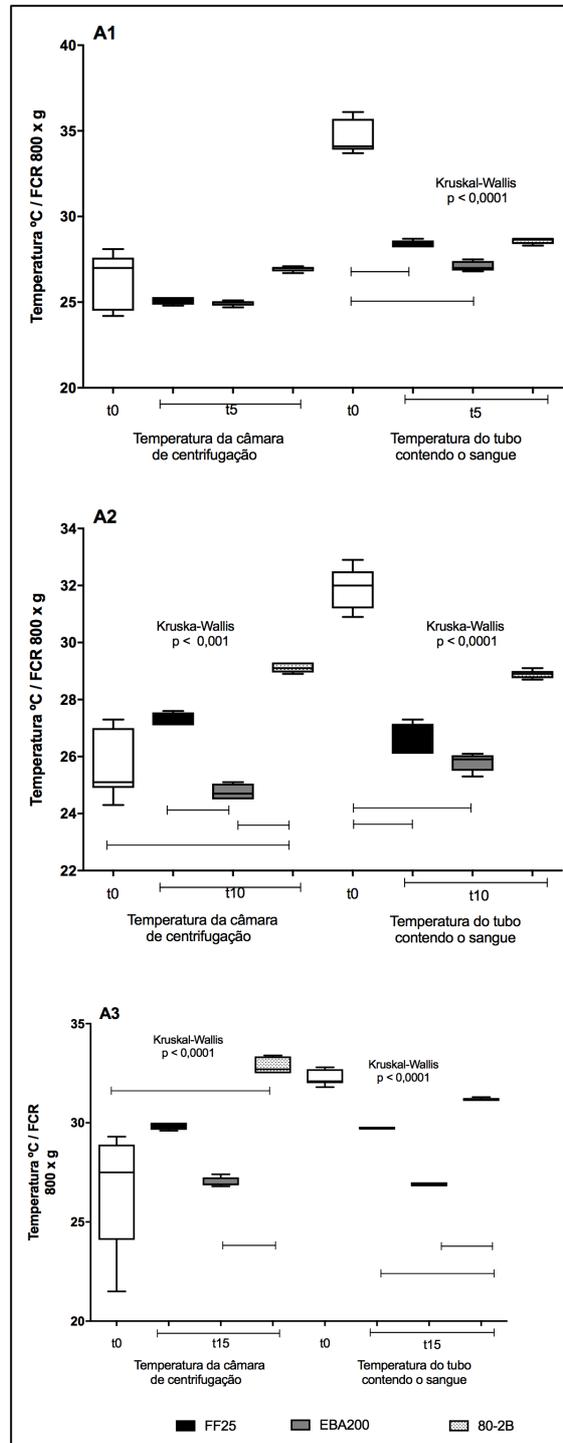


Figura 9. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 800 x g durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífugas, 80-2B, FibrinFuge25 e EBA200. Os resultados analisados pelo teste de correlação indicaram aquecimento nas câmaras de centrifugação e resfriamento da amostra ($p < 0,0001$ Kruskal-Wallis). O baixo resfriamento do espécime em 80-2B (A3) demonstra a influência de ΔC sobre ΔS unicamente na configuração (80-2B/800xg/15min). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e valores discrepantes.

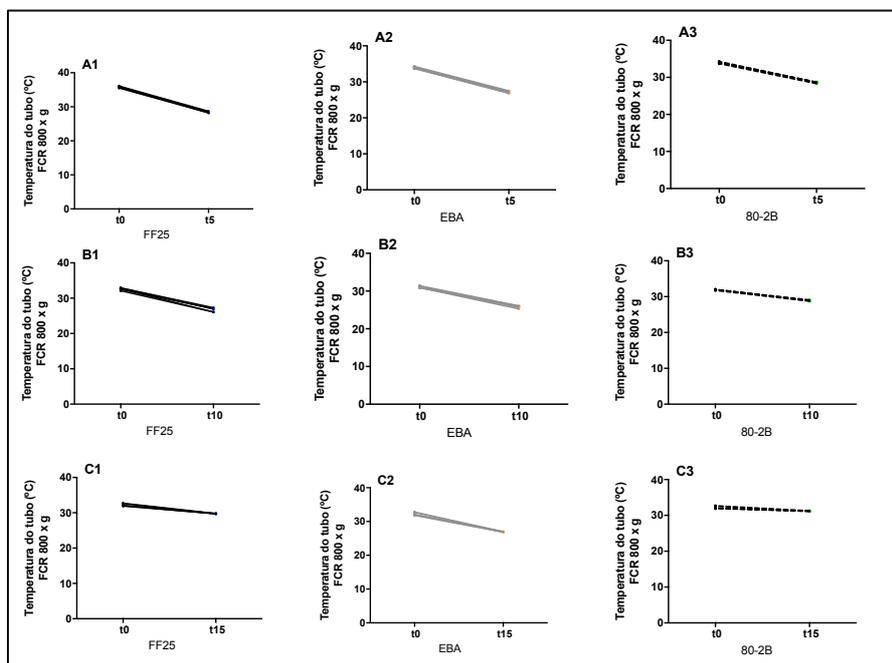


Figura 10. Variação de temperatura em ciclos de centrifugação de 800 x g durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífugas, 80-2B, FibrinFuge25 e EBA200. Os resultados analisados pelo teste de correlação Kruska-Wallis indicaram o resfriamento da amostra ($p < 0,0001$) em todas configurações paramétricas. Estas representações gráficas demonstraram o resfriamento individualizado de toda a amostragem da experimentação $n=5$, exceto em C3 (80-2B/800 x g /15min) onde, observou-se a baixa redução de ΔS em ($p > 0,05$ Kruska-Wallis).

Tabela 6. Níveis de ruídos em funcionamento (dB)

RCF	Decibel (dB)		
	FibrinFuge25	EBA200	80-2B
200g	55,63 ± 0,32	53,37 ± 0,67	63,10 ± 1,08
400g	62,30 ± 1,06	59,77 ± 0,31	67,93 ± 0,32
800g	69,60 ± 0,85	59,50 ± 0,79	77,37 ± 0,21

Os dados são médias ± desvio-padrão ($n=3$). As medidas feitas em dB foram reproduzidas em triplicata nas FCR de 200g, 400g e 800g.

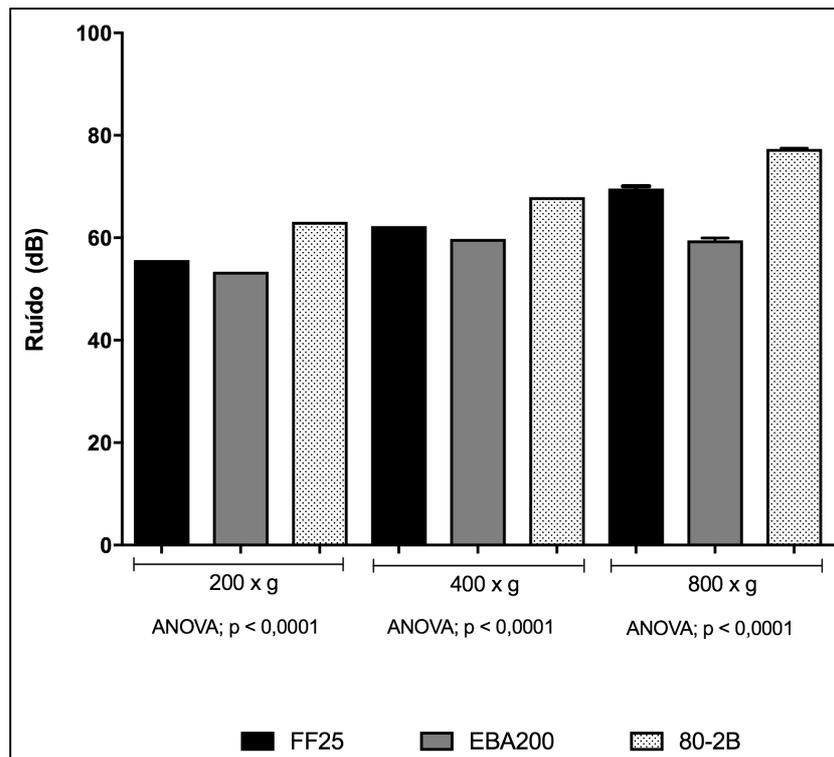


Figura 11. Níveis de ruído em dB nos ciclos de centrifugação (n=3) de 200, 400 e 800 xg durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífuga FibrinFuge25, EBA200 e 80-2B,. Os resultados analisados pelo teste de correlação ANOVA indicaram nível de significância ($p < 0,0001$) em todas configurações paramétricas. Estas representações gráficas demonstraram a correlação entre a FCR e o aumento no nível de ruído da experimentação. Nas três faixas de FCR as centrífuga FF25 e 80-2B exibiram elevação nível de ruído. A centrífuga EBA200 apresentou o menor nível de ruído neste experimento.

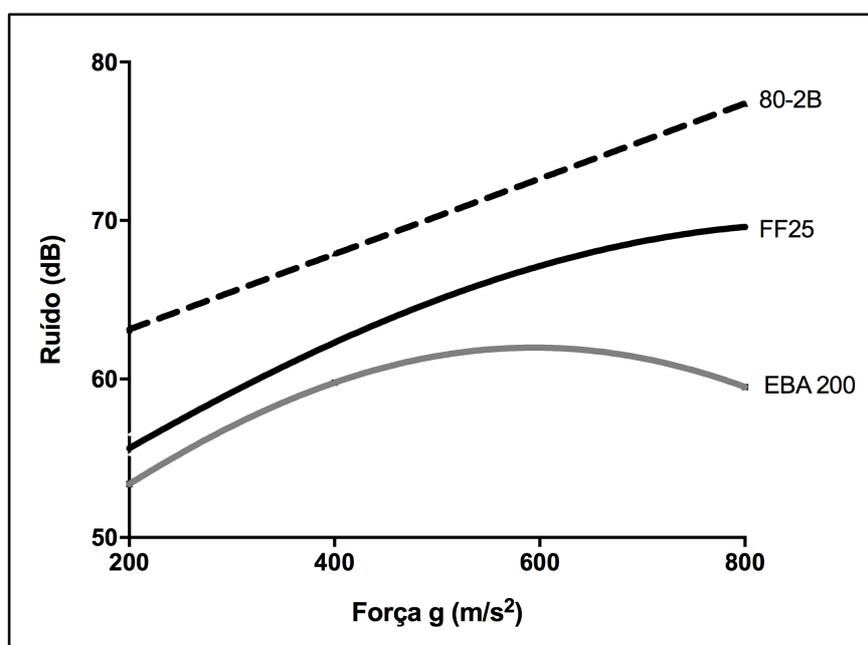


Figura 12. Níveis de ruído em dB nos ciclos de centrifugação (n=3) de 200 a 800 x g durante 5, 10 e 15 minutos nas três centrífuga FibrinFuge25, EBA200 e 80-2B,. Os resultados analisados pelo teste de correlação ANOVA indicaram nível de significância ($p < 0,0001$) em todas configurações paramétricas. Estas representações gráficas demonstraram a correlação entre a FCR e o aumento no nível de ruído na experimentação.

4. Discussão

Na escolha de uma centrífuga a ser utilizada para separação seletiva dos elementos sanguíneos na obtenção das matrizes de LPRF devem ser observadas características relacionadas à funcionalidade, ergonomia e aspectos sanitários.

Ergonomicamente, deve apresentar dimensões diminutas para adequação ao ambiente clínico, uma vez que a técnica preconiza o preparo das matrizes de LPRF no próprio ambiente de seu emprego terapêutico à fresco; funcionalmente deverá apresentar mínima variação térmica e baixos níveis de vibração radial para não influenciar na integridade biológica do conteúdo celular e proteico desta matriz, além do baixo nível de ruído em funcionamento; os equipamentos de eleição devem ainda apresentar condições sanitárias para preparo de uma matriz biológica a ser reinsertada para efeito terapêutico. Miron *et al.* 2019 propuseram a utilização exclusiva de dispositivos sanitariamente classificados como *medical devices*¹⁶.

O primor destas características visa proteger o conteúdo sanguíneo contra os efeitos físicos da centrifugação, especialmente vibração e aquecimento.

Nos resultados da nossa investigação as três centrífugas analisadas apresentaram padrões funcionais pretendidos dentro dos parâmetros preconizados para o método. As centrífugas EBA200 e FF25 apresentaram características funcionais muito próximas. Foram observados baixo nível de vibração e estabilidade térmica em ambas. A FF25, por tratar-se de uma centrífuga projetada exclusivamente para a obtenção da LPRF, apresentou maior facilidade operacional pela disponibilidade de reprodução de

programações protocolares em função da FCR e criação de rampas de aceleração e desaceleração para redução de impactos sobre o conteúdo centrifugado. A centrífuga 80-2B é uma centrífuga de laboratório de baixa sofisticação tecnológica e apresentou o maior nível de vibração, dentre as três comparadas, bem como a maior variação térmica observada. Entretanto, o nível de aquecimento sofrido na sua câmara de centrifugação não influenciou o comportamento natural de resfriamento do sangue durante os diferentes ciclos observados em todas as análises. Nesta centrífuga o sangue resfriou em média $3,7 \pm 2,6$ °C enquanto a câmara interna aqueceu $1,1 \pm 1,2$ °C. Isto demonstrou que apesar de tratar-se de um equipamento destinado ao uso laboratorial, o mesmo não implicou em alterações térmicas significativas, atingindo temperaturas acima de 40 °C, a ponto de promover desnaturação proteica ou ativação de proteínas de choque térmico (PCTs)³¹.

Deste modo todas as centrífugas analisadas apresentaram-se adequadas para a obtenção da matriz de LPRF com preservação de suas características biológicas de acordo com os métodos eleitos.

Quanto ao aspecto sanitário, na obtenção das matrizes de LPRF o sangue é extraído, manipulado e terapêuticamente reinserido no organismo, e mesmo sendo a centrifugação classificada como manipulação mínima, este processamento pode implicar em riscos sanitários^{18,32}. Deste modo, há uma tendência sanitária internacional, já manifesta em decretos e resoluções internacionais^{33,34}, para a indicação do uso de dispositivos classificados como *medical device*. Miron *et al.* 2019¹⁶ propõem tal classificação como padronização de controle de qualidade.

O método intitulado Intraspin *L-PRF*TM, que utiliza com exclusividade a centrífuga EBA200, é descrito na literatura como o único método de processamento da LPRF com registro sanitário no *Food and Drug Administration (FDA)* por possuir o registro 510K desta agência¹⁵. Entretanto, outros dispositivos de separação seletiva do sangue já se apresentam elegíveis para o método, como por exemplo as centrífugas Medifuge200 (Silfradent, Italy) e a Fibrin System (Ortoalresa, Spain) que possuem a certificação da Comunidade Européia (CE) como MD de acordo com a Diretiva 2001/83/CE, o Regulamento (CE) nº 178/2002 e o Regulamento (CE) nº 1223/2009 que revoga as Diretivas 90/385/CEE e 93/42/CEE³³. A centrífuga FibrinFuge25 (Zenith Lab Co, China) possui registro sanitária nacional na ANVISA e internacionais CE e FDA como dispositivo clínico para obtenção da matriz de LPRF. A centrífuga 80-2B é classificada apenas como *IVD*.

Na ciência dos concentrados sanguíneos autólogos existe um binômio que pode gerar conflitos conceituais. De um lado o registro sanitário do processo ou método e de outro o registro sanitário do equipamento. A literatura atual sobre o tema ainda não trouxe nenhum esclarecimento acerca disso criando uma lacuna nesta interpretação. O processo descreve as etapas metodológicas e os materiais empregados, sendo a centrífuga apenas um item enumerado para a sua execução. Certamente, este trabalho contribuirá sobre o tema por demonstrar que alguns dispositivos com classificação *IVD* apresentam condições básicas para atender às demandas funcionais na obtenção da matriz de LPRF, merecendo a devida adequação sanitária. Isto pode tornar o método ainda mais acessível, não-exclusivista, de custo econômico reduzido, bem como provocar na indústria a devida adequação de classificação ou reclassificação sanitária.

O conhecimento sobre os limites funcionais das centrífugas e suas influências sobre os aspectos biológicos da matriz de LPRF tende a expandir o emprego terapêutico para outras áreas da saúde como a estomaterapia e a ortopedia.

O desenho experimental deste estudo visou interpretar as condições básicas de funcionamento das centrífugas eleitas. A escolha das centrífugas foi direcionada de acordo com o *status* funcional obtido e devidamente referenciado na literatura internacional sobre as características da EBA200. Especialmente os parâmetros de vibração e variação térmica desta centrífuga foram utilizados como padrão na condução do nosso estudo. O trabalho de Dohan *et al*, 2017¹⁵ referenciou o seu modelo antecessor, a EBA20, como sendo o padrão funcional na obtenção das matrizes de LPRF. O modelo atual, EBA200, foi desenvolvido e lançado comercialmente como adequação às normativas sanitárias europeias para fabricação de dispositivos *IVD* e *MD* a partir de 2015.

Dentre os parâmetros observados comparativamente no presente estudo, o nível de vibração serviu para demonstrar que a opção metodológica de emprego de baixa rotação, <4000 RPM com FCR equivalente <1000 x g, gerou níveis de vibração muito baixos na FF25 e valores baixos na 80-2B. Os dados deste trabalho ratificaram que os níveis de vibração observados foram suficientes para indicar o emprego de qualquer uma das três centrífugas para a obtenção das matrizes de LPRF. O trabalho de Dohan *et al*. 2017 demonstrou que a vibração das centrífugas EBA-20 e A-PRF12 exibiram comportamento muito distintos quando aceleradas acima de 2000 rpm.

A partir do comportamento padrão da EBA200 a FF25 apresentou característica semelhante ao gerar a menor vibração radial total nas zonas de menor FCR. A Centrífuga 80-2B foi a que exibiu os maiores valores de vibração total nas duas configurações. Entretanto, exibiu valores menores com rotor vazio acima de 400 x g, isto pode ser entendido pelo efeito de carregamento de massa na estabilização vibracional.

Se potencialmente a vibração radial total poderia exercer algum efeito danoso sobre a integridade morfológica das plaquetas e leucócitos da LPRF, possíveis variações térmicas deveriam ser mais significativas ainda. Entretanto, neste experimento constatou-se que o nível de aquecimento sofrido na câmara de centrifugação de todas as centrífugas não exerceu nenhuma influência sobre o resfriamento natural das amostras, onde todas apresentaram significativa redução em sua temperatura ao final dos ciclos de centrifugação. As variações paramétricas propostas serviram para explorar os possíveis interferentes variando tempo e FCR. Estudos morfofuncionais de natureza ultraestrutural e biomolecular sobre as matrizes de fibrina obtidas nestes equipamentos servirão para avaliar suas influências sobre a viabilidade celular, bem como a síntese de citocinas e mediadores químicos.

A avaliação do nível de ruído teve como objetivo apenas a identificação deste parâmetro nos diferentes dispositivos, onde apenas a centrífuga 80-2B apresentou níveis acima de 65 dB nas configurações de 400 e 800 x g, a FF25 apenas em 800 x g e a EBA200 exibiu níveis abaixo de 65 dB em todas as configurações propostas, demonstrando que trata-se, de fato, de um equipamento de qualidade técnica superior e por esta razão foi utilizado no presente estudo como o padrão para as demais interpretações funcionais. Deste

modo, a FF25 demonstrou funcionamento semelhante, e às vezes superior, nas faixas de FCR e tempo eleitos para as metodologias clássicas, 200 e 400 x g e 5 e 10 minutos.

O presente estudo traz contribuições para que futuros usuários destas metodologias possam observar este quesito com criticidade e isenção, pois foram avaliadas três máquinas com distintos níveis de qualidade técnica e precificação de mercado e todas apresentaram características funcionais adequadas à obtenção das matrizes de LPRF. É fato que bons produtos são indispensáveis para assegurar a qualidade na produção de insumos e prestação de serviços de saúde. Entretanto, o devido esclarecimento sobre as propriedades funcionais de tipos distintos de equipamentos, suas limitações e indicações são requisitos para o desenvolvimento ético e responsável dessa ciência, uma vez que os aspectos científicos não estão completamente isentos aos aspectos mercadológicos.

Conclusão

Os resultados da avaliação de vibração, variação térmica e nível de ruído com variações de FCR e tempo nas três centrífugas permitiram as seguintes conclusões:

1. O nível de vibração nos eixos X, Y e Z foi menor na centrífuga FibrinFuge25 e maior na 80-2B;
2. A variação térmica sobre a amostra sanguínea apresentou resfriamento em todas as centrífugas;
3. O nível de ruído foi baixo em todas as centrífugas apresentando variações apenas na maior faixa de FCR, onde foi menor na centrífuga EBA200 e maior da 80-2B.

A padronização paramétrica pode ser uma tendência na evolução dos concentrados sanguíneos, porém, é preciso compreender que tais parâmetros podem ser adequadamente reproduzidos em diferentes tipos de centrífugas.

No conjunto, os resultados mostraram que os parâmetros utilizados são eficazes na produção da matriz de fibrina independentemente das variações de vibração, temperatura ou ruído.

Considerando que a padronização dos parâmetros de obtenção da matriz de fibrina pode ser uma tendência na evolução dos concentrados sanguíneos, esse estudo aponta para novas investigações para avaliar a viabilidade celular por métodos ultra estruturais e funcionais, assim como é preciso compreender como os diferentes parâmetros metodológicos podem ser adequadamente reproduzidos em diferentes tipos de centrífugas.

Referências

1. Sánchez M. Préparation riche en facteurs de croissance (PRGF) dans les pathologies de l'appareil locomoteur. *J Traumatol du Sport*. 2009;26(2):73-75. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jts.2009.03.001
2. Arabaci T, Albayrak M. Titanium-Prepared platelet rich fibrin provides advantages on periodontal healing: A randomized split mouth clinical study. *J Periodontol*. 2018. doi:10.1002/JPER.17-0294
3. Chokroun J, Adda F, Schoeffloer C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie, le PRF. *Implantodontie* 2001 ; 42 - 55-62. *Implantodontie*. 2001.
4. Oliveira, LA; Buzzi, M; Leão, MP; Andrade, PCAR; Kuckelhaus S. Ultrastructural morphological characterization of the autologous leukocyte-platelet fibrin matrix in association with xenogenic and alloplastic biomaterials for bone grafting. Fibrin® Protocol. *Rev Catarinense Implantodont*. 2018;18:24-33.
5. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest*. 2016. doi:10.1007/s00784-016-1719-1
6. Miron R, Choukroun J GS. Controversies Related to Scientific Report Describing G-Forces from Studies on Platelet-Rich Fibrin: Necessity for Standardization of Relative Centrifugal Force Values. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent* . 2018;0(0):0. doi:10.4103/GFSC.GFSC_23_18
7. Mourão CF de AB, Valiense H, Melo ER, Mourão NBMF, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*. 2015. doi:10.1590/0100-69912015006013
8. Lourenço ES, Mourão CF de AB, Leite PEC, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD, Alves GG. The *in vitro* release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res Part A*. January 2018. doi:10.1002/jbm.a.36346
9. Li Q, Reed DA, Min L, et al. Lyophilized Platelet-Rich Fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. *Int J Mol Sci*. 2014. doi:10.3390/ijms15058509
10. Yavaş S, Ayaz S, Köse SK, Ulus F, Ulus AT. Influence of Blood Collection Systems on Coagulation Tests. 2012:367-375. doi:10.5505/tjh.2012.59254
11. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51(5):438-443. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.08.003
12. Borsani E, Bonazza V, Buffoli B, et al. Biological Characterization and In Vitro Effects of Human Concentrated Growth Factor Preparation : An Innovative Approach to Tissue Regeneration. 2015;7(5). doi:10.4172/0974-8369.1000256
13. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet Rich Fibrin With the Low Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility and Cellular Response. *J Periodontol*. 2016. doi:10.1902/jop.2016.160443
14. Nelson R, Pinto, Andrea Pereda, Paula Jiménez, Marco Del Corso, Byung-Soo Kang, Hom-Lay Wang, Marc Quirynen and DMDE. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and

- Scanning Electr. *Poseido*. 2014;2(2):141-154.
15. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2017;00(00):1-14. doi:10.1080/09537104.2017.1293812
 16. Miron RJ, Pinto NR, Quirynen M GS. Standardization of Relative Centrifugal Forces (RCF) in studies related to platelet rich fibrin. *J Periodontol*. 2019. doi:10.1002/JPER.18-0553
 17. Lansing WD, Kraemer EO. Molecular weight analysis of mixtures by sedimentation equilibrium in the Svedberg ultracentrifuge. *J Am Chem Soc*. 1935;57(7):1369-1377. doi:10.1021/ja01310a058
 18. Uldall A, Trier Damgaard P, Drachmann O, Jorgensen F, Kennedy D, Lauritzen M, Magnussen E RJC and VP. Centrifuge Guidelines IFCC. *J Automat Chem*. 1991;13(5):221-229.
 19. CHOUKROUN J, ADDA F, SCHOEFFLER C VA. Une opportunité en parodontologie, le PRF. *Implantodontie* 2001; 42 - 55-62. *Implanto*. 2001;42:55-62.
 20. RE M. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-228.
 21. Ehrenfest DMD. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010;110(3):275-278. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.048
 22. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.010
 23. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-167. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009
 24. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Trombos Hemost*. 2005;3:1894-1904.
 25. Anitua E, Zalduendo MM, Prado R, Alkhraisat MH, Orive G. Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: Evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2015. doi:10.1002/jbm.a.35244
 26. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C DE, Zrnc TA, Parvini P, Schwarz F, Sader R, Choukroun J GS. Homogeneous Pressure Influences the Growth Factor Release Profiles in Solid Platelet-rich Fibrin Matrices and Enhances Vascular Endothelial Growth Factor Release In The Solid Platelet-rich Fibrin Plugs. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent*. 2018;1(1):8:16. doi:10.4103/GFSC.GFSC_9_18
 27. Eren G, Gürkan A, Atmaca H, Dönmez A, Atilla G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets*. 2016;27(5):427-432. doi:10.3109/09537104.2015.1131253
 28. Kim TH, Kim SH, S??dor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol*. 2014. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.02.004
 29. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, et al. Comparison between PRP, PRGF and PRF: Lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur*

- Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(6).
30. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets.* 2018;00(00):1-12. doi:10.1080/09537104.2018.1445835
 31. Castro SV, Lobo CH, De Figueiredo JR, Rodrigues APR. Proteínas de choque térmico hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Vet Bras.* 2013;7(4):261-271.
 32. Anderson NG. An Introduction to Particle Separations in Zonal Centrifuges 1.
 33. *REGULAMENTO (UE) 2017/ 745 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO - de 5 de Abril de 2017 - Relativo Aos Dispositivos Médicos, Que Altera a Diretiva 2001/ 83/ CE, o Regulamento (CE) n.o 178/ 2002 e o Regulamento (CE) n.o 1223/ 2009 e Que Revoga as Diretivas 90/ 385/ CEE e 93/ 42/ CEE Do Conselho.* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745&from=EN>. Accessed April 19, 2019.
 34. Cber C. *Deciding When to Submit a 510(k) for a Change to an Existing Device - Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff.* <http://www.regulations.gov>. Accessed April 19, 2019.

Capítulo 2

Contagem Celular x Força g

**CONTAGEM CELULAR EM MATRIZES SANGUÍNEAS
PLASMÁTICAS EM FUNÇÃO DA FORÇA CENTRÍFUGA
RELATIVA (FCR) E DO INTERVALO DE TEMPO.**

RESUMO

Os concentrados sanguíneos (CS), tanto a forma líquida anticoagulada de plasma rico em plaquetas (PRP) como a forma polimérica de fibrina rica em plaquetas (PRF) são preparações terapêuticas autólogas não-transfusionais com propriedades biológicas aplicáveis na regeneração tecidual. Esses CS diferem na forma de preparo, na arquitetura da rede de fibrina, na liberação dos fatores de crescimento e no conteúdo de plaquetas e células. Considerando que as alterações metodológicas podem resultar em matrizes distintas e possíveis comprometimentos de sua eficácia clínica, este trabalho avaliou a influência de variações na força g, tempo de rotação, sobre o conteúdo celular e plaquetário, em matrizes sanguíneas experimentais. Amostras de sangue humano foram utilizadas para obter matrizes de plasma sanguíneo utilizando a centrífuga FibrinFuge25 com três forças g distintas (200, 400 e 800 x g) durante 5, 10 e 15 minutos. A contagem de células e plaquetas no plasma apresentou maiores concentrações na fração sobrenadante com 200 x g, contudo registrou a maior perda de leucócitos mantidos no sedimento de eritrócitos devido à baixa ação da força de empuxo. As forças g de 400-800 x g apresentaram as maiores concentrações plaquetárias adstritas à zona de *buffy coat*. A aplicação de 800 x g aumentou a força de empuxo gerando menor concentração de leucócitos e plaquetas no PPP e no sedimento de eritrócitos apresentando-se como o parâmetro mais promissor para promover a recuperação de leucócitos totais, especialmente de neutrófilos. Esses dados experimentais contribuirão para o entendimento dos efeitos das variações paramétricas nos métodos de obtenção da matriz LPRF sobre a concentração celular e plaquetária promovendo o conceito de que diferentes métodos podem gerar matrizes de LPRF com configurações aplicáveis para fins terapêuticos específicos.

Palavras-Chave: Plasma, Centrifugação, Força g, Plaquetas, Leucócitos

ABSTRACT

Blood concentrates (BC), both the anticoagulated liquid form of platelet-rich plasma (PRP) and the polymeric structure of leukocyte platelet-rich fibrin (LPRF), are autologous non-transfusion therapeutic preparations with biological properties applicable to tissue regeneration. This BC can differ in the architecture of the fibrin network and growth factors release and platelets and cell content. Considering that the methodological changes may result in different matrices and possible compromises in their clinical efficacy, this work evaluated the influence of variations in g-force, rotation time, on the cellular and platelet content, in experimental blood matrices. Human blood samples were used to obtain blood plasma matrices using the FibrinFuge25 centrifuge with three distinct g forces (200, 400, and 800 x g) for 5, 10, and 15 minutes. The plasma cell and platelet count showed higher concentrations in the supernatant fraction with 200 x g; however, it registered the most significant loss of leukocytes maintained in the erythrocyte sediment due to the low action of the buoyant force. The 400-800 x g forces showed the highest platelet concentrations attached to the buffy coat zone. The application of 800 x g increased the buoyant force, generating a lower level of leukocytes and platelets in the PPP and the erythrocyte sediment, presenting itself as the most promising parameter to promote the recovery of total leukocytes, especially neutrophils. These experimental data will contribute to the understanding of the effects of parametric variations in the methods of obtaining the LPRF matrix on cell and platelet concentration, promoting the concept that different approaches can generate LPRF matrices with configurations applicable for specific therapeutic purposes.

Key-Words: *plasma, centrifugation, g-force, platelets, leukocytes*

1. Introdução

No coágulo sanguíneo, a rede de fibrina, as plaquetas e seus exossomos, as micropartículas circulantes, os leucócitos e glicoproteínas plasmáticas são os responsáveis diretos pelos estágios iniciais do reparo. Assim, nestes eventos a isenção das hemácias no coágulo pode prover uma rede de fibrina mais densa e com maior agregação leucoplaquetária¹.

No reparo tecidual os elementos sanguíneos que possuem atividades relacionadas à sinalização e adesão celular são especialmente derivados das plaquetas, dos leucócitos e do plasma sanguíneo. São glicoproteínas, imunoglobulinas, citocinas, fatores de crescimento e micropartículas circulantes que atuam na modulação da resposta angiogênica e reparadora em leitos lesados²⁻⁴.

As hemácias que, em circulação são funcionais no transporte de gases e na hemostasia auxiliam na compactação de um “tampão” hemostático para a cessação do sangramento, no reparo propriamente dito podem ser dispensadas gerando espaço físico para obtenção de uma rede de fibrina mais densa e com maior agregação leucoplaquetária⁵. Este é o princípio de obtenção de uma matriz rica em plaquetas e leucócitos, tecido este originário do fracionamento seletivo do sangue que possui maior concentração celular e de fatores de crescimento quando comparado a um coágulo de sangue total^{6,7}.

Por esta prerrogativa surgiram no contexto da medicina regenerativa, os agregados sanguíneos para terapêuticas não-transfusionais⁸, inicialmente o plasma rico em plaquetas (PRP) e como proposta de evolução metodológica a fibrina rica em plaquetas (LPRF).

O emprego terapêutico do PRP, feito para favorecer a hemostasia deficitária em pacientes com distúrbios de coagulação e riscos de eventos hemorrágicos, iniciou-se pelos estudos de Matras e colaboradores nos anos 50⁹.

O PRP que é um agregado sanguíneo para o uso não-transfusional e autólogo teve o ápice de sua evolução metodológica e terapêutica com os trabalhos de Robert Marx¹⁰ e Eduardo Anitua¹¹ e nos anos 1990 e 2000 tornou-se bastante popular¹². O princípio metodológico para sua obtenção é fundamentado na dupla centrifugação para assegurar a obtenção de uma diminuta fração de plasma isento de leucócitos e com plaquetas íntegras para posterior ativação química¹⁰.

Os processos de intervenção na cascata de coagulação não seguiram padronizações metodológicas e até mesmo agentes xenogênicos, como a trombina bovina, foram utilizados para o seu processamento¹³⁻¹⁷. Tais características foram associadas a resultados controversos e ineficazes como adjuvantes no reparo tecidual¹⁸⁻²¹. Tal condição acabou por gerar descrédito na eficácia desta terapêutica e muitos profissionais adeptos ao método passaram a não prescrever ou utilizar.

Diante das fracas evidências epidemiológicas apresentadas em revisões sistemáticas e meta-análises, o uso clínico do PRP foi associado com resultados clínicos contraditórios e sem consenso sobre seus efeitos²²⁻²⁴. No Brasil, no âmbito da medicina, o Conselho Federal de Medicina (CFM) já emitiu parecer desfavorável ao seu emprego clínico, caracterizando-o apenas como procedimento experimental em território nacional²⁵. Entretanto o conselho Federal de Odontologia (CFO) regulamentou seu uso clínico no âmbito da

odontologia conceituando-o em sistemas fechado e aberto e definindo especificidades sanitárias quanto à forma de obtenção²⁶.

Choukroun *et al.* 2001²⁷, como uma proposta evolutiva ao método de obtenção de PRP²⁸, idealizaram uma metodologia simplificada e sem intervenção química significativa na cascata de coagulação e denominou este produto como fibrina rica em plaquetas (FRP). Dohan *et al.* 2006²⁹ caracterizaram-na por sua composição leucoplaquetária, sua característica morfológica ultraestrutural, sua resistência mecânica e sua agregação de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e leucócitos presentes na malha³⁰. Dohan marcou a ciência dos agregados sanguíneos por uma intensa e esclarecedora produção científica tornando-se um dos principais autores internacionais sobre o tema^{6,31-35}. Como fruto do trabalho do seu grupo de pesquisa surgiu uma proposta nominativa deste agregado denominando-o como fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF)¹³.

A LPRF é um coágulo potencializado por ser isento de hemácias e possuir agregação de plaquetas e leucócitos mononucleares em concentrações sanguíneas suprafisiológicas por volume proporcional³⁶. Seu uso clínico é exclusivamente autólogo, obtido sem intervenção química anticoagulante em sistema estéril fechado por único processo de centrifugação de baixa rotação³⁷.

Estudos de caracterização bioquímica, pela concentração relativa de fatores de crescimento de origem plaquetária, de citometria para a quantificação celular e de morfologia, pela análise estrutural da malha de fibrina destes agregados sanguíneos tem demonstrado as características biológicas *in vitro* obtidas por distintos métodos de centrifugação, sem contudo, correlacioná-las às

respostas clínicas de modo discriminativo^{28,38-41}. Estudos clínicos tem evidenciado precocidade nas respostas cicatriciais mesmo diante de variações metodológicas, por vezes indiscriminadas, na obtenção da L-PRF^{7,42-46}.

Os métodos de obtenção da L-PRF disponíveis na literatura trazem diferenças conceituais e denominativas, por vezes confundem método com produto. Entretanto, trata-se da mesma matriz de fibrina contendo células mononucleares e plaquetas concentradas^{36,47,48}.

O método pioneiro, idealizado por Choukroun *et al.* 2001 na França, tornou-se uma marca registrada e recebeu a denominação de PRF Choukroun ProcessTM²⁷. Em 2010 surgiu nos Estados Unidos da América um método denominado Intraspin L-PRFTM caracterizando-se, até os dias atuais, como o único método com registro na *Food and Drug Administration (FDA)*⁴⁹. Entretanto, à exceção da nomenclatura, não descreve nenhuma distinção metodológica do conceito PRF original proposto por Choukroun e colaboradores. Estes dois descrevem seus parâmetros em função das rotações por minuto (RPM) e do tempo de 12 minutos de centrifugação de modo exclusivo na centrífuga de bancada EBA20 (Hettich, Germany). Estes métodos trataram como ponto fundamental a força centrífuga relativa eleita para preservar a integridade de leucócitos e plaquetas presentes na matriz de fibrina⁴⁰. Estes métodos são os mais frequentemente referenciados na literatura internacional, sendo comum a utilização do epônimo *Choukroun's PRF*³².

O método denominado Concentrated Growth Factors - CGFTM - foi idealizado na Itália por Sacco e colaboradores⁴¹ e também possui especificações em torno da centrifugação como o uso imperativo da centrífuga Medfuge200

(Silfradent, Italy) que conta com um processo alternado de rotações por minuto (rpm) durante o ciclo de centrifugação de 14 minutos^{41,45,46}.

Fujioka-Kobayashi *et al.* 2016 propuseram uma nova metodologia fundamentada no conceito da centrifugação de baixa velocidade⁵⁰. Neste método houve ainda a alteração do uso dos tubos de plástico contendo ativador de coágulo por tubos de vidro e a inclusão de uma centrífuga dedicada denominada A-PRF12 (Process, France). Este protocolo foi denominado de A-PRF™, do inglês, *Advanced Platelet Rich Fibrin*^{51,52}.

Apesar destas indicações metodológicas a literatura científica tem demonstrado que variações metodológicas, mesmo em diferentes faixas de força centrífuga relativa (FCR) aplicadas, tem proporcionado a obtenção de matrizes de LPRF com efetiva propriedade biológica e resposta clínica favorável^{7,42,53}.

Devido às potencialidades desta matriz de fibrina leucoplaquetária na prática clínica e a necessidade de determinar a influência dos parâmetros de obtenção na sua morfologia e na concentração celular, este estudo propõe-se à caracterização morfológica como foco na identificação da influência de variação de parâmetros de FCR e tempo visando elucidar suas influências na composição celular e plaquetária das matrizes de LPRF.

2. Materiais e Métodos

2.1. Aspectos éticos

Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com seres humanos foram rigorosamente obedecidas, em concordância com a lei 6.638/79 e conforme a declaração de Helsinque (*World Medical Association Recommendation 2011*). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob o número 055468/2015.

2.2. Participantes

Participaram voluntariamente deste estudo 5 indivíduos adultos jovens, 2 do gênero feminino e 3 do gênero masculino dos quais foram obtidos 40ml de sangue total de cada participante após leitura e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os mesmos declararam-se saudáveis, não tabagistas e não portadores de doenças infecto contagiosas.

Os mesmos foram submetidos à realização prévia de anamnese, exame físico e do hemograma completo que apresentaram índices hematimétricos dentro dos valores de referência e foram realizados no laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

2.3. Coleta Sanguínea

Todo material de coleta foi apresentado ao doador em embalagem estéril e inviolada. Foi realizada a abertura do catéter sobre agulha 21G do sistema de coleta à vácuo (Greiner Bio-One Vacuette, Brasil).

Previamente à coleta sanguínea foi feita a antissepsia das mãos do flebotomista com álcool 70% e calçamento de luvas de procedimento;

O doador de sangue foi acomodado com o repouso do seu membro superior sobre base de apoio para a coleção sanguínea com exposição anterior da fossa antecubital;

Foi realizada a aplicação de dispositivo para compressão venosa (garroteamento) com um massageamento ascendente compressivo na face anterior do antebraço;

Feita a seleção da veia na fossa antecubital (cefálica, intermédia antecubital ou basilíca) por inspeção e palpação digital com o dedo indicador do flebotomista procedeu-se a anti-sepsia cubital com swab álcool 70% (Benckton Dickson, USA) com dois movimentos ascendentes com inversão da face aplicada do swab;

A venopunção foi feita por inserção do dispositivo venopunctur (Greiner Bio-One Vacuette, Brasil) com a exposição da agulha e bisel voltado para cima com angulação entre 15 e 30° em único movimento. A introdução oblíqua da agulha permitiu a visualização da penetração vascular pelo retorno sanguíneo no interior da cânula plástica entre as extremidades proximal e distal do escalpe.

Cada coleção sanguínea foi realizada em tubo plástico de 4mL com anticoagulante (EDTA) (Greiner Bio-One, Brasil), onde previamente à inserção dos tubos, foi realizada a assepsia das suas tampas com álcool 70%.

Os tubos foram posicionados com a tampa para baixo afim de proporcionar o preenchimento ascendente. Isto além de facilitar a visualização reduziu o risco de hemólise por impacto excessivo do sangue contra a parede e fundo do tubo. De cada participante extraiu-se 10 tubos de sangue de 4mL. Ao todo cada participante cedeu 40 mL de sangue.

Na finalização da coleta o tubo foi removido, a agulha removida e aplicado um rolete de algodão estéril sobre o ponto de inserção da agulha com a manutenção da compressão por 3 minutos sem a dobra do cotovelo. Após este período foi feita a aplicação do curativo estéril (Labor Import, China).

2.4. Centrifugação

Após o término da venopunção, os tubos foram imediatamente levados para as centrífugas e posicionados em balanço diametral no rotor com um tubo idêntico preenchido com água pelo sistema a vácuo para proporcionar estabilidade vibracional.

Utilizou-se a centrífuga de rotor fixo Fibrinfuge25® (Zenith Lab Co, China) para a obtenção dos espécimes de plasma sanguíneo sobrenadante em duas frações e no sedimento nas FCRs de 200, 400 e 800 x g nos intervalos de 5, 10 e 15 minutos. A centrífuga eleita para o estudo apresenta rotor com raio médio de 65 mm e ângulo de 25°, tendo sido este eleito para o cálculo referencial da força centrífuga relativa.

2.5. Obtenção dos espécimes de plasma sanguíneo anticoagulados com EDTA

A coleção sanguínea foi realizada com tubos contendo anticoagulante para viabilizar a contagem celular por citometria de fluxo. Deste modo obteve-se o plasma sanguíneo caracterizado experimentalmente como plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP).

Imediatamente após o ciclo de centrifugação foram separadas de cada tubo as seguintes frações: a) Superior do sobrenadante, o PPP; b) Inferior do sobrenadante, o L-PRP; c) Sedimento de eritrócitos. Cada fração removida foi transferida para um criotubo plástico isento de aditivos (Eppendorf, EUA).

A Figura 1 ilustra as frações obtidas pela separação seletiva do sangue.

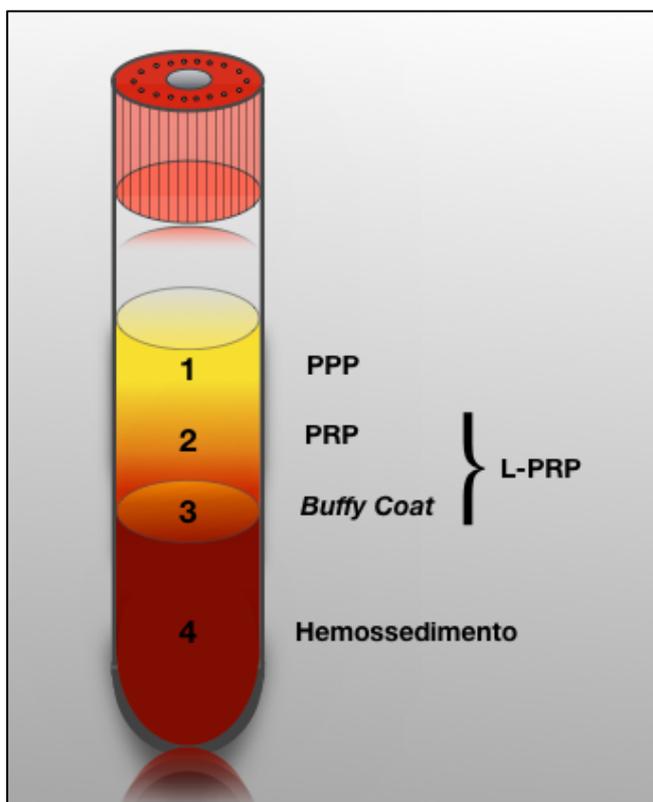


Figura 1. As amostras foram colhidas em tubos contendo EDTA para obtenção do plasma sanguíneo estratificado por diferencial de densidade. Deste, foram extraídas as frações do sangue após a sedimentação seletiva por centrifugação. 1. Plasma puro ou plasma pobre em plaquetas (PPP); 2. Plasma rico em plaquetas e leucócitos; 3. *buffy coat*; 4. Sedimento de eritrócitos. A fração L-PRP corresponde ao PRP adicionado do *buffy coat*.

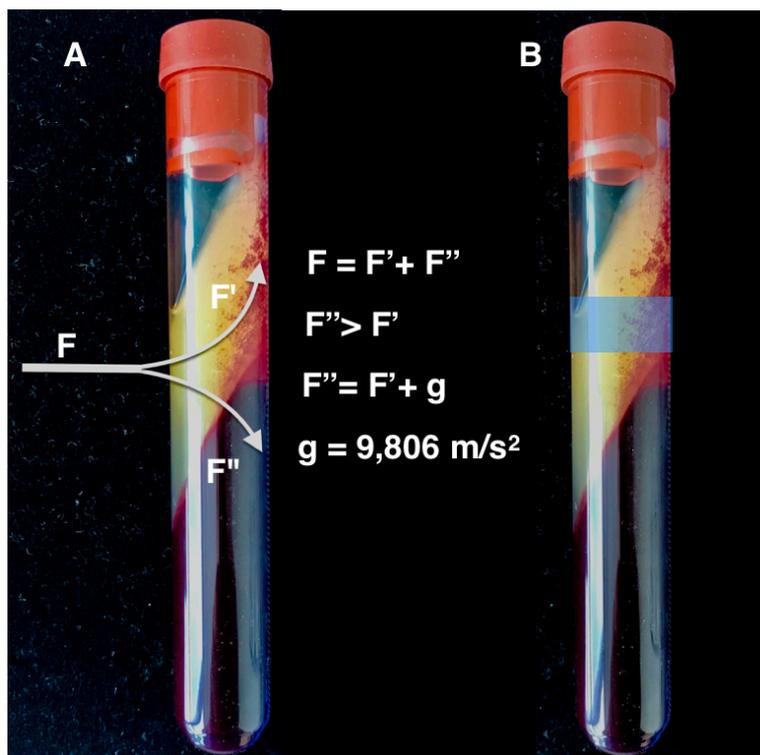


Figura 2. Decomposição do vetor força (F) gerando vetores divergentes F' e F'' em **A**. A força centrífuga relativa (FCR) é um múltiplo da aceleração gravitacional ($9,806 \text{ m/s}^2$) e sua decomposição pelo anteparo da parede do tubo provoca a sedimentação (F'') e o empuxo (F') a partir do *buffy coat*. F' é eficiente em “arrastar” o conteúdo celular de densidade intermediária entre o plasma e os eritrócitos para a porção superior da matriz, inclusive uma pequena porção das hemácias. Em **B**, tem-se a região central do corpo da matriz.

2.6. Contagem Celular

Para a hemocitometria as amostras de sangue periférico foram centrifugadas de acordo com a proposta experimental, fracionadas e processadas no contador hematológico automático *Hematology System* (Siemens AG, Alemanha). O equipamento foi calibrado de acordo com os padrões hematológicos preconizados pelo fabricante para contagem das séries eritrocitária, leucocitária com diferencial e plaquetária. Este citômetro de fluxo dedicado à contagem hematológica de alta eficiência é acoplado ao método de coloração por reações de peroxidase para a contagem diferencial de leucócitos. A figura 2 ilustra o experimento de contagem celular pela definição do sangue total utilizado como controle (ST), das frações sobrenadantes, PPP e L-PRP,

bem como o sedimento. A figura 3 ilustra o citograma obtido por este equipamento a partir de uma contagem de ST.

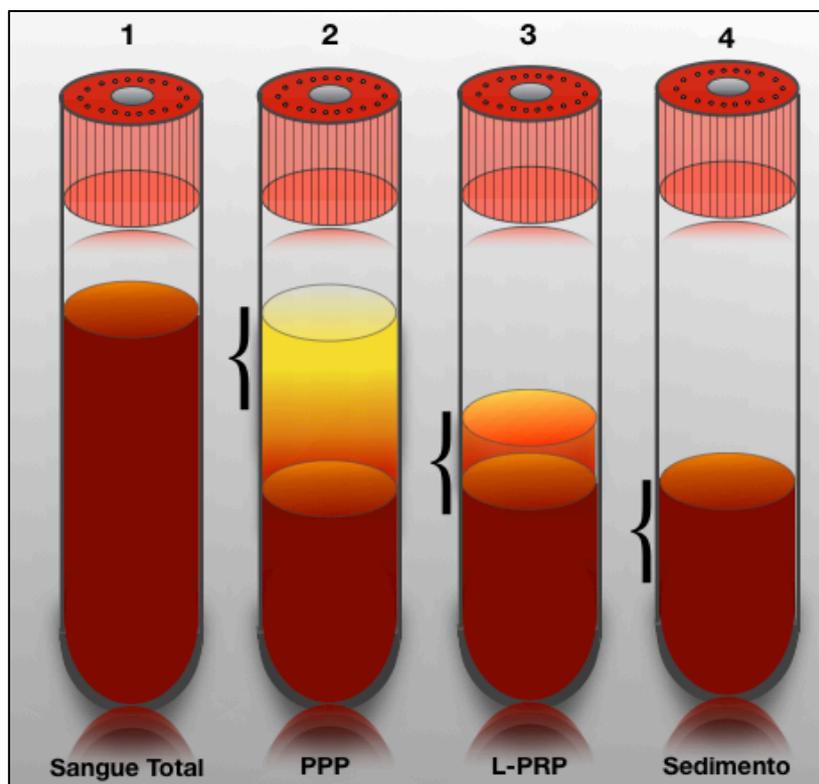


Figura 3. Frações plasmáticas experimentais para contagem por hemocimetria. 1) Sangue Total cuja contagem hemocitológica serviu de *baseline* para comparações citométricas obtidas pelas variações paramétricas de centrifugação; 2) O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) é a zona mais alta do sobrenadante obtido após a centrifugação; 3) A fração de Plasma rico em Plaquetas e Leucócitos (L-PRP) correspondente à faixa compreendida entre o limite inferior do PPP e o *buffy coat*, é a zona de maior concentração plaquetária; 4) O Sedimento de eritrócitos é a zona inferior onde ocorre deposição de eritrócitos em função da ação gravitacional sobre sua densidade corpuscular de 1,095 g/dL.

Previamente às centrifugações preconizadas para obtenção das amostras de plasma sanguíneo foi feita a contagem no ST, cuja média dos três participantes serviu para o estabelecimento da linha de base para as concentrações celulares e plaquetária em nível fisiológico, posteriormente feita no sedimento e nas frações sobrenadantes do PPP e do L-PRP, obtidas nas três faixas de FCR 200, 400 e 800 em nos três intervalos de tempo (Δt) 5, 10 e 15 minutos.

2.7. Análise Estatística

As contagens de eritrócitos, leucócitos e plaquetas representam o número total destes elementos nas frações sanguíneas obtidas pelas variações paramétricas de FCR e Δt . Os dados foram expressos como média \pm DP. Os testes de ANOVA e Newman-Keuls foram utilizados para as análises de variância em comparações múltiplas onde os níveis de significância estatística foram definidos com valores de $p < 0,05$. O programa GraphPad Prism 8® (GraphPad Software, USA) foi utilizado para as análises e a produção dos gráficos.

3. Resultados

A quantificação das células e plaquetas por citometria de fluxo foi feita no sangue total, no sedimento e nas duas frações sobrenadantes obtidas nas centrifugações eleitas para o experimento, PPP e L-PRP. A figura 4 ilustra a região de quantificação dos elementos figurados do sangue.

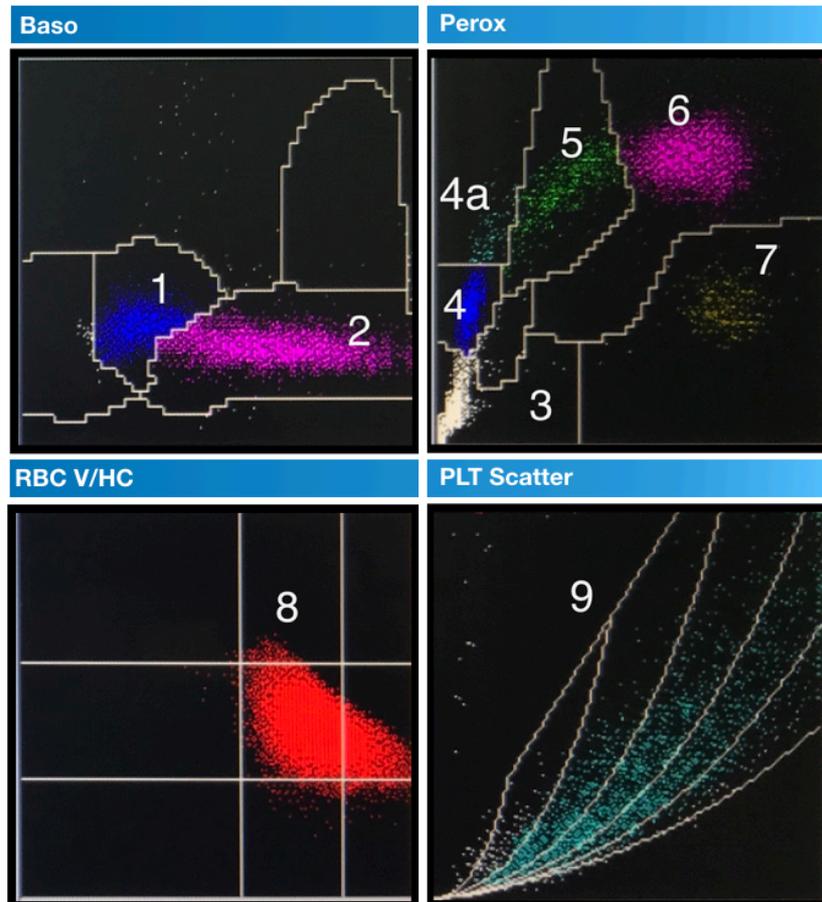


Figura 4. Citograma obtido pela contagem do sangue total por citometria de fluxo acoplada à citoquímica por peroxidase ilustrando a concentração celular e plaquetária do sangue com distribuição leucocitária por grupos e diferencial. 1. Mononucleares; 2. Polimorfonucleares; 3. Reticulócitos; 4. Linfócitos; 4a. Linfócitos Atípicos; 5. Monócitos; 6. Neutrófilos; 7. Eosinófilos; 8. Eritrócitos; 9. Plaquetas.

Os resultados quantitativos das análises por citometria estão apresentados para cada FCR (200, 400 ou 800 x g) nas tabelas de 1 a 9 e as comparações entre os grupos estão representadas nas figuras 1, 2 e 3.

Tabela 1. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 200 x g por 5 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/μL	Eritrócitos	5,1 ± 0,4	5,1 ± 0,5	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,4
x10 ³ cels/μL	Plaquetas	224,0 ± 7,9	122,7 ± 4,5	169,7 ± 50,4	328,7 ± 19,9
	Leucócitos totais	7,3 ± 1,8	5,1 ± 0,9	0,2 ± 0,2	9,1 ± 1,8
	Linfócitos	2,8 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,0 ± 0,0	4,6 ± 0,6
	Monócitos	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,4
	Granulócitos	5,0 ± 0,3	3,7 ± 0,5	0,0 ± 0,0	3,9 ± 2,8

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

A FCR de 200/5min gerou concentrações de eritrócitos com equivalência à do sangue total, bem como sua redução expressiva nas frações sobrenadantes. Deste modo apresenta-se como uma faixa de força suficiente para sedimentar as células vermelhas do sangue de modo eficiente. Na fração sobrenadante do L-PRP as concentrações de plaquetas apresentaram-se supra-fisiológicas correspondendo a um acréscimo de 46,5% em relação à concentração no sangue total. Na fração sobrenadante do PPP observou-se concentrações 24,5% abaixo nos níveis fisiológicos encontrados no ST. A contagem de leucócitos totais revelou que cerca de 67,7% dos leucócitos foram mantidos no sedimento, demonstrando que o intervalo de tempo de 5 minutos não se mostrou suficiente para favorecer a difusão – empuxo de partículas de menor densidade para a fração sobrenadante ou menisco limitante. A contagem diferencial mostrou que a maior concentração leucocitária nas frações sobrenadantes foi de linfócitos e que nestas a concentração de granulócitos apresentou-se proporcionalmente abaixo dos níveis fisiológicos (26,6%), sendo que 73,4% deste conteúdo foi encontrado no sedimento. Isso demonstra a que proximidade de densidade corpuscular entre eritrócitos e granulócitos, 1,095g/dL e 1,085g/dL respectivamente, favoreceu a sedimentação dos granulócitos nesta configuração paramétrica experimental de FRC 200/5min.

Tabela 2. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 200 x g por 10 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/μL	Eritrócitos	5,1 ± 0,4	5,3 ± 0,5	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,2
x10 ³ cels/μL	Plaquetas	224,0 ± 7,9	136,7 ± 15,0	40,7 ± 50,4	341,0 ± 153,6
	Leucócitos totais	7,3 ± 1,8	4,1 ± 2,3	0,0 ± 0,0	6,6 ± 4,3
	Linfócitos	2,8 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	3,2 ± 0,4
	Monócitos	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,2
	Granulócitos	5,0 ± 0,3	3,1 ± 0,6	0,0 ± 0,0	1,8 ± 2,6

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

Os dados da tabela 4 revelaram algumas semelhanças em relação aos achados da tabela 3, exceto a redução de 81,84% nas concentrações plaquetárias no PPP e elevação na concentração de linfócitos em L-PRP com 15,9% acima da observada no ST. Os monócitos apresentaram concentrações discretamente maiores que no ST e a presença de granulócitos no L-PRP apresentou-se com a perceptível redução de 64,93%, quando comparada à centrifugação de FCR 200/5min (26,6%).

Tabela 3. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 200 x g por 15 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/μL	Eritrócitos	5,1 ± 0,4	5,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,9
x10 ³ cels/μL	Plaquetas	224,0 ± 7,9	48,7 ± 17,1	15,3 ± 8,6	304,0 ± 76,6
	Leucócitos totais	7,3 ± 1,8	1,8 ± 0,6	0,0 ± 0,0	7,7 ± 7,6
	Linfócitos	2,8 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	2,1 ± 2,0
	Monócitos	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5
	Granulócitos	5,0 ± 0,3	1,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	4,6 ± 4,7

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

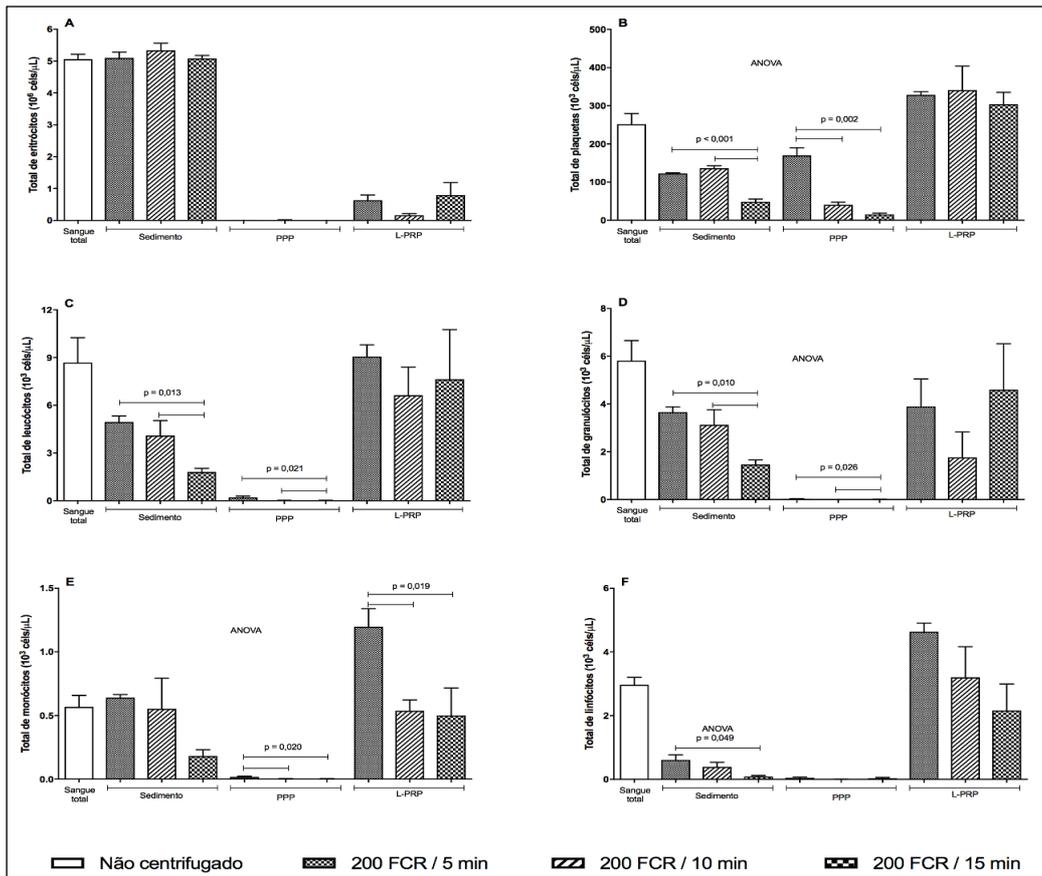


Figura 5. Concentração avaliada por citometria de fluxo dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, plaquetas, leucócitos totais, granulócitos, monócitos e linfócitos) no sangue total (branco), no sedimento e nas frações sobrenadantes de PPP e L-PRP (n=5). A força relativa de centrifugação foi de 200 x g por 5, 10 ou 15 minutos. As análises foram feitas pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para as múltiplas comparações e as barras indicam os grupos que apresentam diferenças entre si ($p < 0,05$)

A figura 4 apresentou a concentração dos índices hematológicos sob efeito da FCR de 200 nos Δ ts de 5, 10 e 15 min. A contagem no sangue total (ST) não centrifugado serviu como linha de base para as comparar as concentrações hematológicas nas frações após as centrifugações eleitas para o estudo. A contagem dos eritrócitos em A demonstrou que independente do Δ t experimental empregado nesta faixa de FCR os eritrócitos foram eficientemente sedimentados demonstrando concentrações similares às encontradas em ST, mantendo apenas pequena porção em L-PRP. Ou seja, as frações sobrenadantes tornaram-se praticamente isentas da presença de eritrócitos. Em B, a contagem plaquetária evidenciou que a FCR de 200 é suficiente para gerar concentrações suprafisiológicas nas frações sobrenadantes. Entretanto, a avaliação do sedimento demonstrou que uma parte significativa das plaquetas ficaram sedimentadas junto aos eritrócitos, e isto representa perda funcional. As concentrações em PPP apresentaram-se abaixo dos níveis fisiológicos observados em ST. Porém, demonstraram proporcionalidade inversa entre tempo e concentração plaquetária, ou seja, 5, 10 e 15 min apresentaram concentrações decrescentes significativas, $p=0,002$, ANOVA. Em L-PRP todas as concentrações foram elevadas com níveis acima de ST em todos os Δ ts. Em C, a contagem total de leucócitos revelou a manutenção no sedimento, demonstrando que quanto menor o Δ t, maior a concentração, $p=0,013$ ANOVA. Níveis muito baixos foram encontrados no PPP em todos os Δ ts. Em L-PRP foram encontrados níveis médios próximos aos valores fisiológicos de ST. Em D a contagem de granulócitos revelou concentrações equivalentes entre o sedimento e a fração de L-PRP, ou seja, apesar da densidade dos granulócitos serem próximas à dos eritrócitos, boa parte deles permaneceram na fração sobrenadante, especialmente no L-PRP. Em E a contagem de monócitos revelou concentrações em nível fisiológico no sedimento e em níveis suprafisiológicos

acima de 100% no L-PRP. Em PPP e L-PRP as maiores concentrações ocorreram em Δt de 5 min $p = 0,02$ ANOVA. Em E a contagem de linfócitos revelou que no sedimento e no PPP as concentrações foram drasticamente reduzidas, evidenciando níveis suprafisiológicos em Δt de 5 e 10 min exclusivamente na fração de L-PRP.

Tabela 4. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 400 x g por 5 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/ μ L	Eritrócitos	5,1 \pm 0,4	5,6 \pm 0,2	11,0 \pm 1,9	68,4 \pm 11,5
	Plaquetas	224,0 \pm 7,9	67,2 \pm 15,9	27,0 \pm 17,1	330,7 \pm 35,8
x10 ³ cels/ μ L	Leucócitos totais	7,3 \pm 1,8	4,9 \pm 2,7	0,2 \pm 0,3	2,9 \pm 1,2
	Linfócitos	2,8 \pm 0,3	1,0 \pm 0,9	0,1 \pm 0,1	2,0 \pm 1,9
	Monócitos	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	1,5 \pm 1,6
	Granulócitos	5,0 \pm 0,3	3,3 \pm 1,4	0,1 \pm 0,1	1,7 \pm 1,6

Os dados representam a média \pm desvio padrão (n=5).

Na centrifugação a FCR de 400 por 5 minutos a concentração leucocitária no sedimento apresenta-se elevada e corresponde a 67,75% do total de leucócitos da amostra, ou seja, este percentual não estará impregnado na matriz de LPRF, uma vez que este experimento o plasma foi obtido apenas para viabilizar a contagem celular automatizada por citometria de fluxo. A concentração plaquetária apresentou níveis comparados aos obtidos nas centrifugações por FCR de 200. A concentração de monócitos apresentou aumento de 186,53% quando comparada ao ST.

Tabela 5. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 400 x g por 10 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/μL	Eritrócitos	5,1 ± 0,4	5,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,7
	Plaquetas	224,0 ± 7,9	94,3 ± 58,5	8,0 ± 3,6	309,7 ± 78,5
	Leucócitos totais	7,3 ± 1,8	4,5 ± 2,7	0,0 ± 0,0	7,7 ± 6,0
x10 ³ cels/μL	Linfócitos	2,8 ± 0,3	0,6 ± 0,5	0,0 ± 0,1	3,2 ± 2,5
	Monócitos	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,6
	Granulócitos	5,0 ± 0,3	3,0 ± 1,6	0,0 ± 0,1	3,6 ± 3,1

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

Na centrifugação a FCR de 400 por 10 minutos houve recuperação do conteúdo leucocitário total com níveis acima da concentração fisiológica de ST. Os neutrófilos e linfócitos apresentaram-se com as maiores concentrações nesta configuração paramétrica correspondendo a 78,27% e 114,51% respectivamente. A concentração plaquetária no sedimento representou 42% do total. Isto demonstrou que este parâmetro provoca uma redução da concentração plaquetária final na porção sobrenadante, onde seu ganho foi de apenas 38,24%.

Tabela 6. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 400 x g por 15 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/μL	Eritrócitos	5,1 ± 0,4	5,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,9 ± 1,1
	Plaquetas	224,0 ± 7,9	49,0 ± 23,5	1,7 ± 1,5	277,0 ± 69,5
	Leucócitos totais	7,3 ± 1,8	1,8 ± 1,0	0,0 ± 0,0	2,3 ± 0,9
x10 ³ cels/μL	Linfócitos	2,8 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,3 ± 1,1
	Monócitos	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2
	Granulócitos	5,0 ± 0,3	1,5 ± 1,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 2,0

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

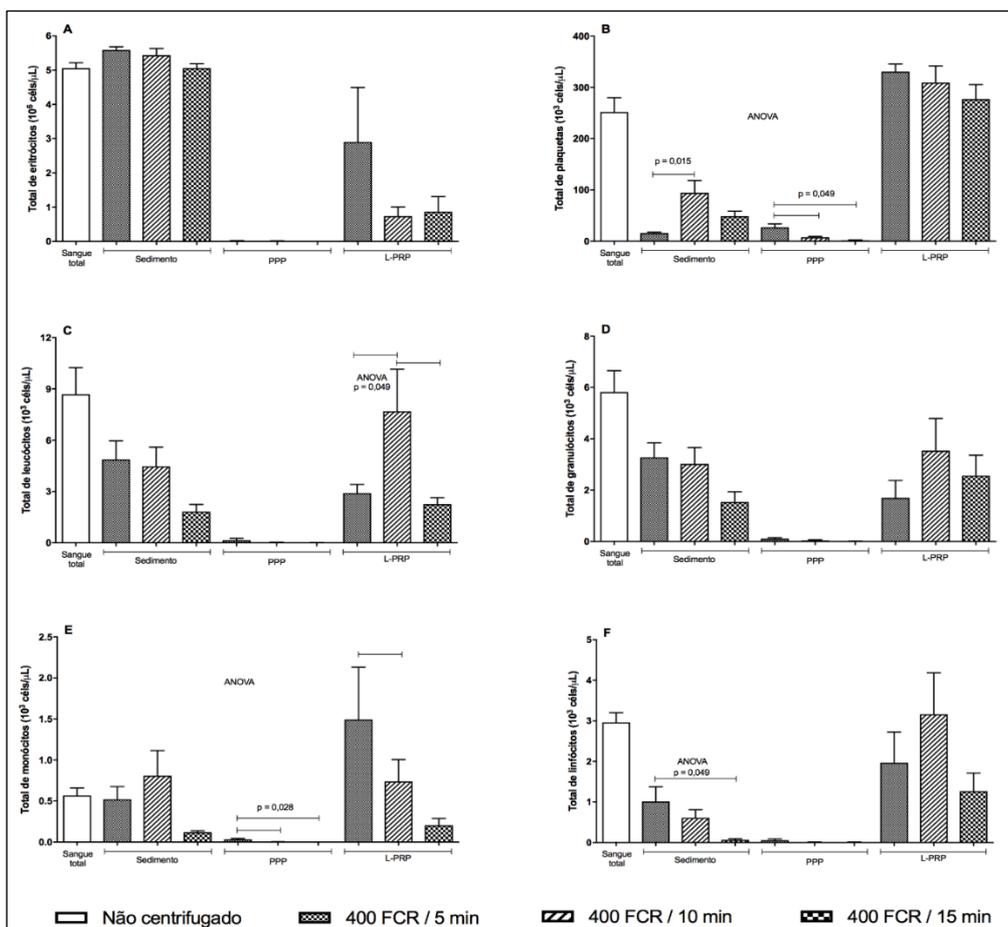


Figura 6. Concentração avaliada por citometria de fluxo dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, plaquetas, leucócitos totais, granulócitos, monócitos e linfócitos) no sangue total (branco), no sedimento e nas frações sobrenadantes de PPP e L-PRP (n=5). A força relativa de centrifugação foi de 400 x g por 5, 10 ou 15 minutos. As análises foram feitas pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para as múltiplas comparações e as barras indicam os grupos que apresentam diferenças entre si ($p < 0,05$)

A figura 5 apresentou a concentração dos índices hematológicos sob efeito da FCR de 400 nos Δt s de 5, 10 e 15 min. Em A a concentração de eritrócitos no sedimento apresentou níveis maiores que os encontrados em ST configurando maior poder de sedimentação quando comparado à FCR de 200. Na fração sobrenadante do PPP os níveis foram muito baixos, o que também evidencia a eficácia de sedimentação nesta faixa de FCR. No L-PRP o Δt de 5 min evidenciou a maior concentração de eritrócitos dentre os 3 Δt comparados com FCR de 400. Em B foi verificada a presença de plaquetas no sedimento, com maior concentração em Δt 5 min representado pouco mais de 1/3 da concentração de ST. À medida em que o Δt aumentou a concentração plaquetária diminuiu. Este comportamento reproduziu-se também nas frações sobrenadantes. Entretanto, em PPP as concentrações foram muito reduziram-se quando comparadas com FCR de 200, sendo significativa a diferença em função do tempo $p=0,049$ ANOVA. Em L-PRP as concentrações plaquetárias reproduziram padrão semelhante ao observado em FCR de 200 com discreto aumento. A contagem de leucócitos totais em C exibiu maiores concentrações no sedimento que em Δt de 5 e 10 min. Em PPP a presença de leucócitos reduziu-se sobremaneira, e em L-PRP apesar da concentração significativa em Δt de 10 min $p = 0,49$ ANOVA os níveis ainda ficaram abaixo da concentração fisiológica de ST. Em D a contagem de granulócitos demonstrou que cerca de 50% ficou no sedimento. A fração de PPP apresentou baixa concentração sendo maior no L-PRP. Em E a contagem de monócitos demonstrou maior concentração menores concentrações relativas no sedimento comparadas aos leucócitos totais e granulócitos. No L-PRP a concentração observada em Δt 5 min foi acima de 100% dos valores fisiológicos de ST. Em E a contagem dos linfócitos apresentou menores concentrações no sedimento e níveis elevados

em L-PRP, sendo que a subgrupo de destaque foi em Δt 10 min com concentração equivalente a ST.

Tabela 7. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 800 x g por 5 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/ μ L	Eritrócitos	5,1 \pm 0,4	5,2 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	1,4 \pm 1,0
x10 ³ cels/ μ L	Plaquetas	224,0 \pm 7,9	84,7 \pm 66,1	5,7 \pm 2,1	480,7 \pm 158,0
	Leucócitos totais	7,3 \pm 1,8	1,7 \pm 1,2	0,0 \pm 0,0	17,3 \pm 5,5
	Linfócitos	2,8 \pm 0,3	0,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	5,6 \pm 1,7
	Monócitos	0,5 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3	0,0 \pm 0,0	1,2 \pm 0,5
	Granulócitos	5,0 \pm 0,3	1,6 \pm 1,1	0,0 \pm 0,0	10,0 \pm 3,1

Os dados representam a média \pm desvio padrão (n=5).

Na centrifugação a FCR de 800 por 5 min os índices leucoplaquetários apresentaram elevações em suas concentrações onde todos os parâmetros exibiram aumentos acima de 100%. Plaquetas 114%; Leucócitos totais 136,66%; Neutrófilos 119,62%; Linfócitos 103,62%, Monócitos 127%. Este parâmetro exibiu eficiência na separação seletiva dos elementos sanguíneos e maior recuperação celular e plaquetária quando comparado aos demais parâmetros com FCR de 200 e 400.

Tabela 8. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 800 x g por 10 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/ μ L	Eritrócitos	5,1 \pm 0,4	5,2 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	1,9 \pm 1,2
x10 ³ cels/ μ L	Plaquetas	224,0 \pm 7,9	33,3 \pm 35,0	1,3 \pm 0,6	607,3 \pm 217,7
	Leucócitos totais	7,3 \pm 1,8	0,4 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	26,6 \pm 12,4
	Linfócitos	2,8 \pm 0,3	0,1 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	8,4 \pm 3,0
	Monócitos	0,5 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	2,3 \pm 1,6
	Granulócitos	5,0 \pm 0,3	1,2 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0	15,7 \pm 8,3

Os dados representam a média \pm desvio padrão (n=5).

Na centrifugação a FCR de 800 por 10 min os índices leucoplaquetários reproduziram o ocorrido em 800 por 5 min em que apresentaram as seguintes concentrações na fração sobrenadante do L-PRP: Plaquetas 171,12%; Leucócitos totais 264,43%; Neutrófilos 233,17%; Linfócitos 205,43%, Monócitos 346,15%. A fração sobrenadante do PPP apresentou-se muito empobrecida onde apenas a concentração plaquetária 0,5% destacou-se. Nesta configuração o conteúdo leucoplaquetário apresentou-se mais compactado na zona do *buffy coat*.

Tabela 9. Índices hematológicos à centrifugação por FCR 800 x g por 15 minutos.

FibrinFuge 25		ST	Sedimento	PPP	L-PRP
x10 ⁶ cels/μL	Eritrócitos	5,1 ± 0,4	4,9 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,9
	Plaquetas	224,0 ± 7,9	46,7 ± 11,5	0,7 ± 0,6	231,0 ± 356,4
	Leucócitos totais	7,3 ± 1,8	1,9 ± 1,4	0,0 ± 0,0	5,5 ± 8,6
x10 ³ cels/μL	Linfócitos	2,8 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,5 ± 2,40
	Monócitos	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3
	Granulócitos	5,0 ± 0,3	1,6 ± 1,1	0,0 ± 0,0	3,5 ± 5,3

Os dados representam a média ± desvio padrão (n=5).

Na centrifugação a FCR de 800 por 15 min todos os índices leucoplaquetários nas frações sobrenadantes apresentaram concentrações menores que as observadas em 800 por 10 min e 800 por 5 min. A figura 6 apresentou a concentração dos índices hematológicos sob efeito da FCR de 800 nos Δts de 5, 10 e 15 min. A contagem de eritrócitos demonstrou a total sedimentação em todos os subgrupos de Δts. A fração do L-PRP exibiu níveis muito baixos, especialmente em Δt 15 min. Em B a contagem mostrou uma significativa redução na concentração de plaquetas no sedimento e no PPP p = 0,001 ANOVA. Em L-PRP foram observadas as maiores concentrações dos parâmetros experimentais, especialmente em Δt 10 min com níveis acima dos 200%.

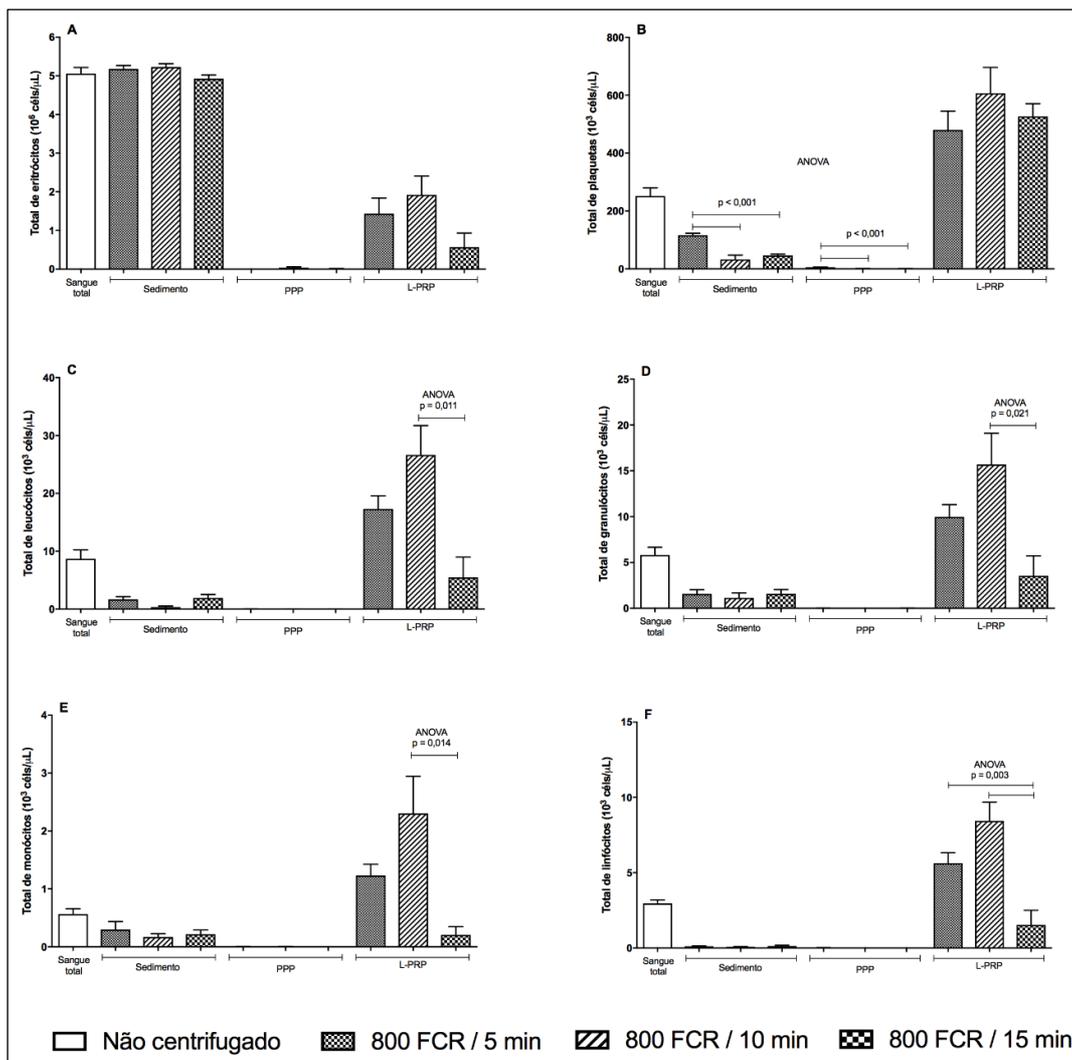


Figura 7. Concentração avaliada por citometria de fluxo dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, plaquetas, leucócitos totais, granulócitos, monócitos e linfócitos) no sangue total (branco), no sedimento e nas frações sobrenadantes de PPP e L-PRP (n=5). A força relativa de centrifugação foi de 800 x g por 5, 10 ou 15 minutos. As análises foram feitas pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para as múltiplas comparações e as barras indicam os grupos que apresentam diferenças entre si ($p < 0,05$)

A contagem de leucócitos totais em C demonstrou maior recuperação do conteúdo, onde após as centrifugações o sedimento e o PPP ficaram empobrecidos e a fração de L-PRP exibiu as maiores concentrações do experimento com destaque para Δt 10 min com níveis próximos aos 300%. A contagem de granulócitos em D exibiu padrões similares aos leucócitos totais, entretanto foram observadas concentrações remanescentes no sedimento, menores que as observadas nas outras FCRs, mas significativas o suficiente para demonstrar que a força perpendicular aplicada sobre o ângulo inclinado (25°) do tubo favoreceu o empuxo de granulócitos para as frações superiores. A contagem de monócitos em E apresentou concentrações reduzidas no sedimento e elevadas em L-PRP, nesta fração exibiu níveis acima dos 100% em Δt 10 min. A contagem de linfócitos em E demonstrou níveis próximos a 0% no sedimento, no PPP e níveis suprafisiológicos em L-PRP.

4. Discussão

Na separação seletiva do sangue para a obtenção de agregados sanguíneos terapêuticos a centrifugação diferencial fraciona os elementos deste fluido coloidal multifásico de acordo com o tamanho de suas partículas e de suas densidades corpusculares relativas⁵⁴.

Muitos estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos como objetivo de compreender e padronizar os métodos de centrifugação em função de uma melhor eficácia na obtenção das matrizes de fibrina para fins terapêuticos autólogos^{38,40,50-52}. Nestes estudos elementos como a concentração celular tem ganhado destaque, uma vez que tal concentração leucoplaquetária pode influenciar na concentração de exossomos e fatores de crescimento⁵⁵.

Forças indistintas proporcionadas por variações metodológicas indiscriminadas também tem sido frequentes, contudo sem apresentarem uma abordagem técnica específica sobre as influências das forças e tempos de centrifugação aplicadas sobre o sangue⁵⁶. Os métodos comerciais têm apresentado diversidade de nomenclatura e de parâmetros sem nenhuma evidência de vantagem clínica ou terapêutica plausível, pois suas comparações limitam-se às análises *in vitro*¹. Isto motivou-nos a observar os efeitos de faixas experimentais de FCR e Δt sobre a concentração celular em diferentes variações paramétricas. Deste modo, observamos o efeito paramétrico sobre as condições do concentrado sanguíneo e não uma observação limitada aos métodos pré-estabelecidos, tal como tem sido recorrente os estudos comparativos^{47,57}.

O contador automático Siemens ADVIA 2120, utilizado no presente estudo, é um sofisticado equipamento capaz de distinguir as células por um

método de citometria de fluxo de dispersão de luz de laser de dois ângulos, que utilizando o índice de refração e um histograma de volume, mede eritrócitos totais e índices hematimétricos, plaquetas totais e índices plaquetários, leucócitos totais com contagem diferencial e contagem de reticulócitos, onde o diferencial é feito por citoquímica por peroxidase. Esse conjunto de atributos modernos configurou-o como um dos mais modernos leitores hematológicos de rotina laboratorial⁵⁸.

No presente estudo observamos a contagem das séries vermelha e branca com diferencial de leucócitos e plaquetometria.

A contagem de eritrócitos serviu-nos como parâmetro comparativo na contagem hematológica do sangue total e do sedimento após as centrifugações. Estes dados mostraram a eficiência da centrifugação na sedimentação dos eritrócitos, mesmo nas menores faixas de FCR e Δt s empregados pela proximidade das concentrações experimentais muito próximas às observadas no sangue total (ST). A concentração de eritrócitos observadas em PPP foram próximas de zero em todas as condições. Entretanto, quanto menores FCR e tempo, maiores foram as concentrações em L-PRP.

A contagem de plaquetas representou um dos pontos de maior relevância deste estudo. Uma vez que a densidade corpuscular das plaquetas é de aproximadamente 1,040g/mL sua localização em um fracionamento seletivo por centrifugação de baixa velocidade tende a ocupar uma região intermediária entre os leucócitos mononucleares (1,065g/mL) e o plasma sanguíneo (1,020 g/dL), na zona de peletização leucoplaquetária. A centrífuga eleita para este estudo foi a FibrinFuge25 (Montserrat, China), que possui rotor de ângulo fixo de 25°, isto

colaborou para que a concentração celular e plaquetária não ficasse adstrita ao buffy coat, mas dispersa em todo o sobrenadante por favorecer a força de flutuabilidade ou empuxo⁶⁰.

Embora os concentrados sanguíneos popularmente conhecidos como agregados ou concentrados plaquetários serem referenciados na literatura como “ricos” em plaquetas, as observações experimentais do presente estudo demonstraram concentrações suprafisiológicas de plaquetas nas frações sobrenadantes que raramente ultrapassaram a 200% da concentração fisiológica do sangue total (controle). As maiores concentrações foram observadas nas frações de L-PRP em todas as condições experimentais. Entretanto, a FCR de 200 apresentou as maiores concentrações nas frações de PPP, onde a sedimentação foi sempre menor comparativamente às outras faixas de FCR.

Na centrifugação por FCR de 200 durante 5 minutos houve significativa elevação na concentração de leucócitos no L-PRP, apresentando níveis suprafisiológicos. A recuperação do conteúdo leucocitário atingiu índices acima de 100%, porém completamente sedimentados na zona do *buffy coat*. A concentração plaquetária manteve correspondência com os outros intervalos de tempo nesta mesma faixa de FC. Na fração de PPP observou-se significativa redução na concentração de todos os elementos figurados do sangue. A baixa concentração de granulócitos no sedimento nesta faixa experimental significa que a FCR atuando obliquamente sobre o conteúdo sanguíneo produz efeito antagonista à sedimentação caracterizando uma separação seletiva em função da densidade relativa dos elementos sanguíneos. Nos demais experimentos com FCR de 200, nos intervalos de tempo de 5 e 10 foram exibidas elevadas

concentrações de granulócitos. O maior tempo de centrifugação tende a concentrar a maior parte do conteúdo leucoplaquetário na fração do L-PRP.

Na centrifugação a FCR de 400 por 15 minutos observou-se que a concentração plaquetária apresenta comportamento inversamente proporcional ao tempo de centrifugação. A concentração de leucócitos totais e diferencial apresentou níveis inferiores aos valores fisiológicos de ST. Deste modo, tal configuração paramétrica não demonstrou ser capaz de enriquecer o sobrenadante com leucócitos e plaquetas.

Na centrifugação a FCR de 400 por 15 minutos observou-se que a concentração plaquetária apresenta comportamento inversamente proporcional ao tempo de centrifugação. A concentração de leucócitos totais e diferencial apresentou níveis inferiores aos valores fisiológicos de ST. Deste modo, tal configuração paramétrica não demonstrou ser capaz de enriquecer o sobrenadante com leucócitos e plaquetas.

Ao compormos a concentração plaquetária total do sobrenadante pelo somatório das frações de PPP + L-PRP, apenas nas FCRs de 200 e 800 foram observadas concentrações acima de 200%. Estes dados assemelham-se aos achados de Miron *et al.* 2019, que demonstraram concentrações da ordem de 200% ao executarem métodos cujas FCRs eleitas variaram entre 200 e 400⁵⁹. O trabalho de Varela *et al.* 2018⁶¹ realizaram a plaquetometria automatizada aplicando FCR de 400 e observaram concentrações médias de 115% comparadas ao sangue total (controle).

A leucometria feita por contagem automatizada em hemocitômetro de fluxo combinado com citocímica peroxidase, duas metodologias de alta eficiência empregadas em rotinas de laboratório de diagnóstico hematológico, isentou o experimento de dificuldades metodológicas comuns nas contagens manuais.

As contagens de leucócitos totais nas condições experimentais de 200 e 400 x g nos diferentes Δt s não exibiram concentrações suprafisiológicas em PPP e L-PRP. Em 800 x g as concentrações de leucócitos totais em L-PRP chegaram a representar cerca de 200% dos valores de ST, ratificada pela significativa redução no sedimento, fato que não ocorreu nas outras condições experimentais. Tais observações associam-se com o potencial de sedimentação que é diretamente proporcional à FCR. Isto ficou demonstrado pelas decrescentes concentrações leucocitárias em PPP à medida em que a FCR aumentou. Entretanto, a FCR de 800 apresentou dados que demonstraram que o aumento da FCR associado à redução de angulação do tubo aumentou a concentração da fração leucocitária no L-PRP, diminuindo-a significativamente no sedimento, ou seja, aumentou a sedimentação e o empuxo de modo concomitante. Esta faixa de FCR promoveu a maior concentração de leucócitos totais dentre todas as condições experimentais observadas, especialmente com Δt 10 min.

Nas observações das contagens diferenciais de leucócitos, as concentrações de granulócitos no sedimento demonstraram que a sua densidade relativa, 1,080 g/mL, foi fundamental para reduzir sua concentração nas frações sobrenadantes, PPP e L-PRP. Tanto o sedimento quanto L-PRP apresentaram concentrações abaixo de ST. Na FCR de 800 observou-se também a maior concentração de granulócitos em L-PRP.

A alta concentração relativa de linfócitos fortaleceu o conceito do fracionamento seletivo em função da densidade corpuscular. Nas frações mononucleares as concentrações volumétricas apresentaram-se acima dos níveis fisiológicos com maior frequência no grupo dos linfócitos. Ou seja, o principal leucócito encontrado nas frações sobrenadantes foi o linfócito. O trabalho de Varela *et al.* 2017⁶¹ corrobora com os achados deste experimento.

As concentrações de monócitos apresentaram níveis acima de ST em todas as condições do experimento. De fato, os leucócitos mononucleares aumentaram sua concentração em função da aplicação de FCR entre 200 e 800. As FCRs de 200 e 400 apresentaram maiores concentrações mononucleares nas frações sobrenadantes, enquanto que 800 concentrou-as na zona de peletização do L-PRP. Apesar da leucometria diferencial apresentar valores elevados nas faixas de FCR de 200 e 800, a menor FCR apresentou maior distribuição celular em toda a fração sobrenadante e não apenas concentrada na zona de peletização junto à L-PRP.

Conclusão

Os resultados de contagem celular e plaquetária por citometria de fluxo nas amostras experimentais de plasma demonstraram os efeitos da FCR e do tempo sobre a composição leucoplaquetária e permitiram as seguintes observações:

1. A centrifugação proporcionou concentrações suprafisiológicas de plaquetas nas diversas condições experimentais;
2. A menor faixa de FCR, 200 x g, proporcionou a maior concentração leucoplaquetária na fração sobrenadante acima do buffy coat, mas expressou a maior perda de leucócitos mantidos no sedimento;
3. A maior faixa de FCR, 800 x g, apresentou maior concentração celular e plaquetária no buffy coat, mas a menor concentração na fração sobrenadante.

O presente estudo, por tratar-se de uma investigação *in vitro*, limitou-se a apresentar as características da composição celular obtida diante das diferentes condições paramétricas. Deste modo, os estudos *in vivo* são indispensáveis para verificar a eficácia terapêutica de cada variação.

Referências

1. Oliveira, LA; Buzzi, M; Leão, MP; Andrade, PCAR; Kuckelhaus S. Ultrastructural morphological characterization of the autologous leuko-platelet fibrin matrix in association with xenogenic and alloplastic biomaterials for bone grafting. *Fibrin® Protocol. Rev Catarinense Implantodont.* 2018;18:24-33.
2. Niewland R and SA. Platelet-Derived Microparticles. In: Michelson AD, ed. *Platelets*. Second. Burlington: Elsevier; 2007:403-414.
3. Dulmovits BM, Herman IM. Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):1800-1812. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.031
4. Witte MB, Barbul A. General Principles of Wound Healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-528.
5. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008
6. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.010
7. Vieira FLD, Silva RR da, Minozzo C, et al. Tratamento da osteonecrose mandibular medicamentosa usando a fibrina leucoplaquetária autóloga – Dez meses de acompanhamento sem recidiva. *Implant Int J.* 2017;2(1):48-55. <http://www.inpn.com.br/InPerio/Artigo/Index/22264>.
8. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):3-9.
9. Matras H, Jesch W, Watzek G DH. Use of fibrin adhesives in mouth, jaw, and face surgery. *Osterr Z Stomatol.* 1978;75(12):433-437.
10. RE M. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-228.
11. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-535.
12. Pontual, M.A.B e Magini RS. Leão, M.P.; Magini, R.S. Coagulação (formação do gel): trombina + cloreto de cálcio x cloreto de cálcio. In: Pontual, M.A.B e Magini RS, ed. *Plasma Rico Em Plaquetas e Fatores de Crescimento. Das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica.* 1ª. São Paulo: Editora Santos; 2004:308.
13. Dohan DM, Choukroun J. PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC ... How to find your way in the jungle of platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2007;103(3):305-306. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.10.009
14. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-167.

- doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
15. Casati MZ, de Vasconcelos Gurgel BC, Gonçalves PF, et al. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects—A pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(2):132-136. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2006.06.004>
 16. Papalia R, Vasta S, Zampogna B, Tecame A, Maffulli N, Denaro V. Platelet-Rich Plasma Injections and Surgery: Short-Term Outcomes and Long-Term Prognosis. *Oper Tech Orthop.* 2012;22(2):71-77. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/j.oto.2012.01.001>
 17. Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA. What Is Platelet-Rich Plasma? *Oper Tech Sports Med.* 2011;19(3):142-148. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/j.otsm.2010.12.001>
 18. Kon E, Filardo G, Di Matteo B, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-Rich Plasma in Sports Medicine: New Treatment for Tendon and Cartilage Lesions. *Oper Tech Orthop.* 2012;22(2):78-85. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/j.oto.2011.11.002>
 19. Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elb Surg.* 2011;20(4):518-528. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2011.02.008>
 20. Pallua N, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns.* 2010. doi:10.1016/j.burns.2009.05.002
 21. Schippinger G, Studencnik G, Fankhauser F. PRP bei sportmedizinischen Indikationen – eine Literaturübersicht. *Sport Orthop Traumatol Sport - Sport.* 2015;31(1):45-53. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.orthtr.2014.11.001>
 22. Saltzman BM, Jain A, Campbell KA, et al. Does the Use of Platelet-Rich Plasma at the Time of Surgery Improve Clinical Outcomes in Arthroscopic Rotator Cuff Repair When Compared With Control Cohorts? A Systematic Review of Meta-analyses. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2016;32(5):906-918. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2015.10.007>
 23. Vannini F, Di Matteo B, Filardo G, Kon E, Marcacci M, Giannini S. Platelet-rich plasma for foot and ankle pathologies: A systematic review. *Foot Ankle Surg.* 2014;20(1):2-9. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fas.2013.08.001>
 24. Cai Y, Zhang C, Lin X. Efficacy of platelet-rich plasma in arthroscopic repair of full-thickness rotator cuff tears: a meta-analysis. *J Shoulder Elb Surg.* 2015;24(12):1852-1859. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2015.07.035>
 25. Resolução CFM 2128_2015prp. pdf.
 26. Conselho Federal de Odontologia. Agregados Plaquetários Autólogos não transfusionai. Resolução 158/2015. <http://cfo.org.br/publicacoes-principal/prestacao-de-contas/servicos-e-consultas/servicos-e-consultas/ato-normativo/?id=1927>. Published 2015.
 27. Chokroun J, Adda F, Schoeffloer C, Vervelle A. Une opportunité en paro implantologie, le PRF. *Implantodontie* 2001 ; 42 - 55-62. *Implantodontie.* 2001.
 28. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G, Charrier JB. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Growth factor release and contradictory results. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2010. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.059
 29. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, 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 Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012
30. Choukroun J, Simonpieri A, Girard M-O, Fioretti F, Dohan S, Dohan D. Platelet Rich Fibrin (PRF): un nouveau biomatériau de cicatrisation: Biotechnologies et fibrine, plaquettes et cytokines, aspects immunitaires, implications thérapeutiques 4e partie: implications thérapeutiques. *Implantodontie*. 2004;13(4):229-235. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.implan.2004.07.002
 31. Dohan D, Diss A. Compte-rendu du 2e Symposium international sur les Facteurs de croissance (SyFac 2005). *Implantodontie*. 2005;14(3):116-125. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.implan.2005.09.002
 32. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte M-P, Charrier J-B. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009;108(3):341-352. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.04.020
 33. Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier J-BB. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol*. 2010;55(3):185-194. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.01.004
 34. Ehrenfest DMD. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010;110(3):275-278. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.048
 35. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, Charrier J-B, He L. Selecting a relevant in vitro cell model for testing and comparing the effects of a Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) membrane and a platelet-rich plasma (PRP) gel: Tricks and traps. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010;110(4):411-413. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.05.055
 36. Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*. 2012;40(5):323-329. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.07.004
 37. Su CY. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.047
 38. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, et al. Comparison between PRP, PRGF and PRF: Lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(6).
 39. Khorshidi H, Raoofi S, Bagheri R, Banihashemi H. Comparison of the Mechanical Properties of Early Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin versus PRGF / Endoret Membranes. *Hindawi Publ Corp*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/1849207
 40. Nelson R, Pinto, Andrea Pereda, Paula Jiménez, Marco Del Corso, Byung-

- Soo Kang, Hom-Lay Wang, Marc Quirynen and DMDE. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and Scanning Electr. *Poseido*. 2014;2(2):141-154.
41. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech*. 2011. doi:10.1002/jemt.20968
 42. Bai M, Wang IVC, Wang IJ, Lin IM, Wing II, li PC. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. (14):116-124. doi:10.6061/clinics/2017(02)09
 43. Vieira1 FLD, Cruz RFF, Rodrigues CRT, Junior NG de O, Vieira AF, Oliveira LA de. Utilização de fibrina leucoplaquetária autóloga para reinserção de implante com perda de estabilidade primária em cirurgia guiada – relato de caso. *Full Dent Sci*. 2017;8(30).
 44. Vieira FLD, Orem IB, Minozzo C, Lavinhas FP., Jr. NG., Elias WC. Utilização de fibrina leucoplaquetária autóloga na recuperação de perfuração crítica da membrana sinusa. *Implant Int J*. 2016;1(7):1293-1299.
 45. Borsani E, Bonazza V, Buffoli B, et al. Biological Characterization and In Vitro Effects of Human Concentrated Growth Factor Preparation: An Innovative Approach to Tissue Regeneration. 2015;7(5). doi:10.4172/0974-8369.1000256
 46. Bonazza V, Borsani E, Bu B, Castrezzati S, Rezzani R, Rodella LF. How the different material and shape of the blood collection tube influences the Concentrated Growth Factors production. 2016;(August):1-6. doi:10.1002/jemt.22772
 47. Kim TH, Kim SH, S??dor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol*. 2014. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.02.004
 48. Anitua E, Prado R, Troya M, et al. Implementation of a more physiological plasma rich in growth factor (PRGF) protocol: Anticoagulant removal and reduction in activator concentration. *Platelets*. 2016;71104:1-8. doi:10.3109/09537104.2016.1143921
 49. Neiva RF, Gil LF, Tovar N, et al. The Synergistic Effect of Leukocyte Platelet-Rich Fibrin and Micrometer / Nanometer Surface Texturing on Bone Healing around Immediately Placed Implants: An Experimental Study in Dogs. 2016;2016.
 50. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet Rich Fibrin With the Low Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility and Cellular Response. *J Periodontol*. 2016. doi:10.1902/jop.2016.160443
 51. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest*. 2016. doi:10.1007/s00784-016-1719-1
 52. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-689. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00138
 53. Qiao J, An N, Ouyang X. Quantification of growth factors in different platelet

- concentrates. *Platelets*. 2017;7104(March):1-5.
doi:10.1080/09537104.2016.1267338
54. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017. doi:10.1007/s00068-017-0785-7
 55. Dohan Ehrenfest DM, Corso M Del, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol*. 2010;81:546-555. doi:10.1902/jop.2009.090531
 56. Miron RJ, Pinto NR, Quirynen M GS. Standardization of Relative Centrifugal Forces (RCF) in studies related to platelet rich fibrin. *J Periodontol*. 2019. doi:10.1002/JPER.18-0553
 57. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within PRF- (Platelet-Rich-Fibrin) concentrates advances patients' own inflammatory cells and platelets: First introduction of the Low Speed Centrifugation Concept. *ETOJ Submitt*. 2016. doi:10.1007/s00068-017-0767-9
 58. Kim MJ, Park P-W, Seo Y-H, et al. Letter to the Editor Diagnostic Hematology Reference Intervals for Platelet Parameters in Korean Adults Using ADVIA 2120. doi:10.3343/alm.2013.33.5.364
 59. Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res Part A*. 2019;(May):jbm.a.36734. doi:10.1002/jbm.a.36734
 60. Lima, FM, Venceslau, GM, Brasil, GT. A downward buoyant force experiment. *Rev Bras de Ensino de Fisica*. 2014, 36: 2, 2309
 61. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, et al. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig*. 2018:1-10. doi:10.1007/s00784-018-2555-2

Capítulo 3

Caracterização Morfológica

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ DE FIBRINA
LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA EM FUNÇÃO DO MÉTODO.**

RESUMO

A matriz de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF) é uma preparação terapêutica não-transfusional com propriedades biológicas aplicáveis na regeneração tecidual. Diferenças na forma de preparo podem implicar em alterações morfológicas macro e microscópicas na arquitetura da rede de fibrina. Considerando que as alterações metodológicas podem resultar em matrizes distintas e possíveis comprometimentos de sua eficácia clínica, este trabalho realizou uma caracterização morfológica de natureza macroscópica e ultraestrutural a partir de variações metodológicas como força g, tempo de rotação, ângulo do rotor, tipos de tubos, organização morfológica estrutural por fracionamento seletivo e de tempo de fibrinólise em matrizes experimentais de LPRF. Amostras de sangue humano foram utilizadas para obter matrizes experimentais de LPRF em três modelos de centrífugas com distintos rotores de ângulo 80-2B (45°), EBA200 (33°) e FibrinFuge25 (25°); três forças g (200, 400 e 800 x g); dois tipos de tubos (vidro puro e plástico com SiO₂). As análises morfológicas dos espécimes experimentais de LPRF foram realizadas por macroscopia (MA), microscopia óptica (LM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A análise macroscópica das matrizes de LPRF apresentou membranas maiores e aumento da área de *buffy coat* com a utilização da centrifugação com ângulo reduzido. A análise por microscopia de luz apresentou um conteúdo mais dispersivo de plaquetas no corpo das matrizes com a centrifugação de menor ângulo do rotor combinado à baixa força g. A análise por microscopia eletrônica de varredura reafirmou os achados da microscopia óptica a partir de cortes transversais do coágulo de LPRF demonstrando maior nível de dispersão celular no corpo da matriz de LPRF associado ao aumento do efeito de empuxo proporcionado pela redução de angulação do rotor de centrifugação. Os aumentos de 20 a 40.000x esclareceram muitas particularidades sobre a estrutura tridimensional da matriz de PRF, sobre a fibrinólise, sobre a contaminação com fragmentos de óxido de silício utilizados como ativador de coágulo em tubos de plástico e a presença de eritrócitos poliédricos na porção terminal da PRF. Esses dados experimentais contribuirão para aumentar o entendimento sobre os efeitos das variações paramétricas nos métodos de obtenção da matriz LPRF.

Palavras-Chave: *polimerização do fibrinogênio, fibrina, microscopia eletrônica de varredura, fibrinólise*

ABSTRACT

The leukocyte platelet-rich fibrin matrix (LPRF) is a non-transfusion therapeutic preparation with biological properties applicable to tissue regeneration. Differences in the form of development may result in macro and microscopic morphological changes in the architecture of the fibrin network. Methodological modifications can compromise their clinical efficacy. This work is a morphological characterization by macroscopic and ultrastructural analyzes based on variations such as g-force, rotation time, rotor angle, tube types, and fibrinolysis time. Human blood samples were used to obtain LPRF matrices in three fixed-angle rotor centrifuges 80-2B (45°), EBA200 (33°) and FibrinFuge25 (25°); three g forces (200, 400 and 800 x g); two types of tubes (pure glass and plastic with SiO₂). Morphological analyzes of the experimental specimens of LPRF were performed by macroscopy (MA), optical microscopy (LM), scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM). The macroscopic analysis of the LPRF matrices showed more extensive membranes and an increased buffy coat area with the use of a reduced angle centrifuge. The investigation by light microscopy revealed a more dispersive content of platelets in the body of the matrices with the centrifuge with a smaller rotor angle combined with low g-force. Scanning electron microscopy analysis reaffirmed the findings of optical microscopy from cross-sections of the LPRF clot, demonstrating a higher level of cell dispersion in the LPRF matrix body associated with the increased buoyancy effect provided by the reduction of the centrifuge rotor angle. The increases from 20 to 40,000x clarified many peculiarities about the three-dimensional structure of the PRF matrix, about fibrinolysis, about contamination with fragments of silicon oxide used as a clot activator in plastic tubes and the presence of polyhedral erythrocytes in the terminal portion of the LPRF. These experimental data will contribute to increasing the understanding of the effects of parametric variations in the methods of obtaining the LPRF matrix.

Key-Words: *fibrinogen polimerization, fibrin, scanning electron microscopy, fibrinolysis*

1. Introdução

A matriz de fibrina, embora muito relacionada ao processo de coagulação, atua como arcabouço primordial para a condução do reparo tecidual^{1,2}. Trata-se de uma rede tridimensional formada e estabilizada após a ativação do fibrinogênio por clivagem peptídica enzimática³. Este processo expõe epítomos na molécula dos monômeros de fibrinogênio proporcionando sua íntima associação em cadeias poliméricas¹. Esta polimerização tende a ocorrer instantaneamente, pois é induzida por tixotropia autógena de glicoproteínas teciduais ou agentes oxidantes em mecanismos exógenos⁴.

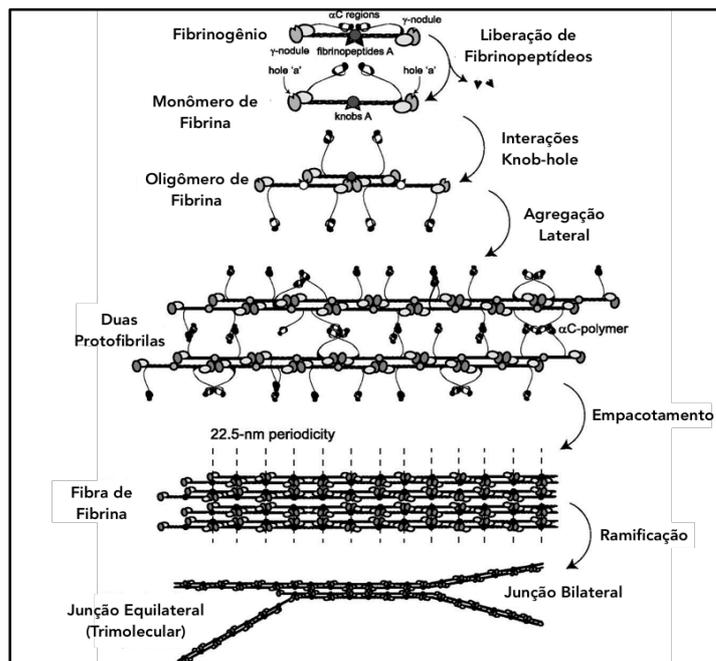


Figura 1. Esquema das etapas de polimerização do fibrinogênio. A figura mostra os seguintes passos: (1) a liberação enzimática de fibrinopeptídeos do fibrinogênio, a formação de botões monoméricos contendo a fibrina e a dissociação parcial das regiões αC ; (2) a automontagem de fibrina monomérica através de interações *knobe-hole* e a formação de oligômeros de fibrina de duas cadeias com dois desvios; (3) a agregação lateral de protofibrilas (oligômeros de fibrina feitos de 20 a 25 monômeros) promovida por interações homofílicas αC - αC dentro e entre protofibrilas, incluindo a formação de polímeros αC ; (4) o empacotamento de protofibrilas em uma fibra com um entrecruzamento periódico de 22,5nm devido à estrutura molecular semi-escalonada e arranjo regular; e (5) a formação da rede de fibrina devido à ramificação de fibra em arranjos bi e trimoleculares. Respectivamente, bilaterais e equilaterais.

A fibrina, naturalmente formada pela coagulação, cria nos tecidos lesados um arcabouço tridimensional entremeado de células sanguíneas cuja ação primordial é prover a hemostasia. Entretanto, atua também como um microambiente tissular temporário e substituível favorável à acomodação de células para reorganização vascular e tecidual^{5,6}.

Tal como o conteúdo celular sanguíneo, há grande importância na própria estrutura da rede de fibrina em sua interação com glicoproteínas adesivas do plasma como fibronectina e vitronectina, que agregam forte adesividade à rede conferindo-lhe uma arquitetura funcional mimética à matriz extracelular⁷ na conjugação dos elementos tissulares. Nesta, células migratórias como fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas e outras mononucleares migram e modulam favoravelmente os eventos reconstrutivos e angiogênicos nos tecidos pela ação conjunta e sinalizadora dos fatores de crescimento (FC) oriundos das plaquetas e das células sanguíneas impregnadas na malha⁸. A adesão destes FC à rede os protege contra a proteólise natural durante a fase inflamatória aguda. Deste modo, atuam na sinalização celular de modo eficiente até as fases proliferativa e remodeladora do reparo. Portanto, o coágulo sanguíneo, em função do sinergismo entre sua composição molecular e arquitetura tridimensional, representa o arcabouço primordial para o reparo dos tecidos.

Os fundamentos biológicos da hemostasia e do reparo serviram para o desenvolvimento de metodologias operacionais para obtenção de concentrados sanguíneos (CS) para emprego terapêutico não-transfusional pela concentração seletiva de plaquetas, leucócitos mononucleares e glicoproteínas na matriz de

fibrina, elementos estes, diretamente relacionados com as respostas regenerativas⁹.

Os concentrados sanguíneos têm sido empregados na odontologia com significativo nível de sucesso terapêutico como adjuvante cirúrgico para prover precocidade do reparo tecidual^{3,10,11}. Inicialmente, em meados dos anos 50, foi desenvolvido um método de fracionamento seletivo do sangue para obtenção de um volume sobrenadante de plasma que apresentasse concentrações suprafisiológicas de plaquetas. Este agregado foi denominado plasma rico em plaquetas (PRP)¹², tal definição foi proposta pelos hematologistas em função da obtenção de uma concentração plaquetária acima da plaquetometria^{13,14} por mm^3 observada no sangue total. O emprego terapêutico do PRP tornou-se bastante popular nos anos 1990 e 2000, especialmente devido às publicações de Robert Marx¹² e Eduardo Anitua¹⁵.

As muitas variáveis dos sensíveis protocolos de obtenção do PRP, principalmente em relação à força centrífuga relativa (FCR) aplicada sobre as amostras e as intervenções químicas anti e pró-coagulantes levaram a resultados controversos acerca da sua concentração plaquetária e respostas clínicas. Muito embora ainda existam muitas aplicações clínicas de utilização do PRP, estas tornaram-se reduzidas em função do surgimento de métodos simplificados sem a necessidade de intervenção química exógena na cascata de coagulação¹⁶. Resultados controversos, falta de evidência clínica sobre potenciais terapêuticos e alterações metodológicas indiscriminadas acabaram por gerar descrédito na técnica¹⁴, especialmente no contexto das cirurgias do complexo bucomaxilofacial.

Como evolução conceitual e metodológica dos concentrados sanguíneos, Choukroun *et al.* 2001⁹ propuseram um método para obtenção de uma matriz de fibrina rica em plaquetas (PRF)⁹. Alguns anos após Dohan *et al.* 2006 propuseram uma mudança de denominação em função da composição adicionada de leucócitos, passando assim a ser chamada de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (LPRF). Mesmo tendo surgido de uma evolução metodológica a partir do PRP, a LPRF apresentava características biológicas muito particulares como o aproveitamento total do sobrenadante sanguíneo incluindo plaquetas, leucócitos mononucleares, proteínas plasmáticas, imunoglobulinas, exossomos e micropartículas circulantes^{17,18}, além de apresentar uma densa e resistente matriz de fibrina assemelhando-se morfológicamente, macro e microscopicamente, a uma autêntica matriz extracelular do tecido conjuntivo⁵.

Oliveira *et al.* 2018³ enaltecem o valor da terapêutica não-transfusional exclusivamente autóloga sugerindo uma denominação de natureza didática e desconfitante, descrevendo-a como uma matriz de fibrina leucoplaquetária autóloga. A terminologia leucoplaquetária inseriu no nome um aspecto de valorização à sua real composição e a palavra autóloga trouxe em si o significado de origem e destinação terapêutica, fazendo que este termo assumisse um expressivo papel na regulamentação sanitária para o emprego clínico no âmbito da odontologia brasileira¹⁹.

Por suas características biológicas, acessibilidade metodológica facilitada e potencial de aplicações terapêuticas, a LPRF tem despertado a atenção das

classes médica e odontológica e inserido muitos procedimentos clínicos neste novo contexto dos concentrados sanguíneos autólogos²⁰.

O uso da LPRF é local, onde exerce papéis biológicos que favorecem o reparo tecidual¹¹. Não é autônoma na neoformação tissular, seja de tecido epitelial, conjuntivo ou ósseo²¹, mas adjuvante em sinergismo condutor e indutor com os leitos adjacentes e suas células hospedeiras através de intensa comunicação e sinalização celular em sua matriz estrutural²².

Seu emprego cirúrgico, exclusivamente autólogo, não é imperativo²³. Entretanto, sua aplicação favorece a resposta reparadora e em muitos casos auxilia e facilita a técnica cirúrgica como no fechamento mecânico da ferida, na proteção de leitos em cicatrização, na adesão de biomateriais para enxertias ósseas e especialmente como agente hemostático tópico^{15,24-27}.

Este tema conta atualmente com mais de 1000 publicações indexadas que vão da pesquisa básica às evidências clínicas²⁶. A maioria dos artigos científicos abordam essencialmente sua potencialidade terapêutica como adjuvante cirúrgico em vários campos da odontologia como a implantodontia e a periodontia²⁸⁻³⁰. Entretanto, estudos incipientes em tratamentos de feridas crônicas³¹ em humanos introduzem o tema na área médica e configuram uma promissora potencialidade terapêutica.

Alguns autores destacam-se historicamente neste cenário como Robert Marx com o uso do PRP¹²; Eduardo Anitua pelo desenvolvimento da técnica para obtenção do plasma rico em fatores de crescimento (PRGF™)¹⁵; Joseph

Choukroun pelo desenvolvimento do método PRF Choukroun Process™ para obtenção da PRF⁹; Luigi Sacco com o método denominado *concentrated growth factors* (CGF™)²⁴; David Dohan pela evolução conceitual e nominativa da PRF contextualizando-a à concentração leucocitária e a denominação LPRF³²; Richard Miron pelos recentes trabalhos de centrifugação com rotores horizontais e de validação metodológica para padronização de nomenclaturas, critérios sanitários e parâmetros de centrifugação^{10,33-35} e Tomoyuke Kawase que contribui com a identificação de potenciais citotóxicos relacionados à presença de agentes exógenos nos tubos para coleta sanguínea³⁶.

Todos estes métodos supracitados apresentam variações paramétricas como tempo de centrifugação, aceleração e FCR aplicadas, tipos de rotores e tipos de tubos utilizados para a coleção sanguínea. Em consequência disto, diferentes concentrações de fatores de crescimento (FC) liberados da matriz de LPRF em ensaios *in vitro*³ tem sido relatadas na literatura internacional. Mesmo apresentando tais variações metodológicas possuem como ponto comum e indistinto a obtenção de uma densa e organizada matriz de fibrina leucoplaquetária humana que exhibe concentrações suprafisiológicas de FC para aplicações exclusivamente autólogas. Apesar das variações de nomenclatura³⁷ os distintos métodos geram a mesma matriz biológica, o produto denominado LPRF, segundo a proposta denominativa feita por Dohan *et al.* 2009³².

Por equívoco metodológico ou inobservância de parâmetros de centrifugação existem relatos na literatura de reproduções protocolares em função de revoluções por minuto (RPM) alterando indistintamente as faixas de FCR preconizadas a serem aplicadas sobre o sangue para este fim³⁸⁻⁴⁰. Deste

modo, as variações metodológicas indiscriminadas podem implicar em alterações sobre as características fundamentais da LPRF com potencial comprometimento sobre a resposta clínica pela cinética da liberação de FC, sobre a organização estrutural da rede de fibrina e na concentração e integridade do conteúdo celular e plaquetário⁴¹.

O objetivo desta caracterização morfológica em função do método servirá para elucidar sobre os efeitos das variações paramétricas e de possíveis interferentes sobre a organização estrutural da matriz de LPRF.

2. Materiais e Métodos

2.1. Aspectos éticos

Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com seres humanos foram rigorosamente obedecidas, em concordância com a lei 6.638/79 e conforme a declaração de Helsinque (*World Medical Association Recommendation* 2011). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob o número 055468/2015.

2.2. Participantes

Participaram voluntariamente deste estudo cinco indivíduos adultos jovens do 3 gênero feminino e 2 do gênero masculino dos quais foram obtidos 180ml de sangue total de cada participante após leitura e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os mesmos declararam-se saudáveis, não tabagistas e não portadores de doenças infecto contagiosas. Os mesmos foram submetidos à realização prévia de anamnese, exame físico e avaliação do hemograma completo apresentando índices hematimétricos dentro dos valores de referência. Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com seres humanos foram rigorosamente obedecidas, em concordância com a lei 6.638/79 e conforme a declaração de Helsinque (*World Medical Association Recommendation* 2011). Este estudo (CAAE nº 46109215.9.0000.5558) foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB). As amostras sanguíneas foram coletadas mediante assinatura do TCLE.

2.3. Obtenção dos espécimes de LPRF

A obtenção das matrizes de LPRF foi feita de acordo com as seguintes variações paramétricas: Força centrífuga relativa: 200, 400 e 800 x g; Tempo de centrifugação: 5, 10 e 15 minutos; Ângulo de rotor: 25, 33 e 45°; Tipos de tubo: tubo de vidro isento de aditivo FibrinTube (Montserrat, China) (1); tubo plástico com ativador de coágulo de duas marcas comerciais (Becton Dickinson, USA) (2) e (Greiner Bio-One, Brasil) (3); tubo plástico sem ativador de coágulo (Greiner Bio-One, Brasil).

Amostras de LPRF em fase monomérica foram obtidas de acordo com o protocolo Fibrin de centrifugação³ utilizando o tubo 3. Esta matriz foi utilizada para hidratar e condicionar membranas de colágeno bovino Lumina Coat (Critéria, Brasil) e para aglutinar partículas de biomateriais mineralizados xenógeno Lumina Porous (Critéria, Brasil) e aloplástico Nanosynt (FGM, Brasil).

As matrizes receberam processamento histotécnico para observação e análise por macroscopia, microscopia óptica (MO), eletrônica de varredura (MEV) e eletrônica de transmissão (MET). Dentre as abordagens metodológicas deste estudo de caracterização morfológica, a fim de verificar alterações estruturais e fibrinólise da matriz em função do tempo decorrido, espécimes foram fixadas em diferentes intervalos de tempo 0, 7, 14 e 21 dias após sua obtenção para verificar o nível de degradação através da morfometria das fibras e fibrilas de fibrina.

2.4. Coleta Sanguínea

Todo material de coleta foi apresentado ao doador em embalagem estéril e inviolada. Foi realizada a abertura do catéter agulhado, scalp, 21G do sistema de coleta à vácuo (Greiner Bio-One Vacuette, Brasil).

Previamente à coleta sanguínea foi feita a antissepsia das mãos do flebotomista com álcool 70% e calçamento de luvas de procedimento;

O doador de sangue foi acomodado com o repouso do seu membro superior sobre base de apoio para a coleção sanguínea com exposição anterior da fossa antecubital;

Foi realizada a aplicação de dispositivo para compressão venosa (garroteamento) com um massageamento ascendente compressivo na face anterior do antebraço;

Feita a seleção da veia na fossa antecubital (cefálica, intermédia antecubital ou basilíca) por inspeção e palpação digital com o dedo indicador do flebotomista procedeu-se a antissepsia antecubital com swab álcool 70% (Becton Dickinson, USA) com dois movimentos ascendentes com inversão da face aplicada do swab;

A venopunção foi feita por inserção do dispositivo venopuncto (Greiner Bio-One Vacuette, Brasil) com a exposição da agulha e bisel voltado para cima com angulação entre 15 e 30° em único movimento. A introdução oblíqua da agulha permitiu a visualização da penetração vascular pelo retorno sanguíneo no interior da cânula plástica entre as extremidades proximal e distal do escalpe.

As coleções sanguíneas foram realizadas utilizando 3 tipos de tubos: 1. Tubo de vidro não siliconizado e isento de aditivos FibrinTube (Montserrat, China); 2. Tubo plástico com ativador de coágulo (Becton Dickinson, USA); 3. Tubo plástico com ativador de coágulo (Greiner Bio-One, Brasil). Os tubos 1 e 2 possuem capacidade volumétrica de 10,0 mL e o tubo 3 de 9,0 mL. Previamente à inserção dos tubos foi realizada a assepsia das suas tampas com álcool 70%.

Os tubos foram posicionados com a tampa para baixo afim de proporcionar o preenchimento ascendente. Isto além de facilitar a visualização reduziu o risco de hemólise por impacto excessivo do sangue contra a parede e fundo do tubo. De cada participante extraiu-se 9 tubos de sangue de 10mL e/ou 9 mL. Ao todo cada participante cedeu 180ml de sangue em três coletas em dias distintos.

Na finalização da coleta o último tubo foi removido, a agulha retirada e aplicado um rolete de algodão estéril sobre o ponto de inserção da agulha com a manutenção da compressão por 3 minutos sem a dobra do cotovelo. Após este período foi feita a aplicação do curativo estéril (Labor Import, China).

2.5. Centrifugação

Imediatamente ao término da venopunção os tubos foram levados para as centrífugas e posicionados em balanço diametral no rotor com um tubo idêntico preenchido com água pelo sistema a vácuo para proporcionar estabilidade vibracional.

As centrífugas Fibrinfuge25® (FF25) (Montserrat, China), EBA200 (Hettich, Alemanha) e 80-2B (Montserrat, China) foram utilizadas para a obtenção das matrizes de fibrina de acordo com os parâmetros propostos neste estudo. Figura 2.

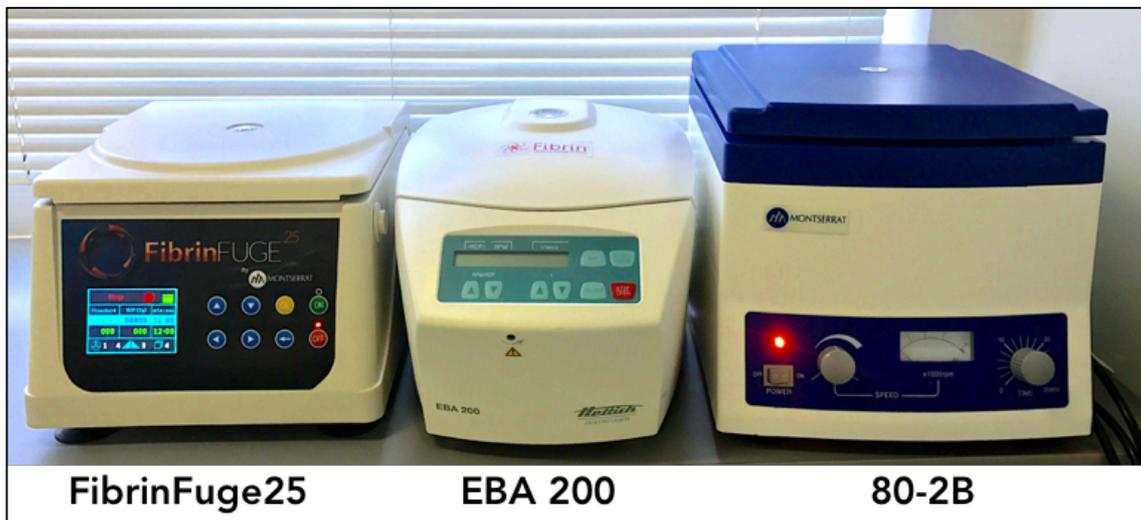


Figura 2. Centrífugas de bancada utilizadas para obtenção de coágulos de fibrina. FF25 (Zenith Lab Co, China), rotor de raio médio de 65 mm e ângulo fixo de 25° com capacidade para 8 tubos de 10mL; EBA200 (Hettich, Alemanha), rotor com raio médio de 50 mm de 33° com capacidade para 8 tubos de 10mL e 80-2B (Montserrat, China), rotor de raio médio de 95mm e ângulo de 45° com capacidade para 12 tubos de 10mL. O raio médio do rotor de cada centrífuga foi utilizado para o cálculo da FCR. O raio médio é considerado no meio do tubo, na região de peletização leucoplaquetária.

2.6. Avaliação morfológica das matrizes de LPRF

As análises morfológicas foram realizadas por macroscopia, microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

2.6.1. Avaliação macroscópica

As análises morfológicas macroscópicas foram realizadas por cálculo integral de áreas irregulares onde foram diferenciadas as áreas total e da ZLP comparando as matrizes LPRF obtidas nos três tipos de centrífugas elencadas. Exclusivamente para a análise macroscópica as amostras foram submetidas à mesma FCR (200 x g) e Δt (10 minutos). Após a obtenção dos espécimes, as matrizes foram comprimidas no dispositivo cirúrgico FibrinBox (Fibrin System, Brasil) com drenagem do excesso de soro para formação das membranas de L-PRF. As amostras foram posicionadas sobre uma superfície metálica para o registro fotográfico referenciado com escala métrica em milímetros. As mensurações da área total da matriz e da ZLP foram feitas utilizando o planímetro digital do *software* Autocad (Autodesk, USA).

2.6.2. Microscopia óptica

As amostras de fibrina foram fixadas em formaldeído (Merck, Alemanha), tamponado em pH 7.2 com tampão fostato (PBS), processadas para as análises histopatológicas por microscopia de luz. Inicialmente os espécimes depois de fixados, foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool (Merck, Alemanha) (70%, 80%, 90% e 3x 100%), diafanizados 2 vezes durante 30 minutos em xilol (Merck, Alemanha) e

impregnados 3 vezes em parafina a 60°C. Em seguida, as amostras foram emblocadas em parafina, seccionadas integralmente no micrótomo RM2125 (Leica Biosystems, Alemanha) em secções histológicas de 5 µm de espessura que foram então coletadas em lâminas para microscopia previamente enumeradas. Para obter os dados das análises histológicas das diferentes regiões que compõem a matriz de LPRF, grupos de 3 secções histológicas foram separadas nas técnicas de coloração (Hematoxilina & Eosina e Tricrômio de Gomori). Depois de coradas, as secções histológicas foram protegidas com lamínulas de vidro e resina sintética Enthelan (Sigma-Aldrich, Alemanha) e posteriormente digitalizadas no sistema de fotodocumentação Aperio (Leica Biosystems, Alemanha) para a coleta dos dados histológicos, qualitativos e morfométricos, de forma cega por único observador.

2.6.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Os coágulos de fibrina foram submetidos à fixação por imersão em solução de Glutaraldeído 1M (Merck, Alemanha) a 25% em tampão cacodilato de Sódio a 0,1M (C₂H₆AsNaO₂) (Sigma-Aldrich, Alemanha) por 24 horas a 4,0°C. Destes foram seccionados fragmentos das seguintes regiões desta matriz: a. corpo; b. ZPL e c. sedimento proximal, Figura 3. Os espécimes obtidos foram lavados em solução tampão cacodilato de Sódio a 0,1M e submetidos ao processo de impregnação por tetróxido de Ósmio (OsO₄) (Sigma-Aldrich, Alemanha) por 2 horas, lavados em banhos de água deionizada (Mili-Q, USA) e em sequência submetidos à desidratação em banhos sucessivos em solução de acetona (Merck, Alemanha) a 30, 50, 70, 80, 95% e dois banhos a 100%, onde cada banho durou 20 minutos. Ainda submerso na acetona 100% os espécimes foram introduzidos na câmara de secagem de ponto crítico CPD 030 (Balzers,

Alemanha) para desidratação em meio contendo CO₂ em fase líquida em condições controladas e crescentes de temperatura (4-5°C elevando para 40-45°C) e pressão de 72,9 atm. Em seguida os espécimes foram montados em suportes cilíndricos de cobre, fixados com adesivo condutivo de prata e submetidos à pulverização catódica SCD 050 (Balzers, Alemanha) para metalização por deposição e recobrimento de toda a amostra com partículas de ouro (Au) onde o desprendimento do cátodo foi feito por bombardeamento com íons de argônio (White Martins, Brasil). Para a obtenção das imagens as amostras foram colocadas em suporte de cobre, metalizadas e levadas ao microscópio eletrônico JSM 7001-F (JEOL, Japan) onde foram inseridas na câmara de vácuo com submissão ao feixe de elétrons para formação das imagens que foram digitalizadas, armazenadas no formato TIFF e digitalmente analisadas utilizando o *software* GIMP 2.10 (Cockroach Labs, USA). A obtenção digital das imagens foi feita por ampliações entre 20 e 45.000x nas diferentes regiões da matriz de fibrina.



Figura 3. Regiões da matriz de LPRF avaliadas na caracterização morfológica.

2.6.4. Fibrinólise in vitro por morfometria.

Fragmentos do corpo de matrizes de LPRF obtidos nas diferentes configurações paramétricas em função da FCR (200, 400 e 800 g) foram separados e condicionados em tubos plásticos isentos de aditivos (Greiner Bio-One, Brasil) onde foram mantidos a 37°, *in natura*, e fixados em fixador Karnovsky em intervalos de tempos de 0, 7, 14 e 21 dias. No primeiro dia, o ponto zero (0) do experimento, as amostras foram fixadas imediatamente após a sua obtenção. Seguindo o protocolo descrito acima para preparo de amostras para a MEV, as amostras foram submetidas à análise para a obtenção de imagens com grandes magnitudes de ampliação, 10.000x e 20.000x. As mesmas serviram para o estudo morfométrico onde foram avaliados 5 campos microscópicos de 100µm² nas ampliações de 10.000x e de 25µm² nas de 20.000x. Foram realizadas 20 mensurações do diâmetro das fibras de fibrina utilizando o planímetro digital do *software* Autocad (Autodesk, USA) e os dados foram processados no *software* GraphPadPrism 8 (GraphPad, USA) para o tratamento estatístico, geração e edição dos gráficos.

2.6.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão os espécimes de LPRF foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M em água deionizada, pH 7,2. Após a fixação a 4°C *overnight*, foram realizadas três lavagens de aproximadamente 15 minutos usando tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após as lavagens, foi feita a pós-fixação, no escuro, em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora à

temperatura ambiente. Novas lavagens usando o mesmo tampão foram realizadas e as amostras foram então desidratadas em acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (duas vezes) por aproximadamente 15 minutos cada, à temperatura ambiente. Posteriormente, à etapa de impregnação com resina PolyBed 812 (PolySciences, USA) seguiu-se as etapas à temperatura ambiente: *overnight* em uma solução de acetona/resina 2:1, 8h em solução acetona/resina 1:1, *overnight* em solução de 1:2, 8h em resina pura. A polimerização ocorreu a 60°C por 48 horas. As secções semi-finas (0,5 µm a 2 µm) foram feitas no micrótomo automatizado RM2255 (Leica, Alemanha) com navalha de vidro obtida no Leica EMKMR2 Knifemaker (Leica, Alemanha). Estas secções foram coradas com azul de toluidina sobre uma placa aquecida (70°C a 90°C) e foram examinadas por microscopia óptica com ampliações de 400x para identificação estrutural da região da peletização leucoplaquetária (ZPL). Os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante Diatome 45° MP3100 (Diatome, Suíça) e contrastados em uma solução aquosa de acetato de uranila 2,5% durante 20 minutos, sob fotoproteção e citrato de chumbo por 1 minuto. Após a etapa de preparo dos espécimes em micro telas, os mesmos foram observados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 100CXII (Jeol, Japan) onde as micrografias foram obtidas e posteriormente analisadas utilizando o software GIMP 2.10 (Cockroach Labs, USA).

3. Resultados

3.1. Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica a matriz de fibrina apresentou 3 regiões distintas onde, de acordo com a densidade diferencial, os elementos figurados do sangue foram aglomerados em função da separação seletiva promovida pela centrifugação de baixa rotação em rotores de ângulos fixos. As matrizes de LPRF obtidas em FF25 exibiram no seu corpo uma extensão ascendente da zona de peletização leucoplaquetária (ZPL). O mesmo foi observado em EBA200, contudo com menores proporções. As amostras obtidas em 80-2B não exibiram tal extensão, ficando restrita à área referente ao diâmetro do tubo. A região do sedimento imediatamente abaixo da ZPL apresentou células mononucleares em meio aos eritrócitos e polimorfonucleares. Estes dados serão ilustrados pela caracterização morfológica macroscópica e microscópica nas sessões seguintes.

A avaliação macroscópica das matrizes de LPRF revelou o efeito da angulação sobre as dimensões totais das membranas, bem como sobre a extensão ascendente da ZPL. O corpo da matriz exibiu dimensões inversamente proporcionais ao ângulo do rotor de centrifugação.

As matrizes obtidas nas três centrífugas apresentaram significativas diferenças macroscópicas, $p < 0,05$, bem como sobre a estratificação dos elementos sanguíneos, uma vez que foram observados eritrócitos e leucócitos impregnados nas porções internas do corpo das matrizes obtidas nas centrífugas FF25 e EBA200. As amostras obtidas em FF25 apresentaram significativo aumento na superfície da ZPL, $p = 0,0059$; ANOVA.



Figura 4. Macroscopia da matriz de LPRF obtida em FF25 a 200xg/10 minutos; escala 2:1 cm. **1)** Corpo da matriz com extensão ascendente do conteúdo leucoplaquetário*; **2)** Zona de peletização leucoplaquetária (ZPL); **3)** Sedimento superior integrado à matriz. Esta região concentra muitas células mononucleares.

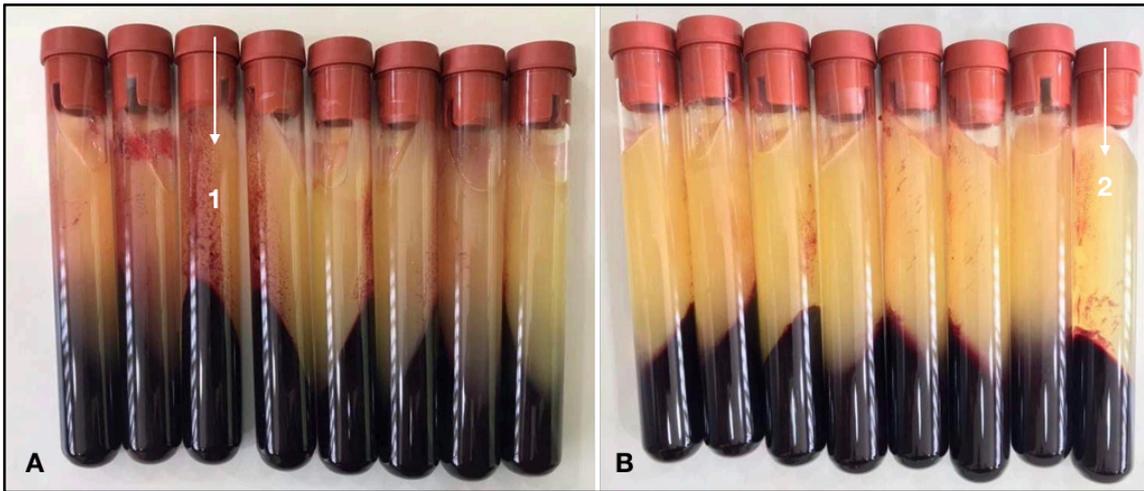


Figura 5. Diferenças macroscópicas das matrizes de LPRF obtidas em diferentes angulações: **A)** 25°, a impregnação de eritrócitos na periferia da matriz demonstrou que a força aplicada “arrastou” o conteúdo celular para a porção superior da matriz (extensão ascendente). **B)** 45°, as matrizes mais “límpidas” ilustram que a maior fração leucoplaquetária encontra-se adstrita à ZPL.

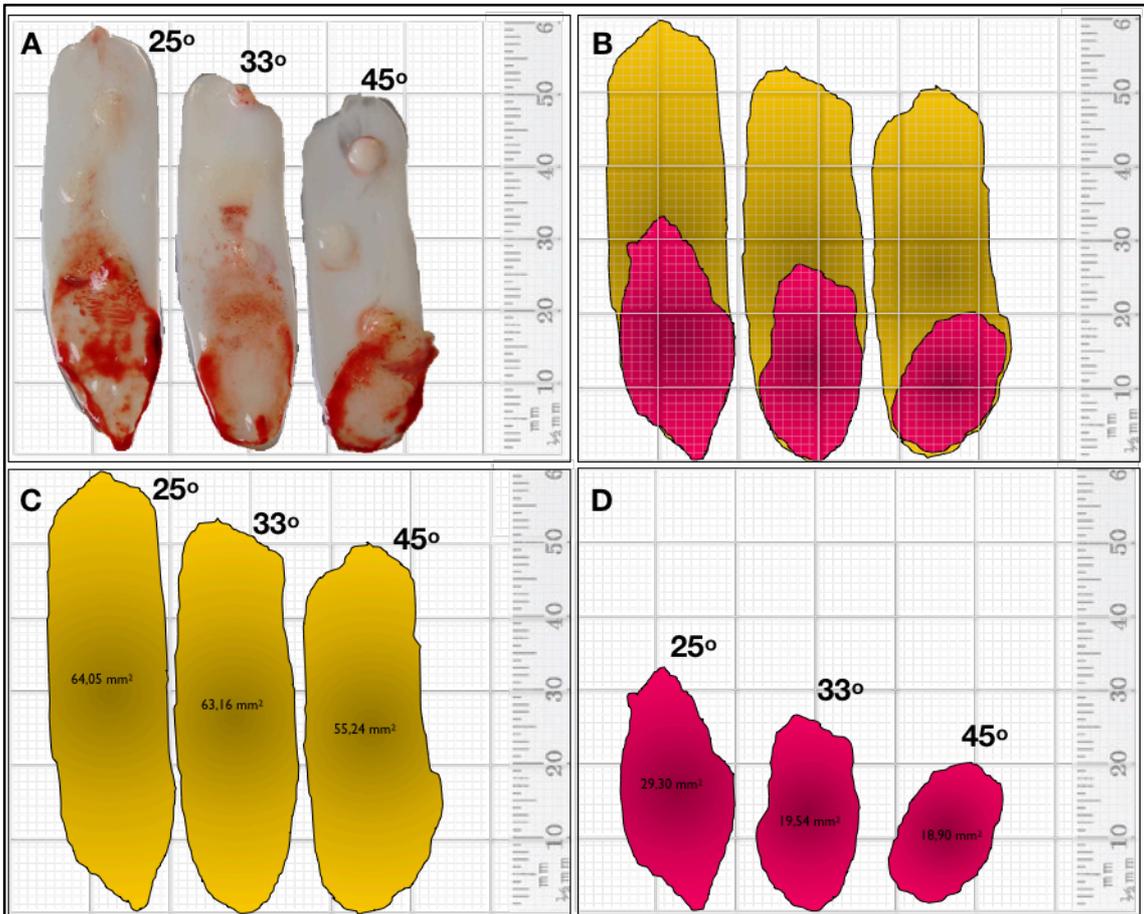


Figura 6. Diferenças dimensionais na avaliação macroscópica das matrizes de LPRF obtidas em diferentes angulações. A escala foi padronizada em mm². A área total dos espécimes obtidos com ângulo de 25° foi 13,6% maior que as observadas em 33° e 45°. Já a ZPL foi aproximadamente 37% maior.

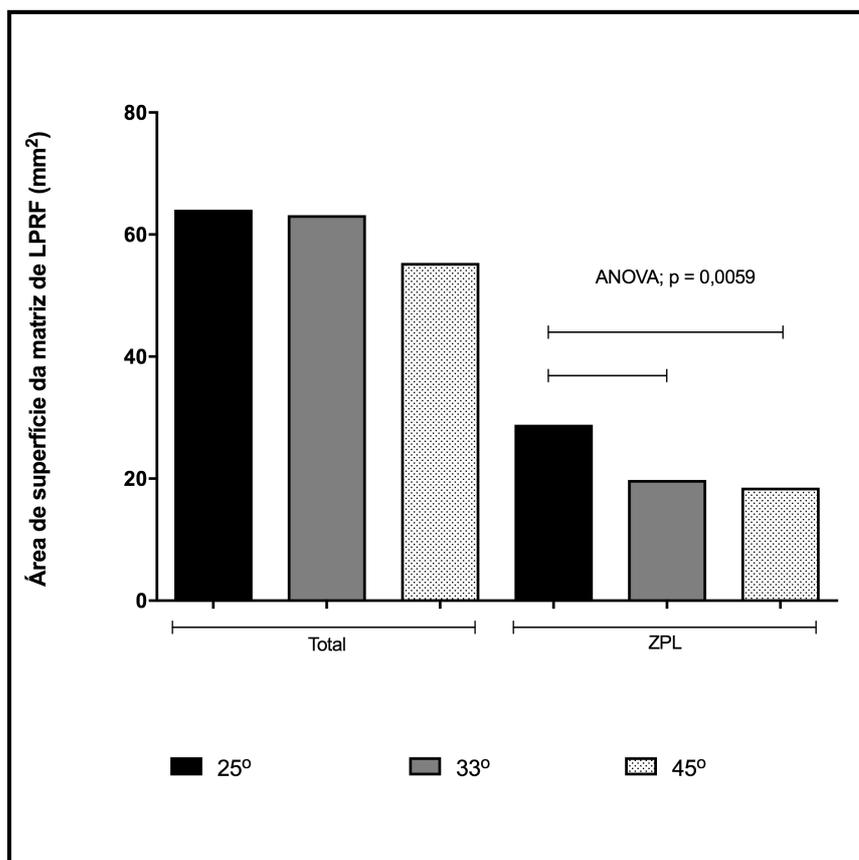


Figura 7. Comparação das áreas de superfície total e da ZPL das matrizes de LPRF obtidas em diferentes angulações de rotores. Todas as amostras, n=5, foram centrifugadas à FCR de 200 xg. Não houve diferença significativa nas áreas totais, embora o ângulo de 25° tenha apresentado a maior área das três análises e em especial a superfície da ZPL com diferença significativa, p = 0,0059; ANOVA, em relação às outras duas amostras.

Tabela 1. Área total e da ZPL das matrizes de LPRF

	Área mm ²	
	Superfície Total (mm ²)	Superfície de ZPL (mm ²)
25°	64,05 ± 1,70	28,84 ± 1,19*
33°	63,16 ± 2,45	19,77 ± 1,55
45°	55,34 ± 2,50	18,54 ± 1,01

Tabela 1. Comparação das áreas de superfície total e da ZPL das matrizes de LPRF obtidas em diferentes angulações de rotores (n=5). As áreas totais apresentaram dimensões aproximadas, mesmo as amostras obtidas com ângulo de 25° tendo apresentando-se maiores.

3.2. Avaliação Microscópica

As micrografias das matrizes de LPRF foram analisadas pela seleção de imagens representativas das condições experimentais propostas neste estudo.

3.2.1. Organização estrutural geral da matriz de LPRF

A microscopia óptica demonstrou as características de alta concentração leucoplaquetária, especialmente de mononucleares na ZPL. Na zona sobrenadante, que compreende todo o corpo do coágulo, uma densa matriz de fibrina com a notória presença de plaquetas entremeadas e de pequenos corpúsculos densos impregnados. A porção superior da matriz, próxima à tampa do tubo, foi caracterizada apenas pela presença das fibras de fibrina em denso arranjo estrutural.

A centrifugação como método de fracionamento seletivo dos elementos sanguíneos proporcionou uma estratificação de acordo com a densidade de cada fração. Deste modo, o plasma sanguíneo e seu conteúdo proteico, de onde derivam os substratos da matriz de fibrina e apesar da alta viscosidade, constituem o extrato sobrenadante após a centrifugação, cuja densidade relativa é de 1,020 g/dL. A matriz polimérica de fibrina apresenta-se nesta porção e a depender da FCR aplicada os corpúsculos de maior densidade, os eritrócitos 1,095 g/dL, sedimentam-se primeiro deixando o sobrenadante livre para a formação da matriz de fibrina isenta destes. A mesma eficiência da sedimentação proporcionou o efeito inverso sobre os corpúsculos de menor densidade elevando-os para ZLP, este efeito foi demonstrado na avaliação macroscópica e ratificado pelas microscopias óptica e eletrônica de varredura

As plaquetas possuem densidade de 1,040 g/dL e os leucócitos dividem-se em duas categorias com densidades distintas, polimorfonucleares 1,080 g/dL e mononucleares 1,060 g/dL. No experimento de contagem celular, capítulo 3 deste manuscrito, observou-se que cerca de 50% dos neutrófilos são sedimentados durante a centrifugação e que a maior concentração leucocitária foi de linfócitos, especialmente com FCRs de 200 e 400 x g. Estas propriedades proporcionaram características diferenciais em relação às variações paramétricas. Entretanto, de modo geral a matriz de LPRF apresentou sedimento de eritrócitos enriquecidos com neutrófilos, ZPL com maior abundância de mononucleares e plaquetas concentradas na ZPL e na porção distal do corpo da matriz, figura 8.

A figura 9 ilustrada por micrografias de varredura com magnificações crescentes entre 500 e 45.000x demonstraram o nível de organização desta porção denominada “corpo da matriz” exibindo a densificação de fibras e fibrilas pela ausência dos eritrócitos. Sua organização estrutural assemelhou-se a uma autêntica matriz de colágeno, entretanto, ressalvadas as devidas proporções de magnitudes, uma vez que as fibras colágenas são mais espessas. A literatura internacional sobre a LPRF a definiu como um ambiente propício à acomodação celular. Entretanto, poucas são as publicações que apresentaram sua caracterização morfológica com distintas magnitudes com ênfase na ilustração ultraestrutural. O aumento de 14.000x demonstrou a rugosidade típica das fibras e fibrilas de fibrina. Esta característica deve-se à impregnação de conteúdo exossômico leucoplaquetário, bem como de micropartículas circulantes e peptídeos plasmáticos que conferem o alto grau de adesividade desta matriz.

Mourão *et al*, 2018 discorreram sobre o papel hemostático da matriz de LPRF em função das suas propriedades adesivas correlacionadas a este conteúdo⁴².

A magnificação de 45.000x demonstrou a sobreposição paralela e helicoidal das fibrilas de fibrina, isto contribuiu para justificar a elasticidade adquirida por esta matriz e sua importância clínica configurando um meio mecânico, hemostático e adesivo para proteção de leitos cirúrgicos.

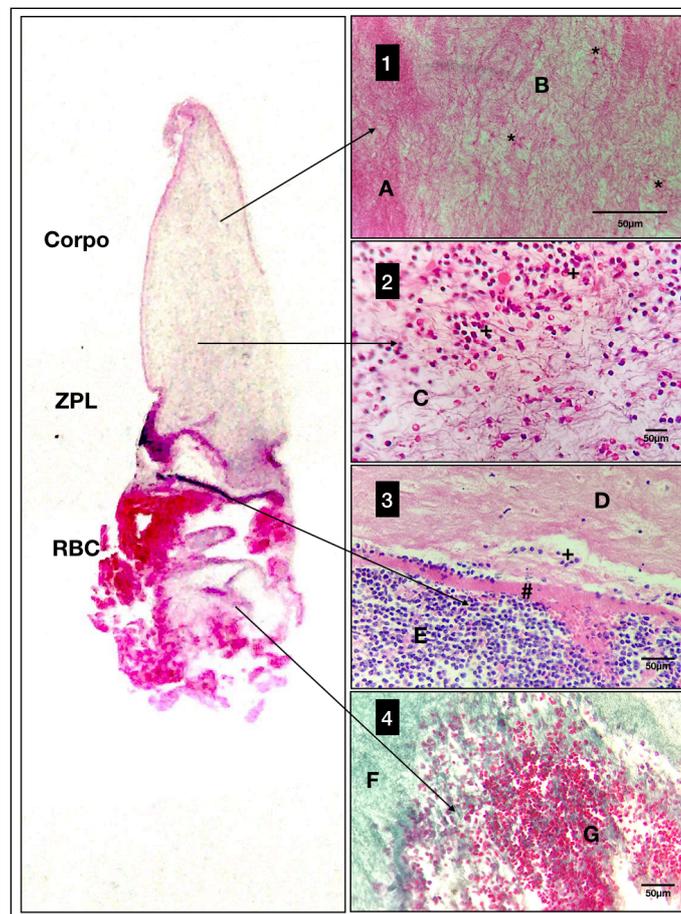


Figura 8. Micrografias obtidas por microscopia óptica com aumentos de 40x, 100x e 200x da matriz de LPRF obtida em 80-2B a 400 xg/10 min. **1) HE.** Região superior do corpo da matriz de LPRF com ampliação de 40x; em **A** zona de maior densidade das fibras de fibrina; em **B** região de menor densidade; * plaquetas discretamente aglomeradas. **2) HE.** Região central do corpo exibindo leucócitos entremeados à matriz de fibrina; em **C** fibras de fibrina; + aglomerações mononucleares. **3) HE.** Zona de peletização leucoplaquetária (ZPL); em **D** zona dessa de fibrina representando a porção distal do corpo da matriz e em **E** a faixa de alta concentração leucoplaquetária observada; # zona limítrofe com densa matriz de fibrina. **4) Tricrômio de Gomori.** Zona do sedimento proximal com alta impregnação de eritrócitos.

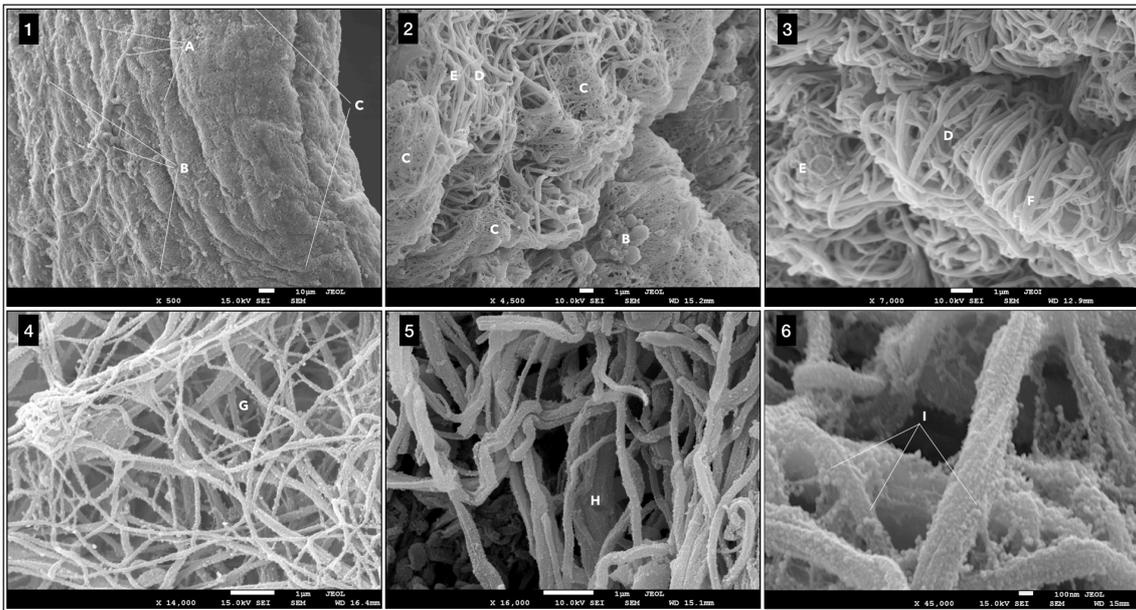


Figura 9. Micrografia da matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg/10 minutos com aumento de 500x. A) Plaquetas expostas na superfície do corpo da matriz; B) Aglomerações leucoplaquetárias - células e plaquetas dispersas na superfície; **2.** Micrografia da matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg/10 minutos com aumento de 4.500x. C) Densificação superficial em espécie de película adesiva com aglomeração de fibrilas em forragem. D) Superfície envelada; E) Fibrilas simples. **3.** Micrografia da matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg/10 minutos com aumento de 7.000x. F) Densa rede envelada com fibras com diâmetros variáveis em função da aglomeração em justaposição paralela de fibrilas. **4.** Micrografia da matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg/10 minutos com aumento de 14.000x. Fibrilas e fibras de fibrina com exposição de conteúdo proteico e exossômico impregnado em suas superfícies; **5.** Micrografia da matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg/10 minutos com aumento de 16.000x H) Feixes de fibras paralelas; **6.** Micrografia da matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg/10 minutos com aumento de 45.000x I) Superfície de uma fibra com sobreposição de fibrilas, conteúdo exossômico superficial e alinhamento dos monômeros peptídicos na formação polimérica da fibrila de fibrina.

3.2.2. Organização e distribuição leucoplaquetária em função do ângulo do rotor

Na avaliação macroscópica, a maior área de peletização confirmou a proposta metodológica que foi ratificada pela caracterização microscópica por MO e MEV nas Figuras 10, 11 e 12 onde observou-se comparativamente o nível de impregnação celular nas porções internas do corpo da matriz. Os espécimes obtidos por centrifugação na centrífuga FF25 demonstraram diferenças no padrão de distribuição celular e plaquetária, onde observou-se alto conteúdo leucoplaquetário intrínseco no corpo da matriz, e não apenas adstrito à ZPL. As secções transversais do corpo do coágulo, em sua porção média, demonstraram a impregnação celular no interior da matriz.

A análise histológica por MO demonstrou diferentes padrões de estratificação seletiva dos componentes sanguíneos em função do ângulo. As matrizes obtidas na centrífuga FF25 demonstraram presença de leucócitos em todas as regiões da matriz. Isto ficou evidenciado pela presença de pequenas zonas de alta concentração mononuclear e plaquetária envoltas pela matriz de fibrina. De modo semelhante, porém com menor grau de evidência a EBA200 também apresentou leucócitos nas frações superiores da matriz. A 80-2B foi que apresentou menor ocorrência de leucócitos impregnados nas porções acima da ZPL, onde foi verificada a alta concentração de mononucleares. No capítulo 2 deste manuscrito, a contagem celular revelou características que corroboram com os resultados deste estudo histológico. O sedimento de eritrócitos revelou a presença significativa de neutrófilos. Este dado justifica-se pelos valores de densidade corpuscular relativa entre estes dois entes celulares, 1,095 e

1,080g/mL, respectivamente. De modo semelhante, a contagem celular por citometria de fluxo abordada no capítulo anterior revelou a alta concentração relativa de polimorfonucleares no sedimento.

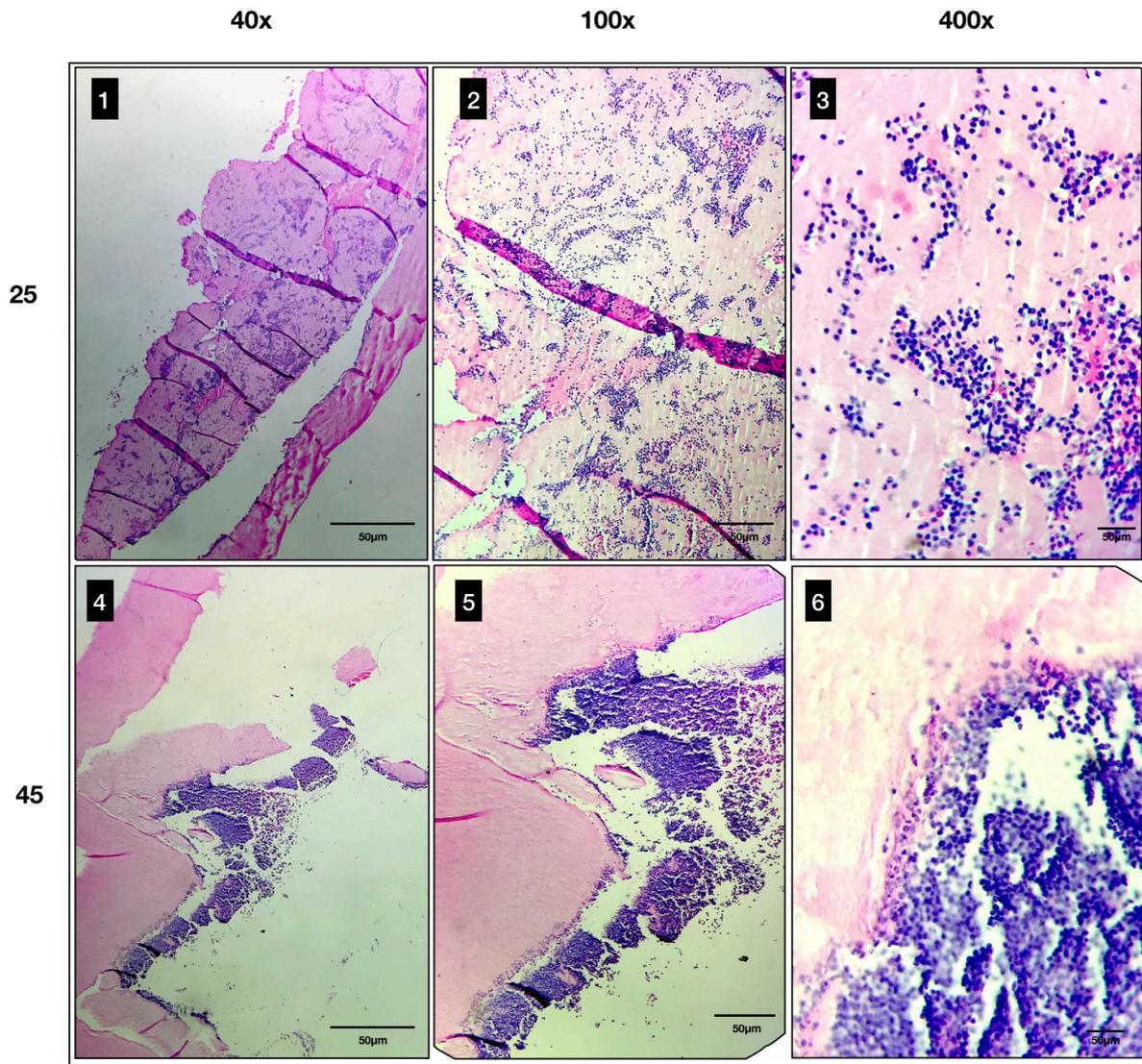


Figura 10. Micrografias obtidas por microscopia óptica com aumentos de 40x, 100x e 200x das matrizes de LPRF obtidas em FF25 (1, 2 e 3) e em 80-2B (4, 5 e 6) ambas a 200g/10 min coradas em HE. Em 1 observou-se um campo da região média do corpo da matriz de LPRF com ampliação de 40x; demonstrando a impregnação de monoculares de núcleos basofílicos densos, típicos de linfócitos, no leito do corpo da matriz de fibrina; * Dobras do processamento histotécnico com sobreposição de conteúdo. Em 2 e 3, as ampliações de 100x e 200x da mesma região. Em 4, 5 e 6 distintas ampliações da região inferior do corpo da matriz de LPRF, junta à ZPL, demonstrando concentração marginal de mononucleares sem evidência de células impregnadas no leito da matriz de fibrina.

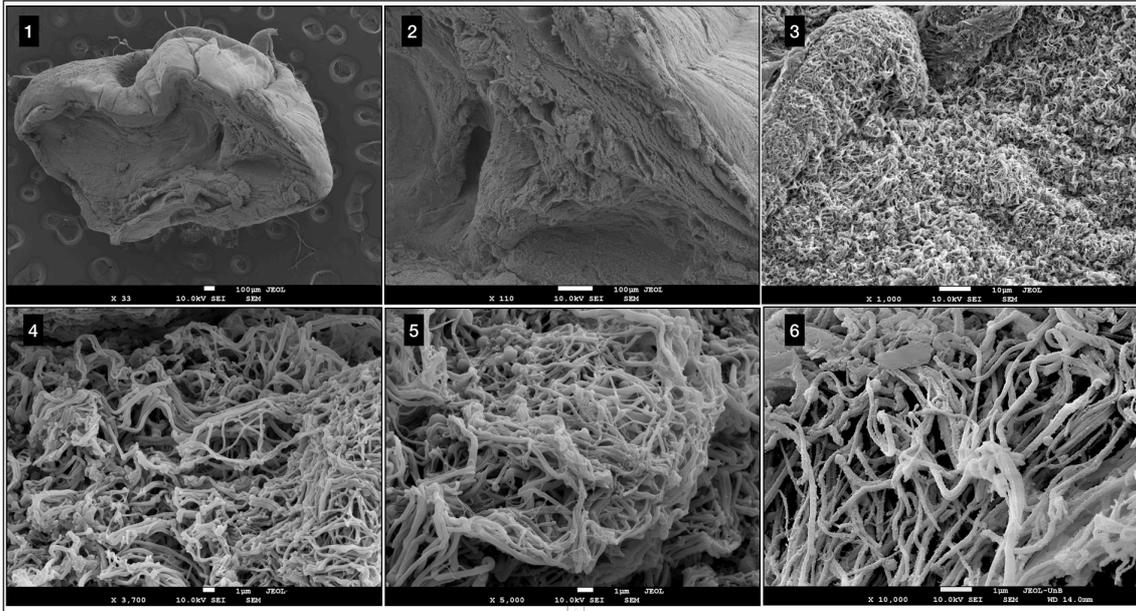


Figura 11. Micrografias de fragmento do corpo da matriz de LPRF obtida em 80-2B a 400xg /10 min com aumentos de 33x, 110x, 1.000x, 3.700x, 5.000x e 10.000x. Fibras e fibrilas de fibrina condensadas, pequenas aglomerações plaquetárias e exposição de conteúdo exossômico superficial.

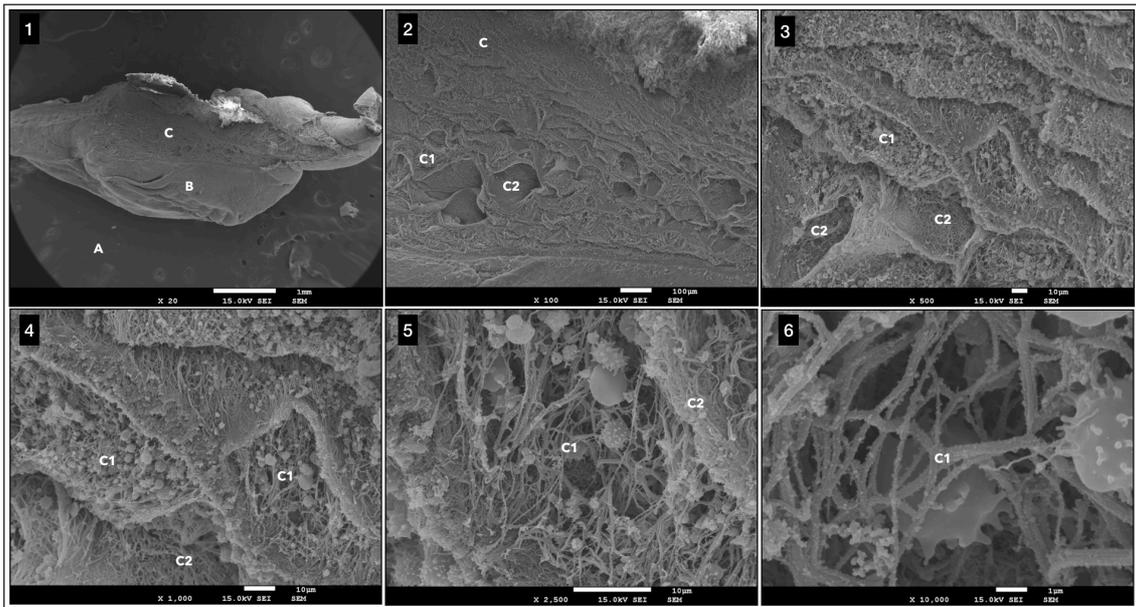


Figura 12. 1. Micrografia da matriz de fibrina de um corte transversal do corpo obtida em FF25 a 200xg/10min com aumento de 20x. A) Fundo do suporte metálico; B) Região periférica da matriz de fibrina; C) Região central da matriz; **2.** Micrografia com aumento de 100x do corte transversal **C** exibindo áreas **C1** (fibrilas com impregnação celular) e **C2** (bordas de fibrina densas delimitando câmaras ou espaços); **3.** Ampliação da zona **C1** com evidente aglomeração celular e plaquetária no centro da matriz; **D). 4, 5 e 6.** Ampliações de 1.000x, 2.500x e 10.000x demonstrando a presença de leucócitos e plaquetas íntegros no interior da rede tridimensional de fibrina e fibras e fibrilas com rugosidade superficial marcada por impregnação de exossomos e peptídeos.

3.2.3. Integridade e morfologias celular e plaquetária

A investigação morfológica na ZPL buscou verificar as influências das variações paramétricas sobre o conteúdo plaquetário, tais como integridade e a concentração celular. A Figura 13 ilustrou em diferentes magnitudes as características das plaquetas e leucócitos observados nesta zona. A ativação plaquetária, mecanismo fundamental para sua liberação de grânulos onde encontram-se os fatores de crescimentos e outras importantes proteínas com atividades no reparo tecidual, ocorreu naturalmente em virtude da formação do coágulo e foi caracterizada pelas alterações morfológicas exibidas. A concentração superficial na zona de peletização, a ativação e sua preservação estrutural funcional foram características exibidas.

As plaquetas apresentaram-se como corpúsculos de superfície rugosa, aglomerados e com tamanhos variáveis em média de $3,0 \pm 2,0\mu\text{m}$ exibindo extensas projeções corpusculares em pseudópodos. Os leucócitos apresentaram-se como células com superfície muito rugosa, sempre intimamente associados às plaquetas em sua superfície ou aglomerados entre si medindo $17,0 \pm 7,0\mu\text{m}$. A rede de fibrina exibiu muitas variações na sua organização tridimensional de acordo com a zona ou região de análise e/ou do grau de magnitude. Os aumentos acima de 5.000x exibiram sua organização ultraestrutural com conjuntos de fibras e fibrilas em cadeias poliméricas com a presença de rico conteúdo proteico e exossômico impregnado nas suas superfícies.

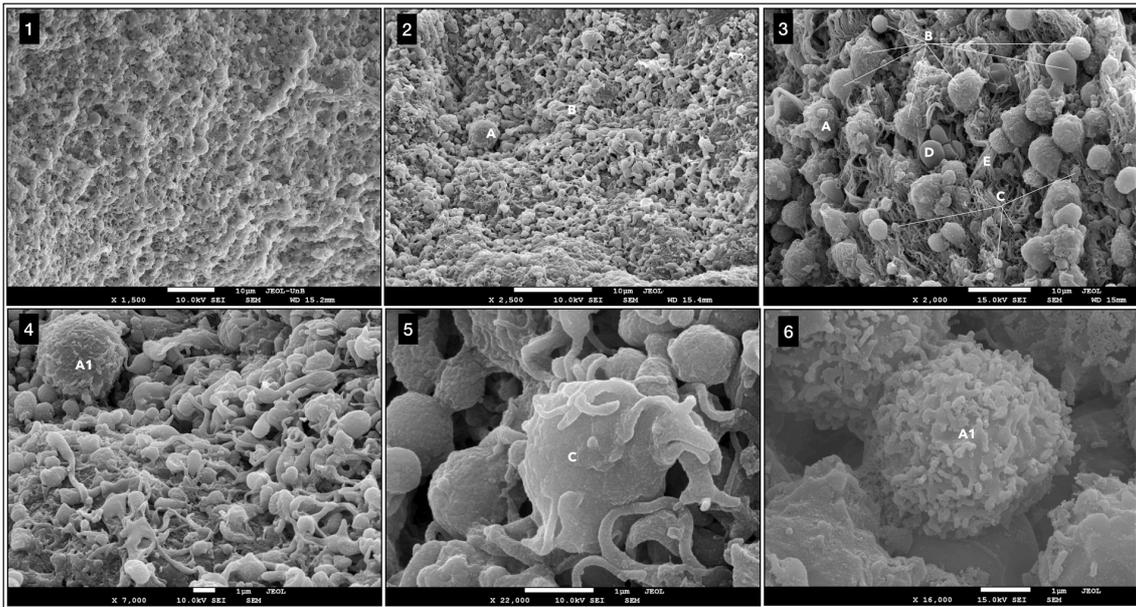


Figura 13. 1. Micrografia da zona de peletização leucoplaquetária (ZLP) da matriz de LPRF obtida em FF25 a 200xg/10min com aumento de 1.500x. 2. ZLP evidenciando alta concentração de plaquetas ativadas e leucócitos (A) 3. Micrografia da ZLP com aumento de 2.000x, Leucócitos com superfícies rugosas (B); Plaquetas apreendidas na superfície (C); Eritrócitos comprimidos pelas fibras de fibrina (D); Feixe de fibras de fibrina (E). 4. Vista topográfica da ZLP exibindo alta concentração plaquetária por área; 7000 plaquetas/mm²; Leucócito mononuclear (A1); 5. Plaqueta ativada com projeções em pseudópodos 22.000x; 6. Superfície celular granulosa típica de linfócitos ativados 16.000x.

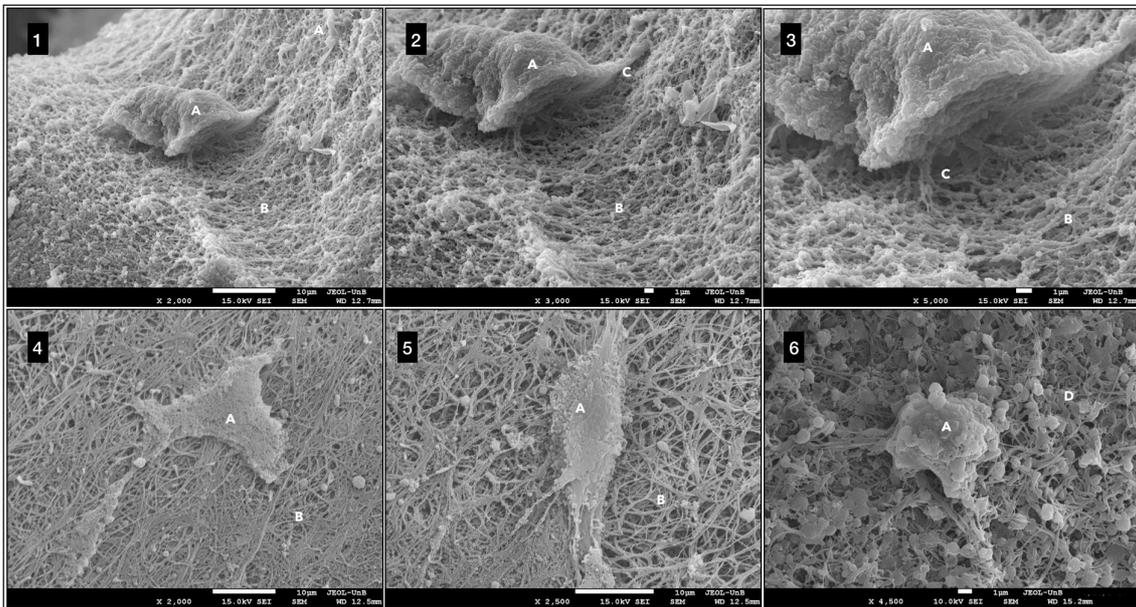


Figura 14. 1-5. Células mononucleares (A) espalhadas aderidas sob a superfície da matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg / 10 min (B) com aumentos de 2.000x, 2.500x; 3.000x e 5.000x, 3.000x. 6. Plaquetas ativadas aderidas à superfície do leucócito.

O conteúdo leucocitário, predominantemente de mononucleares, também apresentou manutenção de sua estrutura morfológica e evidências funcionais de sua íntima interação com a matriz. A Figura 14 apresentou uma célula mononuclear com alterações morfológicas estruturais típicas de espriamento e projeções citoplasmáticas para comunicação entre a célula e a matriz. Também ilustrou leucócitos espriados na superfície da matriz de fibrina e a adesão de plaquetas na superfície leucocitária. O conteúdo proteico de origem plaquetária é retratado como o principal componente funcional das matrizes de LPRF para promover sinalização celular *in situ*. Deste modo, análises microscópicas por microscopia eletrônica de transmissão da ZLP de uma matriz de LPRF permitiu a visualização de plaquetas íntegras, ativadas e em atividade de exocitose, além da demonstração dos grânulos plaquetários. Figura 15.

2.1.1. Densidade das matrizes de fibrina com e sem compactação mecânica;

Uma das principais formas de aplicação clínica das matrizes de LPRF é no formato de membranas. Para tal é possível utilizar mecanismos de compressão mecânica comprimindo-as manualmente com gaze estéril, o que as torna mais desidratadas pela rápida absorção do soro, ou com o dispositivo cirúrgico Fibrinbox (Montserrat, Brasil) para compressão mecânica que as mantém hidratadas. Na Figura 16 são apresentadas micrografias de membranas de LPRF comprimidas no formato de membranas exibindo alto grau de compactação evidenciado pela sobreposição de conjuntos de fibras e fibrilas de fibrina.

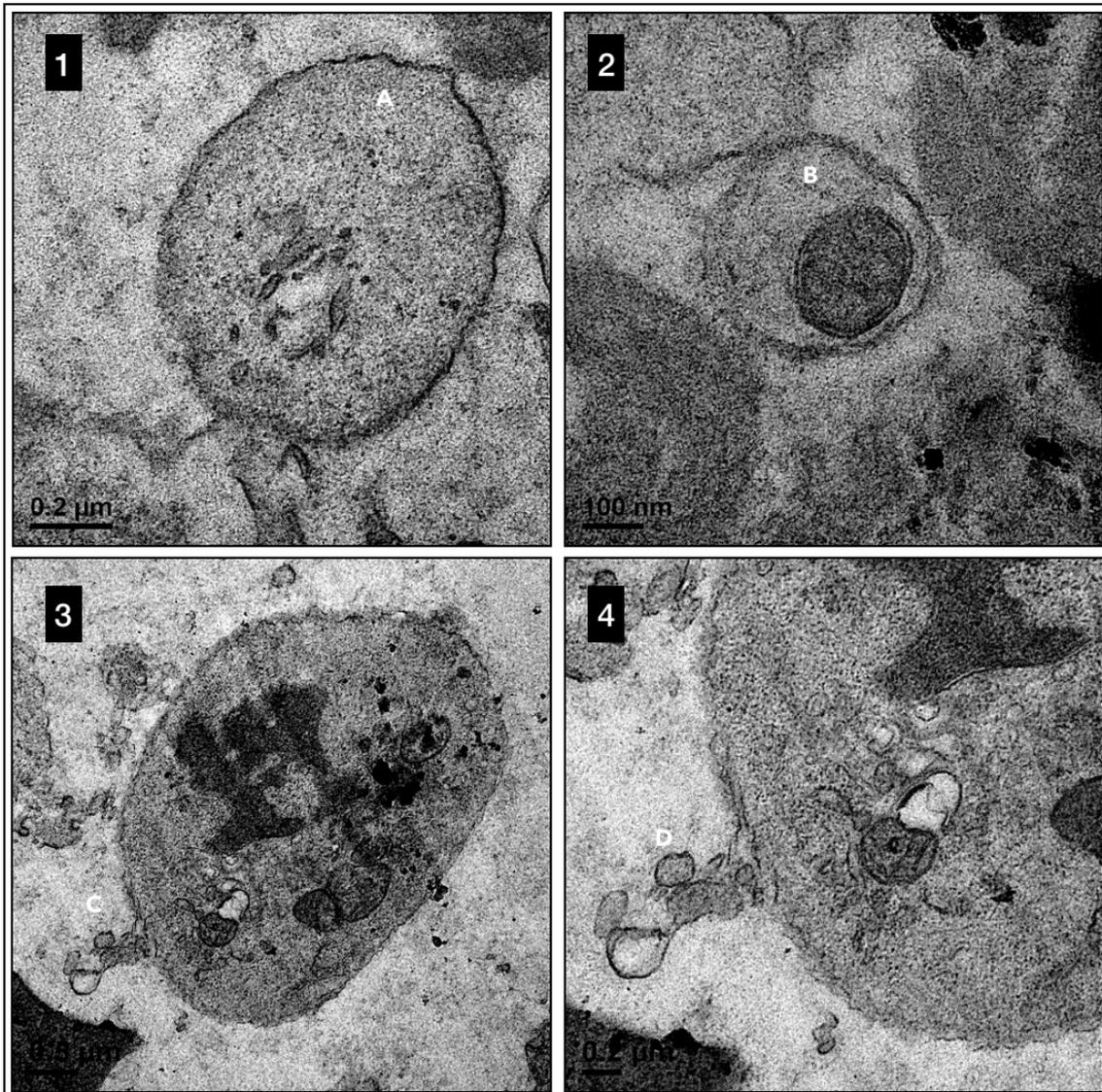


Figura 15. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão a partir da ZPL de uma matriz de fibrina obtida em FF25 a 200xg /10 min com aumentos de **1.** 25.000x; **2.** 150.000x; **3.** 100.000x e **4.** 150.000x. **A)** Plaqueta em fase de ativação com aproximadamente 1,2μm de diâmetro, exibindo membrana íntegra e conteúdo citoplasmático com formações granulares eletrodensas; **B)** Grânulo denso plaquetário íntegro de aproximadamente 350nm de diâmetro com nucléolo eletrodense típico, pela alta concentração de cálcio, com diâmetro de 180nm; **C)** Plaqueta ativada exibindo membrana íntegra e exocitose de grânulos. Zonas eletrodensas típica de grânulos alfa, lisossomos e mitocôndrias na região central do seu citoplasma. Pequenas áreas circulares claras de baixa eletrodensidade são sugestivas de canalículos citoplasmáticos. **D)** Ampliação da zona de exocitose plaquetária com a exibição de grânulos medindo entre 100 e 300nm. Na região intracelular granulometria diversa e canalículos citoplasmáticos.

2.1.2. Densidade das matrizes de fibrina com e sem compactação mecânica;

Uma das principais formas de aplicação clínica das matrizes de LPRF é no formato de membranas. Para tal é possível utilizar mecanismos de compressão mecânica comprimindo-as manualmente com gaze estéril, o que as torna mais desidratadas pela rápida absorção do soro, ou com o dispositivo cirúrgico Fibrinbox (Montserrat, Brasil) para compressão mecânica que as mantém hidratadas. Na Figura 16 são apresentadas micrografias de membranas de LPRF comprimidas no formato de membranas exibindo alto grau de compactação evidenciado pela sobreposição de conjuntos de fibras e fibrilas de fibrina.

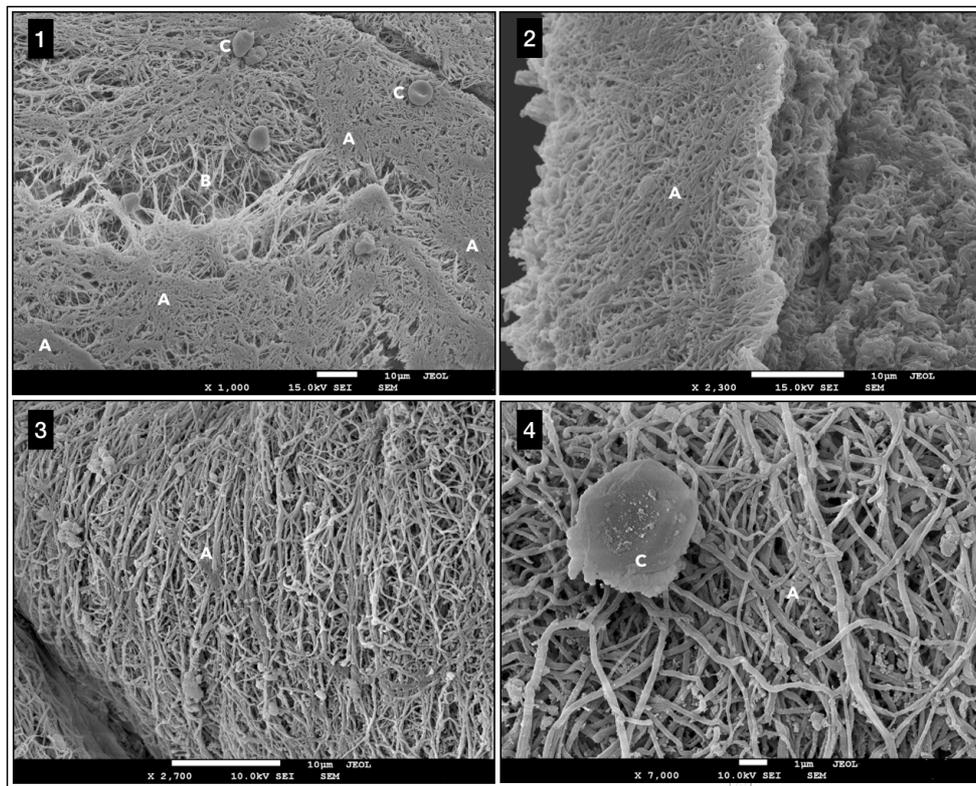


Figura 16. Micrografias da matriz de fibrina obtida em FF25 a 400xg /10 min com aumentos de 1.000x, 2.300x, 2.700x e 7.000x. **A)** Regiões de alta compactação da matriz de fibrina em forma de membrana em função do peso aplicado de 150 gramas durante 5 minutos para drenagem de soro; **B)** Regiões de menor densidade das fibras; **C)** Eritrócito esmagado na superfície da matriz de fibrina.

2.1.3. Presença de artefatos exógenos (ativadores do coágulo);

Os tubos usualmente utilizados para as coletas em sistema de vácuo para análises sorológicas podem ser de vidro sem adição de nenhum agente químico ou tubos plásticos adicionados de ativadores de coágulo, óxido de silício (SiO_2), impregnado em sua face interna⁴³.

O SiO_2 amorfo comporta-se como promotor da ativação plaquetária desencadeando aceleração da formação e retração do coágulo por oxidação do fator XII, fator de Hageman⁴⁴. Isso desencadeia a ativação por contato da via intrínseca até à clivagem do fibrinogênio, culminando na rápida e amplificada polimerização deste em cadeias poliméricas.

A quantidade de sílica impregnada nos tubos plásticos com ativador de coágulo para tal propósito acelera a sobremaneira a retração do coágulo. Enquanto no tubo de vidro o tempo de retração do coágulo ocorre entre 20 e 30 minutos, no tubo plástico impregnado de sílica ocorre entre 10 e 15 minutos. Esse tempo pode variar entre diferentes marcas por suas respectivas concentrações e fontes de silício⁴⁴.

O SiO_2 tem sido utilizado na fabricação de tubos para coleção à vácuo do sangue para fins diagnósticos. Sua introdução industrial ocorreu para prover maior proteção em biossegurança, o que tem recebido atenção e normativas sanitárias internacionais. Entretanto, as matrizes de LPRF, utilizadas terapeuticamente por reinserção no organismo, têm sido amplamente obtidas nestes tipos de tubos nos últimos anos, a partir das indicações metodológicas

propostas por Dohan *et al.* 2006. Apesar de não haver relatos na literatura de citotoxicidade ou agravos inflamatórios em decorrências do SiO₂, isto não é uma prova verídica de sua inexistência, uma vez que a sílica nas formas cristalina octaédrica e amorfa atuam como potencial indutor na síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Dohan *et al.* 2007⁴⁵ demonstraram ausência de citotoxicidade em hepatócitos, fibroblastos e queratinócitos humanos submetidos ao contato com o SiO₂ presentes nos tubos plásticos com ativador de coágulo. As formas moleculares compactas cristalinas ou amorfas do SiO₂ geram partículas com densidade maior que dos elementos sanguíneos. Isto parece conferir um certo grau de segurança em relação à sedimentação destas partículas durante a centrifugação para obtenção das matrizes de LPRF. Entretanto, é possível que tais partículas sejam capturadas durante a formação do coágulo. Para investigar esta proposição matrizes de LPRF foram obtidas com dois tipos de tubos plásticos com ativador de coágulo comerciais e analisadas por MEV. As Figuras 15 e 16 ilustram a impregnação destas partículas no leito da matriz de fibrina.

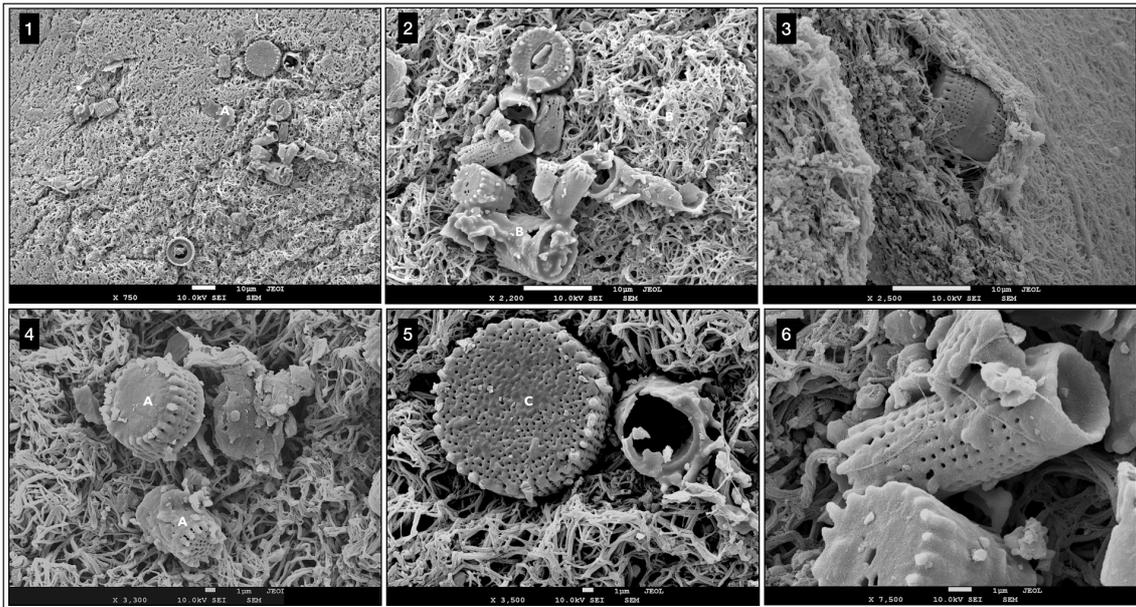


Figura 17. Micrografias da matriz de LPRF obtida em EBA200 a 400xg /12 min utilizando tubo plástico com ativador de coágulo Vacuette (Greiner Bio-One, Brasil) com aumentos de 750x, 2.200x, 2500x, 3330x, 3500x e 7500x exibindo frústolas de diatomáceas planctônicas entremeadas na matriz de LPRF. Também conhecidas como terra de diatomáceas, são utilizadas na indústria cosmética como esfoliantes. São arcabouços de dióxido de silício (SiO_2), por isto alguns fabricantes de tubos para diagnóstico in vitro as utilizam como ativador de coágulo A) *Staurosirella pinnata*; B) *Aulacoseira granulata*; C) *Thalassiosira eccentrica*.

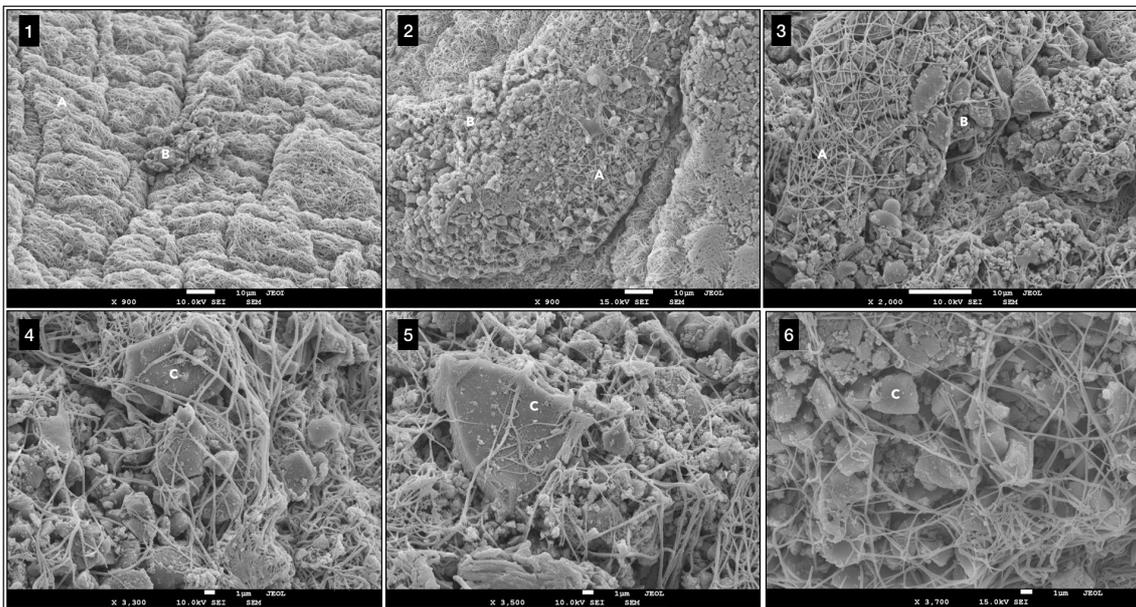


Figura 18. Micrografias da matriz de LPRF obtida em EBA200 a 400xg /12 min utilizando tubo plástico com ativador de coágulo BD (Becton Dickinson, USA) com aumentos de 900x, 2.000x, 2500x, 3300x, 3500x e 3700x exibindo cristais de sílica entremeados na matriz de LPRF. (A) rede de fibrina; (B) partículas de sílica envoltas por fibrina; (C) partículas compactas de sílica apresentando formas geométricas marcadas por superfícies lisas com bordas e vértices regulares.

2.1.4. Características morfológicas dos eritrócitos aderidos à matriz de LPRF

Os eritrócitos foram caracterizados como discos de superfície lisa medindo $7,0 \pm 1,0\mu\text{m}$, arredondados, bicôncavos e não-bicôncavos. Foram observados em grandes concentrações no sedimento proximal aderidos imediatamente abaixo da ZPL.

A Figura 17 ilustra em (1) a morfologia típica dos eritrócitos no formato de disco bicôncavo no sedimento e em (2) um aglomerado de eritrócitos envoltos por uma densa e superficial rede de fibrina. Este achado serve para explicar duas situações que ocorrem durante a obtenção da LPRF: a) a impregnação de uma parte do sedimento na matriz que apresenta significativa resistência mecânica à remoção. Esta porção foi denominada de sedimento proximal e apresenta resistência pela notória presença de fibrina; b) Em algumas ocasiões o conteúdo de fibrina da matriz de LPRF fica diminuído apresentando matrizes macroscopicamente reduzidas.

Nestes casos a polimerização do fibrinogênio pode ocorrer precocemente, até mesmo antes da centrifugação ou em seus instantes iniciais. Isto pode ocorrer devido à venopunção traumática onde o bisel da agulha fica em íntimo contato com o endotélio venoso e a pressão negativa do vácuo pode ser suficiente para lesá-lo expondo o conteúdo ao contato com o colágeno subendotelial. Em ambos os casos de precoce polimerização os eritrócitos, por causa da sua densidade elevada, “capturam” a fibrina para o sedimento.

Os eritrócitos observados na matriz de LPRF também foram manifestos na forma de equinócitos (hemácias crenadas) com a exibição típica de projeções em espículas e com formatos poliédricos, especialmente no sedimento proximal, em zonas adjuntas à ZPL. Estes eritrócitos poliédricos foram observados apenas nas matrizes fixadas após a retração do coágulo, Figuras 17:5-6. Weisel et al, 2015^{46,47} observaram que tal alteração morfológica nos eritrócitos ocorre em função da retração natural do coágulo, mas com maior expressividade em coágulos onde pode ser observada a alta concentração de cálcio, como por exemplo em trombos arteriais em decorrência da ruptura de placas ateroscleróticas. As observações de Weisel e colaboradores podem ser correlacionadas ao achado experimental do presente estudo devido à alta concentração de plaquetas ativadas que tornam o microambiente da LPRF enriquecido em cálcio pela degranulação dos grânulos densos plaquetários.

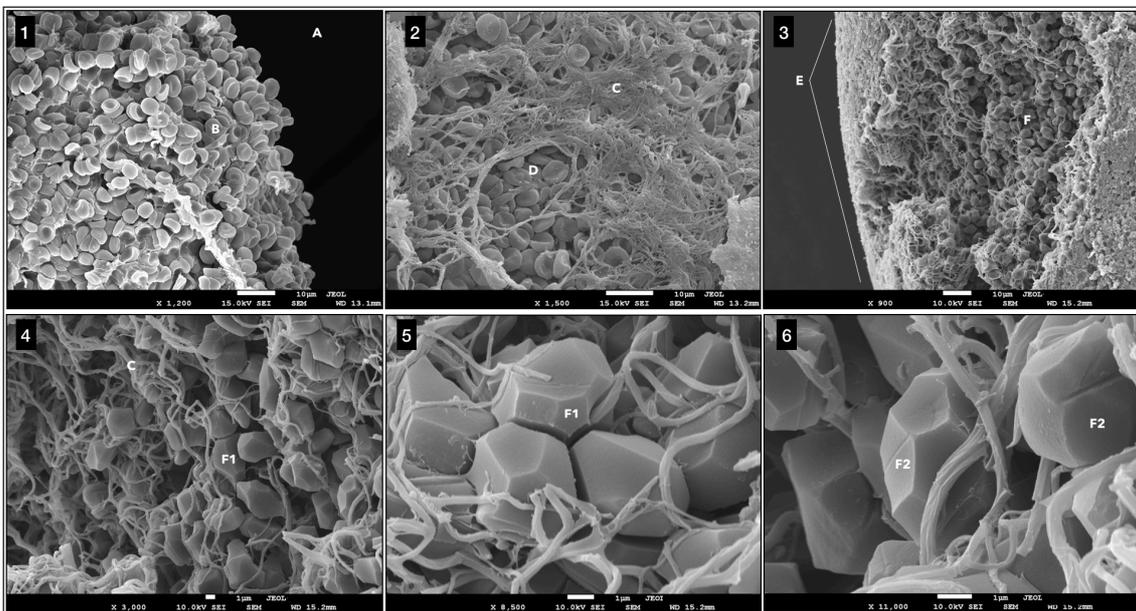


Figura 19. 1. Micrografias da porção proximal do sedimento de eritrócitos de uma matriz de fibrina obtida em EBA a 400xg / 10 min com aumentos de 900x, 1.200x, 1.500x, 3.000x, 8.500x e 11.000x. Sedimento com eritrócitos aglomerados (A); Eritrócitos em formato natural, disco bicôncavo (B); 2. Coágulo não-retraído com eritrócitos retidos por rede periférica de fibrina (C), área densa de fibrina tangente à parede do tubo (D); 3. Região superficial de coágulo retraído (E); eritrócitos em formatos poliédricos no centro (F); 4. Eritrócitos em formato poliédrico (F1); 5.

Eritrócitos compactados exibindo encaixe de adaptação; **6.** Superfície dos eritrócitos exibindo faces poliédricas lisas com delimitações lineares com conjugações em vértices.

2.1.5. LPRF x matriz extracelular conjuntiva x colágeno xenógeno.

A matriz de LPRF tem sido referenciada na literatura como um microambiente natural que mimetiza a matriz extracelular (MEC) atuando como arcabouço primordial nos mecanismos de reparo. As análises microscópicas por MO e MEV comparativas entre a matriz de LPRF, uma amostra de MEC obtida de material humano cadavérico e da matriz de colágeno de origem bovina Lumina coat (Critéria, Brasil) apresentou a similaridade da organização fibrilar ilustrando também as diferenças de magnitudes entre elas. Os feixes de fibras de fibrina apresentaram diâmetro médio de $0,25\mu\text{m}$ e as fibras colágenas bovina apresenta diâmetros variáveis entre 90 e $250\mu\text{m}$ e as fibras colágenas humana de 1 a $20\mu\text{m}$.

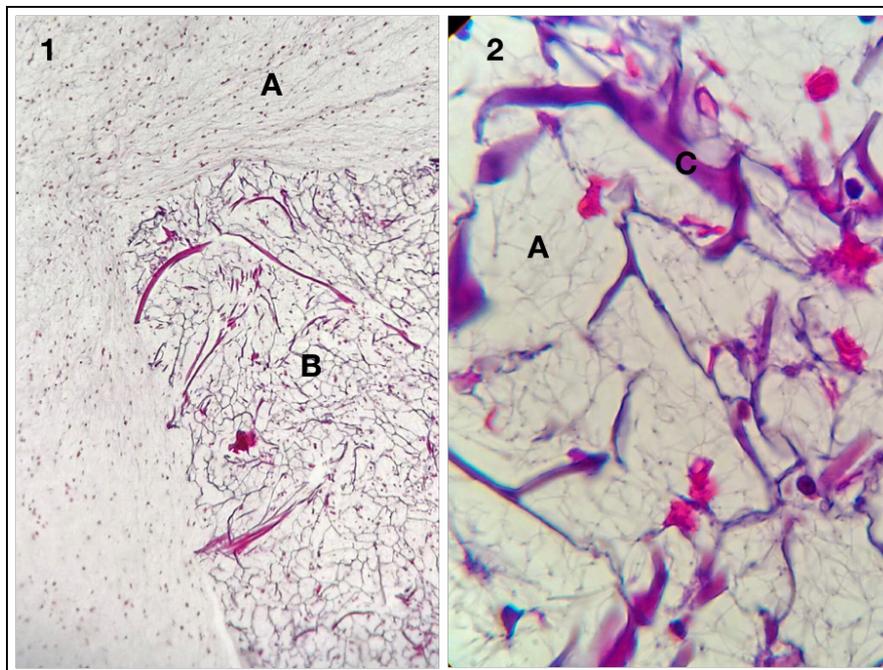


Figura 20. Micrografia obtida por microscopia óptica coradas com HE com aumento de 40x. A) matriz de fibrina leucoplaquetária; B) Matriz de colágeno. 2. Micrografia obtida por microscopia óptica coradas com HE com aumento de 400x. 1. matriz de fibrina leucoplaquetária; C) fibra colágena. As imagens 1 e 2 demonstram as diferentes magnitudes, a intensa coloração basofílica das fibras colágenas e impregnação da matriz de fibrina no leito da matriz de colágeno.

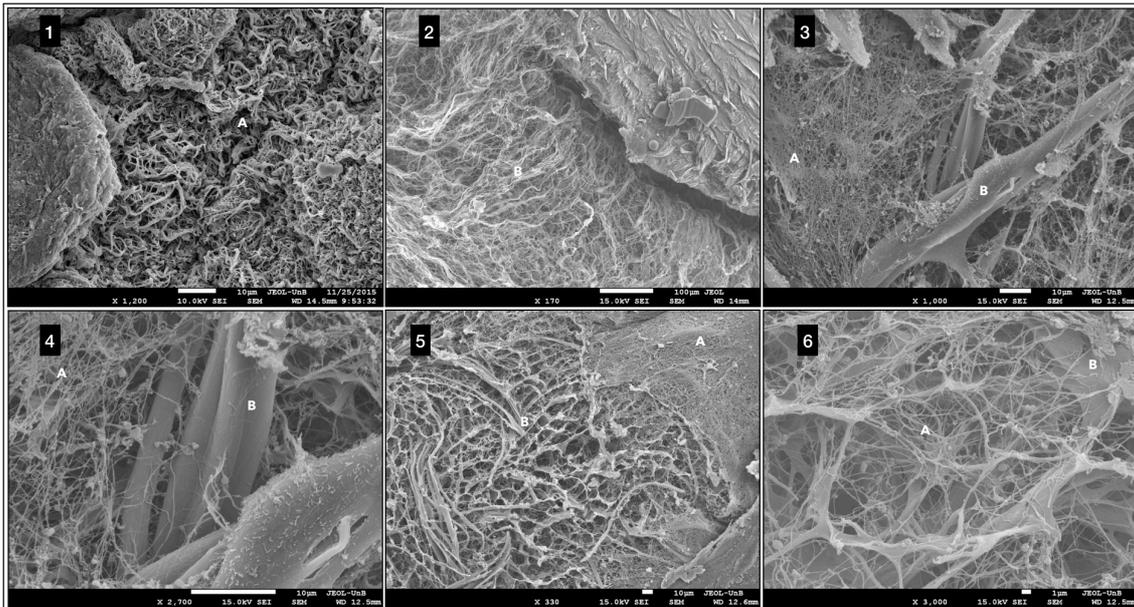


Figura 21. 1. Micrografia do corpo da matriz de LPRF com densa e entremeadada rede de fibrina com aumento de 1200x. 2. Matriz de fibras colágenas humana observada em tecido cardíaco subendotelial com aumento de 170x. Este fragmento foi obtido no estudo de caracterização morfológica ultraestrutural de lesões endoteliais a partir de tecido cadavérico com a devida aprovação pelo CEP da Faculdade de Medicina - UNB. As imagens por MEV foram obtidas durante o estudo de caracterização morfológica da fibrina leucoplaquetária autóloga. 3, 4, 5 e 6 Micrografias da membrana de colágeno xenógeno Lumina Coat (Critéria, Brasil) impregnada com LPRF em fase líquida com aumentos de 370x, 1000x, 2.700x e 3.000x. Rede de fibrina (A) recobrendo os espaços entre as espessas fibras colágenas (B).

2.1.6. Integridade estrutural e rugosidade superficiais das fibras e fibrilas de fibrina em função do tempo.

O tempo de permanência de um coágulo diz respeito ao período demandado pelo organismo para sua reorganização por meio da colonização celular e neoformação e um matriz substitutiva no leito afetado. A fibrinólise é o evento que promove a desorganização polimérica da rede de fibrina liberando fibrinopeptídeos no leito, bem como outros substratos proteicos aderidos à sua rede fibrilar. A observação deste fenômeno *in vitro* demonstrou que diante das variações paramétricas experimentais do presente estudo a maior faixa de FCR empregada provocou precocidade na desorganização fibrilar e desprendimento do conteúdo proteico impregnado. Isto está demonstrado pela análise do diâmetro das fibras e feixes de fibras de fibrina nas figuras 22 e 23 e ilustrado

pela análise microscópica por MEV na figura 24. A relevância deste achado pode ser associada ao destacamento de moléculas e partículas impregnadas nas fibras de fibrina.

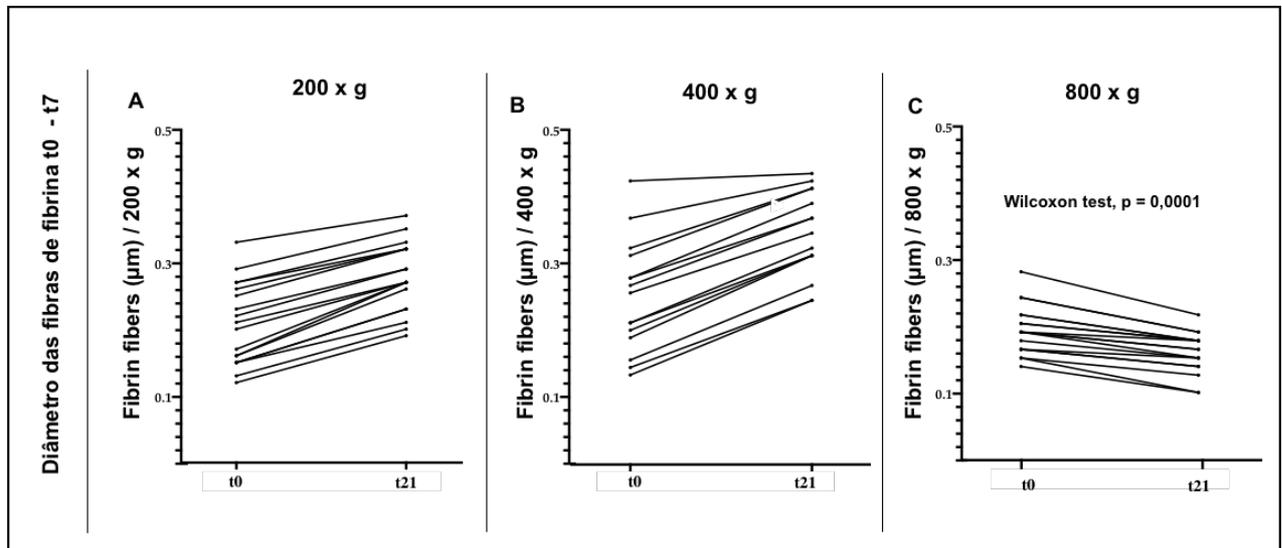


Figura 22. Redução do diâmetro das fibras de fibrina em função do tempo t0-t2.

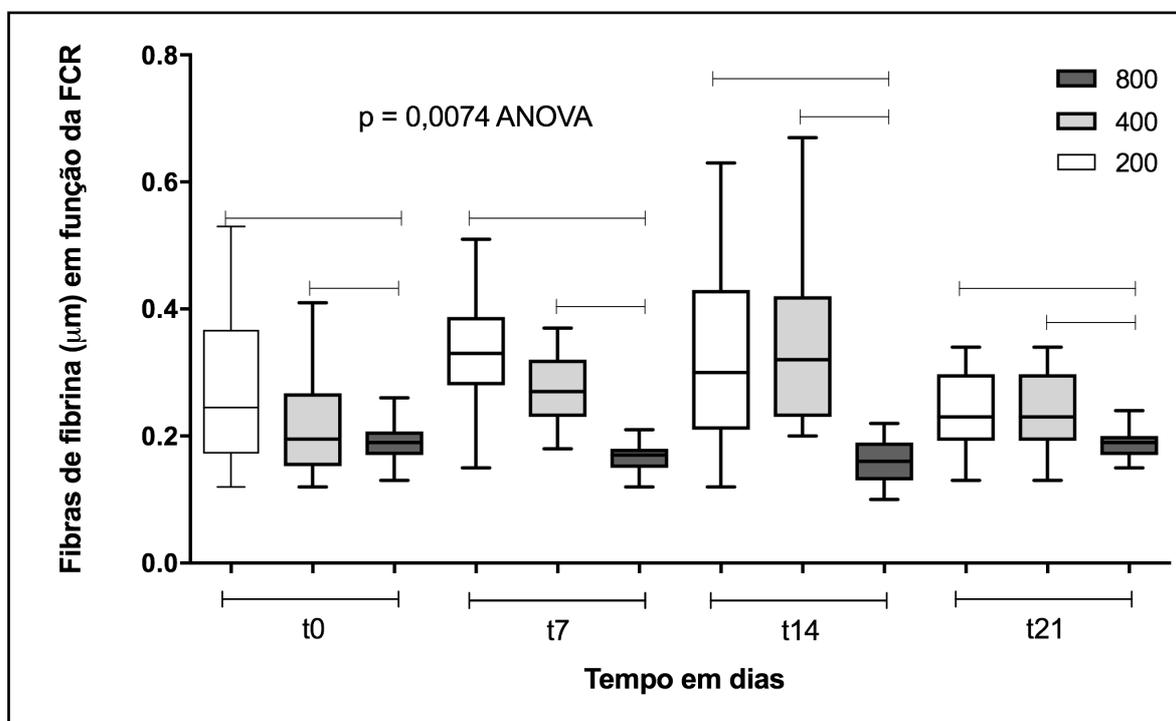


Figura 23. Diâmetro das fibras de fibrina em função do tempo e da FCR.

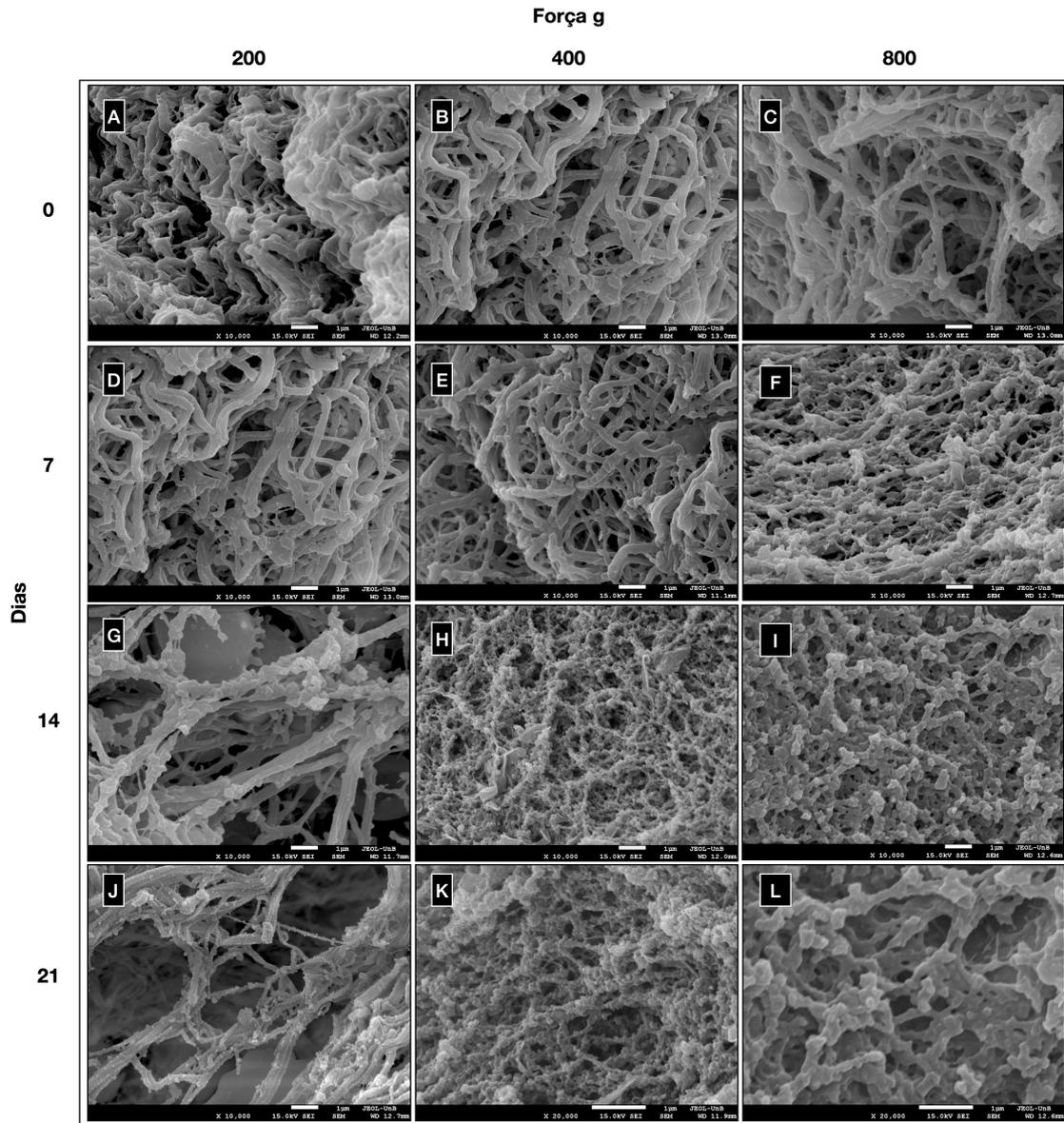


Figura 24. A-E Micrografias de fragmentos do corpo da matriz de LPRF obtidos com FCR de 200, 400 e 800 g e fixados em intervalos de 0, 7 dias com aumentos de 10.000x e 20.000x. A-C representam as características de cada matriz obtida à fresco exibindo organização com fibras íntegras com diâmetro médio de $0,34 \pm 0,18\mu\text{m}$, $0,21 \pm 0,08\mu\text{m}$ e $0,22 \pm 0,12\mu\text{m}$, respectivamente com FCRs de 200, 400 e 800 x g. No intervalo de 7 dias as matrizes D e E apresentaram mínima variação, entretanto, a matriz F exibiu significativa redução no diâmetro médio das suas fibras ($0,19 \pm 0,04\mu\text{m}$). No intervalo de 14 dias, as matrizes H e I apresentaram diâmetros de $0,24 \pm 0,06\mu\text{m}$ e $0,19 \pm 0,06\mu\text{m}$ respectivamente, e exibiram os primeiros sinais de descontinuidade da matriz com desprendimento de partículas de sua estrutura. Estes sinais foram observados na matriz J (200 x g) apenas no intervalo de 21 dias onde suas fibras exibiram diâmetros médios de $0,24 \pm 0,06\mu\text{m}$. O grau de rugosidade superficial foi associado à manutenção da estrutura física das fibras e fibrilas de fibrina para caracterizar, *in vitro*, o nível de fibrinólise sofrida pela matriz em função da FCR aplicada.

3. Discussão

Devido à diversidade de elementos abordados neste capítulo, a discussão será organizada em tópicos referendados na metodologia e nos resultados para facilitar a associação, interpretação e críticas do leitor.

3.1. Avaliação macroscópica

Uma vez que a distribuição celular e plaquetária na LPRF apresentou-se intimamente relacionada à angulação do rotor e à sedimentação, estes parâmetros merecem a devida observação na reprodução metodológica, pois exercem influências nos aspectos morfológicos macroscópicos e microscópicos. Existem relatos comparativos na literatura que avaliaram métodos distintos sem considerar tais características de cada equipamento utilizado, o que pode provocar conclusões equivocadas sobre os aspectos morfológicos das matrizes de LPRF^{39,41}. A angulação do rotor influencia o raio do rotor, bem como a força de centrifugação aplicada sobre o sangue total. Estas influências são suficientes para alterar os aspectos morfológicos da matriz de LPRF⁴¹.

Em nível macroscópico a eleição do ângulo de 25° gerou uma área de superfície na ZPL 37% maior que os outros ângulos investigados, bem como na distensão total do coágulo de fibrina e suas respectivas membranas. Embora esta característica pareça não configurar nenhuma vantagem clínica já experimentada, em casos de tratamento de grandes úlceras do membro inferior pode caracterizar e fortalecer o uso racional do sangue extraído por demandar menores volumes para cobrir a superfície de determinado leito afetado pois proporcionou a obtenção de membranas 13,6% maiores. Outro aspecto

fundamental observado nesta angulação de rotor foi o favorecimento da difusão do conteúdo celular na fração sobrenadante apresentando células e plaquetas impregnadas em quase toda a extensão do corpo do coágulo, e não apenas na ZPL.

3.2. Avaliação microscópica

A avaliação por microscopia óptica revelou a estratificação seletiva dos elementos sanguíneos, devido à diferença de densidade entre distintos elementos figurados. No presente estudo não foi observada nenhuma diferença histológica significativa quando comparada aos relatos da literatura, embora seja indicado um estudo de histomorfometria com marcação por imunohistoquímica para uma melhor compreensão da distribuição celular em função da angulação do rotor. Ghanaati *et al.* 2014, demonstraram uma maior presença de neutrófilos distribuídos na malha de fibrina ao elegerem a faixa de centrifugação de 200 x g. No presente estudo, mesmo sem a realização de imunohistoquímica, foi observada a alta concentração mononuclear na ZPL apenas por análise histológica convencional pela coloração clássica com hematoxilina e eosina.

3.3. Organização estrutural da matriz de LPRF

As análises histológicas comparativas entre as angulações de rotores serviram para ilustrar o efeito de “empuxo” da difusão de centrifugação fazendo com que o conteúdo leucoplaquetário não permanecesse adstrito à ZPL mas disperso em toda extensão do coágulo. A figura 10 demonstrou em magnificações de até 200x a organização diferencial na distribuição celular.

A inclinação dos tubos foi estabelecida como variação paramétrica experimental em função das forças friccionais durante a centrifugação. No presente estudo foram investigados os efeitos de diferentes ângulos fixos. A aceleração angular da centrifugação mecânica gera um campo gravitacional artificial constituído por um sistema de forças onde a FCR é apenas um destes componentes. Outros constituintes deste campo são a força centrípeta, as forças friccionais de sedimentação e empuxo, estas diametralmente opostas são atuantes na estratificação por gradiente de concentração. Deste modo forças perpendiculares atuantes no plano de colisão, a parede distal do tubo, fazem com que parte do conteúdo seja sedimentada e outra suspensa por difusão em função da densidade relativa dos componentes sanguíneos⁴⁸ de acordo com o coeficiente de sedimentação de cada elemento figurado do sangue⁴⁸⁻⁵⁰.

3.4. Integridade morfológica celular e plaquetária

Dohan *et al.* 2017 avaliaram distintas centrífugas utilizadas para a obtenção das matrizes de LPRF e identificaram alterações conformacionais sobre tipos celulares presentes na matriz de fibrina associando este evento ao impacto sofrido durante a centrifugação⁴¹. A manutenção da integridade celular após os ciclos de centrifugação é um aspecto de grande relevância pois sua degradação precoce, ocorrida durante o seu processamento, pode inviabilizar muitas respostas biológicas esperadas. O presente estudo demonstrou a manutenção da integridade celular diante das diferentes condições experimentais, onde nenhuma das centrífugas utilizadas promoveu degradação celular e plaquetária, deste modo, corroborando para a ampliação de utilização de diferentes equipamentos para estes fins³.

3.5. Densidade da matriz com e sem compactação

A organização estrutural da matriz de fibrina exibe um conjunto de fibras de fibrina entrelaçadas configurando um ambiente tridimensional. A sua aplicação no leito terapêutico exige algumas conformações físicas obtidas por modelamento mecânico como a compactação. Dohan *et al.* 2004²⁵ propuseram a utilização de um dispositivo para realizar compactação mecânica dos coágulos de fibrina sem desidratação exacerbada denominado prf-box. Este utensílio sofreu adaptações e representa um artifício indispensável no preparo das membranas de LPRF. O presente estudo caracterizou microscopicamente este efeito, onde ficou demonstrado o alto grau de compactação das matrizes de fibrina. Esta configuração, aliada à retração natural do coágulo, confere à matriz um alto grau de elasticidade e resistência mecânica, o que favorece a sua aplicação como artefato de cobertura em leitos cirúrgicos permitindo que seja suturada às bordas das feridas devido ao alto grau de elasticidade e resistência mecânica.

3.6. Artefatos exógenos

Uma importante observação microscópica feita neste estudo foi a impregnação de distintas partículas de sílica na matriz de LPRF obtidas em tubos plásticos com ativadores de coágulo. Tubos de duas marcas comerciais apresentaram extratos de silício de fontes diferentes, sendo uma delas uma composição de carapaças de diatomáceas. Estes produtos oxidantes foram concebidos para ativação de coágulo para finalidades diagnósticas *in vitro*.

Apesar de serem dispositivos estéreis para assegurar a confiabilidade de ensaios laboratoriais, sanitariamente são classificados como *In Vitro Device (IVD)*. Segundo as normas sanitárias internacionais, produtos processados, inclusive o sangue e seus derivados, bem como dispositivos de manipulação, devem possuir classificação *Medical Device (MD)*. Na Europa O regulamento EU 2017/745 do parlamento europeu e do conselho já recomenda o desuso dos tubos fabricados para fins laboratoriais e a adoção de dispositivos com classificação MD para tais fins. A empresa Silfradent em Santa Sofia, Itália é uma das pioneiras nesta adequação e ao lado da Process francesa e da Intralock americana, já dispõe destes dispositivos com tal classificação. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ainda não se manifestou até o presente momento, por meio de norma técnica regulamentadora, acerca dos aspectos sanitários relacionados à produção da LPRF. Contudo, apesar desta adequação sanitária internacional, não houve na literatura nos últimos 20 anos até o presente momento nenhum relato de citotoxicidade ou insucessos terapêuticos que pudessem estar associados ao uso de tubos IVD⁴⁵. Entretanto, Tsujino *et al.* 2019 indicaram potenciais riscos pela utilização de tubos contendo sílica amorfa como ativador de coágulo³⁶.

Os ativadores de coágulo, como foram concebidos para acelerar a polimerização do fibrinogênio e a consequente retração do coágulo, ao longo da nossa experimentação laboratorial foram observadas diferenças nas características macroscópicas da LPRF entre os tipos de tubos avaliados.

3.7. Eritrócitos poliédricos e retração do coágulo

A retração ou contração do coágulo é um mecanismo fisiológico natural após a sua formação para promover redução volumétrica, liberar o excesso de soro sanguíneo e promover selamento físico local onde os eritrócitos atuam na formação de uma barreira física⁵¹.

A contração do coágulo exerce muitos efeitos na fisiopatologia da hemostasia e do reparo dos tecidos. A contração modula os efeitos fibrinolíticos, alterando a permeabilidade do coágulo e a organização tridimensional das fibras e fibrilas de fibrina. Isto também promove a compactação dos eritrócitos em formatos poliédricos reduzindo o espaço intercelular, o que contribui para criar uma vedação impermeável no local da lesão. Este foi um aspecto morfológico observado e caracterizado no presente estudo. As hemácias poliédricas apresentaram faces, bordas e vértices constituindo a acomodação estática e funcional de uma verdadeira barreira. Os eritrócitos poliédricos com fibrina e plaquetas na superfície formando um selo impermeável que confere resistência à fibrinólise⁴⁶.

Em nível circulatório, a contração atrai os coágulos para a superfície da parede do vaso, evitando que obstruam o fluxo sanguíneo, mantendo assim a efetividade circulatória local e sistêmica. E no reparo tecidual une as bordas da ferida, tornando esse processo importante nos estágios iniciais da cicatrização⁵².

Alguns dos efeitos clínicos das matrizes de LPRF como o potencial hemostático tópico⁴² e a capacidade de proteção dos leitos cirúrgicos pela resistência mecânica e elasticidade⁵³ são devidas às características morfológicas estruturais dos coágulos retraídos de LPRF. Neste aspecto a porção proximal do sedimento de eritrócitos, que corresponde à região imediatamente abaixo da ZPL, e também possui fibrina entremeada e concentra plaquetas e leucócitos. Cines *et al.* 2014⁴⁶ demonstraram o empacotamento de eritrócitos em formas poliédricas em coágulos enriquecidos com plaquetas, que corroboram com os achados do presente estudo que evidenciou que as matrizes de LPRF apresentaram formações poliédricas em eritrócitos nas zonas terminais.

Sendo a matriz de LPRF um coágulo isento de eritrócitos pelo processo de centrifugação ocorre um aumento na concentração estratificada dos outros elementos figurados do sangue envolvidos pela densa e resistente malha tridimensional de fibrina. Entretanto, os achados morfológicos da porção proximal do sedimento de eritrócitos do presente estudo associados aos achados de Cines *et al.* 2014⁴⁶, Tutwiler *et al.* 2018⁴⁷ e Weisel e Litinov, 2019⁵¹ serviram para fundamentar os benefícios eventos biológicos importantes relacionados ao reparo tecidual, especialmente no controle hemostático pelo selamento mecânico dos poliedrócitos como pela redução da fibrinólise. Deste modo, é possível aplicar o conceito do uso terapêutico racional do sangue humano na obtenção da LPRF para cumprir todos os potenciais papéis clínicos que possa cumprir⁵⁴.

3.8. Comparação estrutural entre fibrina e matriz de colágeno

Nas cirurgias reconstrutivas do complexo bucomaxilofacial, especialmente com o emprego de substitutos ósseos, são comumente aplicados princípios de regeneração óssea guiada (ROG). Um dos fundamentos da ROG é a separação física com membranas ou barreiras para cobertura dos leitos enxertados nos eventos cirúrgicos. Além de prover estabilidade mecânica ao conjunto, o uso de membranas impede o trânsito celular entre o tecido ósseo enxertado e os tecidos moles que recobrem este leito, inclusive o periósteo. O propósito disto é impedir que células do tecido mole migrem para o interior do enxerto e devido à rápida proliferação ocupem o espaço pretendido para neoformação óssea.

Este princípio, relacionado ao trânsito celular, parece apresentar um equívoco biológico conceitual, uma vez que as células progenitoras ósseas são oriundas porções perivasculares dos tecidos adjacentes, hematopoiético, endósseo e especialmente do periósteo. Deste modo, o uso de barreiras e membranas pode privar o leito dos enxertos do suprimento das células progenitoras periosteais. O sucesso terapêutico da ROG pode estar mais relacionado à estabilidade cirúrgica proporcionada que ao conceito da seletividade celular. Cabe ainda salientar que o fator predisponente do aumento de fibrose no interior dos leitos ósseos enxertados estão mais relacionados aos eventos de hipóxia local e ausência de estabilidade adequadas provocando menor grau de angiogênese local e consequente diferenciação de células progenitoras em fibroblastos e fibrócitos^{55,56}. Com a crescente utilização da

LPRF em forma de membranas de revestimento nas cirurgias reconstrutivas houve um interesse em compreender se elas seriam eficazes na ROG em substituição às membranas xenógenas de colágeno^{55,57}.

Miron *et al.* 2017 demonstraram que em função da fibrinólise as membranas de LPRF não se mantêm no leito por período prolongado a fim de cumprir tal função. Entretanto, em grandes reconstruções recomenda-se sua combinação com uma membrana de colágeno para fins de estabilização. Nestes casos a combinação, é recomendável aplicando membrana de LPRF sobre as membranas de colágeno. Deste modo, aceleraram o fechamento das feridas, e lhes conferem proteção mecânica e antibacteriana reduzindo a taxa de complicações⁵⁷.

O presente estudo demonstrou as características estruturais comparativas entre as membranas de colágeno e de LPRF, bem como a associação entre as duas.

As matrizes de colágeno apresentam conteúdo fibrilar de diferentes magnitudes, constituídas por fibras colágenas (1-20 μ m); fibras reticulares (20-40nm) e fibras elásticas, compostas por elastina (0,1 a 0,2 μ m) e fibrilina (10nm)⁵⁸. As fibras de fibrina medem cerca de 0,2-0,4 μ m, assemelhando-se estruturalmente com a elastina das fibras elásticas.

3.9. Fibrinólise *in vitro*

O estudo da fibrinólise possui duas vertentes de grande relevância, primeiro por sua função intravascular antitrombótica, e depois pela atividade extravascular na degradação da matriz extracelular e no remodelamento tecidual⁵⁹.

Existe um antagonismo fisiológico da fibrinólise entre os meios intra e extravascular. Dentro dos vasos a fibrinólise fisiológica previne contra o tromboembolismo e neste aspecto quanto mais eficiente for o papel dos agentes fibrinolíticos mais rápida será a degradação da matriz de fibrina do coágulo intravascular. Já no meio extravascular, onde a fibrina representa um arcabouço funcional temporário nos tecidos lesados, é possível que uma lentificação da fibrinólise possa representar benefícios na reorganização dos tecidos lesados ou mesmo proporcionar aplicações terapêuticas da matriz de fibrina para fins regenerativos⁵⁹.

A investigação da fibrinólise tem sido feita por métodos laboratoriais qualitativos focados nos metabólitos pró e anti-fibrinolíticos envolvidos no processo, tais como a plasmina tecidual (tPA), a plasmina urokinase (uPA), a α_2 -antiplasmin, a α_2 -macroglobulina, dentre outros. Estes ensaios possuem grande relevância na esfera clínica para diferenciar condições patológicas e indicar a terapêutica adequada⁵⁹⁻⁶¹.

Entretanto, no contexto do presente estudo, a avaliação da fibrinólise objetivou compreender o seu comportamento extravascular, contudo limitada à análise *in vitro*.

A fibrinólise experimental observada pela grande magnificação microscópica permitiu-nos observar o desarranjo estrutural superficial das fibras de fibrina em função da FCR aplicada.

As condições metodológicas experimentais demonstraram mudanças de padrão na manutenção estrutural do arcabouço de fibrina, onde a aceleração da fibrinólise apresentou-se diretamente proporcional à FCR aplicada. Isto não configura, neste primeiro momento, nenhuma relação de vantagem ou desvantagem, mas de possíveis aplicações terapêuticas específicas em função da demanda tissular local. A fibrinólise mais lenta poderá permitir integração celular prolongada, maior grau de vascularização e proteção física duradoura ao leito afetado, como por exemplo em demandas da regeneração óssea guiada. Por outro lado, sendo mais rápida pode promover liberação precoce de possíveis ativos terapêuticos incorporados intensificando uma terapêutica local, uma vez que a matriz de fibrina pode ser entendida como um *drug delivery system*^{62,64}.

Conclusão

Os resultados apresentados neste capítulo de caracterização morfológica pelos aspectos macro e microscópicos da matriz de LPRF permitiu a identificação de fatores influentes em sua organização tridimensional como:

1. As três FCRs experimentais, bem como as 3 centrífugas utilizadas não promoveram destruição celular e/ou plaquetária;

2. A redução do ângulo para 25° promoveu maior espalhamento e distribuição dispersiva do conteúdo celular bem como a distribuição estratificada em função da densidade de cada componente sanguíneo;

3. A presença de artefatos exógenos presentes nos tubos destinados ao diagnóstico *in vitro* pode caracterizar um ponto de fragilidade sanitária e a indicação de tubos isentos de aditivos deverá ser uma tendência metodológica para o uso clínico dos concentrados sanguíneos;

4. A elevação da FCR aumentou o grau de fibrinólise.

Estes dados apontam para um maior esclarecimento sobre as variações metodológicas existentes na obtenção das matrizes de LPRF, onde devem ser entendidos como opções para gerar produtos com características próprias com diferentes indicações específicas e não graus de superioridade em função de metodologias autorais e comerciais que dificultam o entendimento dos potenciais biológicos desta matriz. Somente os estudos clínicos prospectivos poderão trazer respostas acerca das reais influências sobre os prognósticos de aplicações terapêuticas com especificidades de variações metodológicas. O presente estudo traz elementos ainda não descritos na literatura internacional sobre a LPRF e isto aumenta as perspectivas de suas aplicações clínicas, tendo sido esta a motivação e o foco principal deste trabalho.

Referências

1. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Trombos Hemost.* 2005;3:1894-1904.
2. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 2005. doi:10.1016/S0065-3233(05)70008-5
3. Oliveira, LA; Buzzi, M; Leão, MP; Andrade, PCAR; Kuckelhaus S. Ultrastructural morphological characterization of the autologous leuko-platelet fibrin matrix in association with xenogenic and alloplastic biomaterials for bone grafting. Fibrin® Protocol. *Rev Catarinense Implantodont.* 2018;18:24-33.
4. Di Minno Finno G, Bertele V, Cerletti C, De Gaetano G, Silver MI. Arachidonic Acid Induced Platelet Fibrin Retraction: The Role cyclic endoperoxides. *Trombos Res.* 1982;25:299-306.
5. Dohan Ehrenfest DM, Corso M Del, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol.* 2010;81:546-555. doi:10.1902/jop.2009.090531
6. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G, Charrier JB. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Growth factor release and contradictory results. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2010. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.059
7. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101(3):e45-e50. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009
8. Witte MB, Barbul A. General Principles of Wound Healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-528.
9. Choukroun J, Adda F, Schoeffloer C, Vervelle A. Une opportunité en paro implantologie, le PRF. *Implantodontie* 2001 ; 42 - 55-62. *Implantodontie.* 2001.
10. Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res Part A.* 2019;(May):jbm.a.36734. doi:10.1002/jbm.a.36734
11. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, 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 Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012
12. RE M. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-228.
13. Suchetha A, Lakshmi P, Bhat D, Mundinamane DB, Soorya K V, Bharwani GA. Platelet concentration in platelet concentrates and periodontal regeneration-unsrambling the ambiguity. doi:10.4103/0976-237X.169850
14. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Ski Appendage Disord.* 2018;4(1):18-24. doi:10.1159/000477353

15. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14:529-535.
16. Zumstein MA, Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. The Future of Platelet Concentrates in Sports Medicine: Platelet-Rich Plasma, Platelet-Rich Fibrin, and the Impact of Scaffolds and Cells on the Long-term Delivery of Growth Factors. *Oper Tech Sports Med*. 2011;19(3):190-197. doi:http://dx.doi.org/10.1053/j.otsm.2011.01.001
17. Niewland R and SA. Platelet-Derived Microparticles. In: Michelson AD, ed. *Platelets*. Second. Burlington: Elsevier; 2007:403-414.
18. Zubairova LD, Nabiullina RM, Nagaswami C, et al. Circulating Microparticles Alter Formation, Structure, and Properties of Fibrin Clots. *Nat Publ Gr*. 2015. doi:10.1038/srep17611
19. Conselho Federal de Odontologia. Agregados Plaquetários Autólogos não transfusionai. Resolução 158/2015. <http://cfo.org.br/publicacoes-principal/prestacao-de-contas/servicos-e-consultas/servicos-e-consultas/ato-normativo/?id=1927>. Published 2015.
20. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, et al. Comparison between PRP, PRGF and PRF: Lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(6).
21. Badran Z, Abdallah M, Torres J, Tamimi F. Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges. *Platelets*. 2017;00(00):1-8. doi:10.1080/09537104.2017.1327656
22. Borsani E, Bonazza V, Buffoli B, et al. Biological Characterization and In Vitro Effects of Human Concentrated Growth Factor Preparation: An Innovative Approach to Tissue Regeneration. 2015;7(5). doi:10.4172/0974-8369.1000256
23. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent*. 2013;16(4). doi:10.4103/0972-0707.114344
24. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech*. 2011. doi:10.1002/jemt.20968
25. Ehrenfest DMD. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010;110(3):275-278. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.048
26. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. 2017. doi:10.1007/s00784-017-2133-z
27. Kulkarni MR. The use of platelet-rich fibrin as a hemostatic material in oral soft tissues. doi:10.1007/s10006-018-0738-2
28. Al-Hamed FS, Tawfik MA-M, Abdelfadil E. Clinical effects of platelet-rich fibrin (PRF) following surgical extraction of lower third molar. *Saudi J Dent Res*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.sjdr.2016.05.002
29. Diss A, Dohan DM, Mouhyi J, Mahler P. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants. *Oral Surgery, Oral*

- Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2008;105(5):572-579. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.08.021
30. Wang Z, Weng Y, Lu S, et al. Osteoblastic mesenchymal stem cell sheet combined with Choukroun platelet-rich fibrin induces bone formation at an ectopic site. doi:10.1002/jbm.b.33288
 31. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM, Quirynen M. Leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. doi:10.1080/09537104.2017.1327654
 32. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-167. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009
 33. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet Rich Fibrin With the Low Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility and Cellular Response. *J Periodontol*. 2016. doi:10.1902/jop.2016.160443
 34. Miron RJ, Pinto NR, Quirynen M GS. Standardization of Relative Centrifugal Forces (RCF) in studies related to platelet rich fibrin. *J Periodontol*. 2019. doi:10.1002/JPER.18-0553
 35. Miron R, Choukroun J GS. Controversies Related to Scientific Report Describing G-Forces from Studies on Platelet-Rich Fibrin: Necessity for Standardization of Relative Centrifugal Force Values. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent* . 2018;0(0):0. doi:10.4103/GFSC.GFSC_23_18
 36. Tsujino T, Takahashi A, Yamaguchi S, Watanabe T. Evidence for Contamination of Silica Microparticles in Advanced Platelet-Rich Fibrin Matrices Prepared Using Silica-Coated Plastic Tubes. 2019.
 37. Mautner K, Malanga GA, Smith J, et al. A Call for a Standard Classification System for Future Biologic Research: The Rationale for New PRP Nomenclature. *PM&R*. 2015;7(4, Supplement):S53-S59. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pmrj.2015.02.005
 38. Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*. 2016. doi:10.1186/s40729-016-0052-4
 39. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest*. 2016. doi:10.1007/s00784-016-1719-1
 40. Liu Z, Jin H, Xie Q, et al. Controlled Release Strategies for the Combination of Fresh and Lyophilized Platelet-Rich Fibrin on Bone Tissue Regeneration. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1-10. doi:10.1155/2019/4923767
 41. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2017;00(00):1-14. doi:10.1080/09537104.2017.1293812
 42. de Almeida Barros Mourão CF, Calasans-Maia MD, de Mello Machado RC, de Brito Resende RF, Alves GG. The use of platelet-rich fibrin as a

- hemostatic material in oral soft tissues. *Oral Maxillofac Surg.* 2018;22(3):329-333. doi:10.1007/s10006-018-0708-8
43. Yavaş S, Ayaz S, Köse SK, Ulus F, Ulus AT. Influence of Blood Collection Systems on Coagulation Tests. 2012:367-375. doi:10.5505/tjh.2012.59254
 44. Nemmar A, Albarwani S, Beegam S, et al. Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation. *Int J Nanomedicine.* 2014. doi:10.2147/IJN.S52818
 45. O'Connell SM. Safety Issues Associated With Platelet-Rich Fibrin Method. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2007. doi:10.1016/j.tripleo.2007.03.017
 46. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood.* 2014;123(10):1596-1603. doi:10.1182/blood-2013
 47. Tutwiler V, Mukhitov AR, Peshkova AD, et al. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-14. doi:10.1038/s41598-018-35849-8
 48. Archibald WJ. The process of diffusion in a centrifugal field of force. *Phys Rev.* 1938;53(9):746-752. doi:10.1103/PhysRev.53.746
 49. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, et al. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry.* 2002;49(4):150-158. doi:10.1002/cyto.10161
 50. Vettore L, De Matteis MC, Zampini P. A new density gradient system for the separation of human red blood cells. *Am J Hematol.* 1980;8(3):291-297. doi:10.1002/ajh.2830080307
 51. Article R. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. 2019;(November 2018):1-12. doi:10.1111/jth.14360
 52. Tutwiler V, Mukhitov AR, Peshkova AD, et al. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Sci Rep.* 2018:1-14. doi:10.1038/s41598-018-35849-8
 53. Weisel JW. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys Chem.* 2004. doi:10.1016/j.bpc.2004.07.029
 54. Ari Ens, Robert A S. *A New Red Cell Shape Helps the Clot.*; 2014. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/123/10/1442/1374049/1442.pdf>. Accessed December 8, 2019.
 55. Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C, et al. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 2008;283:4778–86.
 56. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., & Myoui, A. (2006). Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 31079-31092.
 57. Richard J. Miron, DDS, MSc, PhD, and Michael A. Pikos D. PRF as a Barrier Membrane in Guided Bone Regeneration. 2017;(December).
 58. Maurer T, Stoffel MH, Belyaev Y, et al. Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications. *PLoS One.* 2018;13(10):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0205027
 59. Amiral J, Laroche M, Seghatchian J. Jerard Seghatchian , International Consultancy in Blood Components Quality / Safety SC. *Transfus Apher Sci.*

2018. doi:10.1016/j.transci.2018.02.020
60. Longstaff C. Measuring fibrinolysis: from research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost.* 2018;16(4):652-662. doi:10.1111/jth.13957
 61. Longstaff C. Measuring fibrinolysis : from research to routine diagnostic assays. 2018;(January):652-662. doi:10.1111/jth.13957
 62. Ilich A, Key IBNS. Global assays of fibrinolysis. 2017;(March):1-7. doi:10.1111/ijlh.12688
 63. Ahmad E, Fatima MT, Hoque M, Owais M, Saleemuddin M. Fibrin matrices: The versatile therapeutic delivery systems. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:121-136. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.054
 64. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C DE, Zrnc TA, Parvini P, Schwarz F, Sader R, Choukroun J GS. Homogeneous Pressure Influences the Growth Factor Release Profiles in Solid Platelet-rich Fibrin Matrices and Enhances Vascular Endothelial Growth Factor Release In The Solid Platelet-rich Fibrin Plugs. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent.* 2018;1(1):8:16. doi:10.4103/GFSC.GFSC_9_18

Capítulo 4

Liberção de VEGF

**A CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DO
ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE
CENTRIFUGAÇÃO, DA FORÇA CENTRÍFUGA RELATIVA
APLICADA E DO TIPO DE TUBO UTILIZADO NA OBTENÇÃO DE
ESPÉCIMES DE FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA.**

RESUMO

A cinética na liberação de fatores de crescimento é um comportamento biológico dos concentrados plaquetários que pode ser alterado em função de variações metodológicas. O presente manuscrito traçou um comparativo na cinética da liberação do VEGF observando a influência de 3 aspectos metodológicos usualmente empregados na obtenção da LPRF: o tipo de tubo em função da presença de aditivos pró-coagulantes; a FCR empregada na zona de maior concentração leucoplaquetária do agregado e o tempo de centrifugação. Amostras de sangue humano foram utilizadas para obter matrizes de LPRF com tubos de vidro e tubos de plástico com ativador de coágulo. Utilizando a centrífuga FibrinFuge25 foram aplicadas três forças g (200, 400 e 800 x g) durante 5, 10 e 15 minutos. As análises quantitativas foram realizadas por *citometric bead array* (CBA) e demonstraram que o emprego de 200 x g apresentou desprendimento lento com baixas concentrações nos primeiros intervalos e 800 xg apresentou desprendimento e liberação precoce de concentrações elevadas, já os experimentos com 400 xg apresentaram os menores níveis. O uso do tubo de vidro gerou maiores concentrações liberadas de VEGF durante todo o intervalo experimental. O objetivo deste estudo foi verificar a cinética da liberação deste FC em função dos diferentes parâmetros metodológicos experimentais sem preconizar nenhum método comercial ou protocolo específico. Esses dados experimentais contribuirão para o entendimento dos efeitos das variações paramétricas nos métodos de obtenção da matriz de LPRF.

Palavras-Chave: *Fibrina, Centrifugação, Força g, Fatores de crescimento, ultraestrutura*

ABSTRACT

The kinetics in the release of growth factors is a biological behavior of platelet concentrates that can change due to methodological variations. The present manuscript presents a comparison of VEGF release kinetics observing three methodological aspects usually employed in obtaining LPRF: the type of tube depending on the presence of procoagulant additives; the FCR used in the zone with the highest platelet concentration and centrifugation time. Human blood samples were used to obtain LPRF matrices with glass tubes and plastic tubes with clot activator. Three g forces (200, 400, and 800 x g) applied for 5, 10, and 15 minutes. Quantitative analyzes performed by cytometric bead array (CBA) and demonstrated that the use of 200 xg showed slow release with low concentrations in the first intervals, and 800 xg showed detachment and early release of high levels, whereas experiments with 400 xg showed the lowest levels. The use of the glass tube generated higher concentrations of VEGF released throughout the experimental interval. This study aimed to verify the kinetics of the release of this FC according to the different experimental methodological parameters without recommending any commercial method or a specific protocol.

Key-Words: *fibrin, centrifugation, g-force, vascular-endothelial growth factor, leukocyte platelet-rich fibrin*

1. Introdução

A liberação lenta dos fatores de crescimento plaquetários (FC) parece ser um dos aspectos mais vantajosos da Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (LPRF) quando comparada à mesma ação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)¹⁻³. Esta liberação lenta está fundamentada não apenas na composição e concentração celular e plaquetária do concentrado sanguíneo, mas também na organização tridimensional da rede de fibrina⁴, na incorporação de micropartículas circulantes⁵ e glicoproteínas adesivas^{6,7} que lhes proporcionam proteção proteolítica durante sua permanência nos leitos em reparo tecidual⁸.

O comportamento biológico dos concentrados plaquetários pode sofrer variações a depender do método de obtenção⁹ gerando discrepâncias na liberação dos fatores de crescimento, na concentração e integridade do conteúdo leucoplaquetário e na organização estrutural da rede de fibrina¹⁰.

Fatores de crescimento são agentes peptídicos oriundos da degranulação plaquetária, bem como de leucócitos^{11,12} que atuam como sinalizadores celulares nos mecanismos de transdução, transcrição gênica e tradução modulando as atividades de quimiotaxia, migração, proliferação e diferenciação celular dependentes de ativação por receptores tirosina cinase¹³.

Dentre os FC de origem plaquetária, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), é um dos principais agentes angiogênicos liberados pelos α -grânulos plaquetários¹⁴. Outros importantes FCs plaquetários ligados à promoção da neovasculogênese são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb)¹⁵⁻¹⁷.

Entretanto, dentre os agentes plaquetários existem outras moléculas que atuam como moduladores inibitórios para controlar o nível de vasculogênese. Dentre eles destaca-se o fator de crescimento transformante beta (TGFbeta).

Durante a formação do coágulo os FC liberados após a ativação plaquetária inserem-se na superfície adesiva das fibras e fibrilas de fibrina^{18,19}. Este mecanismo protege-os da proteólise durante a fase inflamatória do reparo²⁰. Deste modo o seu desprendimento desta matriz acompanha a fibrinólise, que ocorre de forma lenta e gradual, e é modulada pelas próprias plaquetas e micropartículas plaquetárias que também modulam a ação de agentes fibrinolíticos como a α 2-macroglobulina, a trombosmodulina e o plasminogênio^{21,22}. Deste modo coágulos com altas concentrações de plaquetas são mais resistentes à fibrinólise¹⁴.

A síntese dos FC é feita pelos megacariócitos que por movimentos citoplasmáticos de expansão desprendem vesículas envoltas por biomembranas - as plaquetas - que desempenham importantes mecanismos celulares de sinalização, mesmo não sendo células em *stricto senso* devido ao seu conteúdo proteico¹¹.

Tabela 1. Conteúdo dos α -grânulos plaquetários

Classificação	Metabólitos
Agentes Fibrinolíticos	α 2-macroglobulina e plasminogênio
Fatores da Coagulação	Fator V, Fator VIII e multimerina
Fatores de Crescimento e Angiogênicos	FGFa, FGFb, EGF, HGF, IGF ₁ , TGF β ₁ , VEGF-A, VEGF-C, PDGF
Imunomoduladores	β 1H Globulina, Fator D, IgG e C ₁ inibidor
Moléculas de Adesão	P-Selectina - CD62, CD40, Fator de von Willebrand, Trombospondina, Fibrinogênio, Integrina α IIb β 3, integrina α v β 3 e Fibronectina
Outras Proteínas	Albumina, α 1-antitripsina, Gas6, Glicoproteína rica em histidina, Quininogênio de alto peso molecular, osteonectina, protease nexina-II
Quimiocinas	Proteínas plaquetárias básicas, Fator4 e β -tromboglobulina , IL-8, EVA-78, CCL-3, CCL-5, CCL-7, CCL-17, CXCL1, CXCL5.

Adaptado de *Platelets 2nd Edition 2007. Academic Press. Alan D Michelson*. A tabela 1 apresenta a vasta composição de peptídeos e proteínas residentes nos α -grânulos plaquetários e ajudam a explicar a diversidade funcional que as plaquetas exercem.

Os FC estão classificados em famílias³. Deste modo, os vários agentes exercem papéis sinérgicos e antagônicos sobre a resposta celular, estabelecendo um complexo mecanismo de comunicação intercelular, transdução, transcrição gênica e tradução¹⁵. Tal diversidade funcional está associada à sua concentração local²³. Variações mínimas de concentrações, mesmo ao nível de picogramas/mL (10^{-12} pg/mL) podem ser determinantes para alterar ou intensificar determinada resposta biológica²⁴. Em essência a ativação das respostas celulares mediadas pelos fatores de crescimento são dependentes de sua concentração proporcional, onde são determinantes diferenciais para o tipo de atividade a ser desempenhada²⁵.

Tais características nos remete à sua modulação funcional, ou seja, estes fatores atuam estimulando, controlando e também inibindo a exacerbação de respostas sinalizadoras onde suas atividades se processam²⁴. Deste modo é possível conceber que as atividades dos FC sejam moduladas por mecanismos

neuroendócrinos e imunológicos como integração de diferentes papéis biológicos controlando o crescimento celular garantindo-o de acordo com a demanda local^{26,27}. A tabela 2 sumariza um conjunto de moléculas de origem plaquetária que atuam na modulação da angiogênese ilustrando papéis sinérgicos e antagônicos relacionados a este controle fisiológico.

A família VEGF é composta por um grupo de moléculas semelhantes (isoformas), codificadas por único gene e constituída por diversas proteínas identificadas por letras (VEGF - A a F) e também pelo fator de crescimento placentário^{14,28}. Usualmente referenciada apenas como VEGF atua por meio dos receptores celulares do VEGF (VEGFR1, 2 e 3) que são receptores tirosina cinase e desempenham papel fundamental na diferenciação de células perivasculares em endoteliais que são fundamentais no reparo vascular e na angiogênese¹⁵, sendo por isto caracterizado como um dos principais agentes angiogênicos.

Como as plaquetas são as responsáveis diretas pela liberação da família VEGF, existem evidências do aumento da atividade angiogênica, *in vivo*, nos leitos cirúrgicos pela aplicação de concentrados plaquetários em forma de coágulos potencializados^{5,14} cuja plaquetometria suprafisiológica pode corresponder cerca de 200% a partir concentração fisiológica de um coágulo de sangue total^{23,29}.

Tabela 2. Ativadores e inibidores angiogênicos de origem plaquetária

Ativadores		Inibidores	
Agente	Atividade	Agente	Atividade
Fator de Crescimento do Endotélio Vascular - VEGF	Principal angiogênico de origem plaquetária; quimioatrativo de células endoteliais (CEs); aumento da permeabilidade vascular; atua nos estágios iniciais do reparo.	Angiostatina	Potente inibidor gerado pela clivagem do plasminogênio; Liberada após a ativação plaquetária; Plaquetas agregadas (Pelet) diminuem a liberação de plasminogênio.
Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas - PDGF	Quimioatrativo de fibroblastos e miócitos lisos; contribui na maturação vascular; atua nos estágios avançados.	Trombospondina – TSP-1	Potente inibidor da proliferação e formação tubular de CEs. É uma lecitina endógena. Liga-se ao CD36, ativa a caspase-3 e estimula apoptose de CEs.
Fator de Crescimento Fibroblástico Básico - FGFb	Atua como quimioatrativo e na proliferação de CEs; Forte ativador angiogênico.	Fator 4 Plaquetário – PF4 ou CXCL4	Desempenha potente papel angiostático por inibição ligante de outros GFs como FGF
Fator de Crescimento Epidermal - EGF	Ligante do receptor EGFR expresso em células mesenquimais e epiteliais; A ativação do EGFR aumenta a formação de túbulos, a migração e a mitose; aumenta o efeito pró-angiogênico do IGF.	Inibidor Tissular de Metaloproteinase - TIMPs	CEs, mas estimula a formação tubular em gel 3D de colágeno e fibrina. Forte antiangiogênico endotelial, mas importante quimiotático mononuclear. Macrófagos liberam agentes angiogênicos.
Fator de Crescimento Hepatócito - HGF	Potente mitogênico de diferentes tipos celulares, incluindo CEs. Peptídeo de HGF derivado de plaqueta tem papel antagonista na agregação plaquetária induzida por trombina (Modulação da atividade)	Endostatina	É um pequeno fragmento do colágeno XIII. Ponte agente anti angiogênico; Inibe a liberação de VEGF
Fator de Crescimento Insulínico - IGF	Possui estrutura homóloga à insulina. Possui receptores em CEs e outros tipos; Facilita a motilidade celular e a formação tubular.	Fator de Crescimento Transformante Beta - TGFb	Efeito complexo e antagônico. Inibe a migração de miócitos e CEs, mas estimula a formação tubular em matrizes tridimensionais (gel de colágeno e fibrina). Forte antiangiogênico endotelial, mas importante quimiotático mononuclear. Induz a liberação de agentes angiogênicos nos macrófagos.
Angiopietina – Ang-1	Induz migração endotelial, formação tubular e brotamento; Não induz proliferação endotelial.		
Fosfolípidios Plaquetários - PPs	São fosfolípidios de membrana que atuam na diferenciação gênica de CEs. Estimulam quimiotaxia, mitose e formação de túbulos capilares.		
CD40L e CD154	Moléculas expressas na superfície plaquetária ativam a síntese do fator de ativação plaquetária e estimulam a angiogênese.		
Metaloproteinases - MMPs	São clivantes da matriz extracelular. Facilitam a migração celular e a proliferação endotelial.		
Heparanase	Endoglicosidase clivante de heparan sulfato. Libera na matriz agentes angiogênicos associados com a heparan sulfato.		

Adaptado de *Platelets 2nd Edition 2007. Academic Press. Alan D Michelson*⁵.

Anitua *et al.* 2016 demonstraram por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que uma modificação protocolar pela remoção de anticoagulante e redução de ativador de coágulo no processo de produção do *plasma rich growth factors* (PRGF™) aumentou em 30% a liberação de VEGF, apresentando a concentração relativa de aproximadamente 290,00 pg/mL após o processamento do PRGF².

Kobayashi *et al.* 2016 demonstrou por ELISA que a matriz de fibrina obtida por dois métodos, *Standard platelet rich fibrin* (PRF) e *advanced platelet rich fibrin* (A-PRF™), apresentaram cinéticas distintas na liberação de fatores de crescimento, ressaltando a grande influência nas variações dos parâmetros de centrifugação, especialmente o tempo e a presença de ativadores de coágulo no espécime. Os métodos avaliados apresentaram, respectivamente as seguintes concentrações de VEGF em pg/mL 10 dias após a sua obtenção: a) *Standard PRF* = 732,00 e b) *A-PRF* = 847,00³.

Pinto *et al.* 2014, ao avaliarem o impacto do nível de vibração exercido pela centrífuga na qualidade final do concentrado plaquetário e na liberação de fatores de crescimento também demonstraram por ELISA uma significativa importância das variações protocolares ao compararem a liberação de VEGF pelos protocolos intraspín L-PRF™ e A-PRF™, apresentando em pg/mL, respectivamente, 994,00 ± 159,00 e 514,00 ± 188,00 ao final de 7 dias⁹ após o seu preparo.

Rodella *et al.* 2011, avaliaram a concentração de VEGF do protocolo *concentrated growth factors* (CGF™) por imunohistoquímica demonstrando uma concentração de $335,15 \pm 38,11$ pg/mL. O CGF™ é obtido por um processo de variação de revoluções por minuto (rpm) durante um único ciclo de centrifugação (30" de aceleração, 2' 2,700 rpm, 4' 2,400 rpm, 4' 2,700 rpm, 3' 3,000 rpm, e 36" de desaceleração e parada)³⁰.

Masuki *et al.* 2016³¹, compararam a concentração de VEGF e outros FCs obtidos pelos métodos PRP, PRGF™, A-PRF™ e CGF™ onde demonstraram maiores concentrações relativas nos agregados leucoplaquetários, A-PRF™ e CGF™.

Al-Maawi *et al.* 2018 encontraram diferenças significativas na liberação de VEGF cumulativa de 10 dias em matrizes de fibrina obtidas pelo método A-PRF isentas de compressão mecânica $585,08 \pm 64,61$ pg/mL e compressas em formatos de plugs $848,19 \pm 132,4$ pg/mL³².

Acerca dos protocolos existentes e divulgados na literatura científica, nem todos tratam suas características com a devida formalidade em discriminar os parâmetros como a força centrífuga relativa (FCR), tempo de centrifugação e características particulares dos tubos para coleção sanguínea que foram utilizados. A descrição metodológica em função das revoluções por minutos (RPM) tem sido recorrente sem a devida definição da região de eleição para o cálculo da FCR podendo incorrer em erro de reprodutibilidade pela geração de forças distintas às estabelecidas pelos métodos de eleição^{33,34}.

O presente manuscrito traça um comparativo na cinética da liberação do VEGF observando a influência de 3 aspectos metodológicos usualmente empregados na obtenção da LPRF: 1. O tipo de tubo em função da presença de aditivos pró-coagulantes; 2. A FCR empregada na zona de maior concentração leucoplaquetária do agregado, utilizando como referência o raio médio do rotor da centrífuga (r_{med}); 3. O tempo de centrifugação. Neste estudo pretende-se obter uma melhor compreensão sobre a cinética da liberação deste FC em função de diferentes parâmetros metodológicos sem preconizar nenhum método comercial ou protocolo específico.

2. Materiais e Métodos

2.1. Aspectos éticos

Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com seres humanos foram rigorosamente obedecidas, em concordância com a lei 6.638/79 e conforme a declaração de Helsinque (World Medical Association Recommendation 2011). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob o número 055468/2015.

2.2. Participantes

Participou voluntariamente deste estudo 1 indivíduo adulto jovem do gênero masculino do qual foram obtidos 270ml de sangue total em 3 coletas de 90ml a cada dia após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O mesmo declarou-se saudável, não tabagista e não portador de doenças infecto-contagiosas. A opção de único participante foi feita para evitar interferências nas concentrações de VEGF devido a variações biológicas individuais, uma vez que o propósito do experimento foi avaliar somente as implicações de variações metodológicas.

O participante foi submetido à realização prévia de anamnese e do hemograma completo que apresentou índices hematimétricos dentro dos valores de referência. O hemograma foi realizado no laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com seres humanos foram rigorosamente obedecidas, em concordância com a lei 6.638/79 e conforme a declaração de Helsinque (World Medical Association Recommendation 2011). Este estudo (CAAE nº 46109215.9.0000.5558) foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

2.3. Coleta Sanguínea

Todo material de coleta foi apresentado ao doador em embalagem estéril e inviolada. Foi realizada a abertura do cateter sobre agulha 21G do sistema de coleta à vácuo (Greiner Bio-One Vacuette, Brasil).

Previamente à coleta sanguínea foi feita a antissepsia das mãos do flebotomista com álcool 70% e calçamento de luvas de procedimento;

O doador de sangue foi acomodado com o repouso do seu membro superior sobre base de apoio para a coleção sanguínea com exposição anterior da fossa antecubital;

Foi realizada a aplicação de dispositivo para compressão venosa (garroteamento) com um massageamento ascendente compressivo na face anterior do antebraço;

Feita a seleção da veia na fossa antecubital (cefálica, intermédia antecubital ou basilíca) por inspeção e palpação digital com o dedo indicador do flebotomista procedeu-se a antissepsia antecubital com *swab* álcool 70% (Benckton Dickson, USA) com dois movimentos ascendentes com inversão da face aplicada do *swab*;

A venopunção foi feita por inserção do dispositivo venopuncto (Greiner Bio-One Vacuette, Brasil) com a exposição da agulha e bisel voltado para cima com angulação entre 15 e 30° em único movimento. A introdução oblíqua da agulha permitiu a visualização da penetração vascular pelo retorno sanguíneo no interior da cânula plástica entre as extremidades proximal e distal do cateter sob agulha.

Cada coleção sanguínea foi realizada com dois tipos de tubos: Tubo 1: vidro isento de aditivos (Labor Import, China); Tubo 2: plástico com ativador de coágulo de 5mL (Benckton Dickson, USA); previamente à inserção dos tubos, foi realizada a assepsia das suas tampas com álcool 70%.

Durante a coleta os tubos foram posicionados com a tampa para baixo afim de proporcionar o preenchimento ascendente. Isto além de facilitar a visualização reduziu o risco de hemólise por impacto excessivo do sangue contra a parede e fundo do tubo.

Na finalização da coleta o último tubo foi removido, a agulha do cateter removida e aplicado um rolete de algodão estéril sobre o ponto de inserção da agulha com a manutenção da compressão por 3 minutos sem a dobra do cotovelo. Após este período foi feita a aplicação do curativo estéril (Labor Import, China).

2.4. Centrifugação

Após o término da venopunção os tubos foram imediatamente levados para a centrífuga e posicionados em balanço diametral no rotor com um tubo idêntico preenchido com água pelo sistema a vácuo para proporcionar estabilidade vibracional.

A centrifugação foi realizada na centrífuga de rotor fixo Fibrinfuge25® (FF25) - (Montserrat, China) e os espécimes foram obtidos nas seguintes faixas de FCR de 200, 400 e 800 x g nos seguintes intervalos tempo: 5, 10 e 15 minutos, de acordo com o diagrama experimental na tabela 3.

Tabela 3. Diagrama experimental

Tipo de tubo	FRC	Tempo de centrifugação (minutos)	Tipo de tubo	FRC	Tempo de centrifugação (minutos)
Vidro	200	5	Tubo de plástico com ativador de coágulo	200	5
		10			10
		15			15
	400	5		400	5
		10			10
		15			15
		5			5
		10			10
		15			15
	800	5		800	5
		10			10
		15			15

Tabela 3. O raio médio do rotor da centrífuga FF25 (65mm) foi utilizado para o cálculo das FCRs (200xg = 1670 RPM; 400xg = 2350 RPM; 800 xg = 3320 RPM)

\

2.5. Preparo das matrizes de LPRF

As amostras de sangue foram coletadas utilizando os tubos 1 e 2 utilizando o sistema de coleta à vácuo com agulha 21G (Greiner Bio-One, Brasil). Cada tubo de 5 mL apresentou tempo médio de preenchimento de $10,0 \pm 5,0$ segundos. As amostras sanguíneas foram centrifugadas imediatamente após a coleta do último tubo. Os parâmetros de rpm e tempo foram devidamente ajustados para reproduzir os níveis de FCR eleitos para a realização deste experimento.

2.6. Preparo e quantificação de VEGF

Depois de centrifugadas as 54 matrizes de LPRF obtidas a partir das variações paramétricas deste experimento foram removidas e condicionadas em tubos plásticos sem aditivo (Greiner Bio-One, Brasil) e mantidas a 37°C em estufa (Lab Line Instruments, USA) para a coleta de 200 µL do soro sobrenadante em diferentes tempos (0, 2, 24, 48,72, 96 e 168 horas). Cada alíquota removida foi estocada em criotubo (Kasvi, China) e armazenada em ultrafreezer (Sanyo, Japão) a -80°C.

Para a quantificação de VEGF foi utilizado o método *cytometric bead array* (CBA) a partir do kit comercial (*Human VEGF Flex Set e Cell Signaling Master Buffer Kit BD™ CBA*, USA) conforme as especificações do fabricante³⁵. As amostras foram retiradas do ultrafreezer e descongeladas à temperatura ambiente e removida a alíquota de 25 µL do soro, e então, depositadas em criotubo âmbar para fotoproteção. Para o preparo da curva de calibração foi

reconstituído o padrão de VEGF com 1,0 mL do diluente da amostra com homogeneização apenas por pipetagem e incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Foram diluídas alíquotas do padrão total nas proporções 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256 para obtenção da curva padrão. Os *beads* de captura foram diluídos em solução diluente para os mesmos sob fotoproteção em criotubos âmbar a partir na proporção de 0,5 µL por amostra. Os *beads* de detecção foram preparados na mesma proporção de 0,5µL/amostra e mantidos a 4,0 °C ao abrigo da luz, antes do uso. O procedimento pré-analítico das amostras seguiu a seguinte sequência: a) em cada criotubo âmbar foi adicionado 25 µL da amostra de soro coletado; b) a este foi adicionado 25 µL da solução dos *beads* de captura, feita homogeneização em vórtex e foi incubado por 60 minutos à temperatura ambiente; c) após o tempo de incubação foi adicionado 500 µL do tampão de lavagem, submetido à homogeneização em vórtex e centrifugação a 200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente na centrífuga 1K15 (Sigma, Germany); d) após a centrifugação foi retirado o volume de 450 µL do sobrenadante e adicionados 25 µL da solução de *beads* de detecção; e) a amostra foi homogeneizada e mantida sob fotoproteção por 120 minutos à temperatura ambiente; f) após este período de incubação foi adicionado 500 µL do tampão de lavagem e a amostra foi submetida a nova centrifugação de 200 x g por 5 minutos; g) foram removidos 450 µL do sobrenadante e adicionado 150 µL do tampão para reconstituir o volume final e homogeneizado em vórtex; h) A partir deste ponto foi pipetada a alíquota de 50 µL de cada amostra e aplicada sobre a placa de amostras e a leitura feita do citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD™, USA). Os parâmetros de leitura no citômetro de fluxo foram estabelecidos de acordo com as recomendações do

fabricante para este analito. Os dados das análises foram utilizados para o cálculo de concentração utilizando o programa *FCAP Array™ Software Version 3.0* (BD™, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.7. Análise estatística

A escolha de único participante foi para avaliar a cinética na liberação de VEGF isenta das variações nas concentrações entre indivíduos, considerando apenas as variações paramétricas propostas no estudo. Entretanto, as leituras no citômetro de fluxo foram feitas em triplicata e cada leitura representa medidas de múltiplas análises, isto permitiu-nos a interpretação estatística dos dados. Para testar a normalidade amostral foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. Nas análises multigrupos, ao avaliar as concentrações cumulativas para comparar a distribuição em amostras independentes foi utilizado o teste ANOVA para a análise de variância onde utilizou-se o teste Kruska-Wallis como pós-teste. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O software *GraphPadPrism 8* (GraphPad, USA) foi utilizado para as análises dos dados, geração e edição dos gráficos.

3. Resultados

Os valores da liberação de VEGF foram descritos em pg/mL e apresentados em função do intervalo de tempo que compreendeu 7 pontos em dias e das FCRs às quais foram submetidos os espécimes nos dois tipos de tubos utilizados. As figuras 1 e 2 agrupam os gráficos que apresentam de forma sistemática a cinética da liberação lenta de VEGF dentro dos critérios metodológicos estabelecidos. Os dados são médias \pm desvio-padrão (n=3) para cada valor. VEGF = Vascular Endotelial Growth Factor; x g = Força “centrífuga” ou FCR; Δt = Intervalo de tempo. Todas as amostras foram analisadas nos 3 Δt s, nas 3 FCRs e com matrizes obtidas nos 2 tipos de tubos propostos em triplicata.

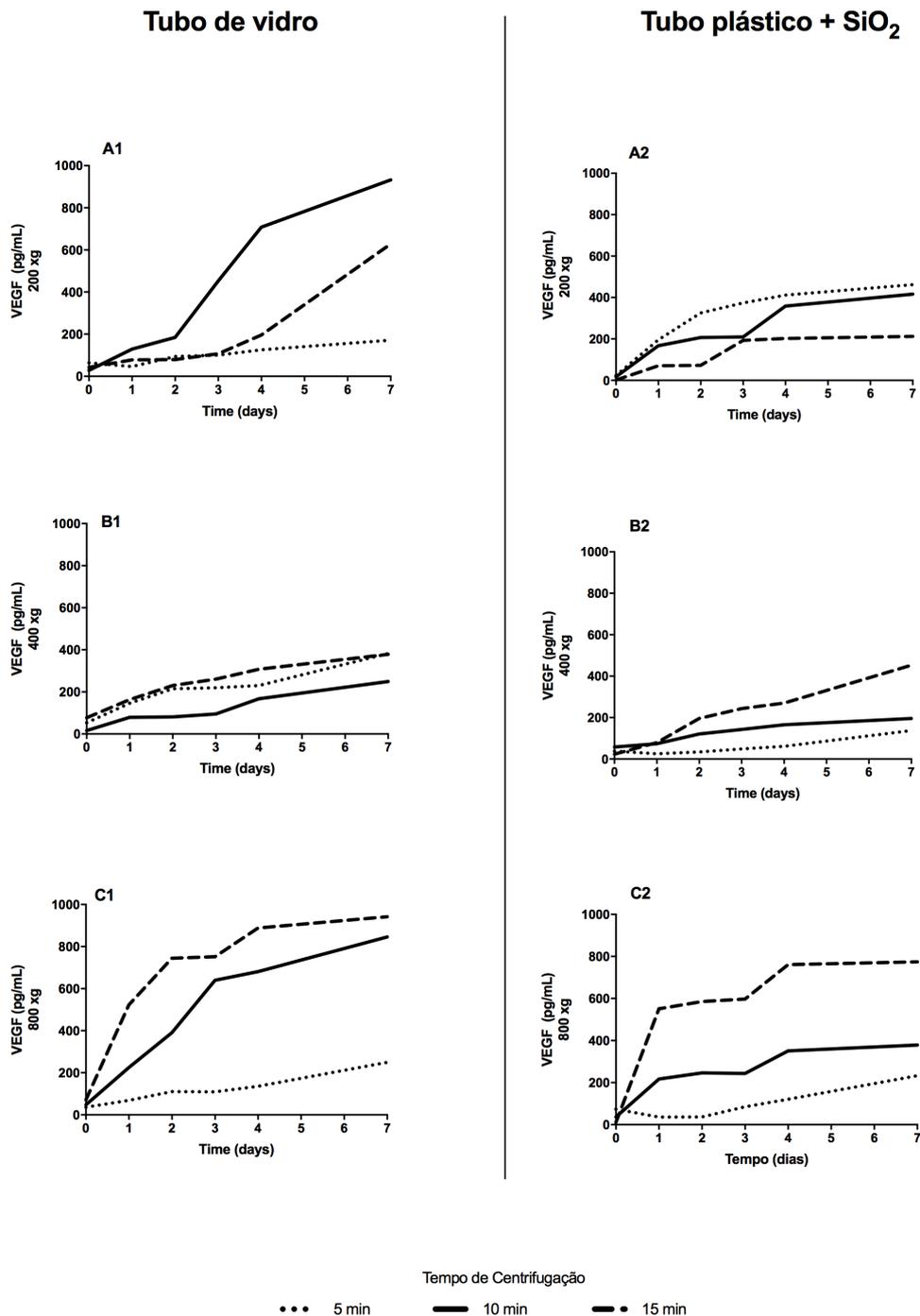


Figura 1. Esta figura é composta por gráficos em que os dados foram agrupados por FCR. As maiores concentrações de VEGF liberadas da matriz de L-PRF em $\Delta t=7$ foram as amostras submetidas à centrifugação por 800 xg/15 min (941,94 pg/mL) e 200 xg/10 min (932,83 pg/mL) ambas em tubos de vidro. As menores concentrações foram nas amostras submetidas à centrifugação por 200 xg/5 min (212,27 pg/mL) e 400 xg/10 min com os valores (249,29 pg/mL). Nas matrizes obtidas em tubos plásticos com ativador de coágulo as maiores concentrações de VEGF foram observadas nos espécimes obtidos à centrifugação por 800 xg/ 15min (774,45 pg/mL) e por 800 xg/10 min (846,11 pg/mL) também em $\Delta t=7$. Os menores valores observados com estes mesmos tubos neste mesmo período foram nas amostras centrifugadas por 200 e 400 xg por 5 e 10 min, respectivamente, (171,46 pg/mL e 137,27 pg/mL). Em $\Delta t=1$, após a obtenção dos espécimes, quase todas as amostras apresentaram valores abaixo de 40 pg/mL demonstrando o mínimo desprendimento destas moléculas nas fases iniciais, exceto nas centrifugações por 800 xg/15 min, gráficos C1 e C2, onde a liberação de VEGF nas primeiras 24 horas manifestou-se em progressão exponencial. Em quase todas as comparações por intervalos de tempo as matrizes obtidas em tubos de vidro apresentaram maiores concentrações relativas e totais em relação às matrizes obtidas nos tubos plásticos com ativador de coágulo. As maiores concentrações, exibidas nos intervalos finais, $\Delta t=4$ e $\Delta t=7$, demonstraram a cinética de desprendimento lento e crescente das moléculas deste fator de crescimento da matriz de fibrina.

Os valores de concentração acumulada de VEGF foram obtidos pelo somatório das concentrações observadas nos intervalos experimentais entre 0 e 7 dias. Deste modo, obtivemos uma concentração teórica de VEGF total em cada matriz pelo seu produto com a volumetria sanguínea ideal para a obtenção da matriz de LPRF em cada variação paramétrica proposta no presente estudo. Os dados foram apresentados em $\mu\text{g}/\text{matriz}$ na tabela 4.

Tabela 4. Valor teórico de VEGF acumulado *in vitro* durante 7 dias.

tempo / tubo	200 xg		400 xg		800 xg	
	vidro	PET	vidro	PET	vidro	PET
5	7,07	7,03	12,47	3,46	28,93	15,11
10	24,35	14,18	6,88	7,56	6,46	5,23
15	19,77	9,82	14,93	11,90	39,21	33,06

O valor teórico acumulado de VEGF liberado ao longo de 7 dias em $\mu\text{g}/\text{matriz}$ foi obtido considerando o volume ideal de 10mL para a obtenção das matrizes de L-PRF.

4. Discussão

Os métodos para obtenção da LPRF apresentados na literatura científica atual possuem, dentre suas várias características biológicas, a liberação lenta dos fatores de crescimento como princípio fundamental e principal característica biológica. Entretanto, existem resultados controversos acerca das concentrações relativas por volume sanguíneo entre diferentes protocolos observados *in vitro*. Atribui-se a isto algum nível de vantagem ou desvantagem, apenas observada em nível laboratorial, por considerar o valor de moléculas desprendidas da matriz em função do tempo sem haver até o presente momento respostas clínicas que justifiquem algum nível de superioridade³⁶. De modo geral, os métodos apresentam mínimas variações operacionais entre intervalos de tempo, FCR e tipos de tubos utilizados.

A proposição de um método simplificado e minimamente expensivo para obtenção de uma matriz de fibrina autóloga teve início com trabalhos de Choukroun e Schleicher em 2000³⁷, que à época, em função da correlação com o plasma rico em plaquetas (PRP) este agregado foi denominado fibrina rica em plaquetas (PRF) e o protocolo para sua obtenção foi alcunhado como PRF Standard ou PRF Choukroun Process™. Este mesmo método foi registrado na agência sanitária americana *Food and Drug Administration (FDA)* com insígnia *Intraspin L-PRF™* sob coordenação da companhia Intralock Internacional (Boca Raton, USA). Deste modo surgiram na literatura diferentes nomes para designar o mesmo método para obtenção da PRF. Sendo assim, os termos *PRF Standard*, *PRF Choukroun Process* e *Intraspin L-PRF* descrevem a mesma metodologia. Entretanto, diferenças paramétricas tem sido apresentadas na literatura

internacional sempre objetivando demonstrar alguma correlação de evolução metodológica e/ou superioridade em suas características biológicas^{36,38-42}.

Muitos trabalhos referenciam o método *PRF Standard* de centrifugação em função das revoluções por minuto (rpm) ao preconizar a submissão do sangue a um ciclo de 2700 rpm durante 12 minutos ou 3000 rpm durante 10 minutos tal como foi descrito nas primeiras publicações de Choukroun e colaboradores⁴³.

São frequentes na literatura científica trabalhos experimentais e clínicos que utilizaram distintas centrífugas sem a devida observação à FCR gerada por tais revoluções, bem como as características estruturais e funcionais da centrífuga originalmente eleita para tal método, a EBA20 (Hettich, Alemanha). Existe uma proporcionalidade direta das RPM e FCR em relação ao raio do rotor da centrífuga. Deste modo, ao substituir o equipamento deve-se levar em conta qual é o raio do rotor para que se aplique um fator de correção de acordo com a equação $g = 1,12 \times r \times (RPM/1000)^2$, onde r = raio do rotor.

Outro detalhe de suma importância é a eleição do raio a ser utilizado como padronização metodológica, pois nas ciências laboratoriais utiliza-se o raio na fundo do tubo (r_{max}) e diferentes métodos para obtenção da LPRF utilizam o raio na porção média do tubo (r_{med}), área correspondente à maior concentração leucoplaquetária³⁶. A inobservância a este princípio tem proporcionado erros metodológicos frequentes na literatura gerando resultados controversos quanto à cinética e concentração na liberação dos fatores de crescimento.

Miron *et al.* 2018⁴⁴ e Miron *et al.* 2019³⁸ publicaram trabalhos sobre controvérsias na literatura acerca da referência paramétrica da centrifugação, onde propuseram que a FCR fosse calculada na porção terminal dos tubos para acompanhar a padronização internacional para centrifugações laboratoriais ou que houvesse, pelo menos, a discriminação da zona de eleição do tubo em rotores de ângulos fixos para a adequação do cálculo de FCR. O presente estudo utilizou o r_{max} para a descrição e estabelecimento da FCR. Entretanto, também apresentou na descrição metodológica as medidas dos três raios existentes na centrífuga de eleição para o experimento, proporcionando assim sua correta reprodução metodológica.

El Bagdadi *et al.* 2016⁴⁵ compararam a liberação de VEGF entre os métodos Intraspin L-PRF[™], A-PRF[™] e A-PRF+[™]. Neste experimento atribuíram uma FCR de 708 x g ao método intraspín L-PRF[™], sendo que o mesmo é preconizado em 400 x g utilizando como referência o raio médio. Ao submeter o sangue à centrifugação em diferentes centrífugas utilizando as rpm como princípio sem a devida distinção a FCR gerada ficará diferente do valor preconizado alterando a composição celular e plaquetária, bem como a concentração de fatores de crescimento.

Kobayashi *et al.* 2016³ compararam dois métodos de obtenção de LPRF sem distinguir características estruturais dos equipamentos utilizados pelos métodos A-PRF[™] e PRF Standard e submeteram o sangue à força de 100g e de 325g, respectivamente³, sendo que o método A-PRF[™] originalmente

proposto por Ghanaati *et al.* 2014 preconiza a força de 214 x g⁴⁶ e o PRF Standard de 400 x g.

Os trabalhos de Anitua *et al.* 2016², de Dohan *et al.* 2015⁹ e de Kobayashi *et al.* 2016³, todos versando sobre a liberação de fatores de crescimento, apresentaram suas comparações protocolares sem o amplo esclarecimento de todos os parâmetros preconizados pelos métodos PRGF™, intraspín L-PRF™ e A-PRF™, respectivamente, gerando resultados inconclusivos acerca da concentração de fatores de crescimento liberados a partir de cada metodologia.

Em função de diferentes padrões metodológicos descritos na literatura, a proposta do presente estudo foi identificar a cinética na liberação do VEGF sob a influência de variações paramétricas e não de métodos comerciais e/ou intelectuais já descritos na literatura. Foram avaliadas as influências de 3 faixas FCR, 3 intervalos de tempo e 2 tipos de tubos. A escolha de único doador e apenas um fator de crescimento foi para reduzir interferências de variações biológicas no universo amostral. Deste modo, valorizou-se a diversidade paramétrica sob a matriz de mesma fonte e não a diversidade amostral.

Os resultados do presente estudo permitiram identificar as influências da FCR sobre a cinética na liberação de VEGF. As centrifugações por 800 x g exibiram concentrações acima de 400 pg/mL logo nas 24 horas iniciais do experimento. Este dado demonstrou o precoce desprendimento deste FC da matriz. Inicialmente, duas possíveis causas poderiam suportar tal evidência: o alto nível de degradação plaquetária durante a centrifugação ou uma precoce

fibrinólise. Entretanto, as micrografias do estudo de caracterização morfológica, capítulo 3, demonstraram integridades plaquetária não corroborando com a primeira hipótese. Entretanto, as análises das superfícies das fibras e fibrilas de fibrina nas amostras submetidas a esta FCR demonstraram redução de diâmetro e destacamento de partículas a partir do 7º dia do experimento de fibrinólise, vide capítulo 3, corroborando com a segunda hipótese. Deste modo, entendemos que a dinâmica da centrifugação com maiores faixas de rpm e conseqüentemente FCR mantém a integridade estrutural dos elementos sanguíneos, mas parecem promover maior liberação precoce do seu conteúdo de VEGF associada à precocidade de fibrinólise. Este dado *in vitro* demonstrou que matrizes de LPRF produzidas com altas faixas de FCR podem não assegurar a proteção proteolítica aos peptídeos, citocinas e FC incorporados em sua matriz tridimensional pelo desprendimento precoce durante as primeiras etapas do reparo tecidual, ou seja, ainda na fase inflamatória aguda cujo potencial proteolítico torna-se aumentado.

As amostras submetidas à centrifugação com FCR 400 x g apresentaram as menores concentrações de VEGF em todos os Δt avaliados neste experimento. Este dado não é suficiente para determinar se este é um aspecto favorável, especialmente por não exibir maiores concentrações em $\Delta t=4$ e $\Delta t=7$.

As amostras submetidas à centrifugação com FCR 200 x g, especialmente nos espécimes obtidos com tubos de vidro, exibiram linearidade em seu padrão cinético que sugere o real significado da liberação lenta e gradual de VEGF, especialmente nos espécimes centrifugados durante 10 e 15 minutos. Em $\Delta t=1$

as concentrações, independentemente do tempo de centrifugação, apresentaram valores abaixo de 100 pg/mL.

De modo geral os resultados demonstraram que a utilização do tubo de vidro apresentou maiores concentrações de VEGF em todas as faixas de FCR e tempos aplicados. As maiores concentrações evidenciadas no estudo foram 800G/5min e 200G/10min. Tais resultados denunciaram uma possível influência da RCF total, ou seja, a força total sofrida pelo agregado em função do tempo na liberação lenta do VEGF. Deste modo, uma força de maior magnitude aplicada por intervalo de tempo mais curto tenderia a gerar um efeito similar ou compensatório em detrimento de uma força menor por maior tempo de centrifugação.

O trabalho de Eren *et al.* 2016, considerou que o tempo total de centrifugação exerce forte influência na concentração total de VEGF liberado apresentando maiores concentrações ao final de 72 horas quando submetido a 12 minutos de centrifugação⁴⁷ ao invés de 10 minutos. No presente estudo foi observada muita proximidade dos valores nas concentrações de VEGF em $\Delta t=7$ liberados por amostras obtidas por 200 x g/10, 800 x g/5 e 800 x g/15 minutos, porém com significativa diferença nos estádios iniciais $\Delta t=1$ e $\Delta t=2$.

Os espécimes obtidos com tubos de vidro demonstraram maiores concentrações de VEGF liberados, especialmente após 72hs, quando comparados aos obtidos em tubos plásticos com ativador de coágulo. Sendo o ativador de coágulo um produto à base de óxido de silício, potencialmente, pode provocar alterações moleculares de natureza oxidativa sobre peptídeos

impregnados na matriz de fibrina aumentando sua adesão ou dificultando seu desprendimento da matriz aumentando sua permanência no seu leito. As partículas de silício empregadas como ativador de coágulo fixam-se na rede de fibrina e podem exercer efeito direto sobre o seu conteúdo como maior grau de adesão de moléculas desprendendo-as em intervalos de tempo superiores aos observados no presente estudo. É possível que isto justifique os níveis de VEGF reduzidos no exsudato desprendido da matriz de fibrina durante o experimento.

Bonazza *et al.* 2016 ao comparar os efeitos de 3 distintos tipos de tubos sobre a matriz de LPRF obtida pelo método CGF™ apresentou distinta distribuição leucoplaquetária e na densidade da malha de fibrina observáveis por ensaios de imunohistoquímica⁴⁸. Estes dados contrariam dados apresentados por Dohan *et al.* 2010a que relatou que os tubos testados, de vidro e de plástico com ativador de coágulo, não alteram a arquitetura da LPRF⁴⁹.

A este respeito, o presente estudo demonstra a nítida influência do tipo de tubo na redução da liberação lenta de VEGF, evidenciando maiores concentrações relativas em distintos intervalos de tempo nos espécimes obtidos em tubos de vidro. Isto pode não ser desvantajoso, pois nosso experimento sobre a degradação temporal da matriz de fibrina, vide capítulo 3, demonstrou que a concentração de fatores de crescimento aumentou à medida em que as fibras e fibrilas de fibrina reduziram sua espessura e desprenderam partículas de sua superfície. De Oliveira *et al.* 2020 descreveram sobre a influência da força g sobre a cinética da liberação de VEGF⁵⁰.

Deste modo, a menor concentração de FC no exsudato pode possuir dois significados; 1) o peptídeo foi degradado e de fato não está presente; 2) o peptídeo encontra-se fortemente aderido e funcionalmente protegido no leito da matriz de fibrina e seu desprendimento dependerá de sua fibrinólise. A este respeito os estudos de imunohistoquímica e/ou microscopia confocal podem elucidar o verdadeiro curso desta mobilidade de FC entre a matriz e o exsudato. Os imunoenaios, a maior parte realizados em kits comerciais por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* sobre o exsudato, serviram para demonstrar que as matrizes de LPRF, independentemente do método comercial eleito, apresentam concentrações suprafisiológicas de FC derivados de plaquetas e leucócitos. Novos estudos podem trazer informações mais esclarecedoras sobre o comportamento deste desprendimento *in vivo*, sob a ação de enzimas e sob condições metabólicas variáveis do equilíbrio ácido-básico, temperatura e mecanismos de indução-resposta durante o reparo tecidual, pois de fato, os experimentos *in vitro* são muito limitados em traduzir o que realmente ocorre no organismo vivo uma vez que são realizados em condições ambientais e metabólicas controladas.

Para avaliar o potencial risco que os ativadores de coágulo podem provocar, Dohan *et al.* 2007⁵¹ realizaram estudos de citotoxicidade *in vitro* em 4 grupos de células humanas (fibroblastos, pré-adipócitos, queratinócitos e osteoblastos) onde seus dados demonstraram ausência de citotoxicidade. Segundo as conclusões deste estudo, apesar dos tubos para coleta a vácuo destinarem-se ao diagnóstico *in vitro*, e possuírem classificação *in vitro device*

(IVD), os coágulos de fibrina obtidos em tubos plásticos contendo SiO₂ para serem reaplicados localmente não ofereceram risco de citotoxicidade.

No presente estudo, todos os tubos de vidro centrifugados por 5 minutos apresentaram sobrenadante líquido ao final do ciclo de centrifugação. Os mesmos tiveram total formação da matriz de fibrina a cerca de 5 minutos após o término da centrifugação. Este dado merece ser observado na elaboração de um método de centrifugação para obtenção de LPRF, uma vez que sua distribuição celular e plaquetária está relacionada à angulação do rotor e à formação da matriz durante a centrifugação. Independentemente do tempo de centrifugação, todos os tubos plásticos com ativador de coágulo apresentaram a matriz polimérica e parcialmente retraída ao final do tempo de centrifugação exibindo uma pequena porção de soro liberado da matriz na porção superior do tubo. Isso demonstra o potencial oxidante do ativador de coágulo na ativação do fator XII por efeito tixotrópico aumentando a efetivamente a velocidade na formação e retração do mesmo³⁶.

A fabricação de tubos plásticos com ativadores de coágulo destinados à sorologia sanguínea surgiu por uma demanda de biossegurança na área de diagnóstico laboratorial⁵². Os tubos de vidro servem perfeitamente ao propósito de acelerar a formação e retração do coágulo por efeito tixotrópico, entretanto, são susceptíveis à quebra durante o manuseio e a centrifugação aumentando o risco de acidentes laborais. Deste modo o uso dos tubos plásticos com ativadores de coágulo, na logística laboratorial, aceleram a formação do coágulo e diminuem os riscos destes acidentes.

Uma vez que a SiO_2 intensifica e acelera a formação do coágulo, o mesmo poderá influenciar a organização da trama da rede de fibrina, bem como a incorporação dos FC. O trabalho de Mosesson *et al.* 2005⁵³ descreve a formação de junções equilaterais que incorporam 3 monômeros de fibrina na organização estrutural da cadeia polimérica das fibras e fibrilas de fibrina sob a influência da lenta velocidade de polimerização do fibrinogênio. As junções equilaterais proporcionam maior resistência e elasticidade à rede, bem como maior resistência à fibrinólise. Segundo este fundamento, o retardamento da retração do coágulo poderá proporcionar maior incorporação de glicoproteínas adesivas, fatores de crescimento e micropartículas circulantes presentes no sangue. Por outro lado, a polimerização mais rápida, pela ação de oxidantes, pode reduzir a incorporação de FC plasmáticos e liberados precocemente pelas plaquetas e leucócitos.

Acerca das características dos tubos *in vitro*, comumente utilizados na obtenção da LPRF, Bowen e Remaley, 2014⁵⁴ esclarecem que os métodos analíticos laboratoriais são muito sensíveis às variações de aditivos empregados na fabricação de tubos para diagnóstico *in vitro*, deste modo, interferindo potencialmente nos resultados das análises. Agentes contaminantes como chumbo e outros metais pesados presentes nas borrachas e nos lubrificantes utilizados para fechamento dos tubos durante o processo de fabricação potencialmente afetariam a precisão dos testes de laboratório. Deste modo, é possível inferir que estes agentes químicos poderiam influenciar possíveis respostas clínicas relacionadas à LPRF.

Algumas empresas envolvidas com a comercialização de centrífugas e insumos para a obtenção de concentrados leucoplaquetários, em atenção às normativas sanitárias internacionais, já possuem em seu portfólio tubos estéreis em embalagens específicas com a descrição indicativa para uso *in vivo*.

Apesar desta tendência sanitária internacional quanto à indicação de equipamentos e insumos com classificação *medical device (MD)*, inexistente na literatura internacional qualquer indicativo de ineficiência, implicações tóxicas ou imunogênicas em função do uso dos tubos *IVD* contendo ativadores de coágulo na obtenção das matrizes de LPRF.

Novos estudos, utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* são necessários para trazer esclarecimentos sobre o potencial citotóxico destes ativadores ou inatividade *in loco* dos mesmos. Entretanto, devido ao melhor padrão cinético apresentado na liberação lenta de VEGF observado no presente estudo o tubo de vidro pode ser adequadamente indicado na obtenção da LPRF para emprego terapêutico não-transfusional.

Conclusão

Os resultados sobre os padrões cinéticos na liberação de VEGF permitiram observar que:

1. A FCR de menor magnitude, 400 x g apresentou melhor linearidade de desprendimento de VEGF da matriz de LPRF com liberação crescente;

2. A FCR de maior magnitude, 800 x g, promoveu a precocidade do desprendimento de VEGF, demonstrando altas e precoces concentrações no meio.

3. Nos ensaios utilizando os tubos de vidro isento de aditivos apresentaram as maiores concentrações finais de VEGF.

4. Os tubos de plástico adicionados com ativadores de coágulo apresentaram menores concentrações em todos os intervalos de tempo do experimento.

Os métodos para obtenção da LPRF devem primar pela aplicação de faixas reduzidas de FCR, tempo adequado para a formação eficiente do coágulo durante a centrifugação e tubos isentos de aditivos cujo o efeito tixotrópico na polimerização do fibrinogênio seja limitado ao contato e sem o desprendimento de partículas potencialmente tóxicas impregnáveis na matriz de fibrina. Os dispositivos para a produção da LPRF devem possuir características sanitárias adequadas para a conduta terapêutica cirúrgica. Estudos *in vivo* serão necessários para demonstrar a correlação entre as variações paramétricas e efetividade nas respostas clínicas.

Referências

1. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, And??a I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* 2006. doi:10.1016/j.tibtech.2006.02.010
2. Anitua E, Prado R, Troya M, et al. Implementation of a more physiological plasma rich in growth factor (PRGF) protocol: Anticoagulant removal and reduction in activator concentration. *Platelets.* 2016;7104:1-8. doi:10.3109/09537104.2016.1143921
3. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest.* 2016. doi:10.1007/s00784-016-1719-1
4. Kononova O, Litvinov RI, Zhmurov A, et al. Molecular mechanisms, thermodynamics, and dissociation kinetics of knob-hole interactions in fibrin. *J Biol Chem.* 2013. doi:10.1074/jbc.M113.472365
5. Niewland R and SA. Platelet-Derived Microparticles. In: Michelson AD, ed. *Platelets.* Second. Burlington: Elsevier; 2007:403-414.
6. Zubairova LD, Nabiullina RM, Nagaswami C, et al. Circulating Microparticles Alter Formation, Structure, and Properties of Fibrin Clots. *Nat Publ Gr.* 2015. doi:10.1038/srep17611
7. Litvinov RI, Farrell DH, Weisel JW, Bennett JS. Distinct fibrin- α IIb β 3 and fibrinogen- α IIb β 3 interactions The Platelet Integrin α IIb β 3 Differentially Interacts with Fibrin Versus Fibrinogen*. doi:10.1074/jbc.M115.706861
8. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, 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 Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012
9. Nelson R, Pinto, Andrea Pereda, Paula Jiménez, Marco Del Corso, Byung-Soo Kang, Hom-Lay Wang, Marc Quirynen and DMDE. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and Scanning Electr. *Poseido.* 2014;2(2):141-154.
10. Chao FC, Shepro D, Tullis JL, Belamarich FA, Curby WA. Similarities Between Platelet Contraction and cellular Motility during mitosis: Role of Platelet microtubules in Clot Retraction. *J Cell Sci.* 1976;2:569-588.
11. Kim TH, Kim SH, S??dor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol.* 2014. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.02.004
12. Carrier W, Free C, Multi-milligram LF. Material Safety Data Sheet (MSDS) for Human Fibroblast Growth Factor basic. 2009.
13. Xiao Y, Cui J, Li Y-X, Shi Y-H, Le G-W. Expression of Genes Associated with Bone Resorption is Increased and Bone Formation is Decreased in Mice Fed a High-Fat Diet. doi:10.1007/s11745-010-3397-0
14. Bradley A. Maron and Joseph Loscalzo. The Role of Platelets in Fibrinolysis. In: Michelson AD, ed. *Platelets.* 2^a. Burlington: Elsevier; 2007:415-430.

15. Alves De Fátima L, De P, Papa C. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF): Regulação transcricional e pós-transcricional. *Rev Biol da USP*. 2010;4:22-27. www.ib.usp/revista.
16. Bohatch Jr. MS, Trojan PJJ, Matkovski PD, Favero GM. Quantificação E Análise Dos Fatores De Crescimento Il-6, Tgf-B, Vegf E B-Fgf No Sobrenadante De Cultura De Mieloma Multiplo. Uma Correlação Com O Microambiente Tumoral. *Publ UEPG Ciências Biol e da Saude*. 2010;16(2):105-109. doi:10.5212/Publ.Biologicas.v.16i2.0003
17. Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, et al. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: A comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs*. 2014. doi:10.1007/s10047-014-0761-5
18. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G, Charrier JB. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Growth factor release and contradictory results. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.059
19. poseido-201422155-66-dohan.
20. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem*. 2005. doi:10.1016/S0065-3233(05)70008-5
21. Vahabi S, Vaziri S, Torshabi M, et al. Effects of Plasma Rich in Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin on Proliferation and Viability of Human Gingival Fibroblasts. *www.jdt.tums.ac.ir July J Dent*. 2015;12(7).
22. Weisel JW. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys Chem*. 2004. doi:10.1016/j.bpc.2004.07.029
23. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(1):3-9.
24. Witte MB, Barbul A. General Principles of Wound Healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-528.
25. Mcdougall S, Dallon J, Sherratt J, Maini P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Phil Trans R Soc A*. 2006;364:1385-1405. doi:10.1098/rsta.2006.1773
26. Ashizawa N, Graf K, Do YS, et al. Osteopontin Is Produced by Rat Cardiac Fibroblasts and Mediates A II -induced DNA Synthesis and Collagen Gel Contraction. *J Clin Invest*. 1996;98(10):2218-2227.
27. Khiste SV, Tari RN, Chen W-C, Lamponi S, Larreta-Garde V, Yang B. Platelet-Rich Fibrin as a Biofuel for Tissue Regeneration. *ISRN Biomater*. 2013. doi:10.5402/2013/627367
28. Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. 2011. doi:10.1186/s40729-015-0032-0
29. Pereira RCDF, Zacarias GVF, Cantarelli C, et al. Avaliação De Sete Protocolos De Obtenção De Plasma Rico Em Plaquetas. *Ciência Rural*. 2012;6. doi:10.1590/S0103-84782013005000052
30. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, et al. Growth factors, CD34 positive

- cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech*. 2011. doi:10.1002/jemt.20968
31. Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*. 2016. doi:10.1186/s40729-016-0052-4
 32. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C DE, Zrnc TA, Parvini P, Schwarz F, Sader R, Choukroun J GS. Homogeneous Pressure Influences the Growth Factor Release Profiles in Solid Platelet-rich Fibrin Matrices and Enhances Vascular Endothelial Growth Factor Release In The Solid Platelet-rich Fibrin Plugs. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent*. 2018;1(1):8:16. doi:10.4103/GFSC.GFSC_9_18
 33. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nestic D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2015. doi:10.1007/s11999-015-4192-2
 34. Lourenço ES, Mourão CF de AB, Leite PEC, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD, Alves GG. The *in vitro* release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res Part A*. January 2018. doi:10.1002/jbm.a.36346
 35. BD™ Cytometric Bead Array (CBA). <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/558336.pdf>. Accessed April 4, 2017.
 36. Oliveira, LA; Buzzi, M; Leão, MP; Andrade, PCAR; Kuckelhaus S. Ultrastructural morphological characterization of the autologous leuko-platelet fibrin matrix in association with xenogenic and alloplastic biomaterials for bone grafting. Fibrin® Protocol. *Rev Catarinense Implantodont*. 2018;18:24-33.
 37. CHOUKROUN J, ADDA F, SCHOEFFLER C VA. Une opportunité en paro implantologie, le PRF. *Implantodontie* 2001; 42 - 55-62. *Implanto*. 2001;42:55-62.
 38. Miron RJ, Pinto NR, Quirynen M GS. Standardization of Relative Centrifugal Forces (RCF) in studies related to platelet rich fibrin. *J Periodontol*. 2019. doi:10.1002/JPER.18-0553
 39. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets*. 2018;00(00):1-12. doi:10.1080/09537104.2018.1445835
 40. Dong-Seok Sohn BH, Jin Kim, W. Eric Park CCP. Utilization of Autologous Concentrated Growth Factors (CGF) Enriched Bone Graft Matrix (Sticky Bone) and CGF-Enriched Fibrin Membrane in Implant Dentistry. *J Implant Adv Clin Dent*. 2015;7(10):17-29. http://jiacd.com/wp-content/files_mf/1451940224JIACDDec15.pdf.
 41. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51(5):438-443. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.08.003
 42. Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an

- introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res Part A*. 2019;(May):jbm.a.36734. doi:10.1002/jbm.a.36734
43. Chokroun J, Adda F, Schoeffloer C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie, le PRF. *Implantodontie* 2001 ; 42 - 55-62. *Implantodontie*. 2001.
 44. Miron R, Choukroun J GS. Controversies Related to Scientific Report Describing G-Forces from Studies on Platelet-Rich Fibrin: Necessity for Standardization of Relative Centrifugal Force Values. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent* . 2018;0(0):0. doi:10.4103/GFSC.GFSC_23_18
 45. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017. doi:10.1007/s00068-017-0785-7
 46. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-689. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00138
 47. Eren G, Gürkan A, Atmaca H, Dönmez A, Atilla G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets*. 2016;27(5):427-432. doi:10.3109/09537104.2015.1131253
 48. Bonazza V, Borsani E, Bu B, Castrezzati S, Rezzani R, Rodella LF. How the different material and shape of the blood collection tube influences the Concentrated Growth Factors production. 2016;(August):1-6. doi:10.1002/jemt.22772
 49. Gassling V, Açıllı Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Response to letter of Dr. David Dohan Ehrenfest. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010;110(4):421-422. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.05.060
 50. de Oliveira, L.A.; Borges, T.K.; Soares, R.O.; Buzzi, M.; Kuckelhaus, S.A.S. Methodological Variations Affect the Release of VEGF in Vitro and Fibrinolysis' Time from Platelet Concentrates. Preprints 2020, 2020030224 (doi: 10.20944/preprints202003.0224.v1).
 51. Dohan DM, Del Corso M, Charrier J-B. Cytotoxicity analyses of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) on a wide range of human cells: The answer to a commercial controversy. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2007;103(5):587-593. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.03.016
 52. Yavaş S, Ayaz S, Köse SK, Ulus F, Ulus AT. Influence of Blood Collection Systems on Coagulation Tests. 2012:367-375. doi:10.5505/tjh.2012.59254
 53. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Trombos Hemost*. 2005;3:1894-1904.
 54. Bowen RAR, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Medica*. 2014;24(1):31-44. doi:10.11613/BM.2014.006

Capítulo 5

Contribuições e Desdobramentos

**CONTRIBUIÇÕES DO PROJETO “CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA FIBRINA
LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA. PERSPECTIVAS NA
APLICAÇÃO CLÍNICA”.**

APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa “CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA. PERSPECTIVAS DA APLICAÇÃO CLÍNICA” surgiu de uma demanda profissional da classe odontológica de melhor entendimento sobre as bases biológicas das matrizes autólogas de fibrina humana.

Esta matriz ficou conhecida internacionalmente como *leukocyte platelet-rich fibrin*, acronizada como LPRF e uma das primeiras contribuições desta pesquisa foi defini-la, embasado no valor da nomenclatura biológica, onde a descrição do produto abrangeu sua identidade, composição e aplicação clínica. Assim foi definida como Fibrina Leucoplaquetária Autóloga. O termo FIBRINA define o que ela é estruturalmente; o neologismo de LEUCOPLAQUETÁRIA a sua composição; e AUTÓLOGA sua origem e limite de aplicação terapêutica.

Este termo não é inédito na literatura científica, pois já conta com sua utilização em artigos publicados em revistas científicas nacionais e internacionais na área de odontologia¹⁻⁸. Estas publicações referenciadas tiveram influência desta pesquisa realizada na Faculdade de Medicina, Faculdade de Tecnologia e Instituto de Biologia e da Universidade de Brasília.

As contribuições desta pesquisa atingiram diferentes áreas sociais, as mesmas serão elencadas abaixo:

1. Capacitação profissional de cirurgiões dentistas para o uso dos concentrados sanguíneos autólogos (200 oficinas didáticas com mais de 2000 profissionais capacitados) – Fibrin Workshop;
2. *Titulación de Profesor Visitante da Universidad Nacional de Caaguazu – Caaguazu – Republica do Paraguay por la Resolución CD N° 10/2016 de 04 de febrero de 2016* pela contribuição científica à faculdade de odontologia. Anexo IV.
3. Assessoria técnica ao Conselho Federal de Odontologia (CFO) nos assuntos relacionados ao uso terapêutico não-transfusional do sangue no âmbito da odontologia. Este trabalho voluntário foi cooperador da criação e publicação da Resolução 158/2015 sobre o uso de concentrados sanguíneos autólogos não-transfusionais no âmbito da odontologia; Anexo VI.
4. Projeto de pesquisa intervencionista em humanos para tratamento de lesões de difícil cicatrização aprovado pelo CEP (Univille-Joinville-SC) e finalizado com artigo científico intitulado “Membrana de Fibrina Leucoplaquetária Autóloga: Avanços no Tratamento de Feridas Crônicas de Membros Inferiores” aceito para publicação pelo periódico Revista Latinoamericana de Enfermagem ISSN 1518-8345. Anexo VII
5. Projeto de pesquisa intervencionista em humanos para tratamento de lesões músculo-tendíneas, aprovado pelo CEP (Hospital Municipal

São José – Joinville-SC) e finalizado com artigo científico intitulado “Cell Composition and Functional Evaluation of Muscle-Tendon Repair of Platelet-Rich Fibrin in Monomeric Phase” submetido à ao periódico *Muscle, Ligaments and Tendons Journal* ISSN 2240-4554. Anexo VIII

6. Projeto de pesquisa intervencionista em humanos para tratamento de lesões de difícil cicatrização, aprovado pelo CEP (FM-UNB), em curso na área de estomaterapia do Hospital Universitário de Brasília como projeto integrativo entre alunos de iniciação científica dos cursos de medicina e enfermagem, bem como enfermeiros e médicos staff do HUB.
7. Projeto de Pesquisa em Humanos na área de otorrinolaringologia e neurocirurgia, aprovado pelo CEP (Fundação Hospital de Base de Brasília), sobre o uso da fibrina leucoplaquetária autóloga como agente hemostático em cirurgias de base de crânio e proteção de calota craniana em craniotomias.
8. Contribuição técnica com a gerência de sangue, células e tecidos da ANVISA no 1º Seminário Internacional para a Regulamentação do Uso do Plasma Rico em Plaquetas na Medicina realizado em agosto de 2018 na sede da ANVISA em Brasília-DF.

Em termos gerais, este projeto de pesquisa trouxe e trará contribuições na esfera científica pela geração de conhecimento para ensino, pesquisa e extensão; na saúde pública por contribuir com o desenvolvimento de técnicas terapêuticas validadas e com nível de

evidência que reduzem expensas e valorizam a prática clínica com princípios terapêuticos no uso racional do sangue autólogo; no desenvolvimento pela criação de postos de trabalho nas áreas de assistência (ex. clínicas locais para tratamentos de ferida gerenciadas de modo autônomo por enfermeiros) e na indústria (ex. desenvolvimento de equipamentos e insumos médicos para obtenção dos concentrados sanguíneos).

Deste modo compreendemos que este projeto manifestou o cumprimento da função universitária: gerar conhecimento e aplicação para atender às demandas da sociedade.

Referências

1. Nogueira, S.L.; Martinez, E.F.; Peruzzo, D.C.; Joly, J.C.; Napimoga, M.H. Inflammatory cell profile using different autologous fibrin protocols. *Tissue and Cell*. Doi.org/10.1016/j.tice.2020.101.407
2. Inchingolo, F.; Dipalma, G.; Paduanelli, G.; de Oliveira, Leonel Alves et al. Computer-Based of na atraumatic sinus augmentation technique usinf CBCT. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 33:6 (S2) 31-39, 2019.
3. de Oliveira, L.A.; Borges, T.K.; Soares, R.O.; Buzzi, M.; Kuckelhaus, S.A.S. Methodological Variations Affect the Release of VEGF in Vitro and Fibrinolysis' Time from Platelet Concentrates. *PreprintOrg* 2020. 1-12. Preprints (www.preprints.org) doi:10.20944/preprints202003.0224.v1
4. Vieira, F. Le Draper.; Silva, R. Rodrigues da.; Minozzo, C. Vieira, A. F. Oliveira, Leonel Jr., N. G. de Oliveira Rodrigues, Carlos Roberto Teixeira. Tratamento da osteonecrose mandibular medicamentosa usando a fibrina leucoplaquetária autóloga – Dez meses de acompanhamento sem recidiva. *ImplantNewsPerio International Journal*. 2:1, 48-55. 2017.
5. Vieira, F. Le Draper, Orem Isabella Barros, Minozzo, Carla, Lavinias, Fabrício Pereira da Silva, Oliveira Jr, Nilton Gonçalves, Elias, Wallace Conceição
Vieira, F. Le Draper Orem, I B Minozzo, C Lavinias, F.P.S Jr., N.G.O.; Elias, W. C. Utilização de fibrina leucoplaquetária autóloga na recuperação de perfuração crítica da membrana sinusal. *ImplantNewsPerio International Journal*. 1:7, 1293-9. 2016.
6. Vieira, F. Le Draper, Cruz, R. Ferreira Fraga, Rodrigues, Carlos Roberto Teixeira, Junior, Nilton Gonçalves de Oliveira, Vieira, Antonio Fabio, de Oliveira, Leonel Alves. Utilização de fibrina leucoplaquetária autóloga para reinserção de implante com perda de estabilidade primária em cirurgia guiada – relato de caso. *Full Dentistry in Science*. 8:30. 2017.
7. de Oliveira, L.A., Almeida, F.L.D. Liberação de VEGF, TGFb e FGFb da Matriz de Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos obtida pelo Protocolo Fibrin® de centrifugação. Benefícios como Adjuvante em elevações do seio maxilar. *Rev Catar Implant*. 19, 20-37, 2019.
8. de Oliveira, L.A; Buzzi, M; Leão, MP; Andrade, PCAR; Kuckelhaus, SS. Ultrastructural morphological characterization of the autologous leuko-platelet fibrin matrix in association with xenogenic and alloplastic biomaterials for bone grafting. *Fibrin® Protocol*. VRev Catar Impl. 18, 24-33. 2018.

Anexo I.

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – FM-UNB



UNB - FACULDADE DE MEDICINA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo morfológico e bioquímico da Fibrina Leucoplaquetária Autóloga: perspectivas na aplicação clínica. **Pesquisador:** Leonel Alves de Oliveira

Area Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 3

CAAE: 46109215.9.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 1.758.110

Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo prospectivo de cunho descritivo, transversal e experimental controlado, das características morfológicas, bioquímicas e osteoindutivas da fibrina leucoplaquetária autóloga obtida de indivíduos submetidos à terapia bucal reparadora, a fim de buscar novas perspectivas para a reabilitação orofacial visando a segurança biológica e a previsibilidade dos resultados. O estudo propõe 3 grupos de indivíduos saudáveis (n=20), jovens, adultos e idosos, com faixa etária de 20 a 40 anos, de 41 a 60 anos e de 61 a 80 anos, todos com indicação para realização de procedimentos cirúrgicos reconstrutivos para reabilitação oral. Critérios de inclusão: indivíduos saudáveis selecionados entre os usuários que procurarem prestação de serviços odontológicos de reabilitação oral no Instituto de Reabilitação Oral Odontoneogênese

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Este projeto já havia sido analisado por este CEP. O pesquisador reapresentou o projeto com os questionamentos respondidos de forma satisfatória. Dessa forma, sou de parecer favorável

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

BRASILIA, 03 de Outubro de 2016

Assinado por: Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto (Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina **Bairro:** Asa Norte

UF: DF **Telefone:** (61)3107-1918 **CEP:** 70.910-900

E-mail: fmd@unb.br **Município:** BRASILIA

Anexo II.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O (a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto **ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOQUÍMICO DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA: PERSPECTIVAS NA APLICAÇÃO CLÍNICA.**

O objetivo desta pesquisa é avaliar a eficácia biológica reparadora dos agregados leucoplaquetários autólogos nas reconstruções craniofaciais com finalidades reabilitadoras. Em termos coloquiais, o objetivo desta pesquisa é avaliar a eficácia de um coágulo sanguíneo isento da presença dos glóbulos vermelhos e com a concentração de leucócitos e plaquetas aumentada no processo de cicatrização através de uma investigação laboratorial criteriosa.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome será mantido no mais rigoroso sigilo pela da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a)

A sua participação será através da cessão de 40ml de sangue para obtenção das malhas de fibrina para estudo histológico e bioquímico, da realização de exames laboratoriais. A coleta será feita no consultório odontológico do Instituto de Reabilitação Oral Odontoneogênese (IROO) LTDA. CNPJ 126453220001-77, por cirurgião dentista, não havendo prejuízo algum à sua saúde e integridade.

A coleção sanguínea, apesar de ser um procedimento minimamente invasivo, pode provocar algumas complicações tais como: tromboflebite local, celulite local, punção acidental de estruturas anatômicas adjacentes como artérias e nervos. A este respeito, diante de qualquer alteração o pesquisador responsável lhe prestará toda assistência de saúde necessária, incluindo cuidados medicamentosos e hospitalares com completa gratuidade e pelo tempo que se fizer necessário. Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a participar de qualquer procedimento ou por qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há contrapartida por sua colaboração. Ao(a) Senhor(a) é garantido o direito a indenização diante de danos eventuais decorrentes da pesquisa.

Sua nobre e altruísta participação pode auxiliar os pesquisadores deste projeto a aumentarem a compreensão sobre as respostas regenerativas quando do uso de agregados plaquetários que poderão aumentar as estratégias e tipos de cuidados para com os portadores de feridas crônicas e a todos sob demanda cirúrgica.

Os resultados da pesquisa serão divulgados em meios próprios de divulgação científica, associadas à propriedade intelectual dos autores e da Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dr(a) Leonel Alves de Oliveira, CRO-DF 8830, no Instituto de Reabilitação Oral Odontoneogênese LTDA, situado na EQNL 02/04 Bloco A Sobrelojas 02 e 03 na cidade de Taguatinga-DF, CEP 72155-501, telefone (61) 32024974 de segunda a sexta de 8:00 às 18:00. Em situações emergenciais pode ser feito o contato direto com o pesquisador responsável pelo telefone (61) 981755505.

Este projeto foi **aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br.

O CEP tem como objetivo avaliar se esta pesquisa não implica em riscos à sua integridade física e mental e se obedece às normas de investigação científica em seres humanos.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o participante da pesquisa.

Anexo III.

Artigo aceito no *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents* IF 1.506; Qualis B2 Área Medicina 1

Cell and platelet composition assays by flow cytometry: basis for new platelet-rich fibrin methodologies

L.A. de Oliveira^{1,2}, R.O. Soares¹, M. Buzzzi², C.F.A.B. Mourão³, T. Kawase⁴ and S.A.S. Kuckelhaus¹

¹Nucleus of Research in Applied Morphology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, Brazil; ²Innovacor Inc., Gainesville, USA; ³Department of Oral Surgery, Federal Fluminense University, Niterói, Brazil; ⁴Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan

Received May 15, 2020 – Accepted July 10, 2020

Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) are selective blood fractions obtained by centrifugation. They act locally on inflammation and immunity as adjuvant homeostatic modulators during tissue regeneration. In recent years, many methods for achieving these blood concentrates have emerged, whose parameters of time and force of centrifugation presented themselves as critical, conflicting, and poorly understood points. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of different centrifugal experimental parameters on the concentration of cells and platelets in samples of anticoagulated blood. Blood samples were centrifuged by forces of 200, 400 and 800 x g for 5, 10 and 15 minutes of centrifugation times to obtain three fractions: a) platelet-poor plasma (PPP), b) leukocyte-rich plasma (L-PRP) and c) red blood cell sediment (RBC). The leukocyte and platelet content of each centrifuged fraction was measured by automated flow cytometry associated with the peroxidase reaction for differential leukocyte count. The application of 200 x g generated a more significant dispersive content of leukocytes and platelets in the supernatant fraction of PPP when compared to the other two strength ranges. However, it presented the highest concentration of platelets in the sediment (P < 0.05 ANOVA), representing a loss of total mass during processing. The 400 and 800 x g forces showed leukocytes and platelets condensed in the L-PRP fraction and lower levels in the sediment, demonstrating the greater effectiveness of buoyancy in the resuspension of these sedimented elements. Our experimental data showed that the concentration and organization of leukocytes and platelets in the centrifuged blood matrices are very sensitive to variations in g force and centrifugation time, thus generating products with different biological composition and characteristics, and with specific potential therapeutic effects. The present study did not focus on comparing authoring methods, but on presenting the impact of methodological variations on the biological nature of centrifuged blood matrices. Further *in vivo* studies are needed to assess the specific clinical effect of each methodological change.

In blood clotting, the fibrin network, platelets/exosomes, microparticles and leukocytes are directly responsible for the early stages of tissue repair, and factors such as fibrin matrix of higher

density, leukocytes and platelet concentration and erythrocyte segregation are fundamental (1). In the tissue repair process, blood elements that act on cell signalling and adhesion are especially derived from

Keywords: centrifugation; g-force; platelets; leukocytes; platelet rich-fibrin

Corresponding Author:

Leonel Alves de Oliveira, DDS, MSc.
Department of Morphology,
Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia,
Federal District, Brazil 70910-000
Tel.: +55 61 981755505
e-mail: profleonel2@gmail.com

Artigo submetido à Plos-One IF 2.776; Qualis B1 Medicina 1.

Brasilia, May 15th, 2020

Editor-in-Chief
Plos One

Dear Editor,

We are submitting the research article entitled “Methodological variations affect the release of VEGF in vitro and fibrinolysis’ time from platelet concentrates” authored by Leonel Alves de Oliveira, Tatiana Karla Borges, Renata Oliveira Soares, Marcelo Buzzi and Selma Aparecida Souza Kückelhaus, for consideration by Plos One.

Autologous blood concentrates have high applicability in the clinical practice, however there is a lack of standardized and suitable methods to obtaining a fibrin matrice with specific composition for each clinical proposal. In view of this, the study sought to evaluate the influence of different g-forces and types of tubes in the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelet-rich fibrin (PRF) as a function of time. We highlight that this paper did not aim to compare protocols, but to demonstrate the effect of methodological variations, in order to propose a conceptual basis for interpreting existing methods and developing new ones.

We declare that the mentioned manuscript has been published as preprint (doi: 10.20944/preprints202003.0224.v1).

<https://www.preprints.org/manuscript/202003.0224/v1>



Corresponding author: Prof. Dr. Selma Aparecida Souza Kückelhaus
Area of Morphology, Faculty of Medicine,
University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil, 70.910-900
E-mail: selmask@gmail.com

PLOS ONE

Methodological variations affect the release of VEGF in vitro and fibrinolysis' time from platelet concentrates

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Methodological variations affect the release of VEGF in vitro and fibrinolysis' time from platelet concentrates
Short Title:	Methodological variations affect the VEGF release and fibrinolysis' time from platelet concentrates
Corresponding Author:	Selma Aparecida Souza Kückelhaus, Ph.D. Universidade de Brasília Brasília, BRAZIL
Keywords:	fibrin matrix; g-force; growth factors; scanning electron microscopy; fibrinolysis
Abstract:	<p> Blood Concentrates (BCs) are autologous non-transfusional therapeutical preparations with biological properties applied in tissue regeneration. These BCs differ in the preparation method, in fibrin network architecture, growth factors release as well as in platelet/cell content. Methodological changes result in distinct matrices that can compromise their clinical effectiveness. The present study evaluated the influence of different g-forces and types of tubes in the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelet-rich fibrin (PRF) as a function of time. The PRF-like samples were obtained with three g-forces (200, 400, and 800 x g) for 10 minutes in pure glass tubes or in polystyrene-clot activator tubes. Scanning and Transmission electron microscopy was used to morphometric analyzes of PRF's specimens and flow cytometry was used to quantify VEGF slow release until 7 days. Our results showed that platelets were intact and adhered to the fibrin network, emitting pseudopods and in degranulation. The fibrin network was rough and twisted with exosomal granulations impregnated on its surface. An increase in the concentration of VEGF in the PRF supernatant was observed until 7 days for all g forces (200, 400 or 800 xg), with the highest concentrations observed with 200 x g, in both tubes, glass or plastic. Morphological analyzes showed a reduction in the diameter of the PRF fibers after 7 days. Our results showed that g-force interferes with the shape of the fibrin network in the PRF, as well as affect the release of VEGF stored into platelets. This finding may be useful in applying PRF to skin lesions, in which the rapid release of growth factors can favor the tissue repair process. Our observations point to a greater clarification on the methodological variations related to obtaining PRF matrices, as they can generate products with different characteristics and degrees of effectiveness in specific applications. </p>
Order of Authors:	Leonel Alves de Oliveira Tatiana Karla Borges Renata Oliveira Soares, Ph.D. Marcelo Buzzi Selma Aparecida Souza Kückelhaus
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	The author(s) received no specific funding for this work.

Anexo IV.

Título Honorífico concedido pela Universidad Nacional de Caaguazu – Caaguazu – Paraguay



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAAGUAZU
Creada por Ley Nº 3.198 de 04 de mayo de 2007
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
"Santo Tomás de Aquino"



CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA – UNC@

ACTA Nº 03/2016

RESOLUCION CD Nº 10/2016

Hoja -1-

POR LA CUAL SE NOMBRA PROFESOR VISITANTE DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA "SANTO TOMAS DE AQUINO" DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAAGUAZU, AL PROF. DR. LEONEL DE OLIVEIRA.-----

Coronel Oviedo, 04 de Febrero de 2016

VISTO: La propuesta presentada por la Coordinación de Posgrado, para el nombramiento del Prof. Dr. Leonel de Oliveira, como Profesor Visitante de la Facultad de Odontología "Santo Tomás de Aquino" de la Universidad Nacional de Caaguazú.

CONSIDERANDO:

La reconocida trayectoria profesional y científica del Prof. Dr. Leonel de Oliveira, quien ostenta el título de graduado en Odontología y Biología; Especialista en Implantología, Máster en Bioquímica, Doctor en Ciencias Médicas y Profesor de Morfología Médica en la UNB (Brasil).

Que el Consejo Directivo, ha considerado y aprobado por unanimidad otorgar por primera vez, la distinción de Profesor Visitante al Prof. Dr. Leonel de Oliveira, teniendo en cuenta su destacada trayectoria profesional y científica mencionada, como así también la invitación para la actividad del Curso sobre "Uso y Aplicación de Fibrina Leucoplaquetaria Autóloga" en la Facultad de Odontología .

Que, la Ley 3385/07 "Que establece la Carta Orgánica de la Universidad Nacional de Caaguazú" en su **Artículo 35, De las Atribuciones del Consejo Directivo**, dispone: inc. **g)** nombrar profesor visitante; en concordancia con el **Artículo 57.-** que establece: Las categorías especiales de profesor de la Universidad Nacional de Caaguazú se rigen por las siguientes disposiciones y requisitos: inc. **c) PROFESOR VISITANTE:** El nombramiento de profesor visitante deberá recaer en personas de reconocida capacidad científica que se hayan distinguido por sus obras o trabajos, cualquiera sea su nacionalidad y que hayan sido invitados a participar de actividades docentes, de investigación o en trabajos de actualización o extensión organizados por la Universidad, y que se ajusta a la presente circunstancia

POR TANTO, EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAAGUAZU, en uso de sus atribuciones y fundado en la consideración precedente:

RESUELVE

Artículo 1º NOMBRAR, al Prof. Dr. LOENEL DE OLIVEIRA, como PROFESOR VISITANTE de la Facultad de Odontología Santo Tomas de Aquino de la Universidad Nacional de Caaguazú.

Abog. Lic. Lucides Desagu de Zúñiga
Secretaría General

Dra. María Gloria Martínez Blanco
Decana
Facultad de Odontología UNC@

Anexo V. Nomeação como Assessor Técnico do Conselho Federal de Odontologia



PORTARIA CFO-SEC-37, DE 23 DE MARÇO DE 2016

O presidente do Conselho Federal de Odontologia, no uso de suas atribuições regimentais,

RESOLVE:

Art. 1º. Nomear como representantes do Conselho Federal de Odontologia, nos assuntos relacionados a Células Tronco, Tecidos e Derivados, junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, a partir desta data e pelo prazo de 01 (um) ano, os seguintes cirurgiões-dentistas:

titular: Moira Pedroso Leão (CRO-PR-CD-7242), e;

suplente: Leonel Alves de Oliveira (CRO-DF-CD-8830).

Art. 2º. Dê-se ciência.


EIMAR LOPES DE OLIVEIRA, CD
SECRETÁRIO-GERAL


AILTON DIOGO MORILHAS RODRIGUES, CD
PRESIDENTE

AMC/pap.

SHIN CA 7, Lote 2, Bloco B, Lago Norte
71503-507 - Brasília - DF
Tels.: (61) 3033-4429 / 3033-4469 / 3033-4499
E-mail: cfo@cfo.org.br / Site: www.cfo.org.br

Anexo VI. Resolução 158/2015 do Conselho Federal de Odontologia



CONSELHO
FEDERAL DE
ODONTOLOGIA



RESOLUÇÃO CFO-158, de 08 de junho de 2015

**Regulamenta o uso de Agregados
Plaquetários Autólogos para fins não
transfusionais no âmbito da Odontologia.**

O Presidente do Conselho Federal de Odontologia, no uso de suas atribuições regimentais, “ad referendum” do Plenário,

Considerando que a Lei nº 5.081, de 24/08/66, que regula o exercício da Odontologia no País, reza em seu artigo 6º, que compete ao cirurgião-dentista: “I - praticar todos os atos pertinentes à Odontologia, decorrentes de conhecimentos adquiridos em curso regular ou em cursos de pós-graduação;”;

Considerando que o Código de Ética Odontológica, Resolução CFO-118/2012, disciplina no artigo 5º: “Constituem direitos fundamentais dos profissionais inscritos, segundo suas atribuições específicas;”, em seu inciso I: “diagnosticar, planejar e executar tratamentos, com liberdade de convicção, nos limites de suas atribuições, observados o estado atual da ciência e sua dignidade profissional;”; que o artigo 11: “Constitui infração ética;”, em seu inciso V: “executar ou propor tratamento desnecessário ou para o qual não esteja capacitado;” e, que o artigo 44: “Constitui infração ética;”, em seu inciso VII: “aliciar pacientes, praticando ou permitindo a oferta de serviços através de informação ou anúncio falso, irregular, ilícito ou imoral, com o intuito de atrair clientela, ou outros atos que caracterizem concorrência desleal ou aviltamento da profissão, especialmente a utilização da expressão “popular;”;

Considerando a necessidade de regulamentação do uso de Agregados Plaquetários Autólogos para fins não transfusionais no âmbito da Odontologia;

Considerando ser o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) a porção do sangue que contém os componentes plaquetários, com a adição de qualquer produto, inclusive anticoagulante ou coagulante; e,

Considerando ser Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) a porção do sangue que contém os componentes plaquetários, sem adição de qualquer produto, inclusive anticoagulante ou coagulante,

RESOLVE:

RESOLVE:

Art. 1º. Reconhecer e regulamentar o uso de Agregados Plaquetários Autólogos para uso exclusivamente autólogo, não transfusional, na prática odontológica (Plasma Rico em Plaquetas e Fibrina Rica em Plaquetas).

§ 1º. Fica autorizada a realização de venopunção para obtenção de Agregados Plaquetários Autólogos para uso exclusivo em Odontologia pelo cirurgião-dentista, devidamente habilitado ou de profissional de saúde devidamente habilitado em conjunto e corresponsabilidade com o cirurgião-dentista.

§ 2º. Para fins de comprovação de qualificação e capacitação em venopunção para obtenção de Agregados Plaquetários Autólogos poderão ser apresentados diplomas, declarações, certificados e congêneres.

§ 3º. O processamento do sangue humano para obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em sistema fechado e a manipulação do sangue para a obtenção da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) podem ser realizados em centro cirúrgico ou consultório odontológico por cirurgião-dentista devidamente habilitado, em conformidade com a RDC/Anvisa - 63/2011 ou a que vier a substituí-la ou complementá-la.

§ 4º. O processamento do sangue humano em sistema aberto, para obtenção de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) para uso autólogo em Odontologia, deverá ser realizado exclusivamente em Centros de Tecnologia Celular (CTCs), devidamente licenciados pela vigilância sanitária competente nos termos da legislação vigente e mediante acordo entre os serviços por meio de documento escrito que comprove terceirização.

Art. 2º. A utilização de Agregados Plaquetários Autólogos em procedimentos clínicos em desacordo com a legislação vigente, ou o anúncio do uso de agregados plaquetários como sendo o mesmo que tratamento com células-tronco, gerando confusão ao paciente, configura infração ética.

Art. 3º. Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação na Imprensa Oficial, revogada a Resolução CFO-153/2015 e demais disposições em contrário.

Rio de Janeiro, 08 de junho 2015.

GENÉSIO P. ALBUQUERQUE JÚNIOR, CD
SECRETÁRIO-GERAL

AILTON DIOGO MORILHAS
RODRIGUES, CD
PRESIDENTE

Anexo VII.

Projeto de Pesquisa em Lesões Cutâneas do membro inferior



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MEMBRANA DE FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA: NOVA PERSPECTIVA NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS EM LESÕES TRÓFICAS DE MEMBRO INFERIORES

Pesquisador: ROBERTO TEODORO BECK

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80951517.6.0000.5366

Instituição Proponente: FUNDACAO EDUCACIONAL DA REGIAO DE JOINVILLE - UNIVILLE

Patrocinador Principal: CURITIBA BIOTECNOLOGIA LTDA - ME

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.563.790

Apresentação do Projeto:

Consta no Parecer Consubstanciado do CEP - Número 2.515.649.

Objetivo da Pesquisa:

Consta no Parecer Consubstanciado do CEP - Número 2.515.649.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Consta no Parecer Consubstanciado do CEP - Número 2.515.649.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Consta no Parecer Consubstanciado do CEP - Número 2.515.649, no entanto, o pesquisador esclarece que os procedimentos de coleta de sangue e preparação da Membrana de Fibrina Leucoplaquetária Autóloga serão realizados em consultório médico localizado no Instituto de Angiologia e Cirurgia Vascular de Joinville, situado na Rua Blumenau, 465, América, Joinville-SC, e que os referidos procedimentos serão realizados pelo pesquisador responsável pelo estudo proposto.

Novo cronograma de pesquisa foi anexado e indica a coleta dos dados no período de 04/05/2018 a 23/06/2018, sendo o encerramento da pesquisa previsto para 28/09/2018.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Consta no Parecer Consubstanciado do CEP - Número 2.515.649.

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 117. campus Bom Retiro
Bairro: Zona Industrial **CEP:** 89.219-710
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3461-9235 **E-mail:** comitetica@univille.br

Anexo VIII. Projeto de Pesquisa em Lesões músculo-tendíneas



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FIBRINA RICA EM PLAQUETAS EM FASE LÍQUIDA NO REPARO DE LESÕES MÚSCULO-TENDINOSAS: NOVA PERSPECTIVA DE TRATAMENTO

Pesquisador: Niso Eduardo Balsini

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 92284718.0.0000.5362

Instituição Proponente: CENTRO DE ORTOPEDIA E FRATURAS DE JOINVILLE S/S LTDA - EPP

Patrocinador Principal: CENTRO DE ORTOPEDIA E FRATURAS DE JOINVILLE S/S LTDA - EPP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.818.186

Apresentação do Projeto:

As lesões músculo-tendinosas atingem grande parte da população e são desordem de difícil abordagem e tratamento. A fibrina rica em plaquetas em fase líquida é um produto obtido a partir da separação dos elementos do sangue autólogo e, baseado nos bons resultados obtidos na melhora de afecções gengivais e ósseas da cavidade oral, apresenta-se como uma alternativa possível na abordagem das tendinopatias. Este trabalho baseia-se na aplicação a fibrina rica em plaquetas em fase líquida em lesões musculotendíneas. Serão apresentados 10 casos de pacientes submetidos a aplicação da técnica e o acompanhamento clínico e radiológico dos mesmos. O principal critério de inclusão será: lesões musculares agudas de grau II ou III e/ou lesões tendinosas, que não tenham submetidos a tratamento cirúrgico prévio no local e que não possuam doença articular associada. Metodologia: será realizada a coleta de sangue autólogo de cada paciente em tubos à vácuo sem anti-coagulante em quantidade compatível com a área em que será realizada a aplicação- limite mínimo de 2 tubos e máximo de 16 tubos por aplicação (160 mL). O local da aplicação será limpo e anestesiado localmente, com material descartável e estéril a fibrina rica em plaquetas em fase líquida será retirada do tubo e injetada na

Endereço: Rua Plácido Gomes, 488
Bairro: Anita Garibaldi **CEP:** 89.202-050
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3441-6629 **Fax:** (47)3441-6629 **E-mail:** cep.hmsj@yahoo.com.br

ANEXO IX. RELATÓRIO DE DEFESA DE DOUTORADO

Processo: 23106.057978/2020-12 Documento: 5470276



RELATÓRIO DE DEFESA DE PÓS-GRADUAÇÃO

GRADUATE PROGRAM DEFENSE REPORT

1. INFORMAÇÕES DO CURSO/ PROGRAM DATA
MESTRADO/ MASTER'S () DOUTORADO/ DOCTORAL (X)
Cotutela/ Cotutelle: (X) Não/ No () Sim, instituição estrangeira/ Yes, partner institution:

2. IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)/ STUDENT INFORMATION		
Nome/ Name: Leonel Alves de Oliveira	Matrícula/ Registration Number: 15/0104707	
Curso/ Program: Ciências Médicas		
Área de Concentração/ Field of Study: Ciências Aplicadas em Saúde	Código/ Code: 7951	Departamento/ Department: FMD

3. SESSÃO DE DEFESA/ DEFENSE SESSION
() Dissertação/ Master's Dissertation (X) Tese/ Doctoral Thesis
Título/ Title: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA. PERSPECTIVAS NA APLICAÇÃO CLÍNICA.

4. PRESIDENTE DA COMISSÃO EXAMINADORA/ CHAIR OF THE EXAMINING BOARD
Nome/ Name: SELMA APARECIDA SOUZA KUCKELHAUS Titulação/ Education Level: Doutora Unidade Acadêmica/ Academic Unity: UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

5. COMISSÃO EXAMINADORA/ EXAMINING BOARD		
Nome(Titulação)/ Name (Educational Level)	Função/Instituição - Role/Institution	Membro por videoconferência (sim/não) Video-conference member (yes/no)
SERGIO BRUZADELLI MACEDO (Doutor)	Membro Interno Não Vinculado - Universidade de Brasília	sim
GUSTAVO LARA REZENDE (Doutor)	Membro Externo Não Vinculado Hospital de Base do Distrito Federal	sim
JOSE ROBERTO DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE (Doutor)	Membro Interno Vinculado - Universidade de Brasília	sim
ANDRÉ LUIS VIEIRA CORTEZ (Doutor)	Membro Interno Não Vinculado - Universidade de Brasília (Suplente)/ (Alternate)	sim

6. RESULTADO/ RESULT

A Comissão Examinadora, em 31/07/2020 após exame da Defesa e arguição do(a) candidato(a), decidiu / The Examining Board, on 31/07/2020, after examining the Defense and inquiry of the candidate has decided to:

(x) Pela aprovação do trabalho/ approve the work.

() Pela aprovação do trabalho, com revisão de forma, indicando o prazo de até 30 dias para apresentação definitiva do trabalho revisado/ approve the work, pending formal review, assigning up to 30 days for the final delivery of the reviewed work.

() Pela reformulação do trabalho, indicando o prazo de XX dias para nova versão/ request the reformulation of the work, assigning XX days for the new version.

() Pela reprovação do trabalho/ not approve the work.

Este relatório não é conclusivo e não tem efeitos legais sem a homologação do Decanato de Pós-Graduação da Universidade de Brasília/ This report is not conclusive and has no legal effects prior to validation by the Dean of Graduate Programs of the University of Brasilia.

Em caso de revisão de forma, a homologação ficará condicionada à entrega definitiva do trabalho revisado à Coordenação do Programa, devendo este Relatório de Defesa ser acompanhado pelo Despacho do(a) coordenador(a) do programa ou do(a) orientador(a) do(a) discente que informará um dos seguintes resultados/ In case of formal review, the validation will be conditioned to the final delivery of the reviewed work to the Coordination of the Program or the student advisor. In such cases, this Defense Report must be supplemented with a notice by the coordinator with one of the following indications:

1. O (A) discente apresentou a revisão de forma e o trabalho foi aprovado/ The student presented the formal review and the work has been approved.
2. O (A) discente apresentou a revisão de forma e o trabalho foi reprovado/ The student presented the formal review and the work has not been approved.
3. O (A) discente não apresentou a revisão de forma/ The student did not present the formal review.

Declaro aceitação dos termos e condições que regem o acesso como usuário externo na Universidade de Brasília, conforme normas estabelecidas pela Universidade e demais normas aplicáveis, admitindo como válida a assinatura eletrônica por usuário e senha. É minha responsabilidade exclusiva o sigilo da senha de acesso ao sistema e o teor dos documentos e informações prestadas por mim. Comprometo-me a apresentar documentos originais inseridos por mim no sistema, que venham a ser solicitados pela Universidade de Brasília. Declaro estar ciente de que em caso de petições eletrônicas, esses, somente poderão ser realizados entre 3 horas e 23 horas e 59 minutos e 59 segundos, horário de Brasília. Estou ciente de que o acompanhamento de solicitações poderá ser realizado no ambiente de usuário externo do SEI-UnB.

I hereby declare that I accept the terms and conditions established for access as an external user of the University of Brasilia, according to the rules set forth by the University and all other applicable rules. I also accept as valid the electronic signature by user and password. It is my sole responsibility the secrecy of the password for accessing the system and the content of the documents and information provided by me. I commit to present the original documents inserted into the system by me should they be requested by the University of Brasilia. I declare to be aware electronic demands can only be send between 3:00 and 23:59, Brasilia official time. I am aware I can track the status of requests via the External User environment of SEI-UnB.

Informações/ Attention:

Documento deverá ser assinado por/ This document must be signed by:

- Presidente da Comissão Examinadora/ The Chair of the Examining Board
- Membros participantes da Comissão Examinadora/ Members of the Examining Board
- Coordenador(a) do Curso/ Coordinator of the Program
- Discente/ Student



Documento assinado eletronicamente por **leonel alves de oliveira, Usuário Externo**, em 31/07/2020, às 22:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Lara Rezende, Usuário Externo**, em 31/07/2020, às 22:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Selma Aparecida Souza Kuckelhaus, Professor(a) de Magistério Superior da Faculdade de Medicina**, em 31/07/2020, às 23:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Bruzadelli Macedo, Professor(a) de Magistério Superior da Faculdade de Ciências da Saúde**, em 03/08/2020, às 23:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto de Souza de Almeida Leite, Professor(a) de Magistério Superior da Faculdade de Medicina**, em 04/08/2020, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Laila Salmen Espindola, Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina**, em 04/08/2020, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.unb.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5470276** e o código CRC **3125903F**.

Referência: Processo nº 23106.057978/2020-12

SEI nº 5470276

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro - Gleba A., Brasília/DF, CEP 70910-900
Telefone: e Fax: @fax_unidade@ - <http://www.unb.br>