

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE  
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS COM  
SANGUE DE GATOS DA RAÇA MAINE COON**

**MAÍRA SALES CASTILHO**

**Botucatu – SP**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE  
FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS COM  
SANGUE DE GATOS DA RAÇA MAINE COON**

**MAÍRA SALES CASTILHO**

Tese apresentada junto ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal  
para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Titular Sheila Canevese  
Rahal

**Co-orientadoras:** Prof.<sup>a</sup> Camila Contin Diniz de  
Almeida Francia

Dra. Luciane dos Reis Mesquita

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Castilho, Maíra Sales.

Preparo e caracterização de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos com sangue de gatos da raça Maine Coon / Maíra Sales Castilho. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sheila Canevese Rahal

Coorientador: Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Coorientador: Luciane dos Reis Mesquita

Capes: 50501003

1. Gato. 2. Sangue. 3. Imuno-histoquímica. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Fibrina rica em plaquetas.

Palavras-chave: Concentrado plaquetário; Fibrina rica em plaqueta e leucócitos; L-PRF; Membrana de fibrina.

Nome do autor: Máira Sales Castilho

**TÍTULO: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS COM SANGUE DE GATOS DA RAÇA MAINE COON**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal  
Presidente da banca e orientadora  
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Valeria Seullner Brandão  
Membro  
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves  
Membro  
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dra. Isabela Cristina de Souza Marques  
Membro  
Departamento de Patologia e Medicina Legal - FMRP  
USP Ribeirão Preto

Prof. Dr. Victor José Vieira Rosseto  
Membro  
Departamento Cirurgia de Pequenos Animais  
FAEF- Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral

# Agradecimentos

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de Doutorado e pela reserva, sem ela não seria possível a comprar a centrífuga e a caixa (Fibrin box®,) para realização do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Primeiramente agradeço a Deus, sem ele eu não estaria aqui.

Agradeço à minha família, pais e irmãos, amigos por todo o apoio e carinho.

Ao meu marido, Ramiro das Neves Dias Neto pelo amor, apoio incondicional, compreensão e companheirismo.

Agradeço também aos tutores que me ajudaram, e permitiram que seus gatos participassem do projeto.

À Prof. Dr. Sheila Canevese Rahal, por aceitar ser minha orientadora pela segunda vez, pela oportunidade, pela confiança e por toda a compreensão.

À Professora Camila Contin Diniz de Almeida, Carlos Eduardo Fonseca Alves, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues e o Técnico Gelson pela ajuda com o projeto, pelas conversas, sempre muito solícitos e prontos a ajudar.

À Ana Cristina, que dividiu todo seu conhecimento comigo sobre L-PRF, sempre tirando minhas dúvidas, sempre atenciosa, e um exemplo de profissional a ser seguido.

Também gostaria de agradecer à Luciane dos Reis Mesquita e ao Washington Takashi Kano, primeiramente pela amizade, por sempre estarem dispostos a me ajudar, não importando a situação.

Agradeço também aos Médicos Veterinários Carina, Rosana, Luís Henrique, Juan Medeiros e Keylla Pacifico, no auxílio na coleta dos dados.

E finalmente agradeço a todas as pessoas que de algum jeito me ajudaram nesse trabalho, as vezes esquecemos nomes devido a correria do dia a dia, mas por mais pequena que seja a participação, sem ajuda, o projeto não teria acontecido.

# Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELA.....	viii
<b>Resumo</b> .....	ix
<b>Abstract</b> .....	x
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	2
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 Coagulação sanguínea.....	4
2.1.1 Hemostasia primária.....	4
2.1.2 Hemostasia secundária.....	5
2.2 Concentrados de plaquetas.....	6
2.3 Técnicas.....	7
2.4 Concentrado de PRF.....	8
2.5 Emprego da PRF em pequenos animais.....	14
<b>3 REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	20
<b>Trabalho científico:</b> Preparação de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) com sangue de gatos da raça Maine Coon	21
<b>ANEXOS</b> .....	42

## Lista de Figuras

- Figura 1** (a) Centrífuga especializada para produção da L-PRF (FibrinFUGE). (b) Tubo após a centrifugação de sangue felino, no qual se observa três camadas: células vermelhas, coágulo de fibrina (seta vermelha e plasma pobre em plaquetas)..... 25
- Figura 2** Note a malha perfurada e tampa da Fibrin box® (a), bem com os demais acessórios utilizados na produção da membrana de L-PRF (b)..... 25
- Figura 3** Membranas de L-PRF produzidas com sangue felino sobre a malha perfurada..... 26
- Figura 4** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Note a intensa rede de fibrina acidofílica acelular (seta amarela). Observe a área do “buffy coat”, na qual é identificada a maior concentração celular, constituída predominantemente de leucócitos (seta branca). Na porção vermelha da membrana são visualizadas as hemácias coradas em rosa/vermelho interpostas com alguns leucócitos (seta vermelha) (HE, 200X)..... 29
- Figura 5** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Observe a arquitetura da rede de fibrina mais densa (seta espessa) próximo ao “buffy coat” e rede mais delgada (seta fina) na porção distante do “buffy coat”. (HE, 100X)..... 30
- Figura 6** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Detalhe da área do “buffy coat” e porção vermelha da membrana. Note a grande concentração celular constituída principalmente por neutrófilos segmentados (seta cheia) e linfócitos (cabeça de seta). Observe o aglomerado plaquetário (seta vazia). (HE, 1.000X)..... 30
- Figura 7** Coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em membrana de L-PRF felina. Observe a alta expressão de PDGF, com componente celular classificado em escore 2 (células positivas de 26% até 50%) (detalhe)..... 32
- Figura 8** Coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em membrana de L-PRF felina. Note a classificação em escore 4 (acima de 75% das células positivas) da expressão de VEGF na membrana (detalhe). Há expressão positiva no componente celular e matriz da membrana. Verifique a expressão negativas nas hemáceas (asterisco)..... 33

**Figura 9** Imagem na microscopia eletrônica de varredura de membrana de L-PRF felina. (a) Note a parte branca da membrana caracterizada exclusivamente pela rede de fibrina (2400x). (b) Área do “buffy coat, na qual se observa uma alta concentração celular, seguida por densa rede de fibrina (600x). (c) Detalhe das células da área do “buffy coat, na qual é possível observar as células entremeadas na rede de fibrina (5000x). (d) Note a porção de célula vermelha da membrana com aglomerado de hemácias junto à rede de fibrina. (10000x)..... 34

**Figura 10** Imagem na microscopia eletrônica de varredura de membrana de L-PRF felina. Note a rede de fibrina como um arcabouço para plaquetas (seta vermelha), leucócitos (seta branca) e hemácias (seta azul) (10000x)..... 35

## Lista de Tabela

<b>Tabela 1</b> – Escores semiquantitativos da coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em 12 membranas de L-PRF felina.....	31
---	----

**CASTILHO, M.S. Preparo e caracterização de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos com sangue de gatos da raça Maine Coon.** Botucatu, 2020. 54p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

O objetivo do estudo foi preparar e caracterizar, por meio de análise histológica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) produzida com sangue de gatos da raça Maine Coon. Foram utilizados 13 gatos adultos saudáveis, conforme critério de inclusão, com peso variando entre 3,1 kg e 7,5 kg, dos quais foi coletado sangue da veia jugular externa com escalpe 21G e tubo plástico siliconizado à vácuo. Dois tubos com 3 mL de sangue cada um foram centrifugados imediatamente à coleta, empregando centrífuga especializada para esta aplicação, 650 g por 12 minutos. O coágulo de L-PRF foi retirado do tubo utilizando uma pinça e com uma espátula foi cuidadosamente escarificado para retirar o máximo de células vermelhas, preservando a região do “buffy coat” (camada celular). Na sequência o coágulo de L-PRF foi posicionado sobre a malha metálica perfurada e comprimido com a tampa, por 30 a 60 segundos, obtendo-se a membrana de L-PRF. Pela análise histológica com a coloração Hematoxilina e Eosina foi possível distinguir as três porções que compunham a membrana: parte branca, “buffy coat” e parte vermelha. A área do “buffy coat” continha a maior concentração de leucócitos. A análise imuno-histoquímica demonstrou a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular e do fator de crescimento derivado de plaquetas. Pela MEV verificou-se a arquitetura tridimensional da rede de fibrina. Na área do “buffy coat” a morfologia das células estava preservada, sendo composta principalmente de leucócitos e plaquetas. Como conclusão, a metodologia empregada permitiu caracterizar a composição da membrana de L-PRF em gatos Maine Coon, que apresenta tipos celulares e arquitetura de rede de fibrina similares ao descrito para a espécie humana.

**Palavras-chave:** Concentrado plaquetário; Membrana de fibrina; L-PRF; Fibrina rica em plaqueta e leucócitos.

**CASTILHO, M.S. Preparation and characterization of leukocyte- and platelet-rich fibrin membrane with blood from Maine Coon cats.** Botucatu, 2020. 54p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **SUMMARY**

This study aimed to prepare and characterize by using histological analysis, immunohistochemical, and Scanning Electron Microscopy (SEM) a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin membrane (L-PRF) produced with blood from Maine Coon cats. Based on inclusion criteria, 13 client-owned healthy adult cats weighing from 3.1 kg to 7.5 kg were enrolled. The blood samples were collected from the external jugular vein using a butterfly catheter (21G) and vacuum plastic tube without additives. Two tubes with 3 mL of blood per tube were immediately centrifuged at 650g for 12 minutes using a centrifuge specifically designed for this application. The L-PRF clot was removed from the tube with tweezers and a spatula which was used to separate it from the red blood cell base layer leaving the buffy coat intact. After this, the L-PRF clot was compressed by specialized metal plate for 30 and 60 sec, and L-PRF membrane was obtained. Light microscopy examination of the membranes stained with hematoxylin-eosin showed three distinct layers: white part, buffy coat and red part. The buffy coat contained a high density of leukocytes. Immunohistochemical analysis demonstrated expression of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor. The SEM revealed the three-dimensional architecture of the fibrin network. The cells of buffy coat showed adequate cellular morphology, being composed mainly of white blood cells and platelets. In conclusion, the method used allowed the characterization of the L-PRF membrane composition in Maine Coon cats, which presented cell types and fibrin network architecture similar to that described for the human species.

**Key words:** Platelet concentrates; Fibrin membrane; L-PRF; Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin.

# **CAPÍTULO 1**

# 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A L-PRF consiste de biomaterial natural, composto principalmente de fibrina, plaquetas, fatores de crescimento, leucócitos e células-tronco, formado por sedimentação sob força g ou força centrífuga relativa (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a; OLIVEIRA et al., 2017). Entre os concentrados plaquetários, a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) tem sido cada vez mais utilizada, em virtude da simplicidade e rapidez da preparação, facilidade de uso e maleabilidade, e provável custo-efetividade (SIMONPIERI et al., 2012; MADURANTAKAM et al., 2015; ALIZADE et al., 2016; ZUMARÁN et al., 2018).

A técnica para produção da L-PRF consiste em centrifugar o sangue venoso imediatamente após a coleta em tubo sem anticoagulante (EHRENFEST et al., 2009; MADURANTAKAM et al., 2015). Durante a centrifugação em baixa velocidade, há a ativação sanguínea com a formação de um coágulo de plaqueta-fibrina, que permanece no meio do tubo de centrifugação (EHRENFEST et al., 2009; MADURANTAKAM et al., 2015; ALIZADE et al., 2016).

O coágulo pode ser aplicado diretamente na área de interesse, ou pode ser transformado em uma membrana, pela compressão entre gazes ou com equipamento específico, ou mesmo como plugue (KOBAYASHI et al., 2012; (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a; UPADHAYAYA et al., 2017; ZUMARÁN et al., 2018). Contudo, a despeito da simplicidade desta segunda geração de concentrado plaquetário, vários detalhes técnicos podem influenciar na qualidade do biomaterial obtido (PINTO et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018). As características da centrífuga utilizada bem como os protocolos de centrifugação são fatores a serem considerados em termos de qualidade de células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina (PINTO et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018).

Vale referir que os felinos apresentam várias afecções de caráter cirúrgico, tanto na área de tecidos moles quanto na área de ortopedia e

traumatologia (MONTAVON et al., 2009; LANGLEY-HOBBS et al., 2014), que fundamentariam o emprego deste biomaterial. Visto os poucos relatos da aplicação de PRFs em pequenos animais (VISSER et al., 2010; VISSER et al., 2011; SOARES et al., 2018), o presente estudo teve por objetivo avaliar e caracterizar a membrana de L-PRF produzida a partir de sangue de gatos da raça Maine Coon.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Coagulação sanguínea*

A hemostasia é um mecanismo responsável pela regulação e controle do sangue no interior do espaço vascular (GARCIA-NAVARRO, 2005). É um processo natural e vital, desencadeado mediante alguma lesão no organismo (SMITH e BROOKS, 2010).

Mediante à uma injúria, haverá dois tipos de hemostasia: primária, também conhecida como tampão plaquetário ou coágulo branco, em que ocorre por meio da ação das plaquetas, estancando o sangramento; secundária, conhecida como cascata de coagulação ou coágulo vermelho, na qual existe a formação do coágulo de fibrina, evitando o sangramento (GARCIA-NAVARRO, 2005; MISCHKE, 2012).

#### 2.1.1 *Hemostasia primária*

Esse tipo de hemostasia ocorre no primeiro momento após a danificação do endotélio (MISCHKE, 2012). A lesão expõe a matriz endotelial vascular, principalmente o colágeno (GARCIA-NAVARRO, 2005). As glicoproteínas da membrana das plaquetas fazem adesão ao colágeno (SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011). Assim, o Fator de Von Willbrand (armazenado dentro de plaquetas ou livres no plasma), forma uma ponte, fazendo uma ligação, unindo seus receptores localizados nas plaquetas ao colágeno, resultando em uma adesão definitiva ao local da lesão (STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

Após aderidas, as plaquetas são ativadas, sendo mediadas pelos agonistas plaquetários: colágeno, trombina e epinefrina, e produzindo tromboxane A<sub>2</sub>, que tem por objetivo gerar maior estimulação e agregação plaquetária (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Após, ocorre a degranulação das mesmas, e há liberação de proteínas de adesão plaquetária, serotonina (responsável pela vasoconstrição) e de fosfolípidios plaquetários (importante na

hemostasia secundária) (STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012). O fibrinogênio circulante se liga as glicoproteínas específicas, conectando as plaquetas entre si (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

### *2.1.2 Hemostasia secundária*

Consiste na ativação sequencial de pró-enzimas em enzimas, resultando na fibrina (GARCIA-NAVARRO, 2005). É composta primeiramente pela via intrínseca, via extrínseca e, logo após, a duas se unem formando uma via comum (GARCIA-NAVARRO, 2005; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

Na Via intrínseca o sangue é exposto a uma superfície negativa (colágeno), resultando na liberação de cininogênio de alto peso molecular, que é responsável pelo início da cascata de coagulação, gerando efeito em cadeia dos fatores (SMITH e BROOKS, 2010). O cininogênio irá ativar o fator XII, formando o Fator XIIa, que por sua vez irá ativar o Fator XI, resultando no Fator XIa (GARCIA-NAVARRO, 2005; SMITH e BROOKS, 2010). Este por sua vez transformará o Fator IX em XIa, que é responsável por ativar o Fator X, que juntamente com cálcio, fosfolípido plaquetário (hemostasia primária) e fator VIIIa, originarão o Fator Xa. Com o Fator Xa, a via intrínseca e a via extrínseca se tornam uma via em comum (GARCIA-NAVARRO, 2005; SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

A Via extrínseca se origina a partir do contato do sangue com o fator tecidual ou tromboplastina (GARCIA-NAVARRO, 2005; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012). O Fator tecidual converte o Fator VII em Fator VIIa que, juntamente com cálcio e fosfolípido plaquetário, transforma o Fator X em Fator Xa (SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

Na Via comum o Fator Xa, mediante a presença de cálcio, fosfolípido e o Fator Va, converte o Fator II (protrombina) em Trombina, que em seguida converte fibrinogênio em fibrina, os quais em conjunto formam a rede de fibrina (GARCIA-NAVARRO, 2005; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012). A trombina também estimula a conversão do Fator XIII em XIIIa, que ajuda

na estabilização da rede de fibrina, evitando novo sangramento (SMITH e BROOKS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; MISCHKE, 2012).

## **2.2 Concentrados de plaquetas**

Os concentrados de plaquetas podem ser classificados com base na presença de leucócitos e na arquitetura da rede de fibrina em: - plasma rico em plaquetas puro (PRP puro ou P-PRP), material líquido suspenso sem leucócitos antes da ativação; - plasma rico em plaquetas em leucócitos (PRP rico em leucócitos ou L-PRP), líquido suspenso com leucócitos antes da ativação; - fibrina rica em plaqueta pura (PRF pura ou P-PRF), material de fibrina sólida sem leucócitos; - fibrina rica em plaquetas e leucócitos (PRF rico em leucócitos ou L-PRF), material de fibrina sólido ou líquido, com leucócitos e fatores de crescimento (EHRENFEST et al., 2009; ZUMARÁN et al., 2018). Em cada classificação, o concentrado pode ser produzido por diferentes processos, seja em configuração totalmente automatizada ou por protocolos manuais (EHRENFEST et al., 2009).

Atualmente o L-PRF está recebendo alta consideração, em virtude da simplicidade e rapidez da preparação, facilidade de uso e maleabilidade, e provável custo-efetividade, uma vez que a partir do momento da aquisição da centrífuga e “box”, o valor da produção da membrana é mínimo, resultando em um material de excelente qualidade e fácil manuseio (GIANNINI et al., 2015; MADURANTAKAM et al., 2015; ZUMARÁN et al., 2018; MUÑOZ e HAIDAR, 2018). A concentração fisiológica de trombina na PRF permite a formação de uma rede flexível, que é apropriada para o armazenamento de citocinas, além de formar um arcabouço para migração celular, e devido a flexibilidade pode ser usado como membrana biológica para regeneração tecidual guiada (ALIZADE et al., 2016). A fração de células mononucleares, tais como células-tronco em baixa concentração e fatores de crescimento leucocitários agregam um arsenal biológico à PRF (OLIVEIRA et al., 2017).

Caruana et al. (2019) citaram que as propriedades biológicas do concentrado de plaquetas exploram a função das plaquetas na homeostase do

organismo, ou seja, coagulação de fibrina e regeneração tecidual. Esse potencial é devido a fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformante  $\beta$ 1), EGF (fator de crescimento epidermal), IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina) e HGF (fator de crescimento do hepatócito). Após a centrifugação, todos esses fatores contribuem para regeneração de tecidos moles e duros, bem como a cicatrização de feridas após lesão tecidual.

Segundo Zumarán et al. (2018), as preparações de PRF tendem a funcionar mais como biomateriais biologicamente ativos e arcabouços para células autólogas, fatores de crescimento e citocinas, particularmente em procedimentos cirúrgicos orais. Assim, as PRFs devem ser consideradas como uma preparação de “tecido vivo”, para a regeneração tecidual guiada natural, e não simplesmente um adjuvante cirúrgico “rico em fator de crescimento”.

### **2.3 Técnicas**

De acordo com Ehrenfest et al. (2009), no concentrado P-PRF o sangue é colocado em tubo com citrato tri-sódio, como anticoagulante, e um geral separador, sendo centrifugado por 6 minutos em alta velocidade. As camadas de “buffy coat” e plasma pobre em plaqueta são transferidas a um segundo tubo contendo  $\text{CaCl}_2$  e o processo de coagulação é desencadeado. O tubo é imediatamente centrifugado por 15 minutos, após o qual um coágulo estável de matriz de fibrina rica em plaqueta pode ser coletado.

O concentrado L-PRF, também denominado PRF de Choukroun, pode ser considerado com concentrado de plaqueta de segunda geração, já que é produzido sem qualquer anticoagulante ou agente gelificante (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a; EHRENFEST et al., 2009). Após o sangue venoso ser colhido em tubo de vidro seco, este é centrifugado em baixa velocidade, sendo formada três camadas, ou seja, uma camada de base com células vermelhas, o coágulo de PRF no meio e o plasma acelular na camada de topo (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a; EHRENFEST et al., 2009;

MADURANTAKAM et al., 2015). A ausência do anticoagulantes, conforme Giannini et al. (2015), permite a ativação das plaquetas em contato com o tubo, desencadeando o processo de coagulação. O fibrinogênio é inicialmente concentrada na parte superior do tubo e, após o contato com a trombina, o mesmo é convertido em fibrina, sendo as plaquetas retidas na malha de fibrina.

#### **2.4 Concentrado de PRF**

A L-PRF consiste em um coágulo natural formado por sedimentação sob força g ou força centrífuga relativa, que deve ser de baixa magnitude (OLIVEIRA et al., 2017). Dependendo da força g e da duração da centrifugação a resultante construção de fibrina rica em plaqueta pode variar em consistência, desde uma substância como gel até uma membrana de fibrina densa (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). O coágulo de PRF a olho nu é composto de duas partes, ou seja, uma porção amarela de fibrina (corpo principal) e uma porção vermelha localizada na extremidade do coágulo (lotada de células vermelhas), sendo que entre estas duas áreas há uma camada esbranquiçada denominada “buffy coat” (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016a).

Segundo Ehrenfest et al. (2010), o “buffy coat” é definido como uma área entre a camada de células vermelhas e a camada da densa rede de fibrina, na qual é possível observar em aspecto macroscópico uma densa celularidade. Análises histológicas e de microscopia eletrônica mostraram que o “buffy coat” é composto principalmente por plaquetas e células de defesa envoltas pela rede de fibrina.

O sucesso da técnica é dependente da rapidez da coleta do sangue e sua transferência para a centrífuga, ou seja, dentro de dois minutos (ALIZADE et al., 2016; HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b). Se houver demora, o fibrinogênio não pode ser concentrado na parte superior e média do tubo, já que é necessário concentrar o fibrinogênio antes da trombina convertê-lo em fibrina (ALIZADE et al., 2016). Se ocorrer falha na preparação pode haver uma polimerização difusa da fibrina, que não é ideal para cicatrização tecidual (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b). Oliveira et al. (2017) citaram que a

malha de fibrina deve ser formada apenas durante a centrifugação e na ausência de hemácias. A falha metodológica pode ser identificada pela presença de coágulos diminutos e impregnação de hemácias. Além disso, segundo Hartshorne e Gluckman (2016b), as características da centrífuga e protocolos influenciam nas células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina seja de um coágulo ou membrana de PRF.

Hartshorne e Gluckman (2016a) descreveram o PRF como um biomaterial natural composto de fibrina, plaquetas, fatores de crescimento e vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células-tronco. Pela análise bioquímica da PRF obtida do sangue coletado em tubo plástico recoberto de vidro e imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, Dohan et al. (2006) concluíram que o biomaterial consiste de citocinas, cadeias glicanas e glicoproteínas estruturais enredadas dentro de uma rede de fibrina polimerizada vagarosamente.

Aparentemente a membrana de PRF permanece intacta, de acordo com estudos *in vitro*, por pelo menos 7 dias e libera continuamente grandes quantidades de fatores de crescimento (fator de crescimento transformante  $\beta 1$  [TGF $\beta 1$ ], fator de crescimento derivado de plaquetas AB [PDGF-AB], fator de crescimento endotelial vascular [VEGF]), e proteínas da matriz ou citocinas (trombospondina-1, fibronectina, vitronectina, osteocalcina, osteonectina) (Hartshorne e Gluckman, 2016a).

Para a produção da L-PRF, Zumarán et al. (2018) recomendaram a coleta de sangue venoso em tubo de vácuo de plástico revestido de vidro, que deve ser centrifugado por 10-20 minutos a 2700-3000 rpm, usando centrífuga de mesa. Das três porções individualizadas, a porção média (coágulo de fibrina amarelado) deve ser coletada ao redor de 2 mm abaixo da linha divisória com a porção inferior. O coágulo pode ser usado diretamente com material de preenchimento; misturado a enxerto ósseo – plugues e blocos; comprimido (usando a caixa cirúrgica para evitar danos e recolhe cola cirúrgica de fibrina no reservatório) para formar uma membrana. Segundo os autores, com centrifugação mais vagarosa (menos que 1500 rpm) por 6-8 minutos resultará em preparação com mais alta quantidade células brancas, denominada Avançada PRF (A-PRF).

De acordo com Hartshorne e Gluckman (2016b), o uso de equipamento específico, tal como a caixa de PRF, permite uma preparação padronizada e homogênea da membrana de PRF, com mais elevado conteúdo de fator de crescimento, evita a desidratação ou morte de leucócitos e previne o encolhimento da arquitetura da matriz de fibrina. Neste caso o coágulo de PRF é colocado no “BoX grid” ou “Xpression Kit” e coberto com a tampa, sendo que a pressão gentil previne a expulsão de todo o plasma contido no coágulo original. Se o coágulo for comprimido com muita força ou por muito tempo ocorre encolhimento de rede de fibrina, liberação de fatores de crescimento, desidratação e dano de leucócitos.

Para avaliar se a preservação das plaquetas e conteúdo do plasma dependem do método de compressão, Kobayashi et al. (2012) comprimiram coágulos de PRF recém-preparados para formar uma membrana fina com o auxílio de um dispositivo de compressão, composto por duas peças em formato de colher com pequenos orifícios no fundo. Foi notada uma maior preservação do conteúdo plasmático, da malha tridimensional de fibrina e plaquetas com o compressor quando comparado pela membrana formada por meio de gaze seca (grupo controle). De acordo com os autores, a região mais próxima a fração de células vermelhas de ser aplicada no tecido alvo. Além disso, para estabelecer a preservação de fatores de crescimento bioativos, ambos tipos de membranas foram testadas em bioensaio usando células Gin-1 e análise de matriz de anticorpos. Entre os fatores de crescimento testados, a membrana preparada pelo compressor continha isoformas de PDGF em níveis mais altos e estimulou significativamente a proliferação e neovascularização celular (KOBAYASHI et al., 2012).

Ehrenfest et al. (2010) determinaram a composição celular e organização tridimensional do L-PRF e avaliaram a influência de dois tipos de coleta (vidro seco ou tubo plástico recoberto com vidro) e procedimentos de compressão (forçado – compressão com uma colher de metal; ou suave – liberação vagarosa do soro durante 20 minutos em copo) na arquitetura final da membrana, empregando sangue de 10 homens saudáveis. O coágulo de PRF concentrou 97% das plaquetas e mais de 50% dos leucócitos, com distribuição tridimensional, dependendo da centrifugação. As plaquetas e fibrina formaram

aglomerados nos primeiros milímetros da membrana, além da base de células vermelhas. A rede de fibrina foi madura e densa. Não houve diferença na arquitetura da PRF usando diferentes tubos de coleta e técnicas de compressão.

Segundo Oliveira et al. (2017), para que a metodologia de obtenção de agregados plaquetários seja reprodutível faz-se necessário descrever o FCR ou Força g [ $1,12 \times r \times (\text{RPM}/1000)^2$ ] por intervalo de tempo. Com ajuste de cálculo a mesma FCR pode ser produzida em equipamentos distintos. Desta forma, quando o objetivo é a preservação das propriedades biológicas dos agregados sanguíneos, são considerados fundamentais o nível de vibração e aquecimento produzido pela centrifuga. Além disso, as dimensões do coágulo de fibrina sofrem influência das angulações do rotor da centrífuga.

Madurantakam et al. (2015) avaliaram a membrana de L-PRF, produzida de sangue humanos. A centrifugação foi a 400g por 12 minutos. A camada de plasma pobre em plaqueta foi aspirada e a L-PRF foi retirada do tubo, usando uma pinça, e colocada em uma malha metálica. Com bisturi a porção da camada de células vermelhas foi removida, deixando a camada leucoplaquetária intacta. Gentilmente o coágulo de L-PRF foi comprimido, usando uma placa metálica de aproximadamente 225 g, por 30 segundos, fazendo que o plasma pobre em plaqueta fosse removido. Após a remoção da placa, a membrana estava finalmente pronta. Pela microscopia eletrônica o coágulo de L-PRF mostrou a porção de topo composta predominantemente de rede de fibrina com nenhuma célula, a camada do meio enriquecida com plaquetas e a camada inferior com uma mistura de leucócitos e células sanguíneas vermelhas aprisionadas dentro de uma matriz de fibrina. As propriedades mecânicas mostraram comportamento viscoelástico, sendo resistente e deformável no teste de retenção de sutura.

A P-PRP e a L-PRF são opostas em termos de arquitetura de fibrina e conteúdo de leucócitos (EHRENFEST et al., 2012). Enquanto a P-PRF apresenta uma rede de fibrina delgada e imatura, sem a presença de leucócitos; a L-PRF proporciona uma rede de fibrina grossa e resistente, com presença de leucócitos (EHRENFEST et al., 2009). Em ambos concentrados, a vitronectina é a única molécula a ser liberada completamente após 4 horas de cultura,

sugerindo que esta molécula não está presa na matriz de fibrina e não é produzida pelos leucócitos (EHRENFEST et al., 2012).

A gel membrana de P-PRP, segundo Ehrenfest et al. (2012), se dissolve completamente na cultura em torno de 5 dias e a de L-PRF permanece intacta após 7 dias. A população de leucócitos tem forte influência na liberação de alguns fatores de crescimento, em especial o TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento transformante  $\beta$ 1). Além disto, a técnica de L-PRF é considerada muito mais simples e menos custosa, ao passo que a produção do P-PRP requer mais passos e tempo.

Schär et al. (2015) analisaram a concentração e cinética de fatores de crescimento liberados de L-PRF, L-PRP e coágulo natural durante a cultura *in vitro*, a migração de células tronco mesenquimais e células endoteliais em resposta aos fatores liberados, bem como as correlações entre fatores de crescimento com a contagem de leucócitos/plaquetas iniciais ou a migração celular induzida. Para preparação dos concentrados e coágulo foi utilizado sangue de 11 homens saudáveis. Foi concluído que em comparação ao L-PRP, a L-PRF teve as maiores quantidades liberadas de TGF- $\beta$ 1, um liberar a longo tempo de fatores de crescimento e indução mais forte de migração celular.

Pinto et al. (2014) avaliaram o impacto das características da centrífuga (intensidade da vibração) na arquitetura da fibrina e célula, tanto do coágulo como da membrana de L-PRF. Foram usadas a centrífuga Intra-Spin (aprovada pelas agências internacionais, CE- European conformity e pela FDA - Food and Drug Administration para a preparação de L-PRF) e três outras centrífugas de laboratório (não aprovadas pela CE e pela FDA para a preparação de L-PRF), ou seja, A-PRF 12, LW - UPD8 e Salvin 1310. O método usado foi com o emprego de tubos plásticos revestidos de vidro e força de 400 g por 12 minutos. A mais baixa temperatura dos tubos foi observada com a centrífuga Intra-Spin, ao passo que a A-PRF e a Salvin promoveram aumento significativo da temperatura. A Intra-Spin e Salvin apresentaram coágulo e membrana de tamanhos similares. Na microscopia de luz as características da L-PRF (concentração de corpos celulares na primeira metade da malha de fibrina) foram similares entre as centrífugas, porém na microscopia eletrônica com a Intra-Spin foi detectada matriz de fibrina espessa altamente polimerizada, todas as células

pareciam vivas com formato normal, incluindo o aspecto superficial texturizado de linfócitos ativados. Nas demais centrífugas, as membranas apresentavam um gel de fibrina levemente polimerizado e todos os corpos celulares visíveis estavam destruídos.

Quatro diferentes centrífugas comerciais para produzir L-PRF, foram avaliadas por Ehrenfest et al. (2018), seguindo o protocolo original (tubos de plástico com revestimento de vidro, 400 g de força, 12 minutos). Na velocidade clássica de produção do L-PRF, o nível de vibração indesejável na centrífuga L-PRF original (Intra-Spin) é 4,5 a 6 vezes menor do que com outras centrífugas. O coágulo L-PRF original (Intra-Spin) parecia completamente distorcido ao usar centrífugas com um nível de vibração mais alto. Segundo os autores, as características da centrífuga e protocolos de centrifugação têm um impacto significativo na célula, fatores de crescimento e arquitetura de fibrina da membrana e coágulo de L-PRF.

Sam et al. (2015) avaliaram as propriedades mecânicas da membrana de PRF, produzida do sangue de um homem de 25 anos, e compararam com membranas comerciais (colágeno de bovino; colágeno peixe), que são empregadas na regeneração óssea guiada. O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante e centrifugado em uma centrífuga de mesa, em 3000 rpm por 10 minutos. A membrana de PRF foi preparada por pressionar a PRF gel entre duas gazes cirúrgicas. De acordo com os autores, a membrana de PRF não apresentou as propriedades mecânicas desejadas quando comparada as membranas de colágenos, sendo que a falta de rigidez e mais rápida degradação podem limitar seu emprego na regeneração óssea guiada.

Segundo Hartshorne e Gluckman (2016a), outras modificações da PRF são o A-PRF (tipo avançado enriquecido de leucócitos) e o i-PRF (PRF injetável), que são produzidos pela redução da velocidade da centrífuga e pela minimização da infiltração de leucócitos dentro da fração de células vermelhas. Há também o CGF (fatores de crescimento concentrado), em que as diferentes velocidades da centrífuga permitem o isolamento da matriz de fibrina que é mais larga, mais densa e mais rica em fatores de crescimento comparada ao PRF.

Ghanaati et al. (2014) compararam PRF (2700 rpm, 12 minutos) com A-PRF (1500 rpm, 14 minutos). Pela imuno-histoquímica, os linfócitos T

(Anti-CD3), linfócitos B (Anti-CD20cy), células-tronco (Anti-CD34 class II) e monócitos (Anti-CD68) foram verificados nos dois grupos, dentro de 25-30% da parte proximal do coágulo, sem diferenças estatísticas em termos de distribuição das células. As plaquetas (Anti-CD61 platelet glycoprotein IIIa) foram detectadas ao longo do coágulo nos dois grupos, embora no A-PRF mais plaquetas foram encontradas na parte distal, afastadas do “buffy coat”. No A-PRF ocorreu aumento de granulócitos neutrofílicos (Anti-CD15) na parte distal do coágulo. Desta forma, tipos celulares específicos se distribuem de forma diferente dependendo da força da centrifuga.

Um estudo, efetuado por Kobayashi et al. (2016), comparou os fatores de crescimento liberados do PRP, PRF e A-PRF produzidos do sangue de seis doadores humanos, por meio da técnica de ELISA. A maior liberação foi de PDGF-AA, seguido por PDGF-BB, TGFB1, VEGF e PDGF-AB. No entanto, ocorreram diferenças na cinética de liberação entre os concentrados, A-PRF liberou quantidades totais significativamente maiores de fatores de crescimento quando comparado ao PRF tradicional.

## **2.5 Emprego da PRF em pequenos animais**

Visser et al. (2010) compararam a concentração de TGF- $\beta$ 1 eluído de uma matriz de PRF, membrana de PRF e coágulo sanguíneo, no decorrer do tempo, assim como os efeitos mitogênicos dos eluentes de cada construção em células de tendão canino. Para o estudo foi empregado sangue de 4 cães adultos da raça Beagle. A membrana de PRF foi preparada de 18 mL de sangue inteiro, colocado em dois tubos de 9 mL, cada qual contendo citrato tri-sódio e gel separador. Os tubos foram centrifugados a 1.100 X g por 6 minutos, criando o sobrenadante de PRP, que foi transferido a um frasco de vidro contendo cloreto de cálcio. A garrafa foi então centrifugada a 4.500 X g por 25 minutos resultando em membrana circular e plana. A matriz de PRF foi preparada de 9 mL de sangue inteiro colocado em tubo contendo citrato tri-sódio tamponado, que após centrifugação a 1.100 X g por 6 minutos foi separada em componente de células sanguíneas vermelhas e brancas e um componente PRP. O sobrenadante (PRP)

foi transferido a um tubo cilíndrico contendo cloreto de cálcio, que após uma segunda centrifugação (1.450 X g por 15 minutos) resultou em matriz de PRF de formato cilíndrico. Tanto a matriz de PRF como a membrana de PRF foram compostas de arcabouço de fibrina densa, que continham concentrações aumentadas de TGF- $\beta$ 1 e foram capazes de aumentar a proliferação de células tendíneas, quando comparadas com o coágulo sanguíneo.

O efeito de uma membrana de PRF em defeito induzido no terço médio do tendão patelar de ambos os membros, em oito cães da raça Beagle, foi avaliado por Visser et al. (2011). Suturas em padrão U horizontal foram colocadas através do remanescente do tendão e a membrana de PRF autóloga foi enrolada para formar um tubo, colocada no defeito e suturada no remanescente do tendão. O defeito contralateral foi deixado vazio. Para produção da membrana foi coletado 18 mL de sangue da veia jugular externa com cateter e colocado em 2 tubos de 9 mL, contendo citrato tri-sódio e um separador de gel. Os tubos foram centrifugados a 1.100 X g por 6 minutos. O sobrenadante do PRP de ambos os tubos foram transferidos com agulha calibre 18 e seringa de 20 ml para um frasco de vidro que continha 1.0 M de cloreto de cálcio. O frasco foi imediatamente centrifugado a 4.500 X g por 25 minutos, resultando em uma membrana de fibrina, circular, plana e densa. Tanto o defeito tratado como o controle estavam preenchido por tecido de reparação por 4 semanas. Segundo os autores, a membrana não aumentou a qualidade ou a taxa de cicatrização do defeito tendíneo.

Soares et al. (2018) descreveu o caso de um gato de 13 anos de idade com fístula oronasal, que havia sido submetido a dois procedimentos cirúrgicos prévios sem sucesso e foi tratado por uma nova abordagem. Esta incluía a aplicação de uma malha de policaprolactona impressa tridimensional e adaptada ao tamanho e forma da fístula, em combinação com PRF autólogo e aspirado de medula óssea coletado do úmero, que foram recobertos por um retalho pedicular mucogengival. Para a produção da PRF o sangue foi centrifugado por 3000 rpm por 10 minutos e, antes da aplicação, a fração de hemácia foi desprezada. Uma tomografia 75 dias após a cirurgia mostrou a formação do novo tecido no defeito, porém o implante não foi observado e havia evidência limitada da consolidação óssea.

### 3 REFERÊNCIAS

ALIZADE, F.L.; KAZEMI, M.; IRANI, S.; SOHRABI, M. Biologic characteristics of platelet rich plasma and platelet rich fibrin: A review. *Int. J. Contemp. Dent. Med. Rev.*, v.2016, p.1-4, 2016.

ARNOCZKY, S.P.; SHEIBANI-RAD, S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Med. Arthrosc. Rev.*, v.21, n.4, p.180-185, 2013.

CARUANA, A.; SAVINA, D.; MACEDO, J.P.; SOARES, S.C. From platelet-rich plasma to advanced platelet-rich fibrin: biological achievements and clinical advances in modern surgery. *Eur. J. Dent.*, v.13, n.2, p.280-286, 2019.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.101, p.E37-44, 2006.

EHRENFEST, D.M.D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*, v.27, n.3, p.158-167, 2009.

EHRENFEST, D.M.D.; DEL CORSO, M.; 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.*, v.81, n.4, p.546-555, 2010.

EHRENFEST, D.M.D.; BIELECKI, T.; JIMBO, R.; BARBÉ, G.; DEL CORSO, M.; INCHINGOLO, F.; SAMMARTINO, G. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.13, n.7, p.1145-1152, 2012.

EHRENFEST, D.M.D.; PINTO, N.R.; PEREDA, A.; JIMÉNEZ, P.; DEL CORSO, M.; KANG, B.S.; NALLY, M.; LANATA, N.; WANG, H-L.; QUIRYNEN, M. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, v.29, n.2, p.171-184, 2018.

- GARCIA-NAVARRO, C.E.K. Hemostasia: coagulação do sangue e fibrinólise. In: *Manual da hematologia veterinária*. 2ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005. p.109–123
- GHANAATI, S.; BOOMS, P.; ORLOWSKA, A.; KUBESCH, A.; LORENZ, J.; RUTKOWSKI, J.; LANDES, C.; SADER, R.; KIRKPATRICK, C.J.; CHOUKROUN, J. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J. Oral Implantol.*, v.40, n.6, p.679–689, 2014.
- GIANNINI, S.; CIELO, A.; BONANOME, L.; RASTELLI, C.; DERLA, C.; CORPACI, F.; FALISI, G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, v.19, p.927-930, 2015.
- HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part 1: Definition, development, biological characteristics and function. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.14-24, 2016a.
- HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part II: Preparation, optimization, handling and application, benefits and limitations of PRF. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.34-48, 2016b.
- KOBAYASHI, M.; KAWASE, T.; HORIMIZU, M.; OKUDA, K.; WOLFF, L.F.; YOSHIE, H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*, v.40, n.5, p.323-329, 2012.
- KOBAYASHI, E.; FLÜCKIGER, L.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; SAWADA, K.; SCULEAN, A.; SCHALLER, B.; MIRON, R.J. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin. Oral Investig.*, v.20, n.9, p.2353-2360, 2016.
- LANGLEY-HOBBS, S.J.; DEMETRIOU, J.L.; LADLOW, J.F. *Feline soft tissue and general surgery*. Saunders Elsevier: China, 2014. 768p.
- MADURANTAKAM, P.; YOGANARASIMHA, S.; HASAN, F.K. Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, a novel biomaterial. *J. Vis. Exp.*, n.103, p.1-8, 2015.

- MISCHKE, R. Overview of hemostasis. In: DAY, M.J.; KOHN, B. *BSVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. 2 ed. Gloucester: BSAVA, 2012. p.182-188.
- MONTAVON, P.M.; VOSS, K.; LANGLEY-HOBBS, S.J. *Feline orthopedic surgery and musculoskeletal disease*. Saunders Elsevier: China, 2009. 582p.
- MUÑOZ, F.T.; HAIDAR, Z.S. L-PRF for use in oro-maxillo-facial surgeries: What do we know? *J. Oral Res.*, v.7, n.3, p.88-90, 2018.
- OLIVEIRA, L.A.; PONTUAL, M.A.B.; BARROS, E.R.; LEAO, M.P. Do L-PRF ao Stick Bone – opções terapêuticas na Implantodontia usando concentrados plaquetários. *ImplantNewsPerio Internat. J.*, v.10, p.1-20, 2017.
- PINTO, N.R.; PEREDA, A.; JIMÉNEZ, P.; CORSO, M.D.; KANG, B-S.; WANG, H-L.; QUIRYNEN, M.; EHRENFEST, D.M.D. 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 Electron Microscopy analysis of 4 kinds of L-PRF clots and membranes. *POSEIDO J.* v.2, n.2, p.141-154, 2014.
- SAM, G.; VADAKKEKUTTICAL, R.J.; AMOL, N.V. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. *J. Indian Soc. Periodontol.*, v.19, n.1, p.32-36, 2015.
- SCHÄR, M.O.; DIAZ-ROMERO, J.; KOHL, S.; ZUMSTEIN, M.A.; NESIC, D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration *in vitro*. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.473, n.5, p.1635-1643, 2015.
- SIMONPIERI, A.; DEL CORSO, M.; VERVELLE, A.; JIMBO, R.; INCHINGOLO, F.; SAMMARTINO, G.; DOHAN EHRENFEST, D.M. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.13, n.7, p.1231-1256, 2012.
- SMITH, S.A.; BROOKS, B.B. Hemostasis: overview of hemostasis. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p.635-653.

SOARES, C.S.; BARROS, L.C.; SARAIVA, V.; GOMEZ-FLORIT, M.; BABO, P.S.; DIAS, I.R.; REIS, R.L.; CARVALHO, P.P.; GOMES, M.E. Bioengineered surgical repair of a chronic oronasal fistula in a cat using autologous platelet-rich fibrin and bone marrow with a tailored 3D printed implant. *J. Feline Med. Surg.*, v.20, n.9, p.835-843, 2018.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Hemostasia. In:\_\_\_\_. *Fundamentos da patologia clínica veterinária*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.213 – 262, 2011.

UPADHAYAYA, V.; AMAN ARORA, A.; GOYAL, A. Bioactive platelet aggregates: Prp, Prgf, Prf, Cgf and Sticky bone. *IOSR J. Dent. Med. Sci.*, v.16, n.5, p.5-11, 2017.

VISSER, L.C.; ARNOCZKY, S.P.; CABALLERO, O.; EGERBACHER, M. Platelet-rich fibrin constructs elute higher concentrations of transforming growth factor- $\beta$ 1 and increase tendon cell proliferation over time when compared to blood clots: a comparative *in vitro* analysis. *Vet. Surg.*, v.39, n.7, p.811-817, 2010.

VISSER, L.C.; ARNOCZKY, S.P.; CABALLERO, O.; GARDNER, K.L. Evaluation of the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane to enhance tendon healing in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.72, n.5, p.699-705, 2011.

ZUMARÁN, C.C.; PARRA, M.V.; OLATE, S.A.; FERNÁNDEZ, E.G.; MUÑOZ, F.T.; HAIDAR, Z.S. The 3 R's for platelet-rich fibrin: a "super" tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided oro-maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration. *Materials (Basel.)*, v.11, n.8, p.1-15, 2018.

## **CAPÍTULO 2**

# TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser enviado para Journal of Feline Medicine and Surgery: <https://journals.sagepub.com/author-instructions/JFM>

## **Preparo e caracterização de membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos com sangue de gatos da raça Maine Coon**

### **Resumo**

*Objetivos:* Preparar e caracterizar, por meio de análise histológica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) produzida a partir de sangue de gatos da raça Maine Coon.

*Métodos:* De acordo com o critério de inclusão foram utilizados 13 gatos adultos saudáveis, com peso variando entre 3,1 kg e 7,5 kg, dos quais foi coletado sangue da veia jugular externa com escalpe 21G e tubo plástico siliconizado à vácuo. Dois tubos com 3 mL de sangue cada um foram centrifugados imediatamente à coleta, empregando centrífuga especializada para esta aplicação, 650 g por 12 minutos. O coágulo de L-PRF foi retirado do tubo utilizando uma pinça e com uma espátula foi cuidadosamente escarificado para retirar o máximo de células vermelhas, preservando a região do “buffy coat” (camada celular). Na sequência o coágulo de L-PRF foi posicionado sobre a malha metálica perfurada e comprimido com a tampa, por 30 a 60 segundos, obtendo-se a membrana de L-PRF.

*Resultados:* Pela análise histológica com a coloração Hematoxilina e Eosina foi possível distinguir as três porções que compunham a membrana: parte branca, “buffy coat” e parte vermelha. Na parte branca a rede de fibrina mostrava-se homogênea e sem presença de células. A rede de fibrina mostrava-se mais densa próxima ao “buffy coat”. Na área do “buffy coat” havia a maior concentração de leucócitos, porém as plaquetas foram de difícil identificação. O exame imuno-histoquímico das membranas mostrou que 69,23% das amostras tiveram escore 4 para VEGF e 30,77% escore 3, ao passo que no PDGF 53,85% tiveram escore 3 e 46,15% escore 2. Pela MEV foi possível verificar a arquitetura

tridimensional da rede de fibrina. Na área do “buffy coat” a morfologia das células estava preservada, sendo composta principalmente de leucócitos e plaquetas.

*Conclusão e relevância:* A metodologia empregada permitiu caracterizar a composição da membrana de L-PRF em gatos Maine Coon, que apresenta tipos celulares e arquitetura de rede de fibrina similares ao descrito para a espécie humana.

## **Introdução**

Os concentrados plaquetários autólogos têm sido usados na medicina regenerativa, principalmente em pacientes humanos, em virtude da abundância de fatores de crescimento, incluindo áreas como cirurgia maxilofacial, dental e oral, cicatrização de feridas e medicina do esporte, entre outros (SIMONPIERI et al., 2012; ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013; ALIZADE et al., 2016; MUÑOZ e HAIDAR, 2018).

Os métodos de obtenção de agregados plaquetários têm apresentado grande evolução e várias nomenclaturas (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a; MUÑOZ e HAIDAR, 2018). Baseado em um consenso, há quatro principais categorias de concentrados plaquetários, considerado o conteúdo de leucócitos e arquitetura de fibrina: P-PRP (plasma rico em plaquetas puro), L-PRP (plasma rico em plaquetas em leucócitos), P-PRF (fibrina rica em plaqueta pura) e L-PRF (fibrina rica em plaqueta e leucócito) (EHRENFEST et al., 2009; EHRENFEST et al., 2013). Os dois últimos estão incluídos dentro dos biomateriais à base de fibrina sólidos (EHRENFEST et al., 2009; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a).

Entre os concentrados plaquetários, a L-PRF tem sido cada vez mais utilizada, em virtude da simplicidade e rapidez da preparação, facilidade de uso e maleabilidade, e provável custo-efetividade (SIMONPIERI et al., 2012; MADURANTAKAM et al., 2015; GIANNINI et al., 2015; ALIZADE et al., 2016; HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b; ZUMARÁN et al., 2018). A técnica para produção da L-PRF consiste em centrifugar o sangue venoso imediatamente após a coleta em tubo sem anticoagulante, aditivos ou quaisquer outros agentes gelificantes (EHRENFEST et al., 2009; MADURANTAKAM et al., 2015; MUÑOZ e HAIDAR, 2018), para que ocorra a concentração de fibrinogênio antes que a trombina o converta em fibrina (ALIZADE et al., 2016). Durante a centrifugação em baixa velocidade, há a ativação sanguínea com a formação de um coágulo de plaqueta-fibrina, que permanece no meio do tubo de centrifugação, estando

as células sanguíneas vermelhas no fundo e o plasma acelular no topo (EHRENFEST et al., 2009; MADURANTAKAM et al., 2015; ALIZADE et al., 2016). O coágulo pode ser aplicado diretamente na área de interesse, ou pode ser transformado em membrana, pela compressão entre gazes ou com equipamento específico, ou mesmo aplicado como plugue (KOBAYASHI et al., 2012; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a; UPADHAYAYA et al., 2017; ZUMARÁN et al., 2018).

A L-PRF é um biomaterial tridimensional ativo biologicamente, que permite a migração e proliferação celular, além da liberação de fatores de crescimento, tais como TGF- $\beta$  1 e PDGF, bem como citocinas (DOHAN et al., 2006; SCHÄR et al., 2015; ALIZADE et al., 2016; UPADHAYAYA et al., 2017; ZUMARÁN et al., 2018). A complexa arquitetura da matriz de fibrina contribui para que as propriedades mecânicas sejam favoráveis (UPADHAYAYA et al., 2017).

A despeito da simplicidade desta segunda geração de concentrado plaquetário, vários detalhes técnicos, incluindo as características da centrífuga utilizada bem como os protocolos de centrifugação, podem influenciar na qualidade do biomaterial obtido em termos de células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina (PINTO et al., 2014; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b; EHRENFEST et al., 2018).

Vale referir que os felinos apresentam várias afecções de caráter cirúrgico, incluindo pele, tecidos moles e a área de ortopedia e traumatologia (MONTAVON et al., 2009; LANGLEY-HOBBS et al., 2014), que justificariam o emprego deste biomaterial. Contudo, há ainda poucos relatos da aplicação de PRFs em gatos (SOARES et al., 2018).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi preparar e caracterizar, por meio de análise histológica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a membrana de L-PRF com sangue de gatos da raça Maine Coon.

## **Materiais e métodos**

### ***Animais e ambiente de experimentação***

A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu, número 184/2018-CEUA (Anexo 1). Antes do início do estudo, todos os tutores assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram utilizados 15 gatos não castrados da raça Maine Coon, 11 fêmeas e 4

machos, com peso variando entre 3,1 e 7,5 kg (Média: 5,69; DP:1,37). Para comprovação da higidez, os gatos foram avaliados pelo histórico, exame físico, análises bioquímicas (Ureia, Creatinina, Fosfatase Alcalina, Transaminase glutâmico-pirúvica) e hemograma completo, cujos valores necessitavam estar dentro dos padrões de normalidade (determinado pelo laboratório de realização das análises), os quais foram especificados no critério de inclusão. Foram considerados critérios de exclusão gatos positivos para FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FELV (vírus da leucemia felina), que tivessem sido submetidos a procedimentos cirúrgicos a pelo menos 6 meses e recebido medicações de uso continuado.

### ***Coleta das amostras sanguíneas***

Após antissepsia com clorexidine alcoólico na região cervical, foi coletado sangue da veia jugular externa com escalpe 21G (Becton Dickinson - BD Vacutainer; Juiz de Fora, Brasil) assim distribuído: dois tubos de plástico siliconizados à vácuo, sem presença de aditivos (BD Vacutainer; Juiz de Fora, Brasil), com 3 mL em cada um para preparação da PRF; 0,5 mL em tubo EDTA à vácuo (BD Vacutainer; Juiz de Fora, Brasil) para o hemograma completo; 0,5 mL em tubo seco à vácuo com ativador de coágulo (BD Vacutainer; Juiz de Fora, Brasil) para os exames bioquímicos.

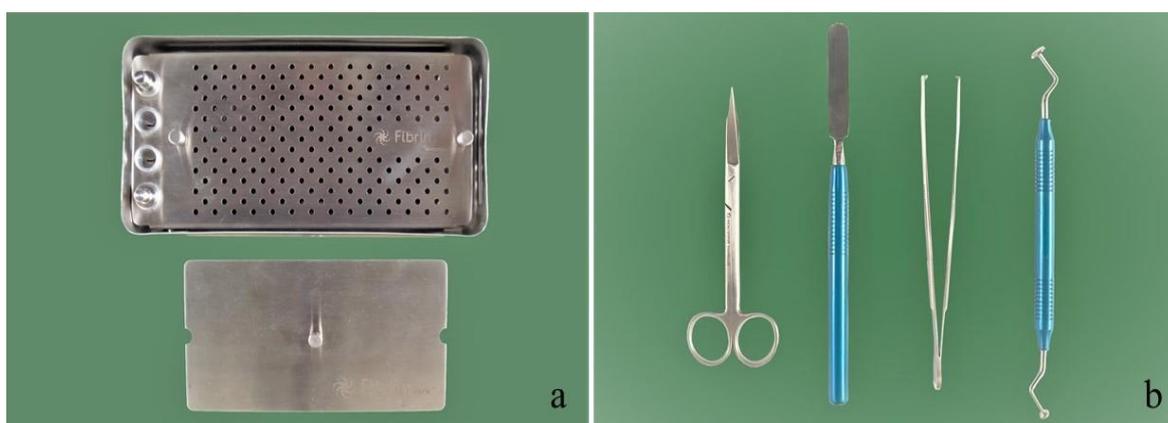
### ***Protocolo para a preparação da membrana de L-PRF***

Os tubos siliconizados à vácuo foram centrifugados, imediatamente após a coleta, empregando centrífuga especializada para esta aplicação (FibrinFUGE® - LC-04P-S/LCD; Montserrat Import & Export; São Bernardo do Campo, Brasil), a 650 g por 12 minutos a temperatura ambiente. A centrífuga digital tem nível de vibração abaixo de  $0,50 \text{ m/s}^2$ , ângulo de  $25^\circ$ , raio central de 65 mm, motor de indução, 5 rampas de aceleração e desaceleração (Figura 1a). Ao final da centrifugação, o tubo foi retirado sendo observada três camadas (Figura 1b): ao fundo, as células vermelhas precipitadas formando um coágulo; ao centro, o coágulo de fibrina (L-PRF); e no topo, o líquido de plasma pobre em plaquetas (PPP). Intermediário ao coágulo de fibrina e ao coágulo sangue, encontrava-se o “buffy coat”.

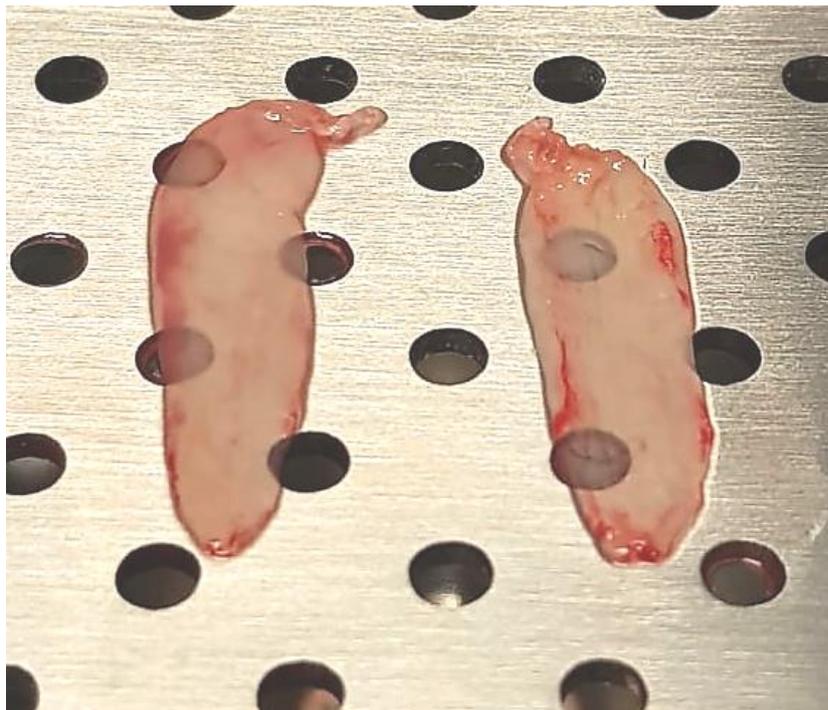


**Figura 1** (a) Centrífuga especializada para produção da L-PRF (FibrinFUGE). (b) Tubo após a centrifugação de sangue felino, no qual se observa três camadas: células vermelhas, coágulo de fibrina (seta vermelha) e plasma pobre em plaquetas

O coágulo da L-PRF foi retirado do tubo utilizando uma pinça e com uma espátula foi cuidadosamente escarificado para retirar o máximo de células vermelhas, preservando a região do “buffy coat”. Na sequência o coágulo da L-PRF foi posicionado sobre a malha metálica perfurada (20 cm x 10 cm x 3 cm) e então comprimido, por 30 a 60 segundos, pelo posicionamento da tampa de metal específica sobre o mesmo, a qual pesava 116 gramas (Fibrin box®; Montserrat; São Paulo, Brasil) (Figura 2). Após a remoção da tampa, foi possível verificar a membrana de L-PRF pronta para o uso (Figura 3).



**Figura 2** Note a malha perfurada e tampa da Fibrin box® (a), bem com os demais acessórios utilizados na produção da membrana de L-PRF (b)



**Figura 3** Membranas de L-PRF produzidas com sangue felino sobre a malha perfurada

#### ***Processamento para análise histológica das membranas de L-PRF***

Um total de 13 membranas foram acondicionadas em cassetes e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas. A seguir foram lavadas em água corrente durante 48 horas e, mantidas no álcool a 70% até o processamento. As amostras foram incluídas em parafina e processadas para obtenção de cortes histológicos de 5  $\mu$ m, que foram corados com Hematoxilina e Eosina.

As amostras foram avaliadas quanto a presença da rede de fibrina e identificação das células presentes dentro das diferentes porções da membrana.

#### ***Processamento e análise imuno-histoquímica das membranas de L-PRF***

A coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) foram efetuadas para avaliar a presença de fatores de crescimento na membrana. Para tanto, empregou-se o método de peroxidase e tetracloreto de 3,3 diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram desparafinadas em xilol e reidratadas em diferentes graduações de álcool. Para a recuperação do antígeno, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH 6,0) em

panela de pressão (Pascal®; Dako, Carpinteria, CA, USA). Posteriormente as lâminas foram colocadas na plataforma automática (AutoStainer; Dako, Carpinteria, CA, USA). O VEGF foi detectado com anticorpo monoclonal de camundongo (Cell signaling; Danvers, MA, USA) com a diluição de 1 em 500 e o anticorpo monoclonal PDGF de camundongo (Cell signaling; Danvers, MA, USA) com a diluição de 1 em 500, por duas horas. A marcação imunológica foi realizada pelo método Histofine (414154F; Nichirei Biosciences, Tokyo, JP). As secções foram contra coradas com a hematoxilina. O controle positivo consistiu em uma placenta de gata. O controle negativo foi realizado para todos os anticorpos pela omissão do anticorpo primário e substituição com solução salina tamponada com Tris.

A análise imuno-histoquímica foi realizada em 13 membranas, de acordo com o previamente descrito (DOS ANJOS et al., 2019), por meio de microscopia óptica e escore semiquantitativo, sendo: escore 0 – amostra sem expressão, escore 1 – células positivas de 1% até 25%, escore 2 - células positivas de 26% até 50%, escore 3 - células positivas de 51% até 75%, escore 4 – acima de 75% das células positivas.

#### ***Processamento das membranas de L-PRF para microscopia eletrônica de varredura***

A preparação das amostras foi efetuada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto Biociência da UNESP Campus Botucatu.

As membranas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 0,5% por 40 minutos, e lavadas em água destilada (3 vezes de 10 minutos). Em seguida, foi realizada as etapas de desidratação em série crescente com álcool em 7,5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Após a desidratação, foi realizada secagem ao ponto crítico, montagem nos “stubs” e metalização com ouro. As amostras foram analisadas empregando microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200; FEI Company, Oregon, USA), tendo sido efetuadas fotografias com 12,5 Kv usando de 600x a 20,000X de magnificação. Um total de cinco membranas foram avaliadas a qualidade da rede de fibrina e a distribuição celular dentro das diferentes porções da membrana.

## **Resultados**

Dos 15 gatos da raça Maine Coon avaliados, somente 13 gatos, 11 fêmeas e 2 machos, com idade entre 1 ano 7,6 anos (Média: 2,7 anos), com peso variando entre 3,1 kg e 7,5 kg (Média: 5,69; Desvio Padrão:1,37) estavam dentro do critério inclusão para o estudo. Dois gatos foram excluídos do estudo porque a contagem de trombócitos estava abaixo do limite de normalidade.

A coleta e a centrifugação foram efetuadas sem intercorrência, após as quais foi obtida as três camadas do concentrado plaquetário. A camada base com hemácias foi facilmente separada do coágulo de L-PRF com o emprego da espátula. A tampa do “Fibrin box” permitiu a formação da membrana de L-PRF de forma uniforme. Macroscopicamente não foi identificado impregnação de hemácias na camada média. Foram formadas 26 membranas, das quais cinco foram para a análise pela MEV.

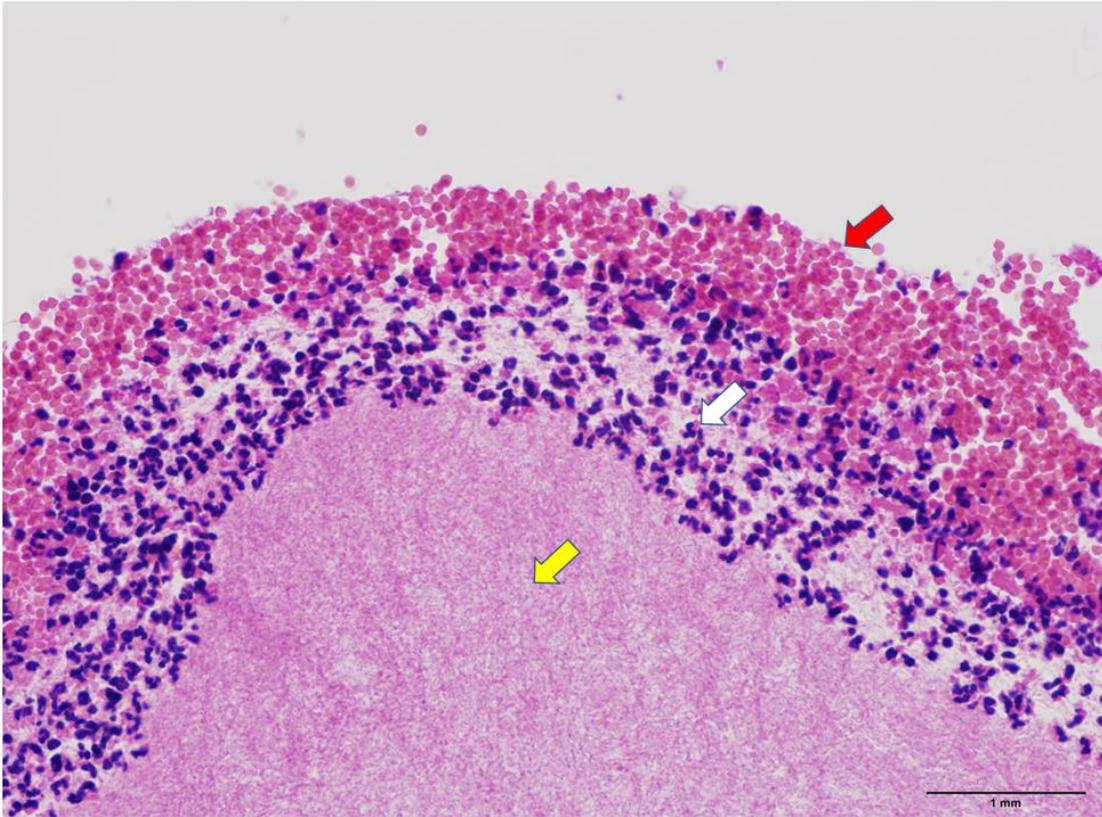
### ***Análise histológica das membranas***

Em todas as amostras avaliadas foi possível distinguir histologicamente a composição das três porções da membrana: parte vermelha, “buffy coat” (camada celular) e parte branca (Figura 4).

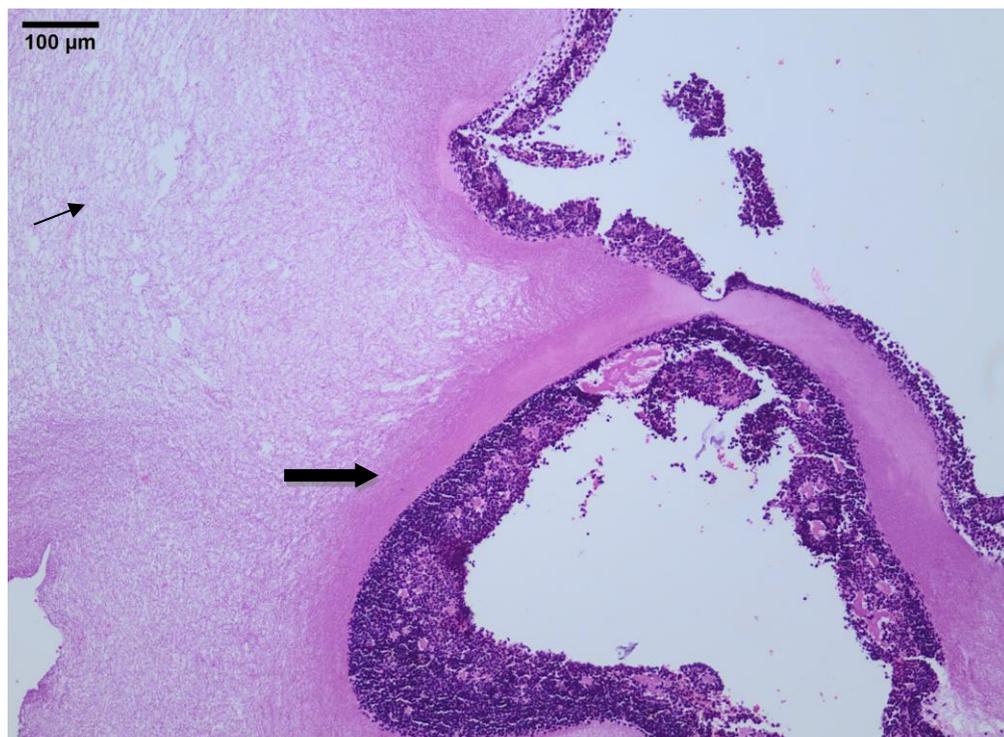
As hemácias foram identificadas pela morfologia característica, apresentando células anucleadas com aspecto de disco bicôncavo e coloração rosa/vermelho, localizadas principalmente na parte vermelha da membrana. Também foi observado na mesma porção, pequena densidade de leucócitos interpostos com hemácias.

A parte branca estava constituída por uma rede de fibrina homogênea, de coloração rósea clara, acidofílica e acelular. A camada da rede de fibrina mostrava-se mais densa próxima ao “buffy coat” devido ao aumento da concentração das células, formando um arcabouço no qual essas células ficavam acondicionadas (Figura 5).

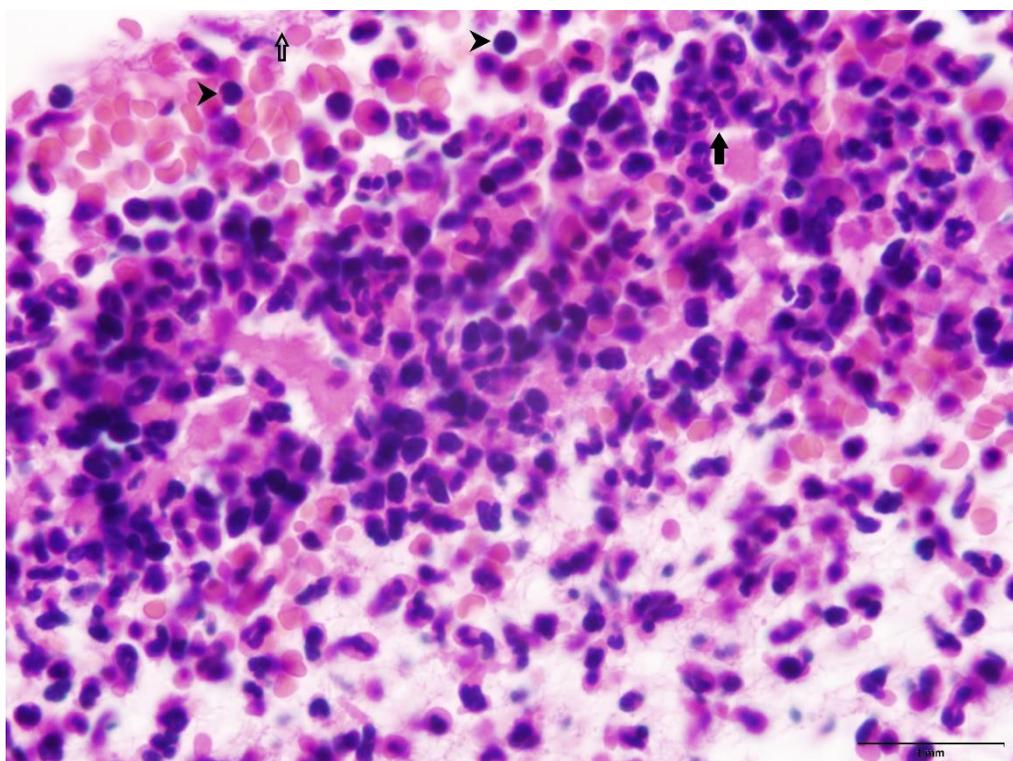
Na área do “buffy coat” foi possível observar maior concentração de leucócitos, predominantemente neutrófilos, que foram identificados por suas características morfológicas, apresentando núcleo lobular multi-segmentado (dois a cinco lóbulos) e abundante citoplasma acidofílico (Figura 6). Também foram identificados linfócitos, células de núcleo grande e esférico com cromatina condensada, com citoplasma basofílico escasso; e plaquetas, pequenas células anucleadas (Figura 6). Não foi possível a identificação de todas as células devido à grande concentração celular nessa região.



**Figura 4** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Note a intensa rede de fibrina acidofílica acelular (seta branca). Observe a área do “buffy coat”, na qual é identificada a maior concentração celular, constituída predominantemente de leucócitos (seta amarela). Na porção vermelha da membrana são visualizadas as hemácias coradas em rosa/vermelho interpostas com alguns leucócitos (seta vermelha) (HE, 200X).



**Figura 5** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Observe a arquitetura da rede de fibrina mais densa (seta espessa) próximo ao “buffy coat” e rede mais delgada (seta fina) na porção distante do “buffy coat”. (HE, 100X)



**Figura 6** Fotomicrografia de membrana de L-PRF felina. Área do “buffy coat” e porção vermelha da membrana. Note a grande concentração celular constituída principalmente por neutrófilos segmentados (seta cheia) e linfócitos (cabeça de seta). Observe o aglomerado plaquetário (seta vazia). (HE, 1.000X)

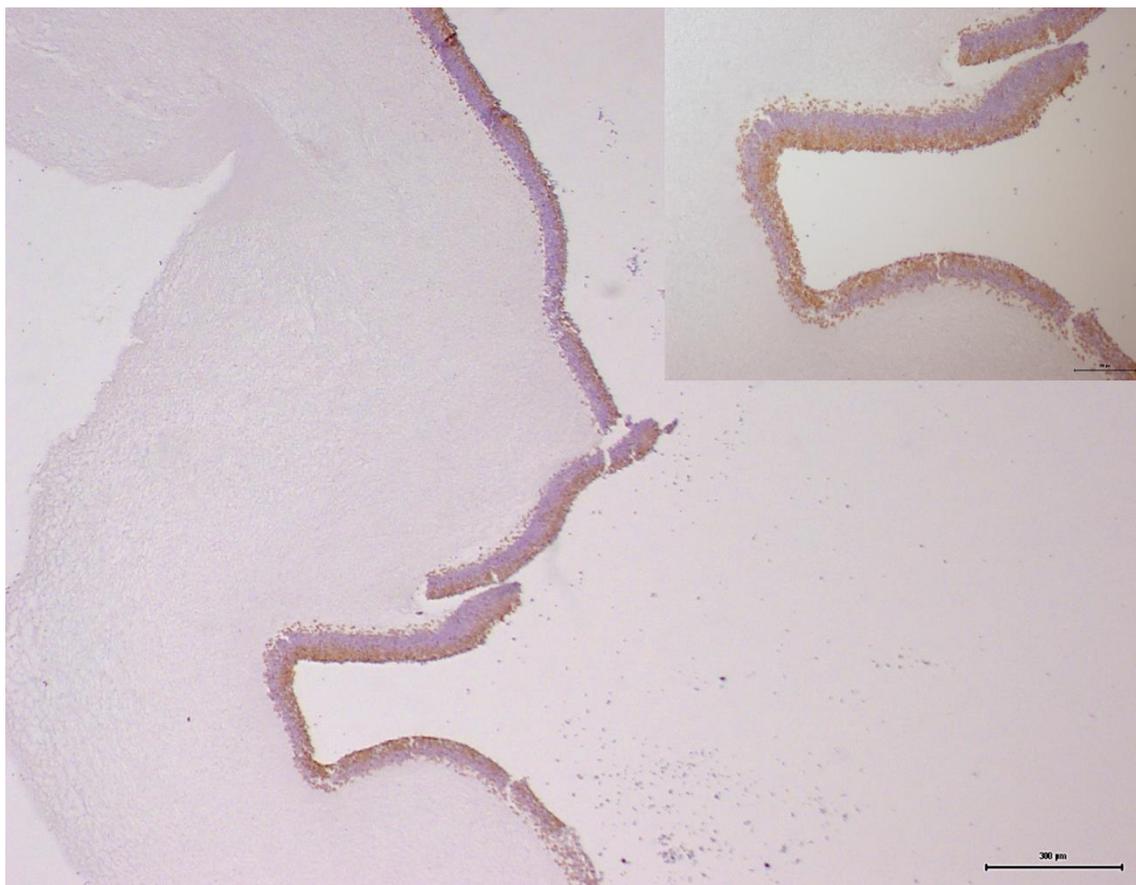
### *Análise imuno-histoquímica das membranas*

Os resultados da análise imuno-histoquímica das membranas de PRF estão descritos na Tabela 1 e ilustrados nas Figuras 7 e 8.

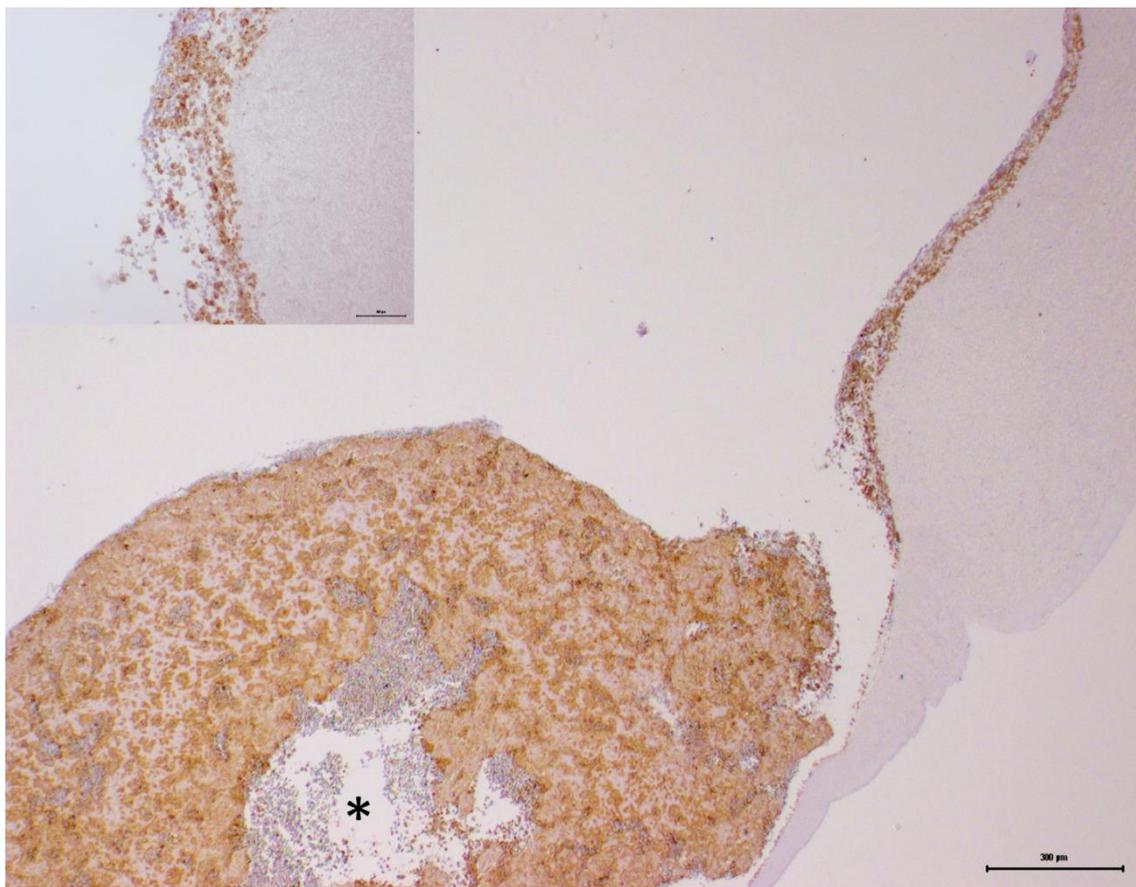
Tabela 1 – Escores semiquantitativos da coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em 13 membranas de L-PRF felina.

<b>Identificação das Amostras</b>	<b>VEGF</b>	<b>PDGF</b>
1	4	3
2	4	3
3	4	2
4	4	3
5	3	2
6	4	2
7	4	3
8	3	2
9	4	3
10	3	3
11	4	2
12	3	2
13	4	3

escore 0 – amostra sem expressão, escore 1 – células positivas de 1% até 25%, escore 2 - células positivas de 26% até 50%, escore 3 - células positivas de 51% até 75%, escore 4 – acima de 75% das células positivas



**Figura 7** Coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em membrana de L-PRF felina. Observe a alta expressão de PDGF, com componente celular classificado em score 2 (células positivas de 26% até 50%) (detalhe).



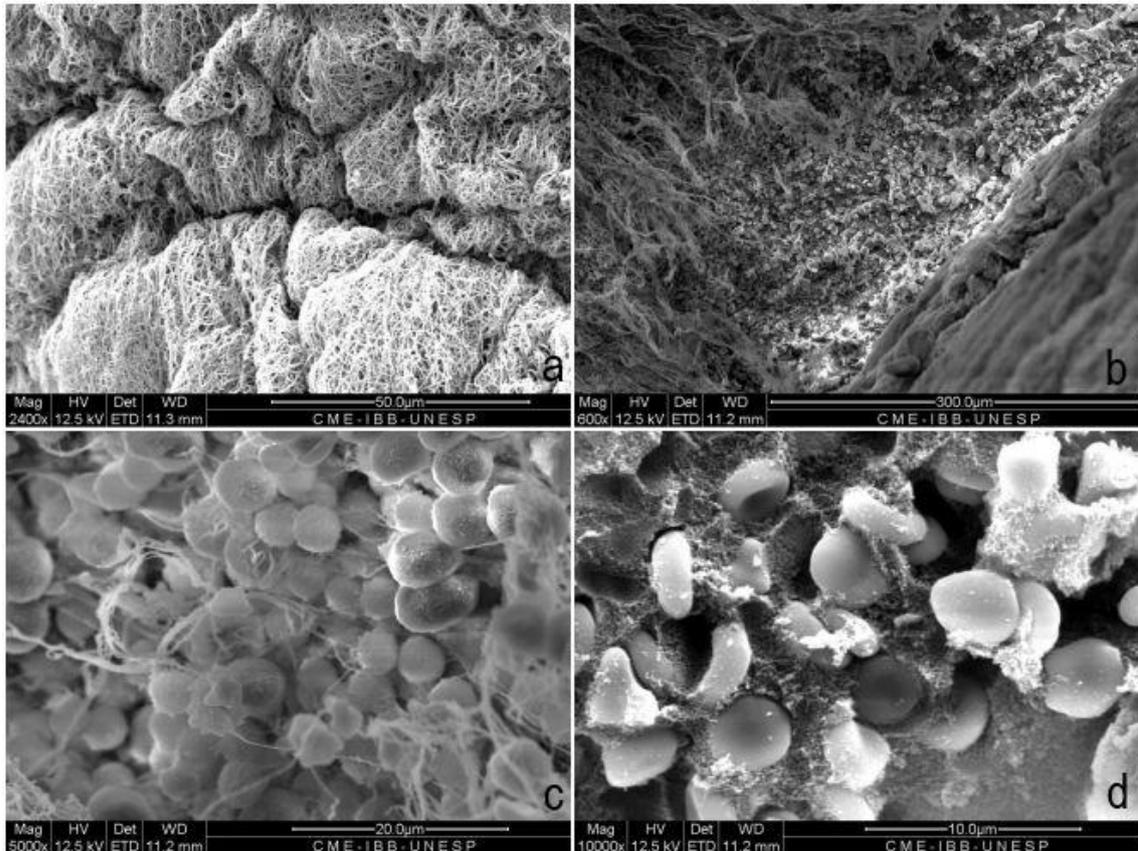
**Figura 8** Coloração imuno-histoquímica para fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em membrana de L-PRF felina. Note a classificação em escore 4 (acima de 75% das células positivas) da expressão de VEGF na membrana (detalhe). Há expressão positiva no componente celular e matriz da membrana. Verifique a expressão negativas nas hemáceas (asterisco).

#### ***Análise das membranas por MEV***

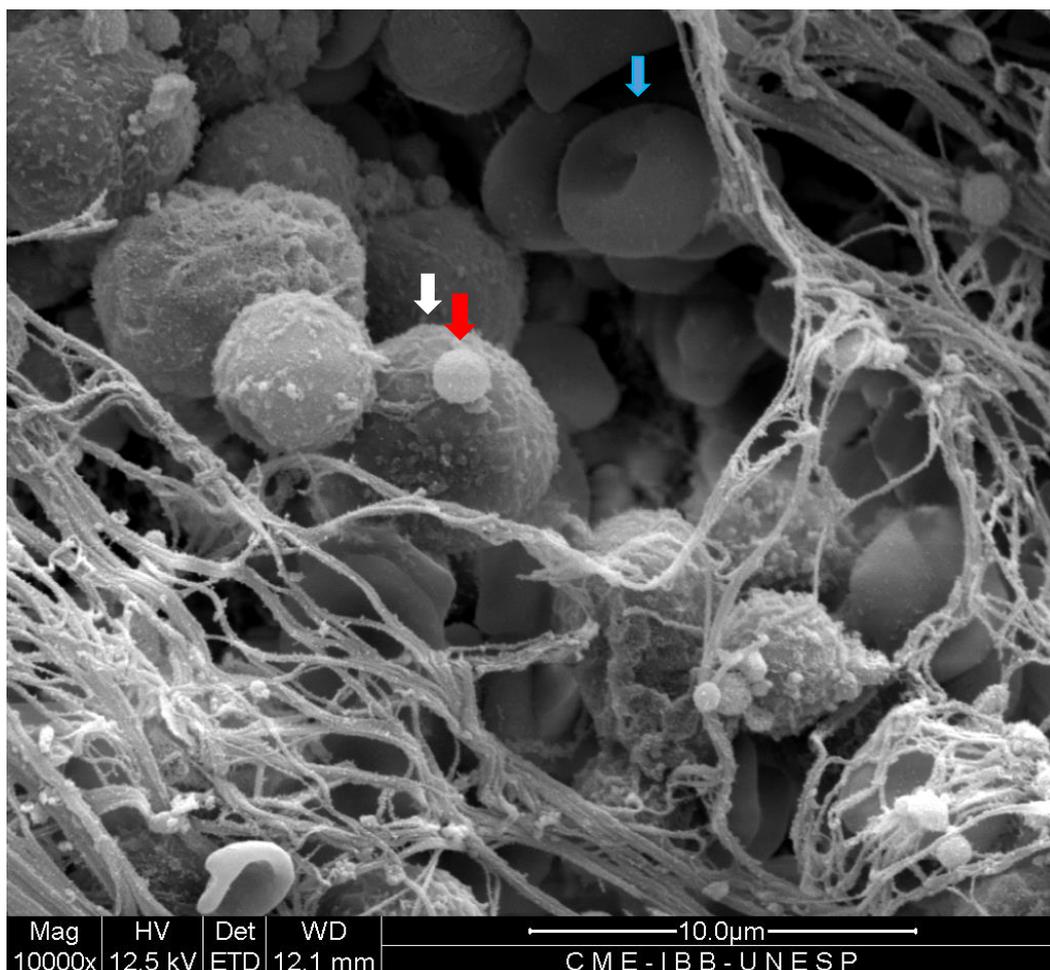
Pela MEV foi possível verificar a arquitetura tridimensional da rede de fibrina (Figura 9a), que se mostrava mais compacta na área próxima ao “buffy coat”.

Na área do “buffy coat” a população celular tinha bom formato, sem sinais de danificação, sendo composta principalmente por leucócitos e plaquetas (Figuras 9b e 9c). Os leucócitos foram identificados como estruturas esféricas com superfície irregular. As plaquetas tinham formato discoide ou arredondado, com menor tamanho comparado aos leucócitos e hemácias.

Na parte vermelha foram observadas hemácias entremeadas a rede de fibrina (Figura 9d). Em locais com presença de fibrina e células, a fibrina apresentava-se com arcabouço para hemácias, leucócitos e plaquetas (Figura 10).



**Figura 9** Imagem na microscopia eletrônica de varredura de membrana de L-PRF felina. (a) Note a parte branca da membrana caracterizada exclusivamente pela rede de fibrina (2400x). (b) Área do “buffy coat, na qual se observa uma alta concentração celular, seguida por densa rede de fibrina (600x). (c) Detalhe das células da área do “buffy coat, na qual é possível observar as células entremeadas na rede de fibrina (5000x). (d) Note a porção de célula vermelha da membrana com aglomerado de hemácias junto à rede de fibrina. (10000x)



**Figura 10** Imagem na microscopia eletrônica de varredura de membrana de L-PRF felina. Note a rede de fibrina como um arcabouço para plaquetas (seta vermelha), leucócitos (seta branca) e hemácias (seta azul) (10000x)

## Discussão

Para melhor caracterização da membrana de L-PRF optou-se no atual estudo pelo uso de um grupo controlado de acordo com o padrão racial, tendo sido escolhido os gatos Maine Coon, por ser uma das maiores raças de gatos domésticos.

Já que não existem protocolos específicos para produção do L-PRF em gatos, a metodologia utilizada foi baseada no estabelecido para pacientes humanos (MADURANTAKAM et al., 2015), levando em consideração que a qualidade da membrana de L-PRF obtida pode ser influenciada pelo intervalo de tempo entre coleta e centrifugação, tipo de tubo empregado na coleta, qualidade do equipamento para a

centrifugação, velocidade de centrifugação (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013; HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b; EHRENFEST et al., 2018).

Com o uso do tubo à vácuo foi possível rápida coleta de amostras sanguíneas, que foram imediatamente processadas. O sucesso na produção do L-PRF é dependente da rapidez da coleta do sangue e sua transferência para a centrífuga, ou seja, dentro de dois minutos (ALIZADE et al., 2016; HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b). Se houver demora, o fibrinogênio não pode ser concentrado na parte superior e média do tubo, já que é necessário concentrar o fibrinogênio antes da trombina convertê-lo em fibrina (ALIZADE et al., 2016). A falha metodológica pode ser identificada pela presença de coágulos diminutos e impregnação de hemácias na rede de fibrina (OLIVEIRA et al., 2017), as quais não foram identificadas macroscopicamente ou pela análise histológica no atual estudo. Além disso, se ocorrer falha na preparação pode haver uma polimerização difusa da fibrina, que não é ideal para cicatrização tecidual (HARTSHORNE e GLUCKMAN 2016b)

O tubo de coleta de sangue utilizado foi de material plástico siliconizado sem anticoagulante, que permitiu o desencadeamento do processo de coagulação. Outros autores têm recomendado o emprego de tubo de vidro seco ou tubos de plástico coberto com vidro (EHRENFEST et al., 2010; ZUMARÁN et al., 2018), não tendo sido detectadas diferenças na arquitetura da PFR ao se comparar estes dois tubos de coleta (EHRENFEST et al., 2010). Além disso, foram empregados dois tubos com 3mL de sangue não apenas pela necessidade de processamento de duas membranas, mas também com o intuito de se obter um balanço entre tubos opostos. Importante citar que as forças precisam estar equilibradas para evitar vibrações durante a centrifugação (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b).

Mesmo usando o tempo de 12 minutos, na velocidade da centrífuga a 400 g, não foi possível obter uma separação adequada das três camadas ou volume suficiente para a produção da membrana e, após várias tentativas, adotou-se 650 g, valor mais alto que o indicado pelo fabricante (400 g) para o protocolo da L-PRF para pacientes humanos. Contudo, ao se calcular o valor em força g deste equipamento, 650 g equivale a 3110 rpm. A centrifugação a 3000 rpm tem sido adotada por vários autores para a produção da L-PRF em pacientes humanos (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b; SAM et al., 2018; ZUMARÁN et al., 2018), assim como o descrito no caso clínico de um felino (SOARES et al., 2018). Dependendo da força g e da duração da centrifugação a resultante construção

de fibrina rica em plaqueta pode variar em consistência, desde uma substância como gel a uma membrana de fibrina densa (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). Em todas as amostras sanguíneas colhidas no atual estudo foi possível comprovar a formação da membrana de L-PRF, tanto pela macroscopia como pela histologia e MEV.

A centrífuga empregada no presente estudo foi desenvolvida especificamente para a produção de L-PRF, sendo autorizada pela ANVISA. Vale referir que embora vários estudos em pacientes humanos usem os mesmos parâmetros de centrifugação, ou seja, a mesma força g e tempo de centrifugação, as características da centrífuga empregada pode ainda induzir variações na qualidade da membrana de PRF (PINTO et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018). Por isso, centrífugas desenvolvidas e testadas especificamente para a produção da membrana PRF são as mais indicadas (EHRENFEST et al., 2018).

Como o processo de compressão do coágulo pode influenciar a qualidade da membrana de L-PRF, no atual estudo empregou-se a “Fibrin box”. Equipamentos específicos como “BoX grid” ou colher de metal permitem uma preparação padronizada e homogênea da membrana de PRF (KOBAYASHI et al., 2012; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b), fato também verificado no atual estudo. No entanto, a pressão gentil é importante, já que se o coágulo for comprimido com muita força ou por muito tempo ocorre encolhimento de rede de fibrina, liberação de fatores de crescimento, desidratação e dano de leucócitos (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). As características histológicas e da MEV confirmaram a qualidade das membranas obtidas.

Pela análise histológica foi possível distinguir a parte branca, “buffy coat” e parte vermelha da membrana, com rede de fibrina mais densa próxima ao “buffy coat”. Isso também foi observado em estudo com outro tipo de concentrado plaquetário (Fatores de crescimento concentrado), que atribuiu a resposta mecânica do material a arquitetura da rede de fibrina (BORSANI et al., 2015). Pela MEV foi identificada uma rede de fibrina tridimensional, que serviu de arcabouço para as células. A densidade e composição da matriz de fibrina são considerados parâmetros fundamentais em um concentrado plaquetário (EHRENFEST et al., 2009).

A coloração com Hematoxilina e Eosina permitiu identificar os leucócitos no “buffy coat”, mas não houve uma clara identificação das plaquetas, as quais foram observadas mais nitidamente pela MEV. Também estudos empregando sangue humanos citaram a dificuldade na caracterização das plaquetas em colorações como Hematoxilina e Eosina bem como o Tricrômico de Masson (BORSANI et al., 2015). A MEV permitiu

distinguir plaquetas ativadas e células em bom formato, sugerindo que a velocidade da centrifugação e o tipo centrífuga utilizados no volume de 3 mL de sangue não atuaram de forma deletéria na formação da membrana L-PRF. A preservação do conteúdo celular é necessária para que ocorra a regulação do processo inflamatório, já que a atuação de uma população de células danificadas provavelmente ocorrerá de forma inadequada em termos de potencial clínico e biológico (PINTO et al., 2014; EHRENFEST et al., 2018).

Os fatores de crescimento existentes nos concentrados plaquetários, tais como VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, IGF-I e HGF, contribuem para regeneração de tecidos moles e duros, bem como a cicatrização de feridas após lesão tecidual (CARUANA et al., 2019). Pela imuno-histoquímica as amostras foram positivas para ambos marcadores testados. Contudo, 69,23% das amostras tiveram escore 4 para VEGF e 30,77% escore 3, ao passo que no PDGF 53,85% tiveram escore 3 e 46,15% escore 2. Desta forma, parece haver uma maior expressão do VEGF, que tem entre suas ações biológicas a regulação da permeabilidade vascular, o início da angiogênese, além da indução da regeneração do tecido ósseo (FUJIOKA-KOBAYASHI e MIRON, 2017; CARUANA et al., 2019). Foi citado que a membrana de PRF tem capacidade de ficar intacta por pelo menos 7 dias, com liberação de VEGF, TGF $\beta$ 1, PDGF-AB e proteínas da matriz ou citocinas (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a). Como o PDGF é dependente da presença de outros fatores de crescimento e tem por ação a quimiotaxia de fibroblastos, macrófagos e outros leucócitos (CARUANA et al., 2019), isso pode ter influenciado na sua menor expressão comparado ao VEGF no atual estudo. Em um estudo avaliando três concentrados de plaqueta humanos (PRP, PRF, e PRF avançado) foi observado que a maior liberação, quantificada pelo método de ELISA, ocorreu com o PDGF-AA, seguido pelo TGF-beta1, PDGF-BB, PDGF-AB, VEGF, EGF e IGF (KOBAYASHI et al., 2016). Desde que PDGF tem meia-vida curta, a matriz de PRF se mantém como suporte para o seu liberar vagaroso e gradual (FUJIOKA-KOBAYASHI e MIRON, 2017). Desta forma, faz-se necessário outros estudos que avaliem a liberação dos fatores do crescimento na L-PRF de felinos de acordo com o tempo.

## **Conclusões**

Foi possível concluir que a metodologia empregada permitiu isolar e caracterizar a composição da membrana de L-PRF em gatos Maine Coon, que apresenta tipos celulares e arquitetura de rede de fibrina similares ao descrito para a espécie humana.

## Referências

- 1 Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, et al. **Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery.** *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 1231-156.
- 2 Arnoczky SP, Sheibani-Rad S. **The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know.** *Sports Med Arthrosc Rev* 2013; 21: 180-185
- 3 Alizade FL, Kazemi M, Irani S, et al. **Biologic characteristics of platelet rich plasma and platelet rich fibrin: A review.** *Int J Contemp Dent Med Rev* 2016; 1-4.
- 4 Muñoz FT, Haidar ZS. **L-PRF for use in oro-maxillo-facial surgeries: What do we know?** *J Oral Res* 2018; 7: 88-90.
- 5 Hartshorne J, Gluckman H. **A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part 1: Definition, development, biological characteristics and function.** *Int Dentistry Afr Ed* 2016a; 6: 14-24.
- 6 Ehrenfest DMD, 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: 158-167.
- 7 Ehrenfest DMD, Sammartino G, Shibli JA, et al. **Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Pure Platelet-Rich Plasma PRP, or platelet-rich fibrin L-PRF): The international classification of the POSEIDO.** *POSEIDO* 2013; 1: 17-27.
- 8 Madurantakam P, Yoganarasimha S, Hasan FK. **Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, a novel biomaterial.** *J Vis Exp* 2015; 29: 1-8.
- 9 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: 927-930.
- 10 Hartshorne J, Gluckman H. **A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part II: Preparation, optimization, handling and application, benefits and limitations of PRF.** *Int Dentistry Afr Ed* 2016b; 6: 34-48.
- 11 Zumarán CC, Parra MV, Olate SA, et al. **The 3 R's for platelet-rich fibrin: a "super" tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided oro-**

- maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration.** *Materials (Basel)* 2018 26; 11: pii: E1293.
- 12 Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, et al. **A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use.** *Biologicals* 2012; 40: 323-329.
  - 13 Upadhayaya V, Arora A, Goyal A. **Bioactive platelet aggregates: Prp, Prgf, Prf, Cgf and Sticky bone.** *IOSR J Dent Med Sci* 2017; 16: 5-11.
  - 14 Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. **Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101: e37-44.
  - 15 Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, et al. **Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration *in vitro*.** *Clin Orthop Relat Res* 2015; 473: 1635-1643.
  - 16 Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, 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. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and Scanning Electron Microscopy analysis of 4 kinds of L-PRF clots and membranes.** *POSEIDO J* 2014; 2: 141-154.
  - 17 Ehrenfest DMD, 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* 2018; 29: 171-184.
  - 18 Montavon PM, Voss K, Langley-Hobbs SJ. *Feline orthopedic surgery and musculoskeletal disease.* China: Saunders Elsevier, 2009.
  - 19 Langley-Hobbs SJ, Demetriou JL, Ladlow JF. *Feline soft tissue and general surgery.* China: Saunders Elsevier, 2014
  - 20 Soares CS, Barros LC, Saraiva V, et al. **Bioengineered surgical repair of a chronic oronasal fistula in a cat using autologous platelet-rich fibrin and bone marrow with a tailored 3D printed implant.** *J Feline Med Surg* 2018; 20: 835-843.
  - 21 Dos Anjos DS, Vital AF, Lainetti PF, Leis-Filho AF, Dalmolin F, Elias F, Calazans SG, Fonseca-Alves CE. **Deregulation of VEGFR-2 and PDGFR Expression and Microvascular Density in a Triple-Negative Model of Canine Malignant**

- Mammary Tumors With Lymph Node or Lung Metastasis.** *Veterinary Sciences* 2019; 6: 3.
- 22 Oliveira LA, Pontual MAB, Barros ER, et al. **Do L-PRF ao Stick Bone – opções terapêuticas na Implantodontia usando concentrados plaquetários.** *ImplantNewsPerio Internat J* 2017; 10: 1-20.
- 23 Ehrenfest DMD, Del Corso M, Diss A, et al. **Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane.** *J Periodontol* 2010; 81: 546-555.
- 24 Sam G, Vadakkekuttical RJ, Amol NV. **In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics.** *J Indian Soc Periodontol* 2015; 19: 32-36.
- 25 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.** *Biol Med* 2015; 7: 2-11
- 26 Caruana A, Savina D, Macedo JP, et al. **From platelet-rich plasma to advanced platelet-rich fibrin: biological achievements and clinical advances in modern surgery.** *Eur J Dent* 2019; 13: 280-286.
- 27 Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ. **Biological components of platelet rich fibrin: growth factor release and cellular activity.** In: Miron RJ, Choukroun J (ed). *Platelet rich fibrin in regenerative dentistry: biological background and clinical indications.* New Jersey: JohnWiley & Sons, 2017, pp 15-31.
- 28 Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. **Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF.** *Clin Oral Investig* 2016; 20: 2353-2360.

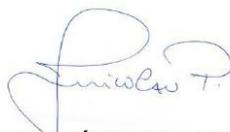
**ANEXOS**

## ATESTADO

**Atesto** que o Projeto "Preparo e caracterização de membrana de fibrina rica em plaqueta e leucócitos com sangue de gatos da raça MAINE COON" **Protocolo CEUA 0184/2018**, a ser conduzido por Maíra Sales Castilho, responsável/orientador Sheila Canevese Rahal, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

<b>Finalidade</b>	PESQUISA CIENTÍFICA
<b>Vigência do projeto</b>	03/09/2018 a 30/09/2019
<b>Nome Comum / Espécie / Linhagem</b>	FELINA / FELIS CATUS /
<b>Raça</b>	Maine Coon
<b>Nº de animais machos</b>	10
<b>Nº de animais fêmeas</b>	10
<b>Nº de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Peso médio de animais machos</b>	0
<b>Peso médio de animais fêmeas</b>	0
<b>Peso médio de animais sexo indefinido</b>	4kg
<b>Idade</b>	0 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
<b>Procedência</b>	Animais de proprietários

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 15/08/2018**



**JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO**  
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

08/01/2020

Gmail - Journal of Feline Medicine and Surgery JFMS-20-0003



Maira S.C &lt;maira165@gmail.com&gt;

---

**Journal of Feline Medicine and Surgery JFMS-20-0003**

---

**Journal of Feline Medicine and Surgery** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

8 de janeiro de 2020 20:36

Responder a: [jfms@sagepub.com](mailto:jfms@sagepub.com)Para: [maira165@gmail.com](mailto:maira165@gmail.com), [sheilaocr@fmvz.unesp.br](mailto:sheilaocr@fmvz.unesp.br), [rdiaspa@gmail.com](mailto:rdiaspa@gmail.com), [acimplantes@bol.com.br](mailto:acimplantes@bol.com.br), [camila.contin@unesp.br](mailto:camila.contin@unesp.br), [carinabars@uol.com.br](mailto:carinabars@uol.com.br), [carlos.e.alves@unesp.br](mailto:carlos.e.alves@unesp.br), [patylainetti@hotmail.com](mailto:patylainetti@hotmail.com)

08-Jan-2020

Dear Miss Castilho:

Your manuscript entitled "Preparation and characterization of leukocyte- and platelet-rich fibrin membrane with blood from Maine Coon cats" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Feline Medicine and Surgery.

Your manuscript ID is JFMS-20-0003.

You have listed the following individuals as authors of this manuscript:

Castilho, Maira; Rahal, Sheila; Dias Neto, Ramiro; Pereira, Ana; Francia, Camila; Antunes, Carina; Fonseca-Alves, Carlos Eduardo; Lainetti, Patrícia

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jfms> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jfms>.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID (<https://orcid.org/>). We encourage all authors and co-authors to use ORCID iDs during the peer review process. If you have not already logged in to your account on this journal's ScholarOne Manuscripts submission site in order to update your account information and provide your ORCID identifier, we recommend that you do so at this time by logging in and editing your account information. In the event that your manuscript is accepted, only ORCID iDs validated within your account prior to acceptance will be considered for publication alongside your name in the published paper as we cannot add ORCID iDs during the Production steps. If you do not already have an ORCID iD you may login to your ScholarOne account to create your unique identifier and automatically add it to your profile.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Feline Medicine and Surgery.

Sincerely,

Aman Kukreti

Journal of Feline Medicine and Surgery

[jfms@sagepub.com](mailto:jfms@sagepub.com)