

Natália Cristine Dias dos Santos

**GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E ASSOCIAÇÃO DE
GEL DE PRP COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO
ADIPOSO HUMANO: análise físico-química, morfológica e de
viabilidade celular**

ASSIS

2017

NATÁLIA CRISTINE DIAS DOS SANTOS

**GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E ASSOCIAÇÃO DE GEL
DE PRP COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO
ADIPOSO HUMANO: análise físico-química, morfológica e de
viabilidade celular**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

Bolsista: CAPES/DS

ASSIS
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

S237g Santos, Natália Cristine Dias dos
Gel de plasma rico em plaquetas (PRP) e associação de gel de PRP com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano: análise físico-química, morfológica e de viabilidade celular / Natália Cristine Dias dos Santos. Assis, 2017.
98 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

1. Engenharia tecidual. 2. Plasma rico em plaquetas PRP).
3. Células-tronco. 4. Tecido adiposo. I. Título.

CDD 574.87

Aos meus pais, Valdecir dos Santos e Fleide Regina Dias dos Santos (in memoriam), e à minha mãe de coração, Márcia Pristina dos Santos Esgalha, pelo exemplo de vida, caráter e coragem que são para mim.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, à Faculdade de Ciências e Letras do Campus de Assis, ao Departamento de Biotecnologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências pela oportunidade concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

Aos membros titulares e suplentes da comissão examinadora pela colaboração e contribuição para a melhoria da redação final.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes pela oportunidade, orientação e confiança depositada em mim durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki pela disponibilidade e pelos esclarecimentos de várias dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marcela Stefanini Ferreira Tsuboy pela amizade, atenção e ajuda que disponibilizou a mim.

Ao Hospital de Cirurgia Plástica Fontana Della Gioventú pela colaboração e doação do material biológico.

Aos doadores voluntários que se disponibilizaram a colaborar com este trabalho, sendo imprescindíveis para que o mesmo pudesse ser desenvolvido.

À equipe do Laboratório GenteCel pela convivência, apoio e amizade durante todos esses anos. E, especialmente, ao Leandro, pela ajuda, ensinamentos e ricas discussões sobre o tema, e a Laís, Leticia e Rafael, por todo auxílio e carinho que sempre tiveram comigo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências e Letras e do Programa de Pós-graduação em Biociências que, direta ou indiretamente,

contribuíram com a minha formação.

E ao José Gilberto Milani e ao Allan Chiea de Souza pela amizade, atenção e suporte técnico oferecido.

Aos meus queridos amigos que estiveram ao meu lado durante todo esse tempo. Obrigada pelas experiências, pela paciência, pelos sorrisos e abraços e por todas as vezes que não hesitaram em me ajudar.

À minha família que sempre me apoiou e torceu pelas minhas conquistas, não me deixando desanimar nos momentos difíceis e ajudando-me a vencer os obstáculos. Obrigada por todo amor incondicional e suporte oferecido.

"Não há progresso sem esforço, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício e tranquilidade sem paciência."

(Chico Xavier)

SANTOS, Natália Cristine Dias dos. **Gel de plasma rico em plaquetas (PRP) e associação de gel de PRP com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano: caracterização físico-química, morfológica e de análise de viabilidade celular.** 2017. 98.f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Assis, 2017.

RESUMO

Vários estudos têm apontado que a interação de plasma rico em plaquetas (PRP) com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano (CT-TAs) é capaz de otimizar o processo regenerativo, estimulando a angiogênese e o recrutamento de células para o local da lesão. O avanço no conhecimento sobre os aspectos físico-químicos do gel de PRP, bem como na interação e no comportamento das CT-TAs quando associadas ao gel poderão resultar em aplicações práticas em processos de regeneração tecidual. Em função disso, objetivou-se analisar diferentes parâmetros relativos a aspectos morfológicos, físico-químicos e estrutural do gel de PRP isolado ou em associação com CT-TAs (PRP/CT-TAs). As análises dos géis foram realizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Também foi avaliada a viabilidade e migração das CT-TAs após associação ao gel de PRP. Os resultados mostraram que as CT-TAs continuam viáveis, mantendo suas propriedades, assim como o gel de PRP, após a associação. Não foram observadas alterações estruturais nos géis de PRP isolado e PRP/CT-TAs, preservando os perfis físico-químicos das amostras. Concomitantemente com estes resultados, observou-se que o gel de PRP pode proporcionar um ambiente favorável às células, permitindo proliferação e migração celular. Os resultados obtidos permitem concluir que o gel de PRP pode ser usado como um potencial *scaffold*, mantendo as células viáveis quando encapsuladas, preservando os aspectos físico-químicos das CT-TAs e do PRP quando em associação. Além disso, pode-se propor que gel de PRP exerce efeitos positivos sob as CT-TAs, estimulando a proliferação e a viabilidade celular.

Palavras-chave: Engenharia tecidual, plasma rico em plaquetas (PRP), células-tronco, tecido adiposo.

SANTOS, Natália Cristine Dias dos. **Platelet-rich plasma gel (PRP) and PRP-gel association with human adipose-derived mesenchymal stem cells: physico-chemical, morphological and cell viability analysis**. 2017. 98.f. Dissertation (Master in Biosciences). - São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2017.

ABSTRACT

Several studies have shown that the platelet-rich plasma (PRP) in association with human adipose-derived mesenchymal stem cells (h-AdMSCs) is able to optimize the regenerative process, stimulating angiogenesis and the recruitment of cells to the lesion site. Advancing in the knowledge of the physico-chemical aspects of PRP-gels, as well as in the interaction and behavior of h-AdMSCs when associated to the gel will result in practical applications in tissue regeneration processes. Therefore, the aim of this study was to evaluate different morphological, physic-chemical and structural parameters of the isolated PRP-gel or in association with h-AdMSCs (PRP/h-AdMSCs). The PRP-gels were submitted to scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy technique (FTIR). The h-AdMSCs viability and migration after association with the PRP-gel were also evaluated. The results showed that as h-AdMSCs remain viable, retaining their properties, as the PRP gel, after association. There were no structural changes in the PRP gels isolated and PRP/h-AdMSCs, so maintaining the physical-chemical profiles of the samples. Additionally to these results, it was observed that the PRP-gel can provide a favorable environment for cells, allowing its proliferation and migration. In summary, it is possible to conclude that PRP-gel can be used as a potential scaffold, maintaining cell viability when encapsulated and preserving the physical-chemical aspects of h-AdMSCs and PRP when in association. In addition, it may be proposed that PRP gel exert chemotatic effects for h-AdMSCs, stimulating cell proliferation and viability.

Keywords: Tissue engineering, platelet-rich plasma (PRP), stem cells, adipose tissue.

Sumário

INTRODUÇÃO	11
1.1 Medicina Regenerativa.....	11
1.2 Plaquetas.....	14
1.3 Plasma rico em plaquetas (PRP)	17
1.4 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	21
OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
CAPÍTULO ÚNICO	26
Introdução	29
Métodos	33
<i>Padronização metodológica para obtenção do PRP</i>	<i>33</i>
<i>Obtenção e formação do gel PRP.....</i>	<i>33</i>
<i>Obtenção, isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo.....</i>	<i>34</i>
<i>Análise de proliferação celular</i>	<i>35</i>
<i>Caracterização das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano</i>	<i>36</i>
<i>Análises físico-química e morfológica do gel de PRP e da associação do gel de PRP com CT-TAs</i>	<i>37</i>
<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier</i>	<i>37</i>
<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	<i>38</i>
<i>Análise de citotoxicidade das CT-TAs durante a associação ao gel de PRP.....</i>	<i>39</i>
<i>Análise de proliferação e viabilidade das CT-TAs após associação ao gel de PRP</i>	<i>40</i>
<i>Análise Estatística</i>	<i>41</i>
<i>Aspectos éticos</i>	<i>41</i>
Resultados	42
Discussão.....	48
Agradecimentos	56
Declaração de interesse	56
Referências	57
Tabelas e figuras	69
CONCLUSÃO GERAL.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO	89

INTRODUÇÃO

1.1 Medicina Regenerativa

A convergência de diversas áreas e especialidades do conhecimento, como engenharia de materiais, engenharia tecidual, biologia molecular e terapia celular, resultou em um novo campo do saber denominado: medicina regenerativa. A medicina regenerativa representa, portanto, um campo multidisciplinar de pesquisa e terapia clínica com grande potencial de aplicabilidade terapêutica em medicina humana e veterinária, seja para substituição ou para regeneração de tecidos e órgãos lesados em diferentes tipos de patologias agudas ou crônicas (Mason & Dunnill, 2008; Schallmoser et al., 2009).

A medicina regenerativa abrange, como assinalado anteriormente, uma ampla gama de abordagens terapêuticas, dentre as quais destaca-se, no contexto deste estudo, a terapia celular, que tem como um dos seus principais focos a aplicação de células humanas para a reparação de tecidos ou órgãos que sofreram disfunções causadas por lesões traumáticas ou patologias crônico-degenerativas (Mason & Dunnill, 2008).

Apesar de ser um dos principais objetivos da medicina regenerativa, a substituição de células e tecidos está entre os grandes desafios encontrados. A substituição de células e/ou tecidos ocorre a partir de uma melhora na capacidade das células endógenas em reparar o tecido danificado ou na utilização de células exógenas em substituir as células danificadas (Sánchez et al., 2012). Muitos materiais, sintéticos ou biológicos, são utilizados a fim reparar tecidos e restaurar funções comprometidas, denominados biomateriais. Os biomateriais entram em contato com os sistemas biológicos

para a recuperação funcional de tecidos e órgãos lesados (Francisco, 2013).

As abordagens metodológicas são diversas dentro da medicina regenerativa, uma vez que combinam várias ferramentas e áreas voltadas para um objetivo comum: a substituição e/ou regeneração de células e tecidos danificados. Dentre as ferramentas biotecnológicas estão terapia gênica, terapia celular, o uso de biomateriais e células, que, em conjunto, potencializam o processo de recuperação tecidual (Greenwood et al., 2006).

A engenharia tecidual, inserida como uma das áreas no contexto mais amplo da medicina regenerativa, representa a utilização de biomateriais, células e fatores de crescimento para a regeneração e/ou reparo de tecidos vivos (Oliveira et al., 2010). O avanço no conhecimento quanto à segurança e eficácia terapêutica resultantes da interação entre células e biomateriais é fundamental para que os mesmos possam ser aplicados na engenharia tecidual (Oliveira, 2009;).

Muitos biomateriais são utilizados com o objetivo de reparar perdas e restaurar funções comprometidas do organismo, podendo ser de origem sintética ou biológica (Turrer & Ferreira, 2008). A interação do biomaterial com o organismo tem sido um desafio para a medicina regenerativa, uma vez que se torna necessário o conhecimento da resposta do organismo frente à presença do material. Um biomaterial ideal tem como um dos requisitos básicos causar reações mínimas no organismo do hospedeiro ao substituir o tecido danificado, além de fornecer suporte mecânico. Portanto, para utilização clínica, espera-se que os biomateriais sejam biodegradáveis, hipoalérgicos, que tenham baixa toxicidade e alta capacidade de absorção e/ou incorporação pelo organismo (Francisco, 2013; Pires et al., 2015).

A associação de biomateriais, fatores de crescimento e células é capaz de promover a regeneração e/ou restabelecer a função normal de órgãos e tecidos (Gimble et al., 2007; Schallmeser et al., 2009). Os biomateriais, no contexto da medicina regenerativa, podem atuar como um sistema de liberação de biomoléculas por através de estímulos presentes no meio, como, por exemplo, alteração na temperatura, força iônica e no pH (Oliveira et al., 2010).

Os fatores de crescimento (FC), por sua vez, representam uma ferramenta importante nos processos de reparo tecidual. Os FC são moléculas biologicamente ativas, relacionadas ao grupo das citocinas e têm como função estabelecer a comunicação entre as células, assim como estimulação da proliferação, migração, diferenciação e a apoptose celular, funções importantes para a manutenção da homeostase e sobrevivência do organismo (Fernández-Delgado et al., 2012; Centeno, 2013; Picard et al., 2015).

Os FC atuam por meio da ligação direta a receptores localizados sobre a membrana celular. Os receptores propagam os sinais do meio externo para o interno, por meio da ativação de uma cascata de sinais, ocasionando a ativação de genes, processo conhecido como transdução de sinal (Pinto & Pizani, 2015).

As plaquetas contêm uma grande quantidade de fatores de crescimento que são liberados a partir dos grânulos plaquetários após a ativação. Resultados satisfatórios utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) em diferentes campos têm destacado as plaquetas como uma opção terapêutica potencialmente promissora em diferentes áreas da medicina, assim como, no

tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização (Fernández-Delgado et al., 2012; Stessuk, 2016).

1.2 Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares discoides, anucleadas, derivadas da fragmentação de células provenientes da medula óssea denominada megacariócitos, com diâmetro de 100 μ m (Everts et al., 2006; Monteiro, 2013; Marques et al., 2015).

As plaquetas possuem um anel de microtúbulos contráteis periféricos, que contém actina e miosina, compondo o citoesqueleto (Everts et al., 2006). A região periférica é formada por um sistema de membrana externa e interna. A camada externa contém receptores que intermediam as reações de adesão-ativação das plaquetas. As membranas externas e internas formam as paredes dos canais que atuam na conexão da superfície com o sistema canicular aberto, responsável pela liberação do conteúdo granular ao atingir a membrana plaquetária (Perez, 2013).

A matriz citoplasmática plaquetária é composta por elementos do sistema contrátil, responsável pela mudança morfológica, formação de pseudópodes, contração interna e secreção. O citoplasma é composto por corpos elétrons-densos, peroxissomos, lisossomos, glicossomos, mitocôndrias e grânulos (Perez, 2013). O conteúdo granular plaquetário, formado por grânulos alfa e grânulos densos, desempenham funções biológicas de forma autócrina e parácrina, como a quimiotaxia, proliferação, diferenciação celular e angiogênese, conferindo às plaquetas papéis importantes na regulação e estimulação dos processos regenerativos teciduais (Sanchez et al., 2003; Castro et al., 2006; Marques et al., 2015; Conceição et al., 2017).

Os grânulos alfa contêm fatores de crescimentos, fator de von Willebrand (FvW), proteínas adesivas, entre outras proteínas. Enquanto os grânulos densos apresentam trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina e cálcio (Castro et al., 2006; Everts et al., 2006).

Em condições normais, as plaquetas circulam pela corrente sanguínea, sem aderir ao endotélio. A contagem média de plaquetas no sangue circulante é de 150 a 400 x 10³ plaquetas/mm³ e sua meia-vida é de sete a dez dias (Perez, 2013). Na presença de danos teciduais, as plaquetas são o primeiro tipo celular a ser recrutado para o local da lesão, entrando em contato com proteínas de matriz, fator de von Willebrand e colágeno. Subsequentemente, as estruturas são alteradas, tornando-se ativas. Este estágio de ativação das plaquetas permite que se agreguem à parede do vaso sanguíneo para dar início à cascata de coagulação. Fatores de crescimento, citocinas e outros fatores homeostáticos são liberados, resultando na formação de um coágulo rico em plaquetas, formando o tampão hemostático para dar início ao processo de reparo da lesão endotelial (Balbino et al., 2005; Everts et al., 2006; Dhillon et al., 2012; Marques et al., 2015; Perez, 2013).

O processo inflamatório inicia-se após o estágio de agregação e degranulação das plaquetas. A liberação de fatores bioativos, histamina e serotonina, aumenta a permeabilidade capilar atraindo células do sistema imune, como leucócitos, macrófagos e neutrófilos, para o local da lesão. As células inflamatórias irão agir fagocitando o material resultante da lise celular (Marques et al., 2015). Ao término desta fase do processo de reparo, o número de células anti-inflamatórias é reduzido e os fibroblastos começam a sintetizar colágeno, elastina e outros componentes da matriz, iniciando a

cicatrização (Sánchez et al., 2012; Marques et al., 2015).

O novo tecido é formado no período de 2 a 10 dias após a lesão e novos vasos sanguíneos são formados por um processo conhecido como neoangiogênese, importante por conduzir oxigênio e nutrientes necessários ao local da lesão. A fase proliferativa, que se segue, é caracterizada pela intensa atividade dos fibroblastos, sob a ação de citocinas, que resulta na formação e deposição de matriz extracelular, constituída, principalmente, por mucopolissacarídeos, colágeno e elastina. A formação de tecido de granulação, constituído por capilares, fibroblastos, macrófagos, colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, ocorre nesta fase. A secreção de altas concentrações de fatores de crescimento e citocinas é inicialmente efetuada por plaquetas e leucócitos e, posteriormente, amplificadas por macrófagos, induzindo o aumento do número de células específicas, a migração de fibroblastos e a estimulação da angiogênese e fibroplasia (síntese de colágeno). Os fatores de crescimento, como TGF-1, PDGF, bFGF e IGF-I, influenciam diretamente o processo de reparo tecidual (Singer & Clark, 1999; Bhanot & Alex, 2002; Sánchez et al., 2012; Stessuk, 2016).

O processo cicatricial é influenciado por fatores locais, tais como viabilidade do tecido, hematoma, infecção, fornecimento insuficiente de sangue, bem como por fatores sistêmicos e/ou mecânicos. O aporte sanguíneo inadequado influencia diretamente na nutrição e oxigenação do tecido, ocasionando isquemia tecidual, e no aumento do risco de infecção (Sánchez et al., 2012).

Considerando a complexidade atribuída aos processos envolvidos no reparo tecidual, a compreensão e aplicação de compostos multimoleculares

surge como alternativa potencialmente promissora no contexto da medicina regenerativa, uma vez que as plaquetas constituem uma fonte natural de fatores de crescimento e citocinas, moléculas críticas para o reparo tecidual.

1.3 Plasma rico em plaquetas (PRP)

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido intensamente estudado, sobretudo nas duas últimas décadas, destacando-se como uma fonte de biomoléculas com importantes papéis em processos de diferenciação e regeneração de tecidos (Marques et al., 2015).

O emprego do PRP tem sido apontado como uma técnica segura, não-cirúrgica e não invasiva, fornecendo bons resultados em tratamento de lesões e úlceras cutâneas (Stessuk, 2016). O uso do PRP baseia-se na propriedade de liberação plaquetária de fatores de crescimento e citocinas que aceleram a reparação de danos e lesões teciduais. Atualmente, o PRP destaca-se como uma alternativa terapêutica promissora em medicina regenerativa. A biossegurança e versatilidade de preparações PRP, assim como os potenciais terapêuticos das plaquetas e do plasma têm estimulado diferentes laboratórios e grupos de pesquisadores à compreensão dos mecanismos de ação celulares e moleculares promovidos pelo PRP (Sánchez et al., 2012).

Frações enriquecidas de plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial na medicina e terapia clínica, maximizando o processo de cicatrização de feridas, assim como, estimulando a hemostasia e vascularização. Estes efeitos têm, portanto, resultado na diminuição de possíveis complicações relacionadas à lesão (Vendramin et al., 2006; Marques et al., 2015; Kontopodis et al., 2015; Stessuk, 2016).

O PRP é definido como uma pequena fração de plasma do sangue, com uma concentração de plaquetas superior ao nível basal (Marx et al., 1998; Marques et al., 2015). A obtenção ocorre a partir de “kits” comerciais, ou mesmo por meio de diferentes protocolos, os quais diferem em número, tempo e velocidade de centrifugação. Os protocolos de obtenção de PRP utilizam, de modo geral, uma a duas centrifugações para a separação do plasma e hemácias do sangue não-coagulado. As células vermelhas (hemácias ou eritrócitos), por terem um peso maior, depositam-se na parte inferior do tubo, e o plasma com as plaquetas permanece suspenso. Entre ambas as camadas, há uma camada fina e esbranquiçada, denominada zona de névoa ou “*buffy coat*”, que contém leucócitos e plaquetas maiores. A camada plasmática pode ser subdividida em três frações, de acordo com a concentração de plaquetas presentes: a fração pobre em plaquetas, fração intermediária e a fração rica em plaquetas (Figura 1). O PRP é originado, portanto, a partir desta última fração (Montero et al., 2015; Marques et al., 2015).

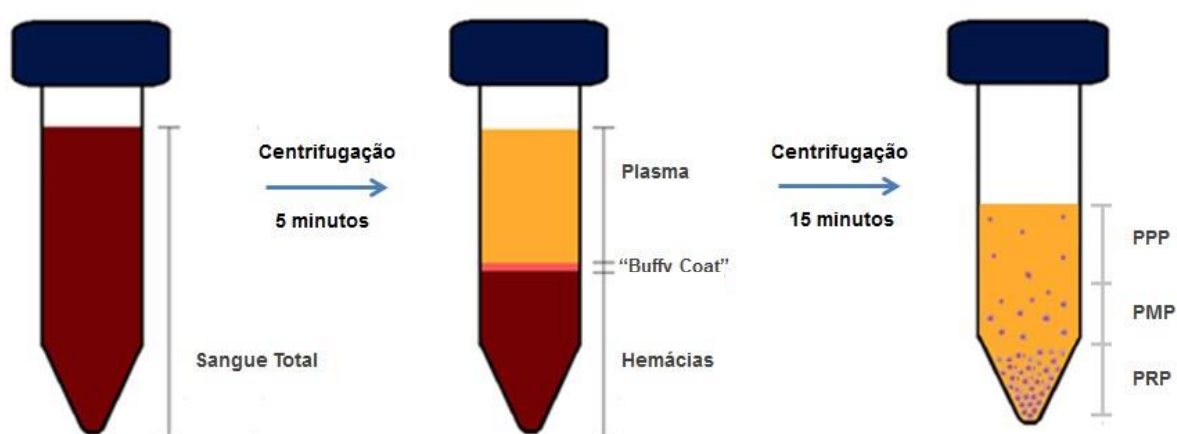


Figura 1. Processamento da unidade de sangue total para obtenção da fração plasmática. O conteúdo final é dividido em três frações, de acordo com a concentração de plaquetas presentes: a fração pobre em plaquetas (PPP), fração intermediária (PMP) e a fração rica em plaquetas (PRP).

A concentração de plaquetas confere ao PRP um papel importante na regeneração tecidual. As moléculas bioativas liberadas pelas plaquetas são responsáveis por regular uma série de eventos celulares, assim como ativar a sinalização das cascatas que implicam na cicatrização dos tecidos lesados. Dentre as moléculas bioativas, destacam-se os fatores de crescimento: fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF). Estes fatores são responsáveis pela migração, proliferação, diferenciação celular e angiogênese, justificando, portanto, a importância do uso terapêutico do PRP na medicina regenerativa (Bhanot & Alex, 2002; Marques et al., 2015; Montero et al., 2015; Pinto & Pizani, 2015)

A aplicação do PRP na medicina regenerativa foi inicialmente realizada na década de 80, decorrente dos avanços do conhecimento sobre as moléculas bioativas presentes e liberadas pelas plaquetas, bem como os avanços acerca dos mecanismos de ação e efeitos regenerativos em tecidos lesados (Knighton et al., 1986). Em 1987, Ferrari et al. realizaram o primeiro estudo clínico descrito na literatura, relatando o uso de PRP autólogo como um elemento adjuvante benéfico na transfusão em cirurgias cardíacas (Ferrari et al., 1987). Contudo, a ampla utilização do PRP em diferentes procedimentos cirúrgicos, como cirurgias maxilofaciais, ortopédicas e odontológicas, iniciou-se somente na década de 90 (Anitua, 1999).

Marx et al., em 1998, mostraram que o plasma concentrado em plaquetas constitui uma fonte de fatores autólogos de crescimento,

possibilitando o aumento na formação de ossos em 44 pacientes que receberam enxertos ósseos autólogos (Marx et al., 1998). Em 1999, Anitua realizou a descrição de um método clínico de obtenção de PRP para aplicação em implantes, estimulando o desenvolvimento de diversas técnicas e aplicações (Anitua, 1999).

Desde o trabalho pioneiro de Ferrari et al. (1987) houve grande avanço nos aspectos metodológicos do PRP e, paralelamente, multiplicaram-se os trabalhos relativos às aplicações clínicas do PRP na medicina humana, veterinária e odontologia, destacando-se resultados expressivos em lesões de cartilagens, ossos, tendões e músculos, bem como cirurgias plásticas e reconstrutivas (Marques et al., 2015).

Os resultados obtidos nas ultimas três décadas apontam, no entanto, para a necessidade de mais investigações quanto à análise e propriedades biológicas do PRP, uma vez que ainda não são completamente conhecidos os fatores plaquetários liberados no processo e seus mecanismos de ação. Além desses aspectos, diferentes laboratórios têm reportado variações nas propriedades bioquímicas e físico-químicas do PRP. Dessa forma, há necessidade de se estabelecer parâmetros metodológicos para otimização e uniformidade de resultados quanto à obtenção do PRP. A padronização metodológica deverá implicar também em avanços significativos na eficácia e reprodutibilidade de resultados clínicos, assim como, a curto e médio prazo, na incorporação do PRP como uma prática clínica rotineira em medicina humana e veterinária.

1.4 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As células estromais mesenquimais multipotentes ou células-tronco mesenquimais (CTM) têm sido consideradas como uma alternativa terapêutica potencialmente promissora. As CTM constituem uma subpopulação de células estromais multipotentes, com formato alongado fibroblastóide, com capacidade de diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (Amorin et al., 2012; Shi et al., 2012).

Segundo a proposição da Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* – ISCT), há três critérios mínimos para definir uma célula-tronco mesenquimal multipotente: 1) aderência à superfície plástica; 2) presença ($\geq 95\%$) de marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência ($\leq 2\%$) dos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II e 3) potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condócitos sob determinadas condições *in vitro* (Dominici et al., 2006).

O interesse nas CTM está, sobretudo, vinculado à facilidade de obtenção e proliferação *in vitro*, além do potencial de diferenciação, possibilidade de enxerto e nos efeitos imunossupressores (Bydlowski et al., 2009). Além disso, as CTM apresentam baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade leucocitário humano (HLA) tipo I e não expressam HLA-tipo II (Shi et al., 2011), possibilitando transplantes alogênicos.

As CTM podem ser isoladas a partir de várias fontes de tecidos, como medula óssea, cordão umbilical, polpa dentária, placenta, músculo, tecido adiposo, pele, líquido amniótico (Amorin et al., 2012; Baer & Geiger, 2012; Al-

Nbaheen et al., 2013; Kim et al., 2014; Liu et al., 2015; Du et al., 2016). Embora a medula óssea (MO) e o tecido adiposo (TA) tenham sido as mais amplas fontes de células-tronco mesenquimais (CTM), o sucesso de isolamento a partir do tecido adiposo é superior ao da medula óssea, com rendimento 40 vezes maior (Zuttion et al., 2013).

A utilização de tecido adiposo para obtenção de CTM tem, portanto, aumentado consideravelmente nos últimos anos (Bourin et al., 2013; Suzuki et al. 2015; Frese, Dijkman, Hoerstrup, 2016; Kaviani & Jalilli, 2016). Uma das diversas vantagens está relacionada à abundância de tecido que pode ser extraído desta fonte a partir de cirurgias eletivas, como abdominoplastias e lipoaspiração, métodos pouco invasivos e com baixo índice de morbimortalidade (Bourin et al., 2013; Frese, Dijkman, Hoerstrup, 2016).

Outra vantagem relacionada ao uso de CTM do tecido adiposo é a capacidade imunomodulatória. Tem sido proposto que o mecanismo de ação das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CT-TAs) na regeneração tecidual seja decorrente da liberação de citocinas e fatores de crescimento que apresentam propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e que estimulam a angiogênese (Uccelli et al., 2008; Silva-Meirelles et al., 2009; Mizuno et al., 2012).

A associação das CT-TAs com biomateriais pode otimizar o processo regenerativo. Vários estudos têm apontado que a interação de CT-TAs com PRP aumenta o potencial regenerativo, estimulando a angiogênese e o recrutamento de células para o local da lesão. A reepitelização é, portanto, atribuída às características imunomodulatórias e plasticidade das CT-TAs, e a liberação de fatores de crescimento do PRP (Blanton et al., 2009; Argôlo Neto

et al., 2012; Zhu et al., 2013; Pinto & Pazini, 2015; Stessuk, 2016).

Estudos recentes mostraram resultados promissores no reparo de úlceras cutâneas após tratamento com a associação de CT-TAs e gel de PRP (Stessuk, 2016). No entanto, há poucos relatos na literatura acerca da interação das CT-TAs em gel de PRP, assim como das propriedades físico-químicas deste gel associado ou não a células. Outro aspecto pouco estudado refere-se à análise da viabilidade da CT-TAs após a interação com o gel de PRP.

Está bem estabelecido que o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) apresenta alta concentração de fatores de crescimento e diferenciação, que podem ser liberados após ativação plaquetária por diferentes processos e agentes químicos (Marques et al., 2015). Está, também, bem estabelecido que as células-tronco do tecido adiposo (CT-TAs) podem liberar uma série de citocinas e fatores de crescimento (Silva-Meireles et al., 2009). Pode-se, por conseguinte, supor que a associação de CT-TAs com PRP na forma de gel pode resultar em um efeito aditivo ou mesmo sinérgico dos processos regenerativos teciduais, mediados por citocinas e fatores de crescimento liberados pela ativação plaquetária e pelas CT-TAs inseridas no gel de PRP.

Partindo-se desse pressuposto, seria, portanto, importante avançar no conhecimento sobre os aspectos físico-químicos e morfológicos do gel de PRP, bem como na interação e no comportamento das CT-TAs quando associadas ao PRP na forma de gel. O avanço no conhecimento destes aspectos pode resultar em aplicações práticas em processos de regeneração tecidual, particularmente em lesões cutâneas de difícil cicatrização.

Em função desses aspectos, analisamos diferentes parâmetros relativos a aspectos morfológicos e moleculares do gel de PRP isoladamente ou em associação com CT-TAs, empregando diferentes metodologias de análise, tais como, técnicas de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Ainda, foi avaliado a possibilidade de recuperação e viabilidade das CT-TAs de pacientes humanos após associação ao gel de PRP.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar as propriedades físico-químicas do gel de PRP e da associação gel de PRP com CT-TAs (PRP/CT-TAs), bem como verificar a viabilidade das células após associação ao gel de PRP.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a estrutura morfológica do gel de PRP associado ou não a células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano (CT-TAs) empregando a microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Analisar a proliferação e viabilidade das CT-TAs após associação ao gel de PRP;
- Avaliar a estrutura molecular do gel de PRP por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

CAPÍTULO ÚNICO

Gel de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e associação de Gel de PRP com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano: análise físico-química, morfológica e de viabilidade celular

Natália Cristine Dias dos Santos, João Tadeu Ribeiro-Paes

Manuscrito elaborado para submissão ao periódico *Platelets* Print ISSN: 0953-7104; Online ISSN: 1369-1635. Fator de impacto: 3.213.

Gel de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e associação de Gel de PRP com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano: análise físico-química, morfológica e de viabilidade celular

Natália Cristine Dias dos Santos¹, João Tadeu Ribeiro-Paes^{1*}

¹*Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Biotecnologia. Assis, São Paulo, Brasil.*

*Endereço para correspondência: João Tadeu Ribeiro-Paes

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências e Letras,
Departamento de Biotecnologia. 19806-900, Assis, SP, Brasil.

Tel.: +55 18-3302 5736

Email: jtrpaes@yahoo.com.br

Resumo

O plasma rico em plaquetas (PRP) destaca-se como uma fonte de biomoléculas com importante papel no processo de regeneração tecidual. Quando em associação a células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (CT-TAs), o PRP pode atuar como um arcabouço, aumentando a adesão e proliferação celular, além de estimular a angiogênese e o recrutamento de células para o local da lesão. O objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos físico-químicos e morfológicos do gel de PRP, bem como a interação e o comportamento das CT-TAs quando associadas ao gel de PRP. As análises foram realizadas por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Também foi avaliada a viabilidade e proliferação das CT-TAs após associação ao gel de PRP. Os resultados mostraram que o gel de PRP mantém suas propriedades físico-químicas e morfológicas, assim como as células após a associação ao gel de PRP, permanecendo viáveis. Adicionalmente a estes resultados, observou-se que o gel de PRP pode proporcionar um ambiente favorável às células, permitindo migração e proliferação celular. Neste contexto, é possível concluir que o gel de PRP pode ser usado como um potencial arcabouço, mantendo as células viáveis quando encapsuladas, preservando os aspectos físico-químicos das CT-TAs e do PRP quando em associação. Os resultados também permitem propor que gel de PRP pode exercer efeitos positivos sob as CT-TAs, estimulando a proliferação e a viabilidade celular.

Palavras-chave: Engenharia tecidual, plasma rico em plaquetas (PRP), células-tronco mesenquimais (CTM), tecido adiposo, MEV, FTIR.

Introdução

A Medicina Regenerativa abrange uma ampla gama de abordagens terapêuticas, dentre as quais destaca-se a terapia celular, que tem como um dos seus principais focos a aplicação de células humanas para a reparação de tecidos ou órgãos que sofreram disfunções causadas por lesões traumáticas ou patologias crônico-degenerativas [1-2].

Apesar de ser um dos principais objetivos da Medicina Regenerativa, a substituição de células e tecidos está entre os grandes desafios encontrados. A substituição de células e/ou tecidos ocorre a partir de uma melhora na capacidade das células endógenas em reparar o tecido danificado ou na utilização de células exógenas em substituir as células danificadas [3]. Muitos materiais, sintéticos ou biológicos, são utilizados a fim reparar tecidos e restaurar funções comprometidas, denominados biomateriais. Os biomateriais entram em contato com os sistemas biológicos do hospedeiro para a recuperação funcional de tecidos e órgãos lesados [4].

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido bastante estudado, destacando-se como uma fonte de biomoléculas com importantes papéis em processos de diferenciação e regeneração de tecidos [5].

A concentração de plaquetas confere ao PRP um papel importante na regeneração tecidual. As moléculas bioativas liberadas pelas plaquetas são responsáveis por regular uma série de eventos celulares. Dentre as moléculas bioativas presentes no PRP destacam-se fatores de crescimento responsáveis pela proliferação, migração, diferenciação celular e angiogênese, justificando, assim, a importância do uso terapêutico do PRP na Medicina Regenerativa [5-8].

Neste contexto, o emprego de gel de PRP como biomaterial, em associação com células, tem sido uma alternativa promissora, visto que se trata de um produto autólogo, capaz de promover a regeneração e/ou o estabelecimento da função normal de órgãos e tecidos devido a ação dos fatores de crescimento plaquetários em processos regenerativos e de diferenciação celular [5, 9-11].

As células-tronco mesenquimais (CTM) têm sido consideradas como uma alternativa terapêutica potencialmente promissora. As CTM constituem uma subpopulação de células estromais multipotentes, com formato fibroblastóide alongado, e são capazes de se diferenciar em três diferentes linhagens (adipogênica, condrogênica e osteogênica) [12,13].

O interesse nas CTM está na facilidade de obtenção e proliferação *in vitro* [14]. Além disso, apresentam baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade leucocitário humano (HLA) tipo I e não expressam HLA-tipo II [15], possibilitando transplantes alogênicos.

As CTM podem ser isoladas a partir de várias fontes biológicas [12, 16-20], porém, a sua obtenção a partir do tecido adiposo tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, tornando-se a principal fonte da medicina regenerativa baseada em células [21-24]. Uma das diversas vantagens está relacionada à abundância de tecido que pode ser extraído desta fonte a partir de cirurgias eletivas, como abdominoplastias e lipoaspiração, métodos pouco invasivos e com baixo índice de morbimortalidade [21,23].

A associação das células-tronco de tecido adiposo (CT-TAs) com biomateriais pode otimizar o processo regenerativo [24]. Contudo, a interação

do biomaterial com o organismo tem sido um desafio para a Medicina Regenerativa, uma vez que torna-se necessário o conhecimento da resposta do organismo frente à presença do material.

Um biomaterial ideal tem como requisito causar reações mínimas no organismo do hospedeiro ao substituir o tecido danificado, além de fornecer suporte mecânico. Portanto, para utilização clínica, espera-se que os biomateriais sejam biodegradáveis, hipoalérgicos ou baixa toxicidade e com alta capacidade de absorção e/ou incorporação pelo organismo [3, 25].

Vários estudos têm apontado que a interação de CT-TAs com PRP aumentam o potencial regenerativo, estimulando a angiogênese e o recrutamento de células para o local da lesão. A reepitelização é, portanto, atribuída as características imunomodulatórias e plasticidade das CT-TAs, e a liberação de fatores de crescimento do PRP [8, 26-28]. Pesquisas recentes mostraram resultados promissores no reparo de úlceras cutâneas após tratamento com a associação de CT-TAs e gel de PRP [29].

Partindo desse pressuposto, torna-se necessário conhecer os aspectos físico-químicos do gel de plaquetas, bem como a interação e o comportamento das CT-TAs quando associadas ao PRP na forma de gel. Um melhor entendimento a cerca desses aspectos pode resultar em aplicações práticas em processos de regeneração tecidual, particularmente em lesões cutâneas de difícil cicatrização.

Deste modo, diferentes parâmetros relativos a aspectos morfológicos, moleculares do gel de PRP isolado ou em associação com CT-TAs foram analisados neste trabalho, empregando-se a microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

Além disso, buscou avaliar a recuperação e viabilidade das células-tronco do tecido adiposo de pacientes humanos após associação ao gel de PRP.

Métodos

Padronização metodológica para obtenção do PRP

Foram avaliados nove protocolos disponíveis na literatura científica, com diferentes forças e tempos de centrifugação, sendo todos com duas etapas de centrifugação [30-38]. Apenas três protocolos foram selecionados para serem testados, levando-se em consideração o menor tempo de centrifugação, assim como a menor força centrífuga empregada [30, 33, 34], conforme apresentado na Tabela 1. As plaquetas e os leucócitos foram determinados com o contador de células Sysmex-Roche KX-21N (Sysmex-Roch, USA).

Para a realização dos três diferentes protocolos foi utilizado o sangue total (40 mL) de doadores voluntários (n=3). O sangue coletado de cada um dos doadores foi fracionado em tubos de ensaio de vidro para a realização dos protocolos.

Obtenção e formação do gel PRP

O sangue venoso periférico foi obtido de doadores voluntários saudáveis, do sexo masculino (com idade entre 26-28 anos), a partir de venóclise do antebraço. O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio a 3,2% (4,5 mL) (BD, New Jersey, USA).

O gel de PRP foi obtido a partir de centrifugações das amostras, seguindo o protocolo proposto por Landesberg et al. (2000) [30], selecionado a partir da padronização metodológica realizada inicialmente. O protocolo de Landesberg et al. (2000) apresentou uma centrifugação inicial de 200 g, por

10 minutos, para a separação do plasma. Posteriormente, a fração de plasma sobrenadante foi coletada e transferida para tubo de ensaio de vidro. O plasma foi centrifugado, novamente, a 200 g, por 10 minutos, para a concentração plaquetária. Após a segunda centrifugação, a fração líquida equivalente a 2/3 superior do volume contida no tubo foi descartada (Figura 1), sendo o 1/3 inferior do volume definido como a fração correspondente ao PRP.

Antes da ativação, o PRP foi previamente adicionado em placa de cultura (BD, New Jersey, USA) para que os géis obtidos apresentassem dimensões padronizadas para cada análise. Subsequentemente, adicionou-se a solução de gluconato de cálcio (10%), na proporção de 100 µL para 500 µL de PRP. A placa foi acondicionada na estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 5-10 minutos até que se completasse a gelificação do PRP.

Obtenção, isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

O tecido adiposo humano foi obtido de indivíduo saudável (n=1) do sexo feminino, com 26 anos de idade, que se submeteu ao procedimento de dermolipectomia abdominal, realizado na clínica de cirurgia plástica Fontana Dela Gioventú, localizada na cidade Assis – SP, devidamente autorizada para a realização do procedimento. Anterior à coleta do material, a paciente teve ciência do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

O tecido adiposo foi mantido em solução salina tamponada – PBS (PBS, LGC Biotecnologia, BRA) suplementada com 2% de antibiótico – antimicótico (Gibco, New York, USA), em temperatura ambiente, durante um

período de 2 horas para a desinfecção. Posteriormente, o tecido foi dissociado enzimaticamente com colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) 0,075%, conforme o protocolo proposto por Zuk et al. (2001) [39], com pequenas modificações. O material obtido foi filtrado em malha de 70 µm (Cell Strainer – BD, New Jersey, USA) para separação dos restos celulares. A suspensão celular resultante foi centrifugada durante 15 minutos a 400 g e o *pellet* foi ressuspendido e uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem e determinação da viabilidade (azul de Trypan). As células foram semeadas em frascos de cultura celular (BD, New Jersey, USA) a uma concentração de 1×10^5 células/cm², em meio de cultura Alpha MEM, suplementado com 1% de antibiótico-antimicótico e 10% de SFB (Gibco, New York, USA). Posteriormente, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Análise de proliferação celular

As células foram semeadas em triplicata, a uma densidade de 1×10^2 células/poço, na placa de cultura de 96 poços (BD, New Jersey, USA) com meio Alpha MEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico-antimicótico. A análise de proliferação foi realizada a partir do ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} (Thermo Fisher Scientific, Eugene, USA), que permite mensurar a atividade metabólica por conversão do composto salino MTT em cristais de formazan, o que é proporcional ao número de células viáveis, refletindo, respectivamente em proliferação e viabilidade celular [40]. Os ensaios foram iniciados após 24h de incubação e realizados conforme instruções do fabricante. A cada dia, três poços foram submetidos à leitura de absorbância. Esse procedimento foi

repetido durante 10 dias consecutivos, possibilitando a construção da curva de viabilidade celular.

Caracterização das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano

Citometria de fluxo

Foram realizados ensaios com o objetivo de caracterizar fenotipicamente as subpopulações celulares presentes na cultura das CT-TAs. As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur-Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) usando os anticorpos contra os marcadores de superfície CD73 (561254), CD90 (555595) e CD105 (561443), CD34 (555822), CD45 (555483) e o antígeno leucocitário humano (HLA)-DR (347364) (Becton Dickinson Pharmigen, Nova Jersey, EUA). As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais seguindo recomendação do protocolo do fabricante. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra

Diferenciação adipogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, as CT-TAs foram semeadas, a uma concentração de $3,85 \times 10^4$ células/poço, em placa para cultura celular com 12 poços. As células foram cultivadas durante sete dias na presença do meio de indução de diferenciação osteogênica (StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela análise da coloração com Oil Red O.

Diferenciação condrogênica

Para induzir a diferenciação condrogênica, as CT-TAs foram semeadas em três gotas com concentração individual de $1,6 \times 10^7$ células/mL em placa de cultura celular com 12 poços. As células foram cultivadas durante 14 dias em presença do meio de indução de diferenciação condrogênica (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alcian Blue.

Diferenciação osteogênica

Para induzir a diferenciação osteogênica, as CT-TAs foram semeadas, a uma concentração de $1,83 \times 10^4$ células/poço, em placa de cultura celular com 12 poços e mantidas em meio Alpha MEM suplementado com 1% de antibiótico – antimicótico e 10% de SBF por aproximadamente quatro dias. Após este período, as células foram cultivadas durante 21 dias na presença do meio de indução de diferenciação osteogênica (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alizarin Red S.

Análises físico-química e morfológica do gel de PRP e da associação do gel de PRP com CT-TAs

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A estrutura e composição dos grupos funcionais presentes no gel de PRP foram analisados empregando-se a técnica de espectroscopia no

infravermelho com transformada de Fourier – FTIR (Bruker Optics, Inc., Bruker Tensor 27, Billerica, MA, EUA), conforme a metodologia previamente empregada por Kwok et al. (2005) [41] e Lu et al. (2016) [42].

O PRP foi obtido a partir do sangue total (20 mL) de cada doador voluntário (n=2). Para o preparo de cada gel foi utilizado o volume de 500 μ L de PRP. Contudo, para formação do gel de PRP/CT-TAs foi utilizada a concentração de 2×10^5 células/500 μ L de PRP. Após o preparo do PRP e do PRP/CT-TA, as amostras foram adicionadas na placa de cultura de 24 poços e 100 μ L de gluconato de cálcio (10%) foram acrescentados por poço para gelificação. As amostras foram armazenadas na estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 10 minutos.

Os géis de PRP e PRP/CT-TAs, em duplicatas, foram colocados no dessecador de vidro a vácuo para a evaporação do soro liberado antes da realização das medidas. Os espectros das amostras foram coletados na faixa espectral de 400-4000 cm^{-1} . As medidas foram obtidas com 128 scans e resolução espectral de 4 cm^{-1} [43-46].

Em paralelo, a técnica de FTIR também foi realizada com *pellet* de CT-TAs, com a concentração de 1×10^7 células. Esta análise foi realizada a fim de obter o controle do espectro das CT-TAs após a associação ao gel de PRP.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características da microestrutura dos géis de PRP com e sem associação de CT-TAs foram analisadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O PRP foi obtido a partir do sangue total (20 mL) de um doador

voluntário (n=1). Para o preparo do gel foi utilizado o volume de 500 µL de PRP. A amostra de gel PRP/CT-TA foi preparada a partir associação na concentração de 2×10^5 células/500 µL de PRP. Após a obtenção do PRP e do PRP/CT-TA, as amostras foram adicionadas na placa de cultura de 24 poços e 100 µL de gluconato de cálcio (10%) foram acrescentados por poço para gelificação. As amostras foram incubadas na estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 10 minutos.

Os géis de PRP e PRP/CT-TAs, em duplicatas, foram fixados com 2,5% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich, USA) em PBS, pH 7,4, por 2 horas. Posteriormente, os géis permaneceram em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M (Electron microscopy sciences, USA) *overnight*. As amostras foram colocadas em tetróxido de ósmio 1% (Electron microscopy sciences, USA) por 2 horas, a 4°C, e desidratadas em uma série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90%) por 10 minutos, com desidratação final em etanol absoluto por 20 minutos, três vezes. Após a desidratação, as amostras foram levadas para a secagem a ponto crítico no aparelho Baltec MED 020 (Baltec, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram depositadas em iões de ouro e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM -6610 LV, Tokyo, Japão).

Análise de citotoxicidade das CT-TAs durante a associação ao gel de PRP

Com o objetivo de analisar a viabilidade das CT-TAs e das plaquetas durante a associação ao gel de PRP foi realizada a análise de citotoxicidade celular.

O PRP foi obtido a partir do sangue total (10 mL) de cada doador voluntário (n=2). Para o preparo do gel foi utilizado o volume de 250 µL de

PRP. Contudo, para a associação PRP/CT-TA foi utilizada a concentração de 1×10^5 células/250 μ L de PRP (com adição de 50 μ L de gluconato de cálcio a 10%).

Para a marcação de cada amostra (PRP e PRP/CT-TAs) foi adicionados 20 μ L de corante FluoroQuench™ Staining/Quenching Reagent (Thermo Fisher, Hannover, Germany) e, posteriormente a homogeneização, foi adicionado o gluconato de cálcio para a formação do gel. As lâminas foram preparadas e analisadas no microscópio de fluorescência Carl Zeiss Axion Scope A1, Cam ICc3 (Zeiss, Germany).

Análise de proliferação e viabilidade das CT-TAs após associação ao gel de PRP

O *pellet* formado a partir da centrifugação das CT-TAs foi ressuspendido com o PRP e, posteriormente, adicionado em poços da placa de 12 poços. Cada poço apresentou a concentração de 1×10^5 células/250 μ L de PRP (ativado com 50 μ L de gluconato de cálcio 10%). As análises foram realizadas a cada 24 horas, durante quatro dias. A cada 24 horas o gel de PRP do poço a ser analisado foi descartado e o meio de cultura foi adicionado no poço.

A análise de proliferação e viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT. Após a migração celular nos respectivos tempos, as células foram semeadas na placa de cultura de 96 poços e incubadas por 24 horas. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante, e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 560 nm em espectrofotômetro (Multiskan FC Versão 1.0079 – Thermo Fisher Scientific).

As CT-TAs que migraram do gel de PRP também foram analisadas quanto à capacidade de diferenciação nas três diferentes linhagens:

adipogênica, condrogênica e osteogênica, seguindo a metodologia descrita anteriormente.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Para verificar a normalidade das variâncias foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Na verificação das diferenças significativas dos testes com mais de dois grupos foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA – one way) seguida de teste Tukey para dados paramétricos e teste de Kruska-Wallis seguido de teste de Dunn para dados não paramétricos. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism for *Windows* versão 5.0.

Aspectos éticos

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Campus de Assis (Assis, São Paulo, Brasil), bem como foi registrado na Plataforma Brasil sob o parecer de número 1.863.603.

Resultados

Padronização da metodologia para obtenção do gel de PRP

Para padronizar a metodologia de obtenção do gel de PRP foram testados três diferentes protocolos: Landesberg et al. (2000), Abegão et al. (2015) e Giraldo et al. (2015) (Tabela 1).

Após a primeira centrifugação foi possível observar a separação do plasma e das hemácias, assim como a formação de uma zona de névoa (*buffy coat*). Notou-se que quanto maior a força centrífuga (g) empregada, maior a quantidade de plasma obtido após a primeira centrifugação (Figura 2). O maior volume de plasma foi obtido a partir dos protocolos de Landesberg et al. (2000) [30] e Abegão et al. (2015) [34] (Figura 3A).

A média (n=3) da concentração plaquetária após a segunda centrifugação foi de $797,667 \times 10^3/\mu\text{L}$ (protocolo I), $904,000 \times 10^3/\mu\text{L}$ (protocolo II) e $803,000 \times 10^3/\mu\text{L}$ (protocolo III), conforme a Tabela 2.

O PRP de cada uma das amostras foi ativado com gluconato de cálcio. O gel de PRP formado a partir do protocolo de Abegão et al. (2015) [34] apresentou menor densidade e resistência quando comparado aos demais protocolos. Seguindo o protocolo de Landesberg et al. (2000) [30], o gel de PRP obtido apresentou um aspecto mais maleável, resistente e espesso. Já, com protocolo de Giraldo et al. (2015) [33], apesar de ter sido obtido um volume menor de PRP, o gel formado também apresentou um aspecto mais resistente (Figura 3B).

Portanto, o protocolo utilizado para obtenção do gel de PRP para o desenvolvimento das análises foi o de Landesberg et al. (2000), com maior concentração plaquetária em relação aos demais protocolos testados. O gel

de PRP obtido a partir do protocolo proposto por Landesberg et al. [30]. apresentou características necessárias para a realização dos ensaios.

Obtenção, isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

As células isoladas por digestão enzimática foram semeadas em frascos de cultura, a uma concentração inicial de 1×10^5 células/cm². Após quatro horas de semeadura foi possível verificar adesão das células à superfície de contato. Sucessivas lavagens com PBS foram necessárias para que hemácias fossem retiradas. Após três dias de incubação, foi possível notar a formação de colônias, assim como células com aspecto fibroblastóide, conforme apresentado na Figura 4.

Desde modo, a confluência de 80-90% em relação à área do frasco de cultura foi atingida no 8º dia de cultura (Figura 4). A cultura celular foi submetida ao tratamento com tripsina. Ao longo dos repiques, a morfologia fibroblastóide das células tornou-se mais evidente, assim como houve uma maior proliferação celular. As culturas foram mantidas até a terceira passagem.

Análise de proliferação celular

As CT-TAs mantiveram a viabilidade e o potencial de proliferação durante o cultivo, conforme ilustrado na Figura 5. O ensaio com MTT revelou um crescimento lento (fase lag) nos primeiros cinco dias de cultivo, o que representa o período de adaptação metabólica das células após a semeadura. Após o sexto dia, as células apresentaram uma fase de crescimento

exponencial (fase log), que se mantém até o 10º dia de cultivo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas do primeiro ao sexto dia, bem como do sexto ao sétimo dia, e entre o oitavo e nono dia.

Caracterização das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano

As CT-TAs apresentaram os três critérios mínimos para definir célula-tronco mesenquimal multipotente: as células foram aderentes ao plástico, apresentando morfologia alongada fibroblatóide *in vitro*; apresentaram os marcadores de superfície e potencial de diferenciação em concordância com o estabelecido na literatura.

A análise de citometria de fluxo confirmou a caracterização da população celular composta por células mesenquimais, apresentando marcadores de superfície positivos para CD 73 (97.53%), CD 90 (99.84%) e CD 105 (96.91%) e negativos para CD 34 (0.68%), CD 45 (2.48%) e HLA classe II (1.30%), conforme a Figura 6.

As CT-TAs apresentaram potencial de diferenciação em adipócitos (após 12 dias), osteócitos (15 dias) e condrócitos (21 dias). A presença de vacúolos lipídicos citoplasmáticos confirma a diferenciação na linhagem adipogênica. A diferenciação condrogênica é confirmada pela presença de mucopolissacarídeos característicos de condrócitos e a diferenciação osteogênica pelos acúmulos de cálcio e matriz óssea sintetizada pelos osteoblastos (Figura 7).

Análise físico-química e morfológica do gel de PRP e da associação do gel de PRP com CT-TAs

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os resultados obtidos pela análise de FTIR não apresentaram diferenças físico-químicas significativas entre a amostra de gel de PRP isolado ou em associação com CT-TAs, em acordo com o gráfico apresentado na Figura 8. O espectro do gel de PRP e do gel PRP/CT-TAs apresentaram estiramento de O-H com picos em 3286 cm^{-1} . O grupo de amida I apresentou picos nos espectros dos géis de PRP e PRP/CT-TAs em 1637 cm^{-1} e 1638 cm^{-1} , respectivamente. Já o grupo de amida II apresentou picos em 1543 cm^{-1} em ambos os géis. As deformações angulares de CH_2 e CH_3 apresentam picos, nos géis de PRP e PRP/CT-TAs, em 1456 e 1397 cm^{-1} . O estiramento C-O foi atribuído com picos em 1081 cm^{-1} e 1079 cm^{-1} , no gel de PRP e PRP/CT-TAs, respectivamente.

O *pellet* de CT-TAs exibiu uma combinação de bandas semelhantes as do gel de PRP, principalmente às atribuições referentes à amida I e II. No espectro do *pellet* de CT-TAs, a amida I e II apresentaram picos em 1642 e 1548 cm^{-1} , respectivamente. Já no espectro referente ao gel de PRP/CT-TA, as amidas I e II apresentaram picos em 1637 e 1543 cm^{-1} , respectivamente.

Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizada para caracterizar morfológicamente os géis de PRP e PRP/CT-TAs, revelou a presença de uma estrutura porosa com fibras de espessura homogênea ao longo do seu comprimento e disposição multidirecional em ambos os géis. As plaquetas, distribuídas entre as fibras e/ou aderidas a elas, apresentaram aspecto morfológico esférico, caracterizando o estado de ativação plaquetária

(Figura 9).

Ao analisar o gel de PRP/CT-TAs foi possível verificar a presença de células dentro do gel, distribuídas entre as fibras. As plaquetas presentes no gel de PRP/CT-TAs, além de apresentarem-se distribuídas entre as fibras, também se revelaram sob as CT-TAs, conforme observado na Figura 9.

Análise de fluorescência das CT-TAs durante a associação ao gel de PRP

O gel de PRP/CT-TAs foi analisado quanto à viabilidade das CT-TAs e das plaquetas durante a associação. Os resultados revelaram que as células-tronco mesenquimais quando associadas ao gel de PRP mantêm-se viáveis e distribuídas aleatoriamente dentro do arcabouço (Figura 10A), podendo apresentar aglomerados em algumas regiões do gel. As plaquetas, por sua vez, aparecem na totalidade da área do gel de PRP e permanecem viáveis durante a associação com CT-TAs (Figura 10B).

Análise de proliferação e viabilidade das CT-TAs após associação ao gel de PRP

Durante a cultura *in vitro* do gel de PRP/CT-TA foi possível observar que a atividade proliferativa das células encapsuladas no gel de PRP aumentou após o primeiro dia (Figura 11 A, B). Notou-se também que algumas células contidas no gel de PRP migraram para a placa de cultura, aderindo-se ao plástico. Após a migração, as células proliferaram-se na placa de cultura, apresentando um aumento no número de células após o segundo dia de incubação do gel de PRP/CT-TAs. As células que migraram no terceiro e

quarto dia apresentaram aspecto fibroblastóide característico de células-tronco mesenquimais (Figuras 11C, D).

A partir do ensaio de proliferação celular por MTT, foi possível verificar que a CT-TAs que migraram do gel de PRP permaneceram viáveis, apresentando atividade proliferativa ao longo dos quatro dias. Notou-se rápido crescimento celular após o terceiro dia de incubação do gel de PRP/CT-TAs (Figura 12).

Ao analisar a capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, evidenciou-se que CT-TAs que migraram do gel e se proliferaram ainda apresentam potencial de diferenciação nas três linhagens, conforme a Figura 13.

Discussão

O PRP tem despertado amplo interesse no que concerne ao grande potencial de aplicabilidade deste biomaterial em Medicina Regenerativa para reparo e/ou regeneração de lesões teciduais decorrentes de patologias agudas (traumas) e degenerativas.

De uma forma geral, encontra-se na literatura científica diferentes metodologias para a obtenção do PRP, com variações na concentração de plaquetas, tempos e aplicações de diferentes forças de centrifugação. Em decorrência de tanta variabilidade metodológica, a realização de uma análise comparativa dos diferentes resultados experimentais em modelos animais e protocolos clínicos em pacientes humanos têm sido dificultados [5, 31, 47].

Atualmente, a quantidade de plasma e plaquetas obtidos no final do processo é o principal requisito para definir a qualidade e o potencial terapêutico do PRP [37]. Contudo, ainda não há um consenso em relação ao número ideal de plaquetas que o plasma deve apresentar, uma vez que a concentração plaquetária varia de acordo com cada protocolo, resultando em um PRP específico para determinadas aplicações [8, 31, 47].

Para uso clínico, a concentração de plaquetas no PRP deve ser significativamente maior do que a concentração presente na corrente sanguínea. Alguns autores tem sugerido que a concentração plaquetária no plasma deve ser 3-5 vezes superior ao nível basal para ser classificado como PRP [8, 48-50]. No presente estudo, o PRP obtido a partir de cada protocolo avaliado apresentou concentração plaquetária 4-5 vezes maior do que a concentração inicial, estando em concordância com a concentração

necessária para ser considerado PRP.

O PRP pode ser obtido a partir de kits comerciais ou por meio do processo de centrifugação do sangue total, resultando na separação dos gradientes de densidade. Alguns autores utilizam apenas uma centrifugação para a obtenção do PRP [51-53]. Contudo, a realização de dupla centrifugação tem apresentado melhores resultados na concentração plaquetária, uma vez que a primeira centrifugação tem como objetivo separar as hemácias e o plasma e a segunda para concentrar as plaquetas [54].

Visto que a força centrífuga (g) é um fator importante para a separação dos componentes sanguíneos, quanto maior a força empregada maior será o volume de plasma obtido na primeira centrifugação, assim como a concentração plaquetária obtida em relação ao plasma na segunda centrifugação [37, 59]. Porém, o emprego de uma força de rotação elevada pode resultar em alterações morfológicas, auto-agregação e ativação das plaquetas e, conseqüentemente, na liberação de fatores de crescimento durante o processo de centrifugação [7, 34, 50, 55].

A análise dos três diferentes protocolos testados para a padronização do PRP permitiu verificar que os protocolos descritos por Landesberg et al. (2000) [30] e Abegão et al. (2015) [34] resultaram em um maior volume de plasma na primeira centrifugação e, conseqüentemente, um maior volume de PPR final quando comparado com o protocolo descrito por Giraldo et al. (2015) [33]. Notou-se também que forças rotacionais muito baixas aplicadas na primeira centrifugação, como proposto por Giraldo et al. (2015) [33], não permitem uma separação eficiente dos diferentes gradientes, obtendo um

pequeno volume de plasma com hemácias presentes. Contudo, quando foram testadas altas forças rotacionais, seguindo as metodologias propostas por Jo et al. (2013) [37] e Vendramin et al. (2009) [38], os tubos quebraram durante o processo de centrifugação. Sendo assim, protocolos que fazem uso de força centrífuga (g) acima de 800 g não foram possíveis de serem testados. Procurou-se, portanto, executar um protocolo com menor força centrífuga, mas que fosse capaz de concentrar maior número possível de plaquetas.

Para a obtenção do PRP foi utilizado o protocolo proposto por Landesberg e colaboradores (2000) [30], onde foi empregada centrifugação de 200 g por 10 minutos na primeira e segunda centrifugação, resultando em um enriquecimento plaquetário de 318% em relação ao sangue total. Os dados do presente estudo refutam os resultados obtidos por outros autores, assim como a hipótese de que o aumento da força de centrifugação resultará no aumento da concentração plaquetária, conforme proposto por Vendramin et al. (2009) [38]. Observou-se que o emprego de forças rotacionais superiores a 200 g, tanto na primeira como na segunda centrifugação, não resultam em altas concentrações plaquetárias. Este fato pode ser decorrente da auto-agregação e a ativação precoce das plaquetas durante o processo de obtenção do PRP.

Vendruscolo e colaboradores [56], em 2012, ao testarem 10 diferentes protocolos de centrifugação para obtenção do PRP, observaram que protocolos com menor força de centrifugação também podem resultar em uma maior concentração plaquetária. A aplicação de altas forças rotacionais resultou, no presente trabalho, na formação de um *pellet* que não era ressuspensionado facilmente, resultado também concordante com Vendruscolo et

al. (2012) [56].

A grande potencialidade terapêutica tem estimulado o uso do PRP em diversas áreas clínicas [4, 38, 54; 57]. O gel de PRP, por sua vez, apresenta-se, também, como uma alternativa terapêutica devido à facilidade de aplicação e a capacidade de reparar danos teciduais [29, 58].

O gel de PRP é obtido a partir da ativação plaquetária por meio do uso de agentes exógenos (trombina, cloreto de cálcio ou gluconato de cálcio). As plaquetas são concentradas a partir da segunda centrifugação do plasma, mantendo a morfológica preservada, posteriormente o ativador (agente exógeno) é adicionado, resultando na gelificação do PRP.

Após a gelificação do PRP, as plaquetas sofrem um processo de degranulação, liberando uma fração líquida correspondente ao soro. Esta fração contém citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, entre outros compostos [59, 60]. A liberação de soro é inversamente proporcional ao volume de ativador utilizado para a obtenção do gel. Entretanto, concentrações elevadas de ativador, como o gluconato de cálcio, podem diminuir o pH do PRP, o que terapeuticamente é inviável, pois o pH muito baixo pode causar danos no local da aplicação [26, 61]. Portanto, foi padronizado em nosso grupo o uso da proporção de 100 – 200 µL de gluconato de cálcio para cada 1 mL de PRP. Segundo Stessuk (2016) [29], menores concentrações do ativador não permitem a formação de um gel de PRP adequado, mantendo-se em forma líquida. Contudo, concentrações entre 100-200 µL proporcionam a formação de um gel mais espesso e resistente.

Estudos também têm apontado o potencial uso do PRP como um

scaffold (arcabouço) capaz de encapsular células e fatores de crescimento [62-63]. A preservação da composição e das características estruturais das células e do biomaterial, portanto, torna-se necessária para que a funcionalidade e a viabilidade celular sejam mantidas.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as composições químicas dos géis de PRP e PRP/CT-TAs não diferem entre si, assim como também não sofrem modificações significativas, estando os géis isolados ou em associação a células. Os perfis dos géis de PRP e PRP/CT-TAs, quando analisados a partir do espectro FTIR apresentam resultados semelhantes, com atribuições em picos próximos, conforme apresentado na Figura 8. Diaz-Gomes et al. (2014) [64] ao analisar o espectro do PRP liofilizado observou picos em 1660 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} atribuídos a amida I e amida II, respectivamente. Em concordância, Liu et al. (2002) [65] ao analisar o espectro somente das plaquetas encontrou ambas as bandas de proteína (amida I e II) com picos próximos de 1652 cm^{-1} e 1545 cm^{-1} . Os resultados aqui apresentados corroboram ambos os estudos, uma vez que os espectros dos géis de PRP e PRP/CT-TAs apresentaram picos entre $1637\text{-}1638\text{ cm}^{-1}$ para amida I, e 1543 cm^{-1} para amida II, respectivamente. Perfis atribuídos às bandas de O-H (3286 cm^{-1}) referentes à banda da água, como os estiramentos de C-O ($1242\text{-}1243\text{ cm}^{-1}$) também aparecem em ambos os espectros de géis de PRP e PRP/CT-TAs, como se verifica a partir dos resultados apresentados na Figura 8.

A ausência de alguns picos nítidos nos espectros dos géis de PRP e PRP/CT-TAs, como, por exemplo, os picos correspondentes ao estiramento de C-H alifático, presentes na região 2963 cm^{-1} , deve-se a hidratação elevada

das amostras. A água tem forte absorção na região entre $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ e em $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$, devido ao estiramento de OH. Portanto, a presença de água nas amostras pode gerar fortes sinais de fundo não-ressonantes [66-68].

O espectro referente às CT-TAs isoladas mostrou um padrão semelhante aos resultados encontrados em diversos trabalhos [69-73]. O perfil traçado no espectro FTIR do gel PRP/CT-TAs mostrou-se semelhante ao espectro das CT-TAs isoladas (Figura 8), sugerindo que a associação das CT-TAs ao gel de PRP mantém as propriedades físico-químicas de ambos após a interação.

A morfologia do gel de PRP é caracterizada pela presença de arranjos de fibras espessas e elementos celulares [74]. Os resultados obtidos com a técnica de MEV revelaram a porosidade do gel de PRP, apresentando fibras dispostas aleatoriamente e com espessura homogênea ao longo do seu comprimento (Figuras 9A, C, E), corroborando os dados obtidos por Fernández-Barbero et al. (2006) e Sadeghi-Ataabadi et al. (2017) [74, 75].

A disposição das fibras não influencia na capacidade do gel de PRP atuar como um arcabouço/suporte para as células associadas a ele (Figuras 9B, D, F), uma vez que não há interferência na capacidade migratória das células no biomaterial [74]. Contudo, outras propriedades mecânicas, como o diâmetro das fibras e a porosidade do gel de PRP, influenciam diretamente na adesão, proliferação e migração [75, 76].

A ativação plaquetária, caracterizada pela morfologia esférica das plaquetas encontradas no gel de PRP e PRP/CT-TAs, assim como a presença de pseudópodes (estabelecendo comunicação célula-célula) são também

responsáveis por intermediar respostas fisiológicas das células associadas ao gel de PRP sobre o tecido a ser reparado [77]. A morfologia esférica das plaquetas reveladas pela técnica de MEV (Figuras 9D, F, H) evidencia que estas são capazes de serem ativadas fora do organismo por agentes exógenos, potencializando, portanto, o uso terapêutico do gel de PRP, uma vez que torna-se possível induzir a liberação de fatores de crescimento e citocinas pelo processo de ativação plaquetária [74, 77].

O gel de PRP atua estimulando a proliferação e migração das células associadas ao biomaterial. As propriedades quimiotáticas do PRP exercem efeito sobre o potencial de migração e proliferação celular, a partir de fatores armazenados nos alfa-granulos das plaquetas [78]. Neste estudo, quando foi analisada a viabilidade das CT-TAs associadas ao gel de PRP e, por conseguinte, a capacidade de migração e proliferação das mesmas *in vitro*, notou-se que as CT-TAs encapsuladas no gel de PRP permanecem viáveis (Figura 10) e em atividade proliferativa (Figura 11), e após o terceiro dia à associação gel de PRP, há um aumento no potencial de migração e proliferação celular (Figura 12).

Vários estudos evidenciam o efeito que o PRP apresenta sobre o potencial proliferativo e migratório das células [62, 76, 78-82]. Dreng et al. (2008) [79], ao analisar o efeito mitogênico do PRP sobre as células-tronco derivadas da medula de ovelhas adultas, notaram que a proliferação celular ocorria somente no terceiro dia após a estimulação. Shimojo e colaboradores (2015) [76] também observaram que após três dias de cultivo no arcabouço de PRP, as células excediam o número inicialmente semeado, indicando viabilidade e atividade proliferativa. O arcabouço de PRP atua sobre o

potencial migratório das CTM a partir dos efeitos biológicos das próprias células e dos fatores de crescimento do PRP, sugerindo que fatores como o PDGF e MMP-9 são os principais responsáveis por regular a migração das CTM *in vitro* [80,81].

A estrutura tridimensional do gel de PRP, formada pela presença de fibrinas, fornece um suporte eficaz para as células e, juntamente com um perfil proteico dos fatores de crescimento e moléculas liberadas, proporciona um microambiente favorável que permite a viabilidade, proliferação, migração e diferenciação celular, podendo prevenir também a apoptose e inibir os efeitos catabólicos de algumas citocinas pró-inflamatórias, atuando na modulação de respostas inflamatórias [78, 81-83].

Em síntese, os resultados obtidos permitem concluir que o emprego de baixas forças rotacionais para obtenção de PRP pode resultar em uma elevada concentração de plaquetas. A adoção dos parâmetros metodológicos possibilitou também a obtenção de um gel com características adequadas para atuar como *scaffold* para as CT-TAs. Pode-se, portanto, inferir que o gel de PRP é um biomaterial capaz de funcionar com eficiência no suporte, manutenção e preservação das CT-TAs incorporadas a ele, não apresentando modificações na composição química e na estrutura do gel de PRP, assim como na viabilidade, capacidade de migração e potencial de diferenciação das células. Estudos adicionais são necessários para que se possa avançar na compreensão das interações estruturais, moleculares e dos efeitos recíprocos resultantes da associação de PRP com as CT-TAs. Será importante avaliar, também, por meio de trabalhos futuros, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, se a associação PRP/CT-TAs pode atuar aditiva ou sinergisticamente no

reparo de lesões teciduais, particularmente em lesões cutâneas.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida (bolsa CAPES-DS).

Declaração de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

- [1] Mason C, Peter D. A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine* 2008; 3:1-5.
- [2] Schallmoser K, Rohde E, Bartmann C, Obenauf AC, Reinisch A, Strunk D. Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Bio-medical materials and engineering* 2009;19(4-5):271-276.
- [3] Francisco JC. Desenvolvimento de biomaterial a partir de matriz amniótica humana. [tese]. Curitiba (PR). Universidade Federal do Paraná. 2013; 100 p. Available from: <http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/30041/R%20-%20T%20-%20JULIO%20CESAR%20FRANCISCO.pdf?sequence=1>
- [4] Sánchez M, Anitua E, Andia I, Sánchez P. Platelet rich plasma (PRP) biotechnology: Concepts and therapeutic applications in orthopedics and sports medicine. *InTech* 2012;113-38.
- [5] Marques LF, Stessuk T, Camargo ICC, Sabeh Jr N, Santos L, Ribeiro-Paes JT. Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. *Platelets* 2015;26(2):101-113.
- [6] Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial plastic surgery* 2002;18(1):27-34.
- [7] Montero EC, Santos MF, Fernández RS. Plasma rico en plaquetas: aplicaciones en dermatología. *Actas dermo-sifiliográficas* 2015;106(2):104-111.
- [8] Pinto JMN, Pizani NS. Aplicabilidade em dermatologia do plasma rico em plaquetas. *Surgical And Cosmetic Dermatology* 2015;7(1):61-64.

- [9] Oliveira LSDAF, Oliveira CS, Machado APL, Rosa FP. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea–método de análise e perspectivas futuras. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 2010;9(1):37-44.
- [10] Centeno AFT, Roldán FA, Álvarez IB, Sánchez RR, Fernández CV. Bioestimulación cutánea con plasma rico en plaquetas autólogo. Estudio controlado con ecografía. *Piel* 2013;28(2):69-74.
- [11] Picard F, Hersant B, Bosc R, Meningaud JP. The grwing evidence for the use of platelet-rich plasma on diabetic chronic wounds: A review and a proposal for a new standard care. *Wound Repair and Regeneration* 2015;23(5):638-643.
- [12] Amorin B, Valim VS, Lemos NE, Moraes Jr L, Silva AMP, Silva MAL. Mesenchymal stem cells – characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications. *Revista HCPA* 2012;32(1):71-81.
- [13] Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, Bogdansky S, Atkinson BL. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. *Tissue Engineering* 2012;18(13-14): 1313-21.
- [14] Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009; 31:25–35
- [15] Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology* 2011;164(1):1-8.
- [16] Baer PC, Geiger H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International* 2012;1-11.

- [17] Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell* 2013; 9: 32–43.
- [18] Kim EY, Lee K-B, Kim MK. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *Biochemistry and Molecular Biology* 2014; 47:135–140.
- [19] Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, Xu G-T, Liang A, Liu S. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dentaltissue derived mesenchymal stem cells. *StemCells* 2015; 33:627-638.
- [20] Du WJ, Chi Y, Yang ZX, Li ZJ, Cui JJ, Song BQ, Li X, Yang SG, Han ZB, Han ZC. Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. *Stem Cell Research & Therapy* 2016; 7(1):163.
- [21] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013;15:641-8.
- [22] Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, Oba S, Nishimatsu H. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *Journal of Cardiology* 2015; 7(8):454–65.
- [23] Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfusion Medicine Hemotherapy* 2016; 43:268-274.

- [24] Kaviani R, Jalili RB. Application of adipose derived stem cells for treatment of chronic wounds. *Investigative Dermatology and Venereology Research* 2016; 2(1): 44- 51.
- [24] Turrer C, Ferreira F. Biomateriais em Cirurgia Craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações-revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* 2008;23(3):234-239.
- [25] Pires ALR, Bierhalz AC, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quimica Nova* 2015;38(7):957-971.
- [26] Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, March KL. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization in wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2009;123(2S):56S-64S.
- [27] Argôlo Neto NM, Del Carlo RJ, Monteiro BS, Nardi N, Chagastelles PC, De Brito AFSS, Reis AMS. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. *Clinical and experimental dermatology* 2012;37(5):544-553.
- [28] Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, Peng J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013;21(11):1627-1637.
- [29] Stessuk T. Terapia celular em úlceras crônicas com implante de células tronco mesenquimais associadas a plasma rico em plaquetas [tese]. São Paulo (SP). Universidade de São Paulo; 2016. 142 p. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-29082016-101221/pt-br.php>
- [30] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels

using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000;58(3):297-300.

[31] Bausset O, Giraudo L, Veran J, Magalon J, Coudreuse JM, Magalon G, Coudreuse J, Magalon G, Christophe Dubois C, Serratrice N, Dignat-George F, Sabatier F. Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product. *BioResearch* 2012;1(3):115-123.

[32] Santos ES. Avaliação da reparação de feridas cirúrgicas em coelhos, tratadas ou não com plasma rico em plaquetas autólogo em gel [dissertação], Presidente Prudente (SP). Universidade do Oeste Paulista; 2013. 44 p. Available from: <http://bdtd.unoeste.br:8080/jspui/handle/tede/684>

[33] Giraldo CE, Álvarez ME, Carmona JU. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC veterinary research* 2015;11(1):60.

[34] Abegão KGB, Bracale BN, Delfim IG, Santos ESD, Laposy CB, Nai GA, Giuffrida R, Nogueira RMB. Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira* 2015;30(3):209-215.

[35] Qi Y, Niu L, Zhao T, Shi Z, Di T, Feng G, Li J, Huang Z. Combining mesenchymal stem cell sheets with platelet-rich plasma gel/calcium phosphate particles: a novel strategy to promote bone regeneration. *Stem cell research & therapy* 2015;6(1):256.

[36] Huber SC, Júnior JLRC, Montalvão S, da Silva LQ, Paffaro AU, da Silva FAR, Rodrigues BL, Lana JFSD, Annichino-Bizzacchi JM. In vitro study of the role of thrombin in platelet rich plasma (PRP) preparation: utility for gel

formation and impact in growth factors release. *Journal of stem cells & regenerative medicine* 2016;12(1):2.

[37] Jo CH, Roh YH, Kim JE, Shin S, Yoon KS. Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation. *The Journal of Oral Implantology* 2013;39(5):525-532.

[38] Vendramin F, Franco D, Franco T. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* 2009;24(2):212-218.

[39] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001;7:211–226.

[40] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65: 55-63.

[41] Kwok SCH, Wang J, Chu PK. Surface energy, wettability, and blood compatibility phosphorus doped diamond-like carbon films. *Diamond & Related Material* 2005;14(1):78–85.

[42] Lu B, WT, Li Z, Dai F, Lv L, Tang F, Yu K, Liu J, Lan G. Healing of skin wounds with a chitosan–gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016;82:884–891.

[43] Sala O. Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho. 2th ed. São Paulo, SP: Editora Unesp; 1996, p. 276.

[44] Atkins PW. Físico-Química. Livros Técnicos e Científicos; 1997, p. 159.

[45] Skoog, D. A; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Princípios de Análise Instrumental, 5th ed. Porto Alegre: Bookman, 2006, p. 836.

- [46] Aroca R. Surface-enhanced vibrational spectroscopy. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. 223.
- [47] Monteiro MR. Plasma rico em plaquetas em dermatologia. *Surgical & Cosmetic Dermatology* 2013;5(2):155-159.
- [48] Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: Background and process. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 2002; 22(6):547-557.
- [49] Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *The Journal of extra-corporeal technology* 2004;36(1):28-35.
- [50] Vanat N, Medeiros TNS, Balarin MRS, Pereira PM, De Biasi F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. *Semina: Ciências Agrárias* 2012;33(1):313-321.
- [51] Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007;28(31):4551-4560.
- [52] Anitua E, Troya M, Orive G. An autologous platelet-rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *Journal of periodontology* 2013;84(11):1556-1566.
- [53] Scaranto MK. Plasma Rico em Plaquetas [monografia] Flóridaópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2002. 26 p. Available from: <http://tcc.bu.ufsc.br/Espodonto212369.PDF>
- [54] Franco D, Franco T, Schettino AM, Tavares Filho JM, Vendramin FS. Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use. *Aesthetic plastic surgery* 2012;36(5):1254-

1259.

[55] Arora S, Doda V, Kotwal U, Dogra M. Quantification of platelets and platelet derived growth factors from platelet-rich-plasma (PRP) prepared at different centrifugal force (g) and time. *Transfusion and Apheresis. Science* 2016;54(1103-110).

[56] Vendruscolo CP, Carvalho ADM, Moraes LF, Maia L, Queiroz DL, Watanabe MJ, Yamada ALM, Alves ALG. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2012;106-110.

[57] de Mello EDA, de Mello GPS, da Silva LA, de Freitas MAC. As bases biológicas do plasma rico em plaquetas. *Revista da Faculdade de Odontologia-UPF* 2010;11(2):91-95.

[58] Kontopodis N, Tavlas E, Papadopoulos G, Pantidis D, Kafetzakis A, Chalkiadakis G, Ioannou CE. Effectiveness of platelet -rich plasma to enhance healing of diabetic foot ulcers in patients with concomitant peripheral arterial disease and critical limb ischemia. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2016;15(1):45-51.

[59] Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty* 2011;11:e38

[60] Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann JJHL, Overdevest EP, Box HA, van Zundert A. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. *Journal of ExtraCorporeal Technology* 2006;38:174–187

[61] DeLong JM, Russell RO, Mazzocca AD. Platelet Rich Plasma: The PAW Classification System. *Arthroscopy* 2012;28(7):998-1009.

[62] Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ, Denom J, Menzel U, Alini M, Verrier S,

Herrmann M. An in vitro investigation of platelet-rich plasma-gel as a cell and growth factor delivery vehicle for tissue engineering. *Tissue Engineering Part C Methods* 2016;22:49-58.

[63] Wang Z, Qin H, Feng Z, Zhao Y. Platelet-rich plasma gel composited with nondegradable porous polyurethane scaffolds as a potential auricular cartilage alternative. *Journal of Biomaterials Applications* 2016,30(7):889-899.

[64] Diaz-Gomez L, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Silva M, Dominguez F, Sheikh FA., Cantus T, Desai R, Garcia VL, Macossay J. Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. *Materials Science and Engineering C* 2014;40:180–188.

[65] Liu KZ, Bose R, Mantsch HH. Infrared spectroscopic study of diabetic platelets. *Vibrational spectroscopy* 2002;28(1):131-136.

[66] Lopes, FN. Espectroscopia Ramam Aplicada ao Estudo de Pigmentos em Bens Culturais: I – Pinturas Rupestres [dissertação]. São Paulo (SP). Universidade de São Paulo; 2005. 87p. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46132/tde-23052007-112206/en.php>

[67] Sulé-Suso J, Forsyth NR, Untereiner V, Sockalingum GD. Vibrational spectroscopy in stem cell characterisation: is there a niche? *Trends Biotechnol* 2014; 32: 254– 262.

[68] Kawagishi M, Obara Y, Suzuki T, Hayashi M, Misawa K, Terada S. Direct label-free measurement of the distribution of small molecular weight compound inside thick biological tissue using coherent Raman microspectroscopy. *Scientific Reports* 2015; 5:13868.

[69] Shi LB, Cai HX, Chen LK, Wu Y, Zhu SA, Gong XN, Xia YX, Ouyang HW,

Zou XH. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. *Biomaterials* 2014;35(5):1519-1530.

[70] Kim MS, Lee MH, Kwon BJ, Koo MA, Seon GM, Lee JH, Han DW, Park JC. Golgi polarization effects on infiltration of mesenchymal stem cells into electrospun scaffolds by fluid shear stress: Analysis by confocal microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* 2016;51(7-9):570-581.

[71] Liu Z, Tang Y, Chen F, Liu X, Liu Z, Zhong J, Hu J, Lü J. Synchrotron FTIR microspectroscopy reveals early adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells at single-cell level. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016;478(3):1286-1291.

[72] Aksoy C, Kaya FA, Kuşkonmaz BB, Uçkan D, Severcan F. Structural investigation of donor age effect on human bone marrow mesenchymal stem cells: FTIR spectroscopy and imaging 2014;36(4):9691.

[73] Vazquez-Zapien GJ, Mata-Miranda MM, Sanchez-Monroy V, Delgado-Macuil RJ, Perez-Ishiwara DG, Rojas-Lopez M. FTIR Spectroscopic and Molecular Analysis during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells. *Stem Cells International*, 2016; 6709714:1-10.

[74] Fernández-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Ávila-Ortiz G, Caba O, Sánchez-Fernández E, Wang HL. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clinical oral implants research* 2006; 17(6): 687-693.

[75] Sadeghi-Ataabadi M, Mostafavi-pour Z, Vojdani Z, Sani M, Latifi M, Talaei-Khozani T. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma

scaffolds for tissue engineering applications. *Materials science & engineering: C* 2017;71:372–80.

[76] Shimojo AA, Perez AG, Galdames SE, Brissac IC, Santana MH. Stabilization of porous chitosan improves the performance of its association with platelet-rich plasma as a composite scaffold. *Materials Science and Engineering: C* 2016;60:538-546.

[77] Castro, BL. Avaliação do uso de plasma rico em plaquetas sobre células tronco mesenquimais da derme associadas à matriz de regeneração dérmica [dissertação]. Flóridaópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2023. 88 p. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/107401>

[78] Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;8:52–62.

[79] Drengk A, Zapf A, Sturmer EK, Sturmer KM, Frosch KH. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2009;189(5):317-326

[80] Roubelakis MG, Trohatou O, Roubelakis A, Mili E, Kalaitzopoulos I, Papazoglou G, Pappa KI, Anagnou NP. Plateletrich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Reviews.* 2014;10(3):417– 428.

[81] Yamada ALM, Alvarenga ML, Brandão JS, Watanabe MJ, Rodrigues CA, Hussni CA, Alves ALG. Arcabouço de PRP-gel associado a células-tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino.

Pesquisa Veterinária Brasileira 2016;36(6):461-467.

[82] Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W, Tuan RS, Zhang C: Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials* 2012;33:7708–7018.

[83] Yamada ALM, Carvalho AMD, Oliveira PGG, Felisbino SL, Queiroz DL, Watanabe MJ, Hussni CA, Alves ALG. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2012;64(2):323-332.

Tabelas e figuras

Tabela 1 – Protocolos selecionados para a padronização do PRP.

Protocolo	Força centrífuga (g) – PC*	Tempo (min) – PC*	Força centrífuga (g) – SC**	Tempo (min) – SC**	Referência
I	200	10	200	10	Abegão et al., 2015
II	200	10	400	10	Landesberg et al., 2000
III	120	5	240	5	Giraldo et al., 2015

* PC: Primeira centrifugação

**SC: Segunda centrifugação

Tabela 2 – Média (n=3) da concentração plaquetária (plaquetas/ μ L) no PRP em relação ao sangue nos diferentes protocolos testados.

Protocolo	Média $\pm$ Desvio padrão ($10^3/\mu$ L)	Enriquecimento (%)
I	796,667 $\pm$ 185,139	268%
II	904,000 $\pm$ 94,398	318%
III	803,000 $\pm$ 324,344	271%

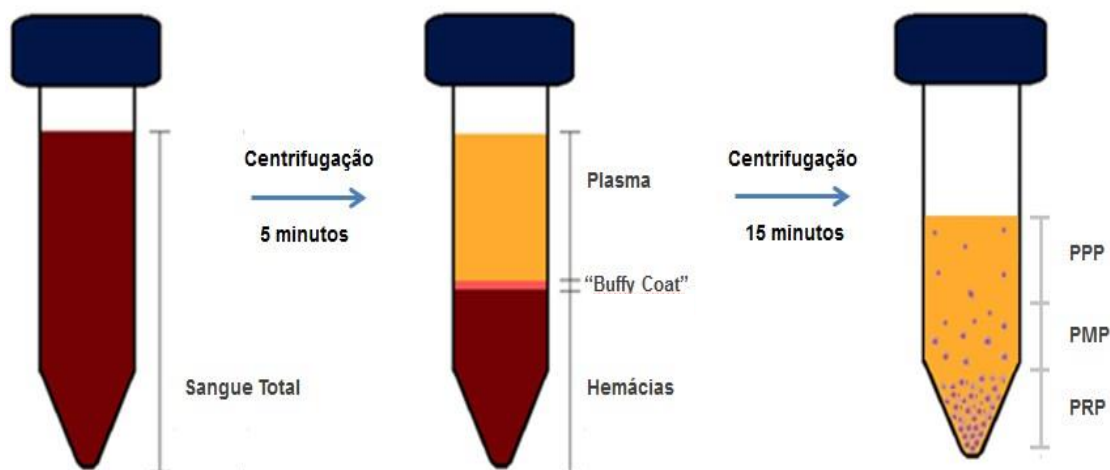


Figura 1 - Processamento da unidade de sangue total para obtenção da fração plasmática. O conteúdo final é dividido em três frações, de acordo com a concentração de plaquetas presentes: a fração pobre em plaquetas (PPP), fração intermediária (PMP) e a fração rica em plaquetas (PRP).

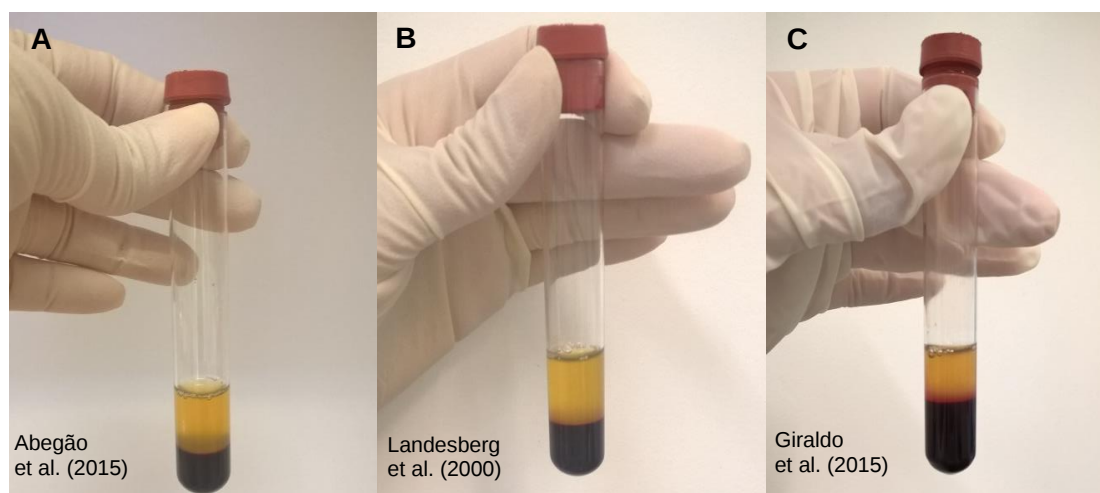


Figura 2 - Separação do plasma após a primeira centrifugação. Da esquerda para direita, protocolo de Abegão et al (2015), Landesberg et al. (2000) e Giraldo et al. (2015), respectivamente.

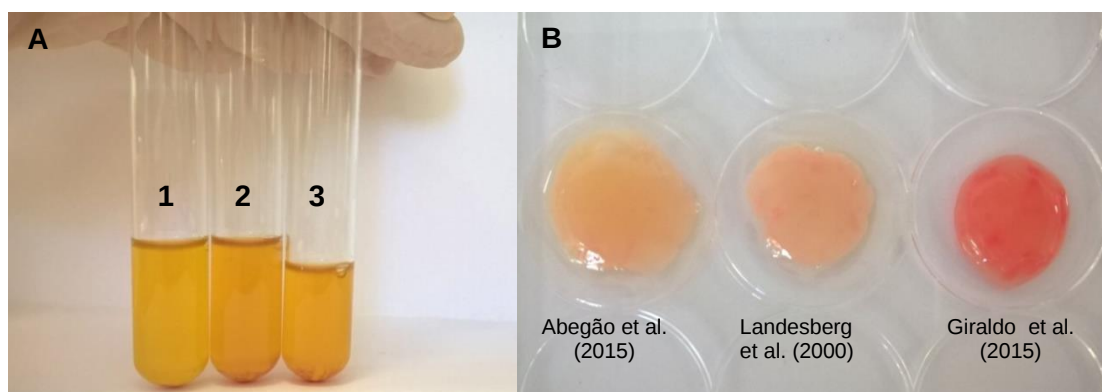


Figura 3 – Obtenção do gel de PRP. (A) Plasma obtido a partir dos protocolos de Abegão et al. (2015) (1), Landesberg et al. (2000) (2) e Giraldo et al. (2015) (3), da esquerda para direita; (B) Gel de PRP formado a partir dos protocolos de Abegão et al (2015), Landesberg et al. (2000) e Giraldo et al

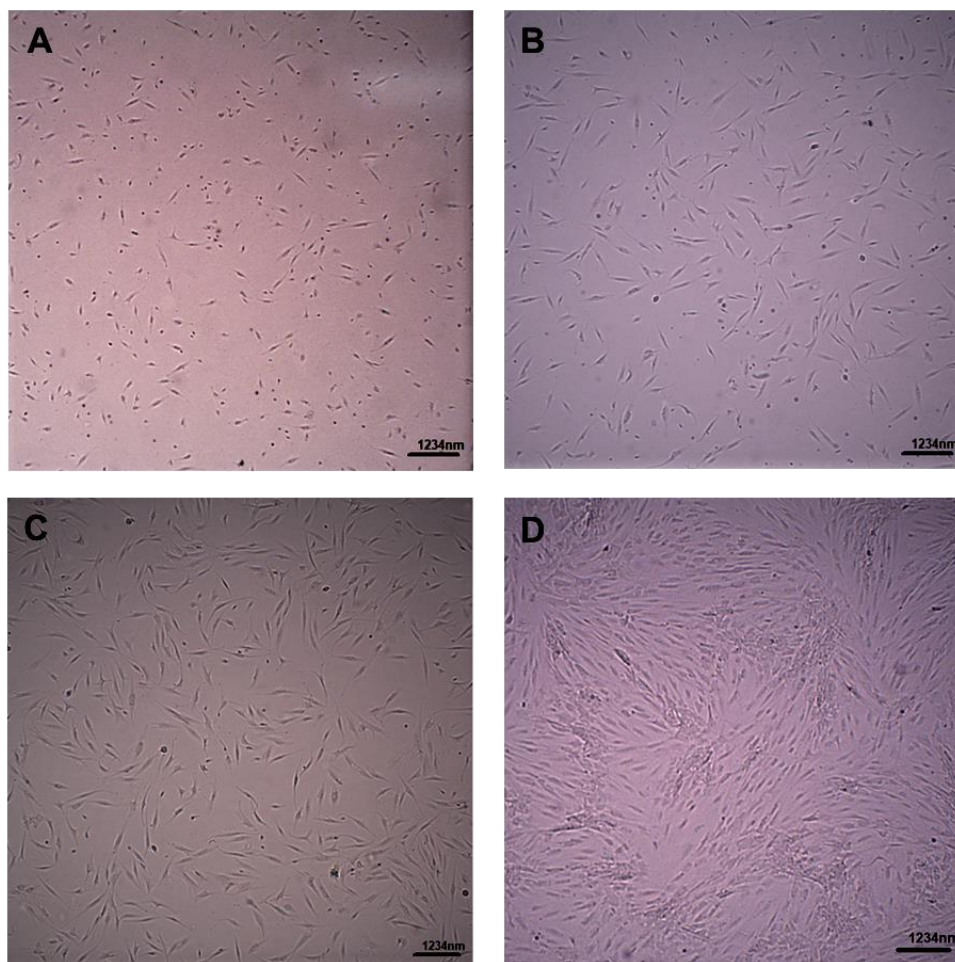


Figura 4 - Cultura primária de CT-TA, (A) após um, (B) dois, (C) três e (D) oito dias, (x40). Barra de escala é 1234 μ m.

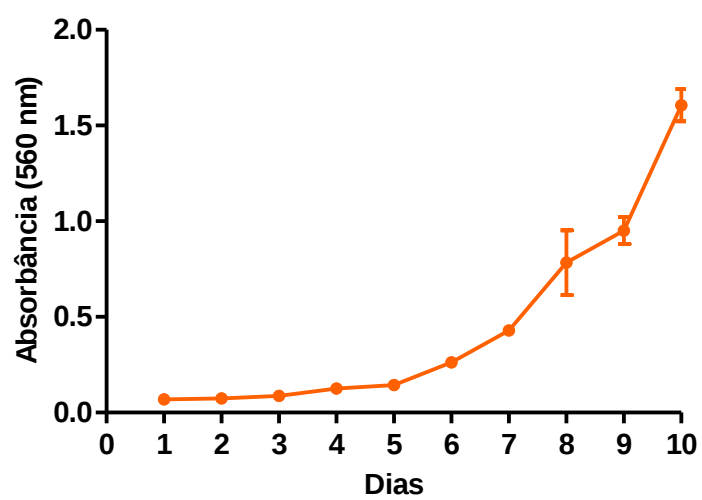


Figura 5 – Curva de proliferação das CT-TA durante o período de 10 dias.

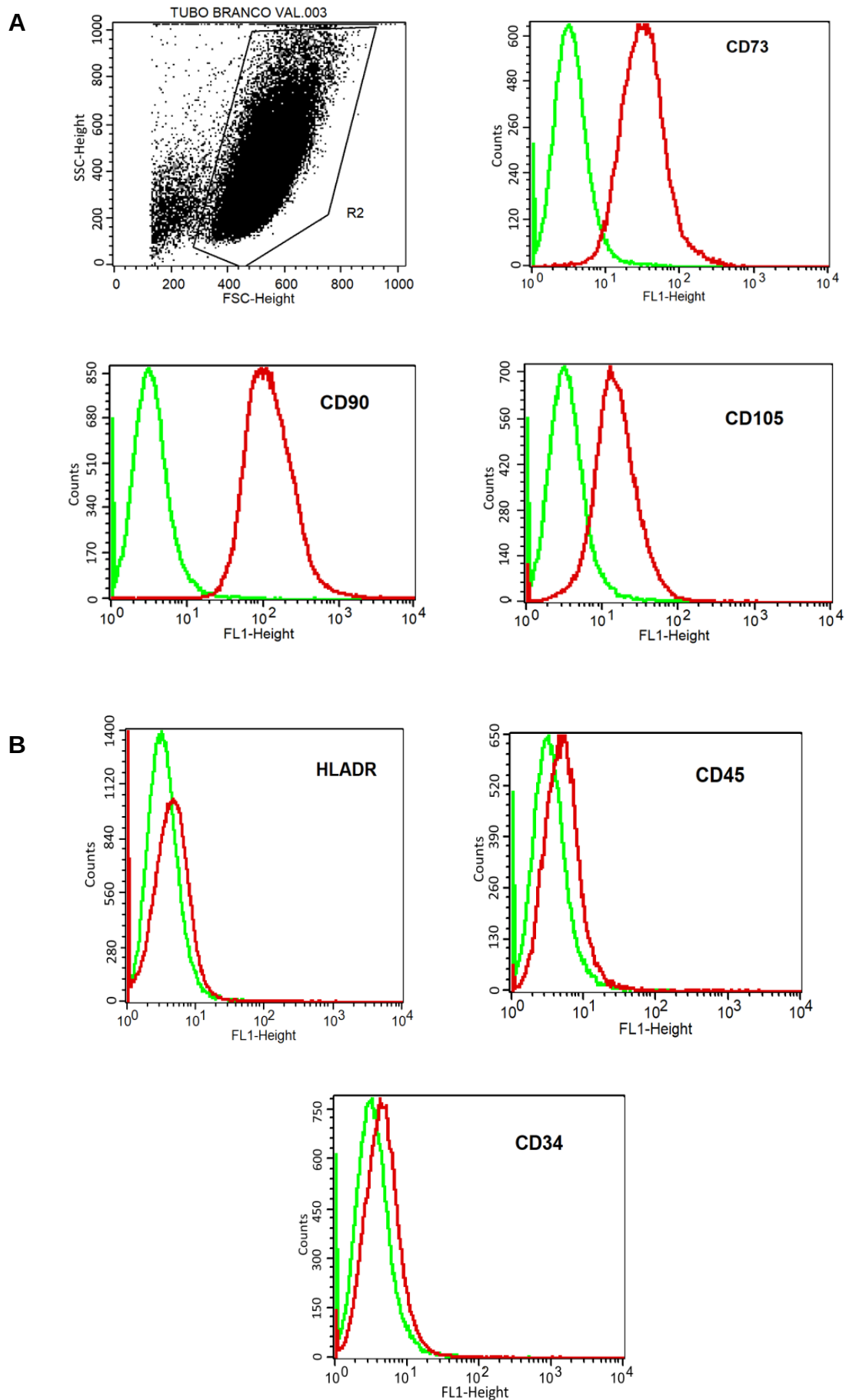


Figura 6 – Caracterização imunofenotípica das CT-TAs por citometria de fluxo. (A) Tubo branco e marcação ($\geq 95\%$) para CD90, CD73 e CD 105, e (B) marcação ($\leq 2\%$) para CD 45, CD34 e HLA-DR.

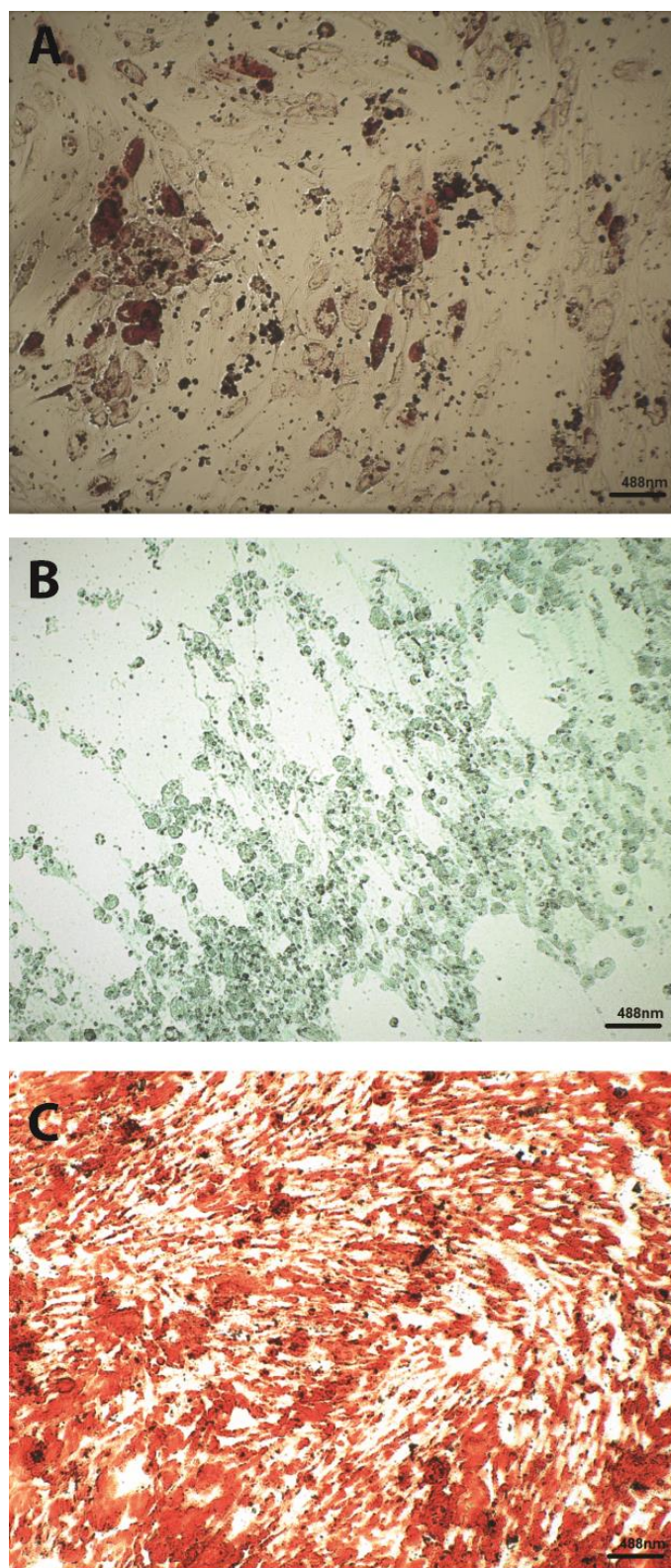


Figura 7 - Diferenciações das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano. (A) Diferenciação adippogênica, corada com Oil Red O, (B) Diferenciação condrogênica, corada com Alcian Blue e (C) Diferenciação osteogênica, corada com Alizarin Red S, (x100). Barra de escala é 488µm.

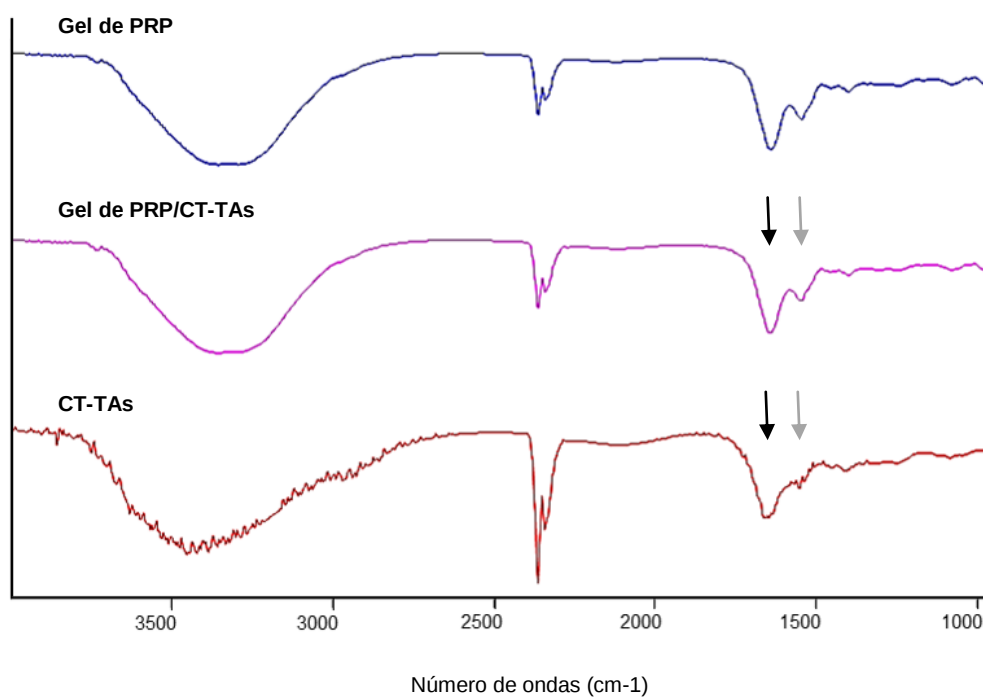


Figura 8 - Espectros FTIR dos géis de PRP, PRP/CT-TA e *pellet* de CT-TAs. O gel de PRP (linha azul) exibiu uma combinação de bandas semelhantes ao gel de PRP/CT-TA (linha roxa). As CT-TA (linha vermelha) e o gel de PRP apresentaram picos próximos atribuídos a amida I (setas pretas) e II (setas cinzas), em 1638-1642 cm⁻¹ e 1543-1548 cm⁻¹, respectivamente.

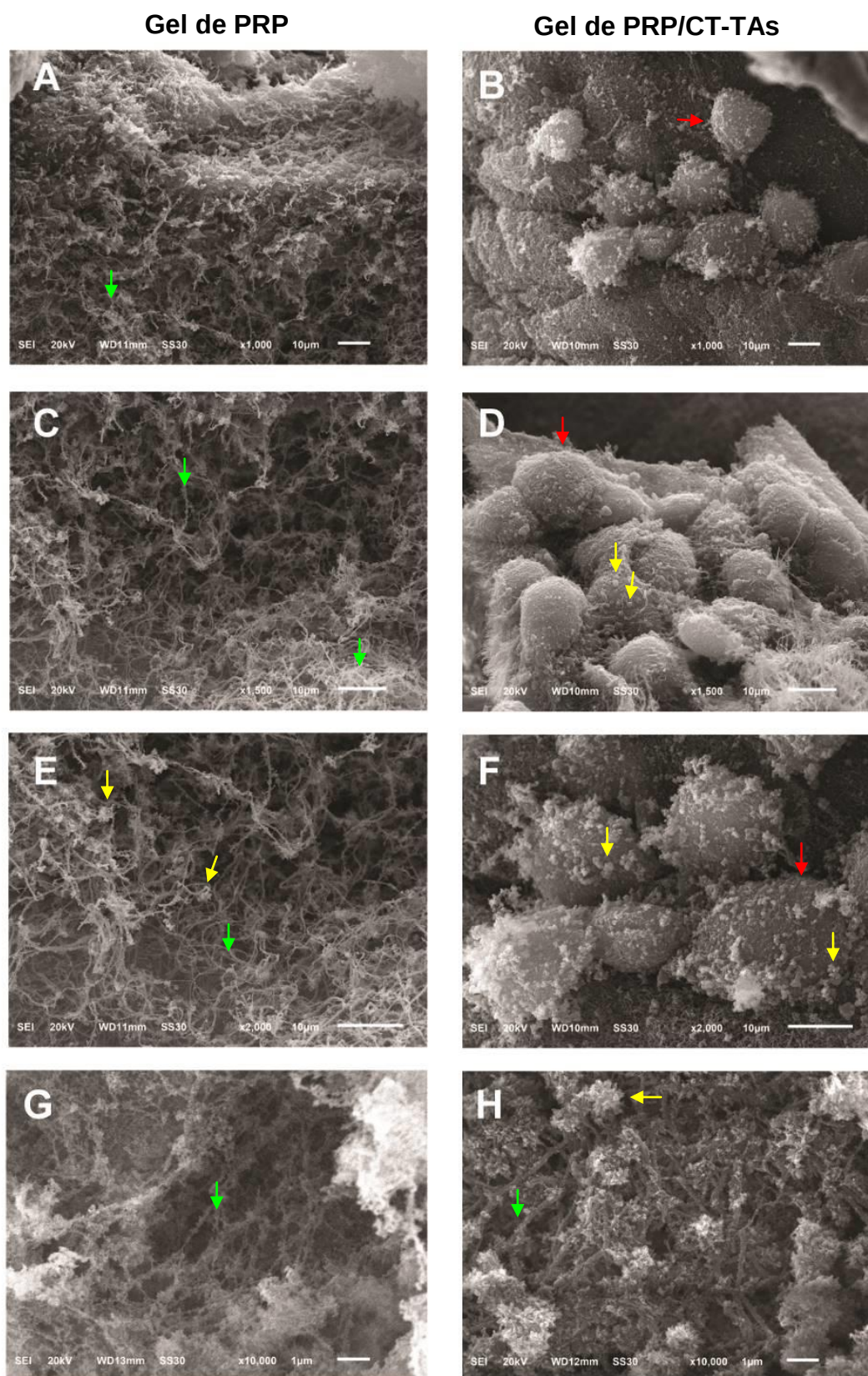


Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura dos géis de PRP isolado e com CT-TA (PRP/CT-TA). A morfologia do gel de PRP é caracterizada pela presença de fibras (setas verdes) e plaquetas (setas amarelas) e, quando em associação com as CT-TAs (setas vermelhas), atuam eficientemente no suporte celular.

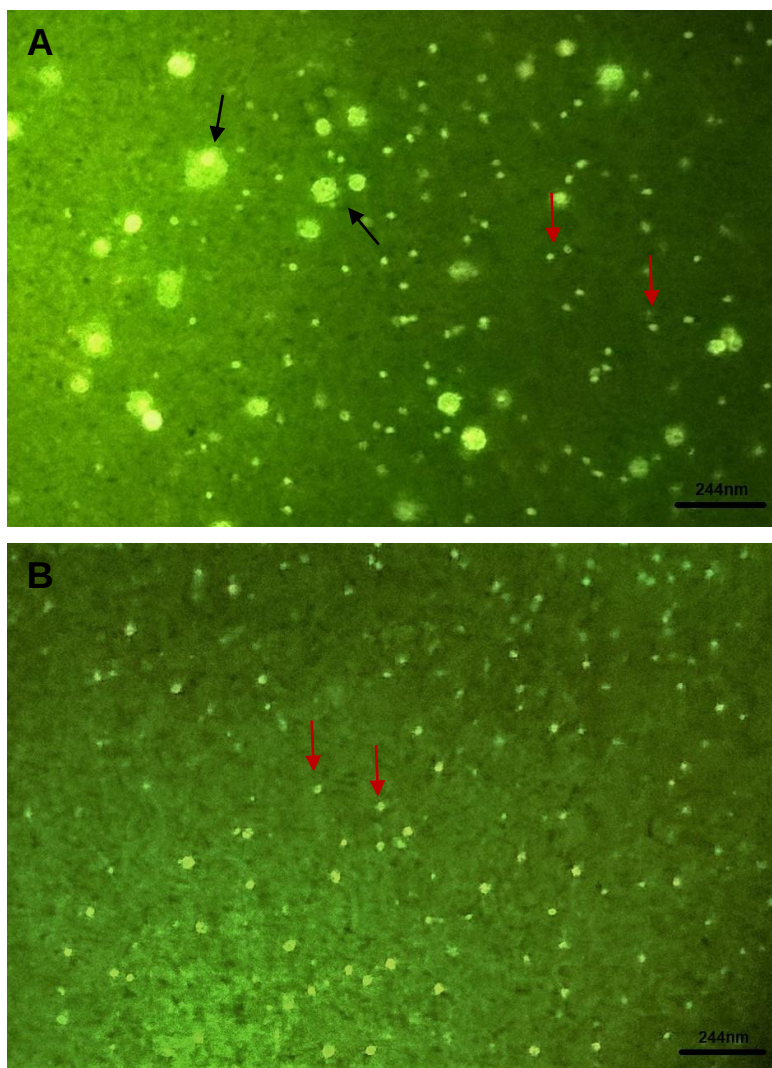


Figura 10 – Microscopia de fluorescência dos géis de PRP e PRP/CT-TAs. (A) Gel de PRP/CT-TAs e (B) Gel de PRP. As plaquetas (setas vermelhas) e as CT-TA (setas pretas) foram marcadas com uma solução de alaranjado de acridina (verdes, células viáveis) e brometo de etídio (vermelhas, células não viáveis).

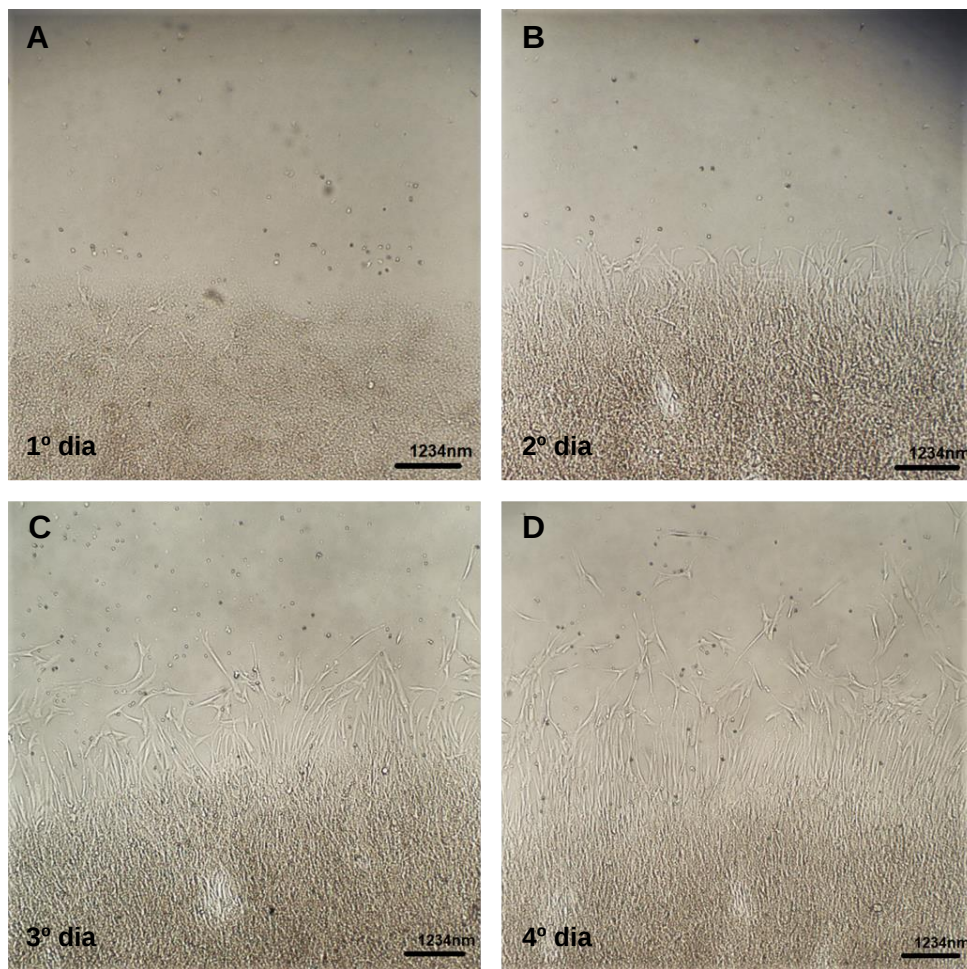


Figura 11 - Migração e proliferação das CT-TA do gel de PRP (40x). Barra de escala é 1234 nm.

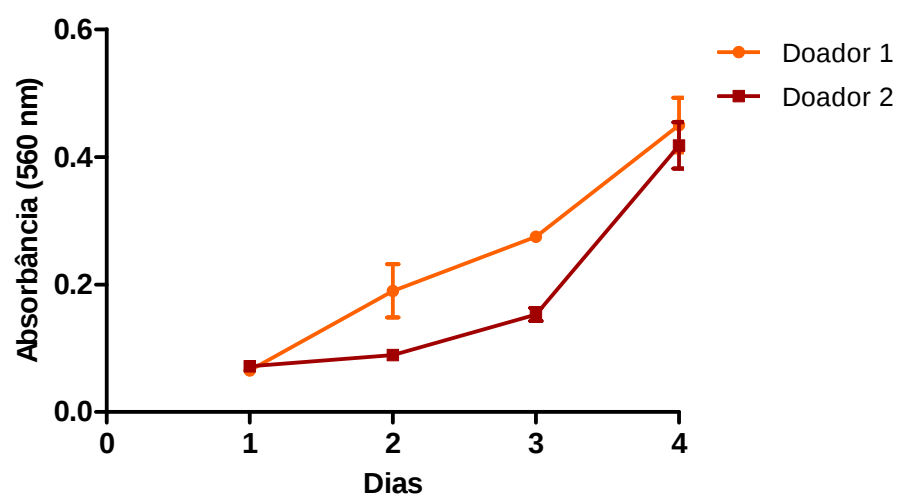


Figura 12 – Curva de proliferação das CT-TA que migraram do gel de PRP.

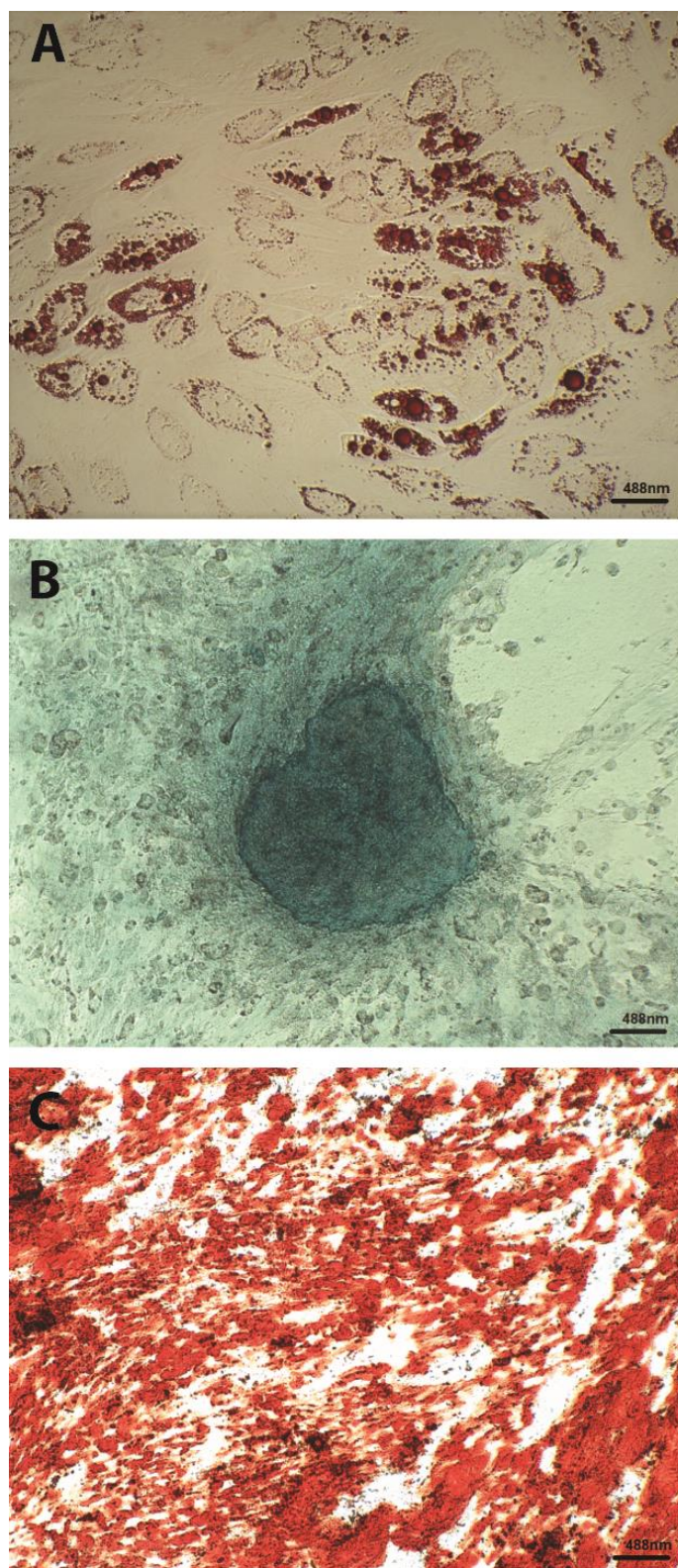


Figura 13 - Diferenciações das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano que migraram do gel de PRP. (A) Diferenciação adippogênica, corada com Oil Red O, (B) Diferenciação condrogênica, corada com Alcian Blue e (C) Diferenciação osteogênica, corada com Alizarin Red S, (x100). Barra de escala é 488µm.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos permitem concluir que baixas forças rotacionais podem ser utilizadas para a obtenção de PRP, resultando em elevada concentração de plaquetas. Os parâmetros metodológicos empregados possibilitam também a obtenção de um gel com propriedades adequadas para atuar como *scaffold* para as CT-TAs. Pode-se, portanto, inferir que o gel de PRP é um biomaterial eficaz no suporte, manutenção e preservação das CT-TAs incorporadas a ele, não apresentando modificações na composição química e na estrutura do gel de PRP, assim como na viabilidade, capacidade de migração, proliferação e potencial de diferenciação das células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-NBAHEEN, M.; VISHNUBALAJI, R.; ALI, D.; BOUSLIMI, A.; AL-JASSIR, F.; MEGGES, M.; PRIGIONE, A.; ADJAYE, J.; KASSEM, M.; ALDAHMAH, A. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 9, p.32–43, 2013.

AMORIN, B.; VALIM, V. S.; LEMOS, N. E.; MORAES JUNIOR, L.; SILVA, A. M. P.; SILVA, M. A. L. Mesenchymal stem cells – characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications. **Revista HCPA**, Porta Alegre, v. 32, n.1, p.71–81, 2012.

ANITUA E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **International journal of Oral and maxillofacial Implants**, v. 14, n.4, p.529–535, 1999.

ARGÔLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; NARDI, N. B.; CHAGASTELLES, P. C.; DE BRITO, A. F. S. S.; REIS, A. M. S. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. **Clinical and experimental dermatology**, v. 37, n.5, p.544–553, 2012.

BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. **Stem Cells International**, p.1–11, 2012.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.

41, n.1, p.27–51, 2005.

BHANOT, S.; ALEX, J. C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. **Facial plastic surgery**, v. 18, n.1, p.27–34, 2002.

BLANTON, M. W.; HADAD, I.; JOHNSTONE, B. H.; MUND, J. A.; ROGERS, P. I.; EPPLEY, B. L.; MARCH, K. L. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization in wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 123, n.2S, p.56S–64S, 2009.

BOURIN, P.; BUNNELL, B. A.; CASTEILLA, L.; DOMINICI, M.; KATZ, A. J.; MARCH, K. L.; REDL, H.; RUBIN, J. P.; YOSHIMURA, K.; GIMBLE, J. M.; Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v. 15, p.641–448, 2013.

BROCCAIOLI, E.; NIADA, S.; RASPERINI, G.; FERREIR, L.M.; ARRIGONI, E.; YENAGI, V.; BRINI, A. T. Mesenchymal stem cells from bichat's fat pad: in vitro comparison with adipose-derived stem cells from subcutaneous tissue. **BioResearch**, v. 2, n.2, p.107–117, 2013.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v31, p.25–35, 2009.

CASTRO, H. C.; FERREIRA, B. L. A.; NAGASHIMA, T.; SCHUELER, A.; RUEFF, C.; CAMISASCA, D.; MOREIRA, G.; SCOVINO, G.; BORGES, L.;

LEAL, M.; PASCHOAL, B.; BERNARDO, V.; BOURGUINHON, S.; RODRIGUES, C. R.; SANTOS, D. O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n.5, p.321–32, 2006.

CENTENO, A. F. T.; ROLDÁN, F. A.; ÁLVAREZ, I. B.; SÁNCHEZ, R. R.; FERNÁNDEZ, C. V. Bioestimulación cutánea con plasma rico en plaquetas autólogo. Estudio controlado con ecografía. **Piel**, v. 28, n.2, p.69–74, 2013.

CONCEIÇÃO, M. L.; ALVARENGA, M. L.; SOUZA, J. B.; MATTOS, L. H. L.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, J. J.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G.. Plasma rico em plaquetas: estudo comparativo entre a dupla centrifugação e o filtro E-PET (Equine Platelet Enhancement Therapy). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.3, p.215-220, 2017.

DHILLON, R. S.; SCHWARZ, E. M.; MALONEY, M. D. Platelet-rich plasma therapy-future or trend?. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n.4, p.219, 2012.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n.4, p.315–7, 2006.

DU, W. J.; CHI, Y.; YANG, Z. X.; LI, Z. J.; CUI, J. J.; SONG, B. Q.; LI, X.; YANG, S. G.; HAN, Z. B.; HAN, Z. C. Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p.163, 2016.

EVERTS, P. A.; KNAPE, J. T.; WEIBRICH, G.; SCHONBERGER, J. P. A. M.;

HOFFMANN, J. J. H. L.; OVERDEVEST, E. P.; BOX, H. A.; VAN ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. **Journal of ExtraCorporeal Technology**, v. 38, p.174–187, 2006.

FERNÁNDEZ-DELGADO, N.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, P.; FORRELLAT-BARRIOS, M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la Medicina Regenerativa. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 28, n.3, p.200–216, 2012.

FERRARI, M.; ZIA, S.; VALBONESI, M.; HENRIQUET, F.; VENERE, G.; SPAGNOLO, S.; GRASSO, M. A.; PANZANI, I. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. **The International journal of Artificial Organs**, v. 10, p.47–50, 1987.

FRANCISCO, J.C. Desenvolvimento de biomaterial a partir de matriz amniótica humana. [tese]. Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. 2013; 100 p.

FRESE, L.; DIJKMAN, P. E.; HOERSTRUP, S. P. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.23, p.268-274, 2016.

GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation research**, v 100, n.9, p.1249–1260, 2007.

GREENWOOD, H. L.; SINGER, P. A.; DOWNEY, G. P.; MARTIN, D. K.; THORSTEINSDÓTTIR, H.; DAAR, A. S. Regenerative Medicine and the

developing world, **PLOS Medicine**, v. 3, n.9, p.1496–1500, 2006.

HUBER, S. C.; JÚNIOR, J. L. R. C.; MONTALVÃO, S.; DA SILVA, L. Q.; PAFFARO, A. U.; DA SILVA, F. A. R.; RODRIGUES, B. L.; LANA, J. F. S. D.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. In vitro study of the role of thrombin in platelet rich plasma (PRP) preparation: utility for gel formation and impact in growth factors release. **Journal of stem cells & regenerative medicine**, v. 12, n.1, p.2, 2016.

KAVIANI, R.; JALILI, R. B. Application of adipose derived stem cells for treatment of chronic wounds. **Investigative Dermatology and Venereology Research**, v.2, n.1, p.44- 51, 2016.

Kim E. Y.; Lee K-B.; Kim M. K. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. **Biochemistry and Molecular Biology**, v.47, p. 135–140, 2014.

KNIGHTON, D. R.; CIRESI, K. F.; FIEGEL, V. D.; AUSTIN, L. L.; BUTLER, E. L.; Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). **Annals of surgery**, v. 204, n.3, p.322, 1986.

KONTOPODIS N.; TAVLAS E.; PAPADOPOULOS G.; PANTIDIS D.; KAFETZAKIS A.; CHALKIADAKIS G.; IOANNOU CE. Effectiveness of platelet - rich plasma to enhance healing of diabetic foot ulcers in patients with concomitant peripheral arterial disease and critical limb ischemia. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 15, n.1, p.45-51, 2016.

LIU, J.; YU, F.; SUN, Y.; JIANG, B.; ZHANG, W.; YANG, J.; XU, G-T.; LIANG, A.; LIU, S. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells** v.33, p. 627-638, 2015.

MARQUES, L. F.; STESSUK, T.; CAMARGO, I. C. C.; SABEH JUNIOR, N.; SANTOS, L.; RIBEIRO-PAES, J. T. Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. *Platelets* 2015; 26(2): 101-113.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 85, n.6, p.638–646, 1998.

MASON, C.; PETER, D. A brief definition of regenerative medicine. **Regenerative Medicine**, v. 3, p.1–5, 2008.

MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A. C. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. **Stem Cells**, v. 30, n.5, p.804–810, 2012.

MONTEIRO, M. R. Plasma rico em plaquetas em dermatologia. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 5, n.2, p.155–159, 2013.

MONTERO, E. C.; SANTOS, M. F.; FERNÁNDEZ, R. S. Plasma rico en plaquetas: aplicaciones en dermatología. **Actas dermo-sifiliográficas**, v. 106, n.2, p.104–111, 2015.

OLIVEIRA, L. S. D. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P.

Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e biológicas**, v. 9, n.1, p.37–44, 2010.

OLIVEIRA, M. P. **Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana** [dissertação]. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2009. 71p.

PEREZ, A. G. M. Preparação, modulação, encapsulação e liberação controlada de plasma rico em plaquetas para aplicação em terapia regenerativa [tese]. Universidade Estadual de Campinas, 2013; 232 p.

PICARD, F.; HERSANT, B.; BOSC, R.; MENINGAUD, J. P. The growing evidence for the use of platelet-rich plasma on diabetic chronic wounds: A review and a proposal for a new standard care. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n.5, p.638–643, 2015.

PINTO, J. M. N.; PIZANI, N. S. Aplicabilidade em dermatologia do plasma rico em plaquetas. **Surgical And Cosmetic Dermatology**, v. 7, n.1, p.61–64, 2015.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n.7, p.957–971, 2015.

SÄNCHEZ, A. R; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.18, n.1, p.93-103, 2003.

SÁNCHEZ, M.; ANDIA, I.; ANITUA, E.; SÁNCHEZ, P. Platelet rich plasma (PRP) biotechnology: Concepts and therapeutic applications in orthopedics and

sports medicine. **InTech**, p.113–138, 2012.

SCHALLMOSER, K.; ROHDE, E.; BARTMANN, C.; OBENAUF, A. C.; REINISCH, A.; STRUNK, D. Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. **Bio-medical materials and engineering**, v. 19, n.4-5, p.271–276, 2009.

SHI, M.; LIU, Z. W.; WANG, F. S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 164, n.1, p.1–8, 2011.

SHI, Y.; NIEDZINSKI, J. R.; SAMANIEGO, A.; BOGDANSKY, S.; ATKINSON, B. L. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. **Tissue Engineering**, v. 18, n.13-14, p.1313–1321, 2012.

SILVA-MEIRELLES, L.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T.; CAPLAN, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n.5, p.419–427, 2009.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **New England journal of medicine**, v. 341, n.10, p.738–746, 1999.

STESSUK, T. Terapia celular em úlceras crônicas com implante de células tronco mesenquimais associadas a plasma rico em plaquetas [tese]. Universidade de São Paulo, 2016; 142 p.

SUZUKI, E.; FUJITA, D.; TAKAHASHI, M.; OBA, S.; NISHIMATSU, H. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease.

Journal of Cardiology, v. 7, n. 8, p.454–65, 2015.

TURRER, C.; FERREIRA, F. Biomateriais em Cirurgia Craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações-revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n.3, p.234–239, 2008.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n.9, p.726–736, 2008.

VANAT, N.; MEDEIROS, T. N. S.; BALARIN, M. R. S.; PEREIRA, P. M.; DE BIASI, F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n.1, p.313–321, 2012.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n.1, p.24–28, 2006.

Zuttion, M. S. S. R.; Cristiane, V.W.; Pedro, A. L.; Celso, T.; Irina, K. Adipose tissue-derived stem cells and the importance of animal model standardization for pre-clinical trials. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 21, p.2179-2186, 2013.

ZHU, Y.; YUAN, M.; MENG, H. Y.; WANG, A. Y.; GUO, Q. Y.; WANG, Y.; PENG, J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n.11, p.1627–1637, 2013.

ANEXO

Instructions for Authors

Platelets considers all manuscripts of relevance to platelets and megakaryocytes at the Editors' discretion; the Editors' decision is final.

Platelets considers all manuscripts on the strict condition that they are the property (copyright) of the submitting author(s), have been submitted only to **Platelets**, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication, nor in press elsewhere. Authors who fail to adhere to this condition will be charged all costs which **Platelets** incurs, and their papers will not be published. Copyright will be transferred to the journal **Platelets** and Taylor and Francis, if the paper is accepted.

Editors-in-Chief:

Paul Harrison

Institute for Inflammation and Ageing, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, UK. Tel: (+44) 121 371 325. Fax: (+44) 121 371 23203, p.harrison.1@bham.ac.uk

Steve P Watson

Institute for Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, UK. Tel: (+44) 121 414 6514. Fax: (+44) 121 415 8817, s.p.watson@bham.ac.uk

Reviews Editor:

Matthew Harper

University of Cambridge, Department of Pharmacology, Tennis Court Road Cambridge CB2 1PD, United Kingdom. Tel: (+44) 1223 3 34032 / Lab: 3 34024, Email: mth29@cam.ac.uk

Systematic Reviews Editor:

Marie Lordkipanidzé

Montreal Heart Institute, Research center, 5000 rue Belanger Montreal, Qc, H1T 1C8, Canada. Tel: (+1) 514-376-3330 poste 2694, Email: marie.lordkipanidze@umontreal.ca

Methods Section Editors:

Elizabeth Gardiner

The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, GPO Box 334 Canberra City ACT 2600, Australia. Tel: (+61) 2 612 58523, Email: elizabeth.gardiner@anu.edu.au

Article Types

Platelets publishes **original articles, fast-track articles, review articles, methods, shortcommunications, case reports, opinion articles** and **letters to the editor**. Suggestions for review articles should be emailed to the Review Editor or the Editors in Chief.

General Guidelines

Please write clearly and concisely, stating your objectives clearly and defining your terms. Your arguments should be substantiated with well-reasoned supporting evidence.

In writing your paper, you are encouraged to review articles in the area you are addressing which have been previously published in the Journal and where you feel appropriate, to reference them. This will enhance context, coherence, and continuity for our readers.

Authors should include telephone and fax numbers as well as e-mail addresses on the cover page of manuscripts.

Articles should be written in English. Authors whose native language is not English are requested to have their manuscript checked for linguistic correctness before submission. For a list of resources we recommend for language editing please [click here](#).

Submissions should include, where appropriate, a formal statement that ethical consent for the work to be carried out has been given.

Submission Guidelines

All submissions should be made online at **Platelets** ScholarOne Manuscripts site: <http://mc.manuscriptcentral.com/cpla>

New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Centre. If you are a new author but have previously reviewed for the Journal through the online system, you should use your existing reviewer username and password to log in as an author.

If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the 'get help now' link.

Hard copies of micrographs may be mailed to the Editor, provided they are labeled appropriately.

Publishing Ethics

The Editors and Taylor & Francis Group are committed to the highest academic, professional, legal, and ethical standards in publishing work in this journal. To this end, we have adopted a [set of guidelines](#), to which all submitting authors are expected to adhere, to assure integrity and ethical publishing for authors, reviewers, and editors.

Taylor & Francis is a member of the Committee of Publications Ethics (COPE). COPE aims to provide a forum for publishers and editors of scientific journals to discuss issues relating to the integrity of their work, including conflicts of interest, falsification and fabrication of data, plagiarism, unethical experimentation, inadequate subject consent, and authorship disputes. For more information on COPE please visit <http://publicationethics.org>.

Preparation of Manuscripts

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). All manuscripts must be typed in 12pt font and in double space with margins of at least 2.5 cm. Charts and tables are considered textual and should also be supplied in a format compatible with

Microsoft Word. All figures (illustrations, diagrams, photographs) need to be submitted as separate files in jpg, tiff or eps format.

References should be given in Council of Science Editors (CSE) Citation & Sequence format (see References section for examples).

Original Articles

Manuscripts should be divided into sections with the headings: Title page, Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Declaration of Interest statement, References, Tables and Figures. A Conclusion section is optional. Each section should begin on a new sheet and be identified with the shoulder heading. Other subsection headings within the main headings may be used but should be limited.

Word Count for Original Articles and Reviews: normally 4000 words excluding the title page, abstract, references, figures, tables and their legends, but flexibility may be applied at the discretion of the Editor.

Fast-Track Articles

Platelets will consider articles of high interest for fast-track publication in the next available issue. The fast-track articles will be handled within 10 working days and should be formatted as per the guidelines of a normal manuscript.

All research studies that prospectively allocate human participants to a health-related intervention (particularly pharmaceutical-, device- or nutrition-related interventions) are considered to be a clinical trial. All clinical trials must be prospectively registered in a recognised public registry of clinical trials, such as [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), before enrolment has commenced. The manuscript should include the name of the registry and the registration number. All manuscripts relating to clinical trials should be reported according to CONSORT guidelines.

Systematic Reviews

Platelets uses the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines as a basis for systematic reviews. Please refer to <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/Default.aspx> for details on the PRISMA guidelines. The PRISMA checklist is available at: <http://www.prismastatement.org/PRISMAStatement/Checklist.aspx>.

Accordingly, we expect that all systematic reviews be registered in an internationally recognized database (e.g. PROSPERO –The International Prospective Register of Ongoing Systematic Reviews).

Title Page

A title page should be provided comprising the article title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person. A short title not exceeding 50 characters (including spaces) and Keywords (2-6) should also be included on the title page. The keywords will assist indexers in cross indexing your article.

Abstract

Authors submitting papers should note that abstracts (unstructured and between 150-400 words) are required. These should outline the questions investigated, the design, essential findings and main conclusions of the study.

Acknowledgments and Declaration of Interests

Acknowledgments and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgments section details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for authorship should also be acknowledged here. Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable.

Acknowledgments section

Anyacknowledgments authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes.

Declaration of Interest section

All declarations of interest must be outlined under the subheading "Declaration of interest". If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: *The authors report no declarations of interest*. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the "Declaration of interest" field is compulsory authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement.

References

References should follow the Council of Science Editors (CSE) Citation & Sequence format. Only works actually cited in the text should be included in the references. Indicate in the text with Arabic numbers inside square brackets. Spelling in the reference list should follow the original. References should then be listed in numerical order at the end of the article.

Examples are provided as follows:

Journal article: [1] Steiner U, Klein J, Eiser E, Budkowski A, Fetters LJ. Complete wetting from polymer mixtures. *Science* 1992;258:1122-1129.

Book chapter: [2] Kuret JA, Murad F. Adenohypophyseal hormones and related substances. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th ed. New York: Pergamon; 1990. p. 1334-1360.

Conference proceedings: [3] Irvin AD, Cunningham MP, Young AS, editors. *Advances in the control of Theileriosis*. International Conference held at the International Laboratory for Research on Animal Diseases; 1981 Feb 9-13; Nairobi. Boston: Martinus Nijhoff Publishers; 1981. 427 p.

Dissertations or Thesis: [4] Mangle ED. A comparative study of the perceptions of illness in New Kingdom Egypt and Mesopotamia of the early first millennium [dissertation]. Akron (OH): University of Akron; 1991. 160 p. Available from: University Microfilms, Ann Arbor MI; AAG9203425.

Journal Article on internet: [5] Loker WM. "Campesinos" and the crisis of modernization in Latin America. *Jour of Pol Ecol* [serial online] 1996; 3(1). Available: http://www.library.arizona.edu/ej/jpe/volume_3/ascii-lokeriso.txt via the INTERNET. Accessed 1996 Aug 11.

Webpage: [6] *British Medical Journal* [Internet]. Stanford, CA: Stanford, CA: Stanford Univ; 2004 July 10- [cited 2004 Aug 12]; Available from: <http://bmj.bmjjournals.com/>

Internet databases: [7] *Prevention News Update Database* [Internet]. Rockville (MD): Centers for Disease Control and Prevention (US), National Prevention Information Network. 1988 Jun - [cited 2001 Apr 12]. Available from: <http://www.cdcnpin.org/>

Further examples and information can be found in *The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Seventh Edition. Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Method Section Articles

Platelets now publishes papers that describe new methods that are specifically for platelet research conducted in vitro and in vivo. Major methodological improvements or important refinements of established platelet-specific haemostasis methods are also considered for publication. The Journal's Scope includes all aspects of contemporary platelet research, including quantitative, biochemical, cellular, computational, molecular, invasive and non-invasive imaging, genetic and physiological research approaches. The Journal welcomes early applications of new analytical methods and approaches with clear impact on platelet research.

Manuscripts should be 3000 words or less, up to 4 figures and/or tables and with no more than 40 references. Longer manuscripts are acceptable at the discretion of the editor. The structure should follow the format: Title, Abstract, Method (including validation), Discussion, Conclusions, References and Figures/Tables; and the title page must include "Method Article". The method should be described clearly with sufficient detail to allow repetition by a skilled operator. Any unusual hazards relating to the chemicals, procedures or non-standard equipment should be clearly identified. The accuracy of primary measurements should be stated. The results should be organised into an orderly and logical sequence and only the most relevant results should be described in the text; to highlight the most important points. The conclusions should

interpret the key results and highlight the novelty and significance of the work. A Declaration of Interest should be included in the manuscript.

Case Reports

These should follow the guidelines for original articles or short communications.

Short Communications

1. Follow general formatting instructions above.
2. Normally 1200 words including references, but flexibility may be applied at the discretion of the Editor.
3. Up to 2 figures or tables are permitted.

Letters to the Editor

Letters may be on any topic of interest to readers of the journal but a particular use of a letter is in addressing points arising from papers recently published in *Platelets*, providing evidence to confirm or refute the work described in the paper in question. Authors of the original paper would be allowed the opportunity to comment on the contents of the letter.

1. Normally up to 1,200 words including references, but flexibility may be applied at the discretion of the Editor.
2. 1 figure or table is permitted.

Opinion articles

Opinion articles are short discussions of current controversies in the field. They are up to 2,500 words in length and are subject to peer review. They can have up to four figures. Authors who wish to submit an opinion article should first send an e-mail to the Editors to provide the outline of the article and why they feel it is suitable for discussion in this format. On acceptance, they are published in the next available edition of the journal.

Tables and Figures:

Tables and figures should not be embedded in the text, but should be included as separate sheets or files. A short descriptive title should appear above each table with a

clear legend and any footnotes suitably identified below. All units must be included. Figures should be completely labeled, taking into account necessary size reduction.

Captions should be typed, double-spaced, on a separate sheet. All original figures should be clearly marked with the number, author's name, and top edge indicated.

Illustrations:

Illustrations submitted (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be clean originals or digital files. Digital files are recommended for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- sized to fit on journal page
- EPS, TIFF, or PSD format only
- submitted as separate files, not embedded in text files

Color Reproduction:

Color art will be reproduced in color in the online publication at no additional cost to the author. Color illustrations will also be considered for print publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in color art reproduction.

Please note that color reprints can only be ordered if print reproduction costs are paid. Print Rates: \$900 for the first page of color; \$450 per page for the next three pages of color. A custom quote will be provided for articles with more than four pages of color. Art not supplied at a minimum of 300 dpi will not be considered for print.

Disclaimer

Taylor and Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in its publications. However, Taylor and Francis and its agents and licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content and disclaim all such representations and warranties whether express or implied to the maximum extent permitted by law. Any views expressed in the Journal are the views of the authors and are not the views of Taylor and Francis.

Page Proofs:

All proofs must be corrected and returned to the publisher within 48 hours of receipt. If the manuscript is not returned within the allotted time, the editor will proofread the article and it will be printed per the editor's instruction. Only correction of typographical errors is permitted.

Complimentary Policy and Reprints:

Authors for whom we receive a valid email address will be provided an opportunity to purchase reprints of individual articles, or copies of the complete print issue. These authors will also be given complimentary access to their final article on *Taylor & Francis Online*.