



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Isabele Silveira Rosa Vanni

**Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades dos
Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela técnica de
Lisado Plaquetário**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

**Botucatu
2016**

Isabele Silveira Rosa Vanni

Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades
dos Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela
técnica de Lisado Plaquetário

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica), linha de
pesquisa: Hemoterapia.

Orientadora: Profa.Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2016

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

Vanni, Isabele Silveira Rosa.

Obtenção, indicadores de qualidade e propriedades dos hormônios derivados de plaquetas humanas pela técnica de Lisado Plaquetário / Isabele Silveira Rosa Vanni. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Elenice Deffune

Capes: 20601000

1. Medicina regenerativa. 2. Plasma Rico em Plaquetas. 3. Plaquetas. 4. Pesquisa bibliográfica. 5. Revisão.

Palavras-chave: Medicina regenerativa; Plaquetas; Plasma Rico em Plaquetas.

Isabele Silveira Rosa Vanni

**Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades dos
Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela técnica de
Lisado Plaquetário**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestra.

Orientador: Prof(a). Dr(a) Elenie Deffune

Comissão examinadora

Profa. Dra. Elenie Deffune
Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp

Prof. Dr. Matheus Bertanha
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Prof. Dr. Marcus Vinícius Danieli
Depto. De Ortopedia Santa Casa de Londrina

Botucatu, 18 de Julho de 2016.

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, que me concede o dom da vida, que nos capacita e nos fortalece dia a dia. Dedico ao meu marido, Vitor, ao meu filho que está a caminho João Vitor, e aos meus pais Marcos e Cleonira.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela Sua eterna graça que nos faz respirar todos os dias, nos ama simplesmente sem pedir nada em troca, pelo conforto da sua palavra que diz: “Que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que ama a Deus.” Romanos 8:28a

Agradeço ao meu marido Vitor pelo incentivo, força e principalmente pelo seu amor, por seu sorriso todas as manhãs. Por nunca me deixar desanimar e me ajudar nessa fase final para logo recebermos o maior presente na nossa casa, o João Vitor.

Agradeço aos meus pais Marcos e Cleonira, pelo amor e instrução deixados para uma vida toda. Obrigado pelo incentivo e orgulho, pois essa defesa é muito mais que um sonho meu, mas deles também. Agradeço as minhas irmãs Mayra e Aline pelos momentos de risadas em família e incentivos depositados a mim.

Agradeço a Dra. Elenice por sempre acreditar em mim, acreditar nos sonhos, jamais desistir e ser grande exemplo profissional e familiar. Obrigada também pela ajuda durante todo o trabalho principalmente nos momentos finais que foram mais que essenciais.

Agradeço as meninas do Laboratório de Engenharia Celular, Monique, Helô, Mari, Ana Lívia, Helga, a Ju Campos e as outras meninas que ajudaram nas fases finais colaborando imensamente, sem a ajuda delas esse trabalho não estaria completo. Também agradeço a Ondina que ajudou grandemente.

Agradeço a Agência Transfusional e a Patrícia, por sempre colaborar com a escala de trabalho, com o horário e com o incentivo para que todos continuem estudando e crescendo profissionalmente

Agradeço a Profa. Dra. Valeria Sandrin pela colaboração com o trabalho, pela parceria e pela ajuda da Lilian que me ajudou em alguns procedimentos e colaborou imensamente.

Agradeço aos Doadores de Sangue.

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Simões da FCA-UNESP, pela grande colaboração na parte estatísticas desse trabalho.

“Confia no Senhor e faze o bem, habita na terra e alimenta-se da verdade. Agrada-te no Senhor e Ele satisfará os desejos do seu coração. Entrega teu caminho ao Senhor, confia nele, e o mais ele fará.”
Salmo 37:3-5

RESUMO

VANNI, I.S.R. **Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades dos Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela técnica de Lisado Plaquetário.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Muitas especialidades médicas têm utilizado o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em diferentes modalidades terapêuticas, como está ocorrendo com a Ortopedia e em Cirurgia Plástica. No entanto, a denominação utilizada para o PRP é muitas vezes equivocada. Diante do crescente número de especialidades médicas usando PRP ou Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP) este trabalho foi delineado. **Objetivo:** compreende três etapas: 1) Levantamento bibliográfico em base de dados com a palavra-chave: *platelet rich plasma* com intuito de avaliar criticamente os artigos publicados na literatura em revistas com Fator de Impacto (FI) ≥ 1 ; 2) Obter PRP, Concentrado de Plaquetas (CP) e HDP de indivíduos saudáveis, pela técnica de lisado plaquetário, após a utilização de agonista e congelamento / descongelamento (N=10) e 3) Avaliar o desempenho destes preparados como substituto do Soro Fetal Bovino na cultura de Células Tronco Mesenquimais humanas (CTMh). **Casuística e Métodos:** Os indicadores monitorados foram: idade, sexo, tipagem ABO/RhD, fenotipagem eritrocitária Rh, Kell e determinação de fatores de crescimento pelo sistema Multiplex-Milliplex®: PDGF- AA, RANTES/CCL5, PAI-1 (total), VEGF-A, FGF-1/FGF-ácido, FGF-2/FGF-básico, EGF, Angiopoietina-2, Fibrinogênio e Fator von Willebrand, estes dosados nas 3 preparações: PRP, CP e HDP. Todos os indicadores monitorados foram realizados análise estatística. **Resultados:** Foram analisados 50 artigos entre 2012-2016, destes, 29 com a palavra-chave *platelet-rich plasma*, 14 *platelet lysate (PL)* e 7 *platelet growth factor (PGF)*. Os artigos publicados com a palavra-chave PL são de periódicos com maior FI e maior coerência com a metodologia, seguida do PGF e PRP. Constatou-se que a maioria dos trabalhos com a terminologia PRP foi empregada de forma equivocada. Estes indicadores registram que não existe correlação entre a contagem plaquetária e a dosagem de hormônios. A idade dos indivíduos está inversamente relacionada com a concentração de fator, à exceção do FGF. Não há correlação da quantidade de fatores de crescimento e sexo. Indivíduos do grupo sanguíneo A, e fenótipo ee são melhores secretores de hormônios de crescimento. Quando se comparam os 3 métodos analisados, o CP e o HDP são estatisticamente superiores ao PRP quanto à dosagem de fatores de crescimento. A análise desempenho dos preparados, na concentração de 20% quando comparado com o Soro Fetal Bovino na mesma concentração, identifica que o melhor desempenho quantitativamente foi CP>PRP>HDP=CTLE. No entanto a análise histológica evidencia um grande número de células aderidas ao *scaffold* de fibrina, com desempenho nitidamente superior para o HDP. **Conclusão:** A maioria dos trabalhos publicados usa a terminologia PRP incorretamente. Levando-se em consideração a quantificação dos hormônios plaquetários dosados e o desempenho em cultura celular as melhores técnicas são CP e HDP, ficando o PRP em desvantagem.

Palavras chave: Medicina Regenerativa, Plasma Rico em Plaquetas, Plaquetas, Pesquisa bibliográfica, Revisão.

ABSTRACT

VANNI, I.S.R. **Obtaining Quality Indicators and Properties of Hormone Derivatives Human Platelet the technique of Platelet Lysate.** Thesis (MS) – Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Diversity medical specialties have been using Platelet Rich Plasma (PRP) therapy form as is happening with the Orthopedics and Plastic Surgery. However, the name used for the PRP is often used wrongly. This work was outlined considering the growing number of medical specialties using PRP or platelet-derived hormones (PDH).

Objective: The work consisted of three steps: 1) Bibliographic search with the key word PRP in order to evaluate the articles published in journals with Impact Factor (IF) ≥ 1 ; 2) obtaining of PRP, platelet concentrate (PC) and PDH from healthy individuals using the platelet lysate technique after use agonist and freeze / thaw (N = 10); 3) evaluate the performance of these preparations as substitute for fetal bovine serum in culture of human mesenchymal stem cells. **Methods:** The indicators monitored were: age, sex, ABO / RhD, erythrocyte phenotyping Rh, Kell and determination of growth factors by Multiplex-Milliplex® system (PDGF-AA, RANTES / CCL5, PAI-1 (total), VEGF-A, FGF-1 / FGF-acid, FGF-2 / FGF-basic, EGF, Angiopoietin-2, fibrinogen and Factor von Willebrand. The monitored indicators were performed statistical analysis.

Results: These parameters were measured in three preparations: PRP, PC and PDH. It was analyzed 50 articles between 2012-2016, of these, 29 with the platelet-rich plasma password, 14 platelet lysate (PL) 7 and platelet growth factor (PGF). Articles published with the keyword PL are journals with higher IF and greater consistency with the methodology followed by PGF and last PRP. It was observed that most of the work with the PRP terminology was used wrongly. These indicators showed that there is no correlation between the platelet count and the dosage of hormones. The age of individuals is inversely related with the concentration of factors, excepting FGF. There is no correlation between the amount of growth factors and gender. Individuals belonging to blood group A and no phenotype E are better secreting of growth hormones. When comparing the three methods analyzed, PC and PDH are statistically higher than PRP on the dosage of growth factors. Compared with 20% of Fetal Bovine Serum, the performance was quantitatively better to PC > PRP > CTL = PDH on the viability of suspension cell. However, the histological analysis showed a large number of cells attached to the fibrin scaffold with higher performance to the PDH. **Conclusion:** The majority of published studies using PRP terminology are incorrectly. Considering the quantitation of platelet hormones and the performance in cell culture, the best techniques are PC and PDH.

Keywords: Regenerative Medicine, Platelet-rich plasma, Platelet, Bibliographic Research, Revision.

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxograma da obtenção dos diferentes hemocomponentes do sangue total	12
Figura 2 - Fluxograma da obtenção dos diferentes hemoderivados a partir do PFC ou PIC.....	14
Figura 3 - Método de fracionamento de proteínas plasmáticas descrito por Cohn e seus produtos obtidos.....	14
Figura 4 - Mercado do PRP na Ásia-Pacífico em 2013.....	18
Figura 5 - Mercado do PRP na Ásia-Pacífico em 2014 conforme o tipo de preparação.....	18
Figura 6 - Ativação e liberação dos hormônios plaquetários.....	20
Figura 7 - Plasticidade das células-tronco mesenquimais.....	23
Figura 8 - Fluxograma da análise de adequação da terminologia utilizada pelos autores <i>versus</i> metodologia empregada.....	27
Figura 9 - Sistema Luminex: Plataforma de monitoramento dos Fatores de Crescimento.....	29
Figura 10 - Esquema de três diferentes preparações: PRP, CP e HDP nos indicadores monitorados.....	30
Figura 11 - Representação esquemática do ensaio com cultura celular com as 3 diferentes preparações como substituto SFB na expansão <i>in vitro</i> de CTMh.....	32
Figura 12 - Localização dos 4 continentes cujos artigos foram analisados neste trabalho.....	38
Figura 13 - Imagem <i>home page</i> de JC Pereira - <i>Robotic Hair Transplant</i>	42
Figura 14 - Identificação da rede de fibrina formada nos poços de cultura que receberam PRP, CP e HDP.....	62
Figura 15 - Aspecto da cultura com quatro e sete dias após plaqueamento das CTMh.....	63
Figura 16 – Aspecto da cultura nos scaffold de PRP, CP e HDP sete dias após plaqueamento das CTMh, corados com hematoxilina-eosina.....	64
Figura 17 – Esquema Produtivo de HDP, pela técnica de Lisado plaquetário, proposto por Burnouf para atender necessidades da Medicina Regenerativa.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para os métodos de dosagem dos fatores de crescimento derivados de plaquetas.....	45
Tabela 2 - AUC para a característica dos doadores como classificadora para o dado quantitativo relativo à extração de plaquetas para cada técnica estudada nos trabalhos.....	46
Tabela 3 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo a idade dos doadores.....	48
Tabela 4 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo o sexo dos doadores.....	49
Tabela 5 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo o tipo sanguíneo dos doadores.....	50
Tabela 6 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo o fenótipo E dos doadores.....	51
Tabela 7 - Comparação entre os métodos PRP, CP e HDP para a técnica FFW.....	53
Tabela 8 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as dosagens de hormônios plaquetários e método de preparo.....	56
Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Pearson entre contagem plaquetária e dosagem dos hormônios nos diferentes métodos.....	56
Tabela 10 - Coeficientes de correlação de Spearman entre as dosagens de hormônios plaquetários e método de preparo.....	57
Tabela 11 - Coeficientes de correlação de Spearman entre contagem plaquetária e dosagem dos hormônios nos diferentes métodos.....	57
Tabela 12 - Comparação entre os métodos PRP, CP e HDP considerando todas as técnicas de dosagem de hormônio.....	58

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Número de artigos disponível no Pubmed, publicados em revistas FI ≥ 1 , <i>open access</i> , utilizando a palavra-chave PRP, LP e HDP; a média do FI das revistas	37
Gráfico 2 - Número de artigos disponíveis em base de dados, <i>open access</i> , FI ≥ 1 , utilizando as palavra-chave PRP, PL e PGF, segundo o país de origem.....	39
Gráfico 3 - Distribuição dos 50 artigos analisados de 2012-2016.....	40
Gráfico 4 - Curvas ROC para os três métodos de preparo: HDP, CP e PRP da técnica FvW para discriminação dos indivíduos dos grupos sanguíneos A+ e O+.....	52
Gráfico 5 - <i>Boxplot</i> que ilustra a diferença entre a concentração de FvW para os grupos sanguíneos A+ e O+ para a técnica HDP.....	53
Gráfico 6 - <i>Boxplot</i> que ilustra a dispersão dos dados para os métodos de preparo PRP, CP e HDP para a determinação do FvW.....	54
Gráfico 7 - <i>Boxplot</i> que ilustra a dispersão dos dados para os métodos de preparo PRP, CP e HDP para todas as técnicas de dosagem de hormônios de crescimento.....	58
Gráfico 8 - Dispersão dos dados para as técnicas de dosagem de hormônio considerando os 3 métodos de preparo.....	59
Gráfico 9 - Média das contagens celulares no cultivo de CTM em D0 e D7, frente às 4 fontes de fator de crescimento: SFB, PRP, CP e HDP.....	60

Lista de Quadros

Quadro 1 - Classificação do PRP, conforme a preparação no mercado da Ásia-Pacífico	16
Quadro 2 - Hemocomponentes e derivados de plasma e plaquetas comercializados no mercado norte americano e o preço por unidade.....	17
Quadro 3 - Fatores de crescimento derivados de plaquetas.....	21
Quadro 4 - Total de artigos publicados com as palavras chave: <i>platelet-rich plasma</i> , <i>platelet lysate</i> , <i>platelet growth factor</i> , de jan 2012 a maio 2016.....	36
Quadro 5 - Parâmetros avaliados nos doadores de sangue: idade, sexo, tipagem ABO/RhD, fenótipo eritrocitário e plaquetometria em 3 momentos e índice de concentração das plaquetas.....	43

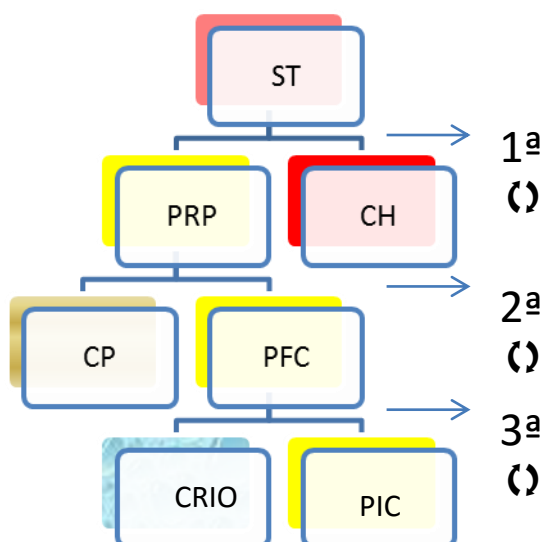
Sumário

1.INTRODUÇÃO	12
1.1. Revisão sobre plaquetas e seu conteúdo.....	19
1.2. Revisão Células-Tronco Mesenquimais e uso de Plasma Rico em Plaquetas.....	22
1.3. Justificativa.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Geral.....	25
2.2. Específico.....	25
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	26
3.1. Análise da adequação da terminologia utilizada em artigos científicos, em revistas com fator de impacto ≥ 1	26
3.2. Obtenção do PRP e monitoramento de indicadores de qualidade: plaquetometria pré e pós obtenção do PRP e dosagem de hormônios plaquetários.....	28
3.3. Avaliação da curva de crescimento de CTM e o tempo de confluência a 80% na presença de PRP, CP e dos HDP pela técnica de lisado em comparação com cultura padrão na presença de soro fetal bovino.....	31
3.4. Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Etapa 1 - Análise do levantamento de artigos publicados em periódicos com Fator de Impacto ≥ 1	35
4.2. Etapa 2 - Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), concentrado de plaquetas (CP) e do lisado plaquetário (HDP) com a determinação laboratorial de fatores de crescimento específicos.....	42
4.3. Etapa 3 - Cultura de célula tronco mesenquimais com o Plasma Rico em Plaqueta (PRP), Concentrado de Plaquetas (CP) e Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP).....	59
5. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

O sangue é uma importante fonte para obtenção de produtos terapêuticos celulares ou proteicos, que essencialmente, não podem ser obtidos a partir de outras fontes. Estes produtos lábeis, ou seja, com curto período de conservação, sem processos industriais, são denominados hemocomponentes, e são obtidos exclusivamente por métodos físicos (mecânicos), como a centrifugação. Dentre eles estão concentrado de hemácias (CH), concentrado de plaquetas (CP), plasma e crioprecipitado, considerados os mais relevantes na prescrição médica¹. O fluxograma abaixo representa as etapas para a obtenção dos hemocomponentes essenciais para a prática hemoterápica (Figura 1).

Figura 1- Fluxograma da obtenção dos diferentes hemocomponentes do sangue total.



Legenda: ST= sangue total; PRP=Plasma Rico em Plaquetas; CH= Concentrado de hemácias; CP= Concentrado de Plaquetas; PFC= Plasma Fresco Congelado; CRIO= Crioprecipitado; PIC= Plasma Isento de Crio; 1ª, 2ª e 3ª = primeira, segunda e terceira centrifugação respectivamente. Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Diante de uma política internacional de hemoterapia seletiva, cujo foco é transfundir ao paciente somente o necessário, alguns hemocomponentes passaram a ter estoques crescentes, como é o caso do Plasma Fresco Congelado (PFC) ou também denominado Plasma Pobre em Plaqueta (PPP), o Plasma Isento de Crio (PIC) e o Plasma Normal (PN). A partir disso, os hemocomponentes excedentes da prática clínica são disponibilizados para o

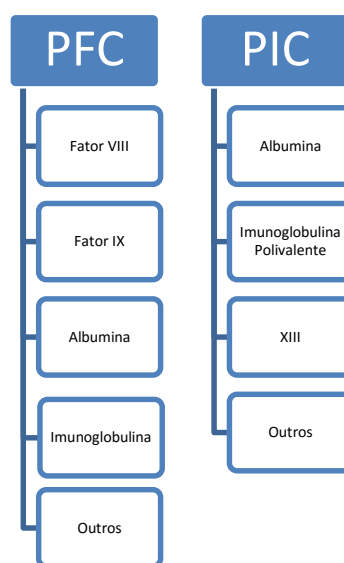
processo industrial e passam por fracionamento industrial de proteínas conhecido como “método de Cohn”². Estes hemocomponentes que passam por processo industrial são denominados Hemoderivados e são obtidos por métodos físico-químicos, processados industrialmente, para a obtenção de suas frações (Figura 2). Portanto, sob a ótica da indústria, estes hemocomponentes excedentes são ótimas matérias prima, e, por alguns autores, definidos como ouro líquido, em função da alta lucratividade das empresas com os hemoderivados, que são estáveis, e, mais recentemente, alguns são conservados em temperatura ambiente diante às inovações tecnológicas. Outros produtos como o CP, após excederem 5 dias para uso clínico, são posteriormente descartados, os quais também apresentam ótimos fornecedores de matéria prima, porém não aproveitado pela indústria.

Quando se compara o plasma e o petróleo, observa-se que ambos são fracionados em diversos subprodutos. A produção mundial de petróleo é de cerca de 16 bilhões de barris/ano, enquanto que as indústrias de hemoderivados processam em média 16 milhões de litros/ano. O maior produtor do petróleo é a Organização de Países Exportadores de Petróleo e de hemoderivados, as empresas norte-americanas. Apesar do volume financeiro movimentado ser muito diferente, cerca de 500 bilhões de dólares/ano para usinas de petróleo, as cifras para as empresas de hemoderivados não é negligenciável: de 20-30 bilhões de dólares/ano. Enquanto o preço do barril de petróleo está por volta de U\$115,60, o de plasma humano bruto é de U\$16.000. Analisando-se o rendimento de derivados de petróleo por barril, o lucro gerado é de U\$45 enquanto que para o plasma humano é de U\$70.000³, enquanto que recentemente, em de 05/09/2012, a revista Isto É publicou o desperdício de 55.000 bolsas de plasma pelo Ministério da Saúde, cotando a U\$120,00 o litro de plasma dando, portanto ao barril (159L) o valor de U\$ 19,080⁴.

O método de processamento de Cohn, utilizando procedimentos físicos químicos, revolucionou a produção de hemoderivados. Durante a segunda Guerra Mundial, impulsionado pela necessidade de se obter produtos estáveis, Edwin Cohn (1947), na Universidade de Harvard, nos Estados Unidos desenvolveu métodos separando as proteínas entre si. Esta metodologia foi publicada em 1947 e passou a mudar o cenário mundial da Hemoterapia,

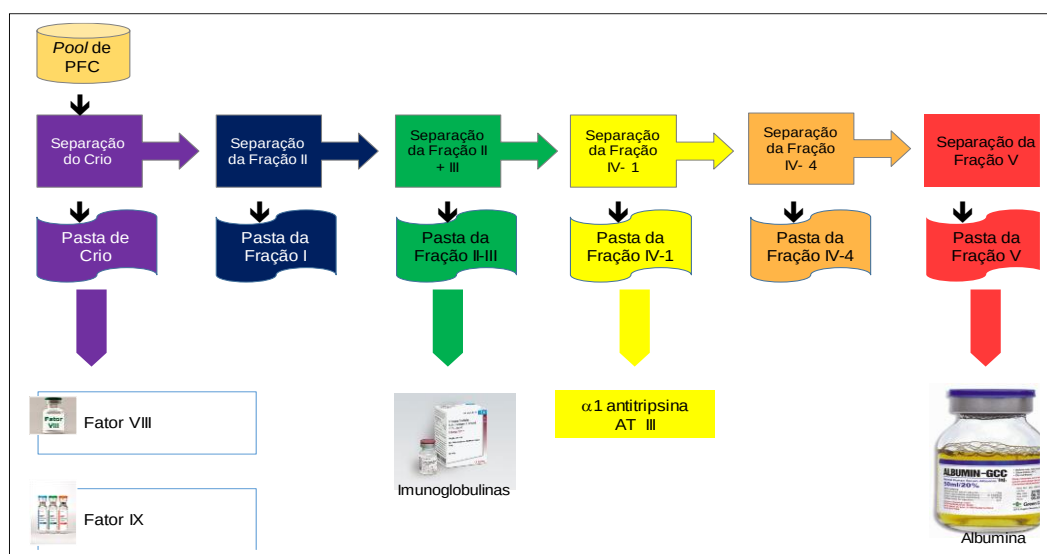
interfaceando-a com grandes complexos industriais e cunhando de forma inexorável o termo “ouro líquido” para o plasma. O valor agregado da bolsa de plasma foi crescendo progressivamente à medida que novos produtos eram produzidos e que o mercado se consolidava². As figuras 2 e 3 representam os produtos obtidos do PFC, do PIC e as frações de precipitação das proteínas pelo etanol, descritas por Cohn².

Figura 2 – Fluxograma da obtenção dos diferentes hemoderivados a partir do PFC ou PIC.



PFC=Plasma Fresco Congelado; PIC = Plasma Isento de Crio
Fonte: Arquivo pessoal, 2015.

Figura 3 - Método de fracionamento de proteínas plasmáticas descrito por Cohn e seus produtos obtidos.



Fonte: arquivo pessoal, adaptado de Cohn².

Diante a riqueza de fatores encontrados no próprio Sangue Total e o alto custo da extração industrial dos mesmos; diversas áreas de conhecimento, como a Medicina Regenerativa, Medicina Translacional, Terapia Celular, Engenharia de Tecidos, sejam elas no setor da saúde, engenharias, veterinária e informática, associadas às nanotecnologias, impulsionou o uso de material alternativo, de eventuais descartes. Portanto, os biomateriais derivados do sangue, combinados ou não com células e fatores de crescimentos, representam grande grupo de produtos sanguíneos que estão em ascensão hoje na medicina. Nas últimas três décadas surgiu a produção e utilização clínica de biomateriais de sangue em medicina regenerativa, o qual vem aumentando diariamente suas aplicações terapêuticas⁵.

O PRP obtido pela centrifugação do sangue periférico tem sido muito utilizado em vários campos da medicina, como ortopedia, plástica, medicina esportiva, dermatologia, reumatologia, entre outras áreas, com resultados notavelmente positivos⁶.

A facilidade de sua obtenção, rapidez e segurança para o paciente, são características favoráveis para o uso do PRP, considerando ainda que evita os riscos de doenças transmissíveis pelo sangue, por serem de origem autóloga, e o baixo custo^{6,7}.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é caracterizado, na literatura, como uma fração de plasma com altas concentrações de fatores de crescimento derivados de plaquetas. Outras definições caracterizam o PRP como uma preparação de CP, num pequeno volume de plasma, o qual pode ser produzido utilizando várias técnicas diferentes^{8, 7}.

Recentemente, o uso do PRP teve um grande impulso, determinando um grande número de artigos publicados. Muitos destes trabalhos abordam a caracterização e classificação das inúmeras técnicas disponíveis no mercado em termos de preparação (velocidade de centrifugação e utilização de anticoagulante), teor (plaquetas, leucócitos, e fatores de crescimento) além das aplicações. Surgiu, também, no mercado, uma diversidade de empresas nascente em função do uso do PRP. Estas empresas propõem dispositivos diferentes para a obtenção do PRP, porém ainda não há um consenso entre os autores, sobre a técnica ideal⁶. Atualmente o termo PRP é utilizado para

identificar protocolos quantitativos e qualitativos diferentes, os quais podem influenciar, de tal modo, os efeitos biológicos do produto final. Não só os diferentes processos, mas também a aplicação no paciente, como e onde podem ser influenciados, pelos diferentes métodos. Em algumas recentes publicações utilizam o termo PRP erroneamente, se referindo, na realidade, ao Concentrado de Plaquetas (CP) e ao Plasma Rico em Fatores de Crescimento (*Plasma Rich in Growth Factors*- PRGF), gerando, desta forma uma confusão de terminologias referentes ao mesmo produto⁹.

Com base na preparação e sua aplicabilidade, o melhor termo a se utilizar seria o PRGF, que representaria o plasma com altas concentrações de fator de crescimento derivado de plaquetas, com elevado potencial terapêutico em medicina regenerativa, utilizando como matéria-prima compostos totalmente autólogos e com protocolos reprodutíveis, porém, ainda hoje, na literatura, o termo Plasma Rico em Plaqueta (PRP) é muito utilizado¹⁰.

Recentemente, disponibilizou-se um relatório sobre PRP, com uma análise abrangente do mercado de plasma rico em plaquetas, na Ásia-Pacífico, considerando vários fatores da macro e microeconomia como marcos regulatórios, aplicação de PRP, indicação, vantagens, desvantagens e custos. O relatório estuda o mercado de plasma rico em plaquetas sob quatro aspectos: tipo, origem, indicação e mercado¹¹.

Com base no tipo de PRP, o mercado na Ásia-Pacífico tem-se segmentado em PRP_P (puro) plaquetas, PRP_L (rico em leucócitos) e PRF_L (rico em plaquetas e leucócitos e ativado com cálcio e trombina para a formação de gel de fibrina). (Quadro 1)

Quadro 1 – Classificação do PRP, conforme a preparação no mercado da Ásia-Pacífico

Tipo	Denominação	Origem	Grandes áreas de aplicação	Marcos Regulatórios e mercado oficial
PRP-P ou PRP _P	Plasma rico em plaquetas puro	Autólogo	Ortopedia Cirurgia	Estados Unidos
PRP-L ou PRP _L	Plasma rico em plaquetas rico com leucócito	Alogênico	Plástica/Cosmética Cirurgia Geral	Europa
PRF-L ou PRF _L	Plasma rico em plaquetas, com leucócitos, na forma de gel (adição de Cálcio e ou trombina)	Homólogo	Neurocirurgia Dermatologia	Ásia-Pacífico

Fonte: arquivo pessoal, baseado em RELATÓRIO *PLATELET RICH PLASMA MARKET – Asia Pacific Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2015 – 2023*¹¹

Com base na origem, o mercado tem-se segmentado em autólogo e alogênico. Em termos de indicação, o mercado tem se segmentado em cirurgia ortopédica, cirurgia plástica, cirurgia geral, neurocirurgia, implantologia dentária, oftalmologia e dermatologia. Em termos de mercado, na Ásia, tem sido aplicado em onze grandes regiões: Austrália, Filipinas, China, Índia, Singapura, Tailândia, Malásia, Coreia do Sul, Hong Kong, Taiwan, e resto da Ásia Pacífico¹¹.

Pesquisando parâmetros de custos ou preços, a busca via base de dados identificou a *Advanced Cell based Solution and Services*, empresa com amplo portfólio de produtos humanos com finalidade terapêutica, disponível na internet, no endereço <<http://www.zen-bio.com/products/serum/human-blood-products.php>>. O quadro 2 listas diferentes produtos e o preço encontrados, tornando mais fácil o entendimento da leitura de relatórios financeiros que apontam cifras vultuosas envolvendo a “era PRP”¹².

Quadro 2 – Hemocomponentes e derivados de plasma e plaquetas comercializados no mercado norte americano e o preço por unidade

Item	Unidades	Catálogo	Preço em dólar americano
Human Platelet Depleted Plasma, per UNIT, Specify Frozen or Fresh	180-200 ml	SER-PDP	\$295.00
Human Platelet Depleted Plasma, per UNIT, FROZEN	10 ml	SER-PDP-10	\$50.00
Human Recovered Plasma, Specify Frozen or Fresh, Anticoagulants available: (ACD, EDTA, Heparin)	2 ml	SER-PLE2ML	\$89.00
Human Leukocyte Depleted Plasma, UNIT (180-200ml)	180-200 ml	SER-LDPL	\$546.00
Human Source Plasma, FRESH FROZEN, in Sodium Citrate	880 mL	SER-SPL	\$493.00
Human Platelet Rich Plasma, per UNIT	180-200ml	SER-PRP	\$298.00
Human Platelet Lysate, Pooled, Frozen (pdf) Cell Culture Growth Supplement	100 ml	SER-HPL	\$325.00

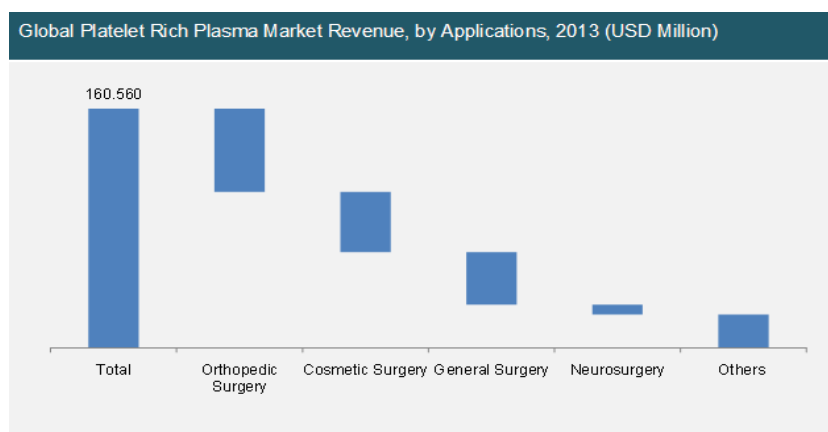
Fonte: *ADVANCED CELL BASED SOLUTION AND SERVICES*, 2014¹²

Finalmente, o relatório discute o perfil dos principais atores inovadores que surgiram no mercado de PRP, na Ásia Pacífico, incluindo novas técnicas de coleta, Arthrex, Inc., Stryker Corporation, BiometZimmer, DePuySynthes, AdiStemLtd., CescaTherapeutics, Inc.e Exactech, Inc. Cada uma das empresas

perfiladas é de parâmetros, tais como visão geral da empresa, descrição financeira, carteira de produtos, estratégias de negócios e desenvolvimentos recentes Pacífico¹¹.

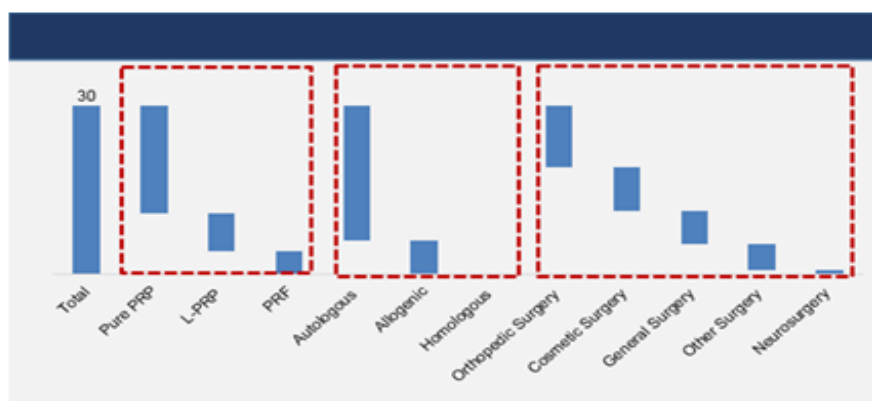
Quanto ao dimensionamento do mercado na Ásia-Pacífico, são surpreendentes os valores encontrados para o mesmo em 2013. A figura 4 identifica que este mercado movimentou U\$ 160 milhões, com predomínio nas áreas de ortopedia, cirurgia plástica/cosmética, cirurgia geral, neurocirurgia, entre outros. A figura 5 demonstra a correção do tipo de preparo do PRP e as áreas médicas mais utilizadas no mercado Ásia-Pacífico.

Figura 4 – Mercado do PRP na Ásia-Pacífico em 2013



Fonte: KOL Opinions Company Reports, Expert Interviews, Investing Publications, Press Release and TMR Analysis. 2014¹³.

Figura 5 – Mercado do PRP na Ásia-Pacífico em 2014 conforme o tipo de preparação



Fonte: arquivo pessoal, adaptado de KOL Opinions Company Reports, Expert Interviews, Investing Publications, Press Release and TMR Analysis, 2014¹³.

No Brasil, algumas empresas e clínicas, iniciaram a atividade com PRP, sem posicionamento oficial da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O Conselho Federal de Medicina (CFM) publica resolução em 29 de outubro de 2015, no diário oficial da união, Seção I, p.236 a Resolução do CFM nº 2.128/2015 que conclui:

Art. 1º Considerar a prática do uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) como experimental no tratamento de doenças musculoesqueléticas e outras anunciadas;

Art. 2º Restringir o uso do PRP à experimentação clínica, dentro dos protocolos do sistema CEP/CONEP, a ser conduzida em instituições devidamente habilitadas para tal fim e que atendam às normas do Ministério da Saúde para o manuseio e uso de sangue e hemoderivados no país¹⁴.

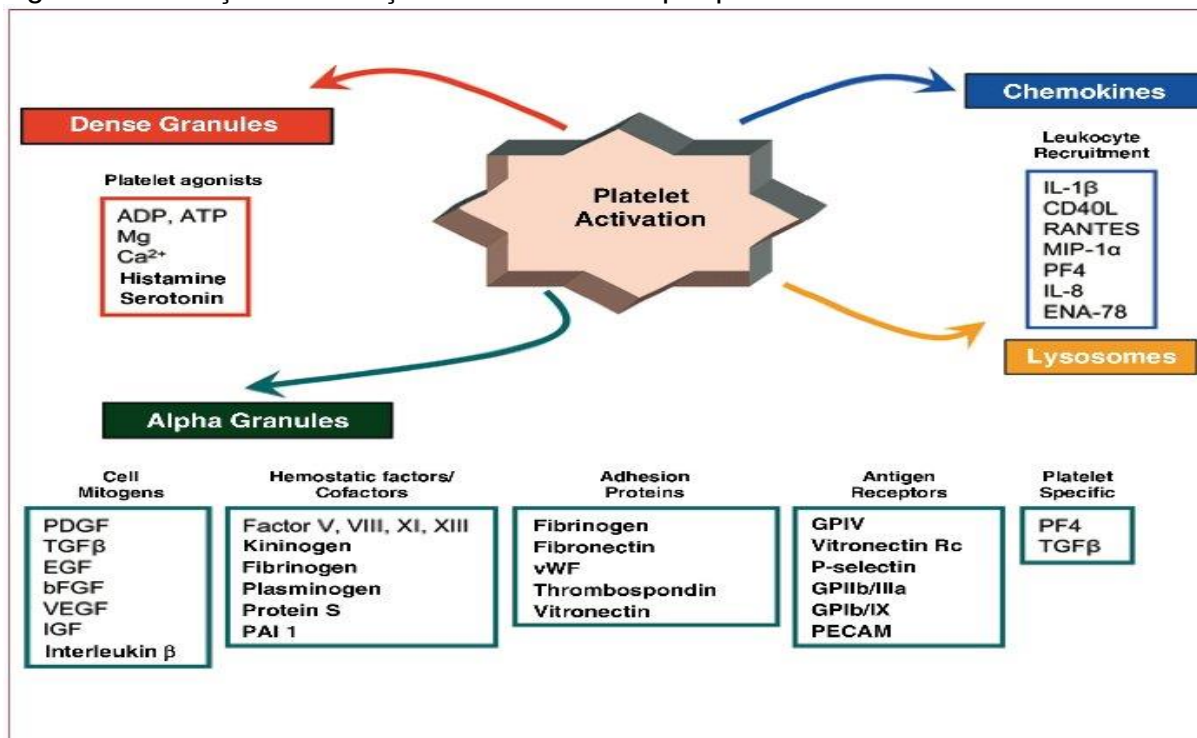
Esta resolução veio nortear o mercado, ainda não regulado, com indicações questionáveis.

Diante dos fatos apresentados, da necessidade de se comprovar cientificamente a presença e a quantidade de fatores de crescimento mediadores de resposta imune e implicados na replicação celular e no remodelamento tissular, este trabalho foi delineado.

1.1. Revisão sobre plaquetas e seu conteúdo

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares anucleados, com aproximadamente 1-3µm de diâmetro. Apresentam à função primária de hemostasia e a secundária de angiogênese, imunidade inata e cicatrização de tecidos danificados. Em adultos normais as plaquetas têm a meia-vida de sete dias, e quando não ativadas apresentam a formatos discóides. São formados a partir de grandes células presentes na medula óssea, os megacariócitos, o qual libera prolongamentos de seu citoplasma na circulação sanguínea. Sua estrutura é composta por citoesqueleto e filamentos de actina e miosina. No citosol encontram-se numerosas organelas incluindo grânulos alfa e densos, peroxissomos, lisossomos e mitocôndrias. Os grânulos densos contêm o ADP, ATP, histamina, serotonina e cálcio. Já os grânulos α contêm fator 4 plaquetário, PDGF, VEGF, EGF, TGF- β , fibrinogênio, fibronectina, inibidor I do ativador de plasminogênio (PAI I), Fatores V, VIII, Fator von Willebrand, entre outras proteínas^{15,16,17} (Figura 6)

Figura 6 - Ativação e liberação dos hormônios plaquetários.



Fonte: BADIMÓN¹⁶, L, VILAHUR, G, PADRÓ, T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. Ver Esp Cardiol., 2009, 62 (10), 1161-78¹⁶

Quando as plaquetas são ativadas, elas mudam sua conformação, passando a ser esféricas, emitem pseudópodes que promovem a agregação plaquetária e posterior liberação do conteúdo dos grânulos via sistema canicular. Esse processo de ativação estimula a produção de citocinas e quimiocinas levando à degranulação de neutrófilos, portanto, estimulando a imunidade inata. A interação celular é ampla, com vasos, glóbulos brancos e uma grande diversidade de proteínas¹⁶

Perante as inúmeras vantagens e quantidades de fatores de crescimentos que as plaquetas possuem, tornou-se um novo alvo de estudo e aplicação na engenharia de tecidos e medicina regenerativa, tanto na clínica como na pesquisa. Considerando a plaqueta como um veículo de armazenamento de fatores de crescimento, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), com denominado na literatura, é mostrado como um ótimo estimulador na reparação de uma ampla variedade de tecidos, tais como osso, músculo, cartilagem, tendão e pele^{18,19}.

Os fatores de crescimento derivados de plaquetas foram utilizados pela primeira vez em úlceras crônicas de pele, desde então é possível encontrar na literatura uma ampla variedade de aplicações do PRGF tais como: ortopedia, cirurgia oral, maxilo-facial, implantologia, no tratamento de doenças e lesões dos tecidos moles, feridas crônicas, estética, engenharia de tecidos e até medicina veterinária. A eficácia clínica depende principalmente do número de plaquetas e da concentração dos fatores de crescimento, os quais atuam como transmissores na maioria dos processos de proliferação, diferenciação, quimiotaxia e a morfogênese do tecido, se utilizando de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos²⁰.

Os grânulos α , presentes nas plaquetas, são considerados como os principais reservatórios biológicos de fatores de crescimento, os quais são cruciais na regeneração, cicatrização e angiogênese do tecido¹⁹. Dentre inúmeros fatores de crescimento nas plaquetas, se destacam RANTES, EGF (*Epidermal Growth Factor*), Angiopoetina-2, FGF-1 (*Fibroblast Growth Factor-1-acid*), FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2- basic*), VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*), Fator von Willebrand, Fibrinogênio, PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), PDGF-AA (*Platelet-Derived Growth Factor-AA*) (Quadro 3).

Quadro 3: Fatores de crescimento derivados de plaquetas:

Fatores de Crescimento	Definição
RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)	Desempenha o papel de recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. ²¹
EGF (Epidermal Growth Factor)	Induz a formação, proliferação e migração de células endoteliais, como fibroblastos e queratinócitos. ²²
Angiopoetina-2	É um regulador da Angiogênese que exerce efeitos sobre as Células Endoteliais. ^{23, 24}
FGF-1 (Fibroblast Growth Factor-1)	Induz a proliferação celular, promove a produção de citocinas para a quimiotaxia de macrófagos e monócitos. ²⁵
FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)	Possui uma atividade angiogênica e mitogênica, são importantes na manutenção das CTM, por serem encontrados na membrana e matriz sub endotelial. ²⁵
VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A)	Regula a Angiogênese, o controle de proliferação, morfogênese, migração e sobrevivência das células endoteliais. Promove o crescimento dos vasos sanguíneos. ²²
PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor-AA)	Induz a migração celular para o local da lesão – Quimiotaxia. ²²
PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)	É um fator hemostático que funciona como o principal inibidor do ativador de plasminogênio de tecido, inibindo portanto a Fibrinólise. ²⁶
Fibrinogênio	Atua diretamente na ativação da fibrina no local da lesão. ²⁷
Fator Von Willebrand	Atua na ativação plaquetária a fim de aderir-las a parede do vaso, para a formação do tampão plaquetário. ²⁸

Fonte: arquivo pessoal 2016

1.2. Revisão Células-Tronco Mesenquimais e uso de Plasma Rico em Plaquetas.

Muitos artigos discutem atualmente a relação entre PRP e Células-Tronco Mesenquimais (CTM), usando o como ótimo aditivo em cultura celular, por conta de sua grande concentração de fatores de crescimento, chegando até a substituir o Soro Fetal Bovino (FBS), chamando então de cultura de células-tronco xeno-free. E também utilizando na clínica em casos de lesão tecidual. Os fatores de crescimento derivados de plaquetas promovem o aumento de recrutamento de células reparadoras ao local, aumentando a regeneração tecidual ^{29,30}.

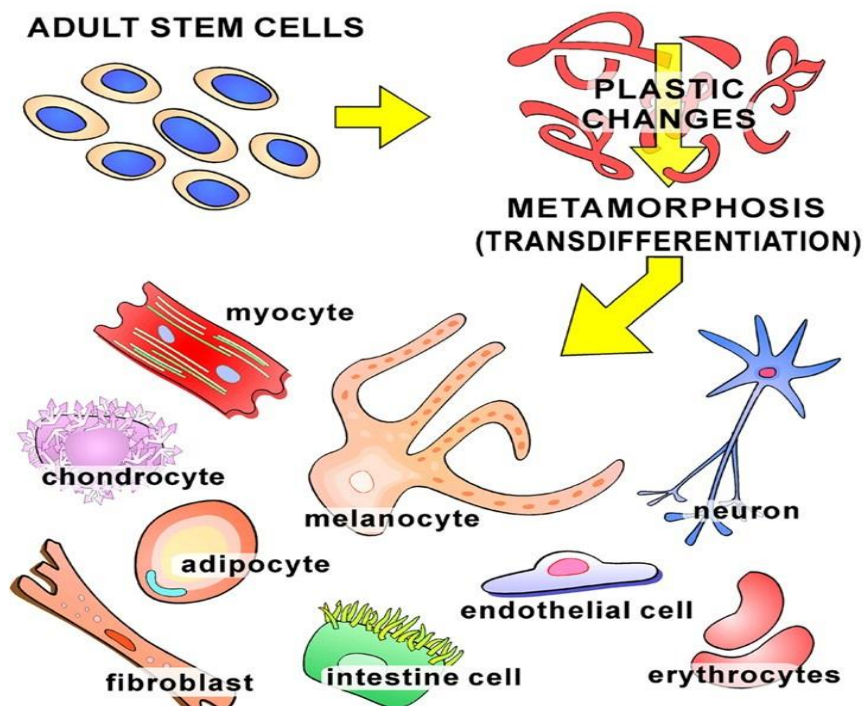
As CTM encontradas em tecidos adultos são caracterizadas como células indiferenciadas, capazes de auto renovação, elevada capacidade proliferativa, diferenciação celular e por serem pouco imunogênicas devido à deficiência de expressão HLA-DR. Em relação à manipulação são de fácil obtenção, adesão em substrato plástico e proliferação *in vitro*³¹.

Atualmente sabem-se da alta plasticidade das CTMs em diferenciar em outros tipos celulares de origem mesenquimais e não mesenquimais, tais como: osso, cartilagem, tendão, células da glia, neurônios, hepatócitos e até células circulantes como os monócitos (Figura 7) ³².

As células-tronco multipotentes adultas foram descritas pela primeira vez em um artigo de 1966, por Friedenstein, como células encontradas na medula óssea denominadas por células formadoras de colônias fibroblastóides - CFU-F (*colony-forming unit-fibroblast*), pois aderem ao plástico com aspectos fibroblastóides, capazes de diferenciação em osteoblasto, condrócitos e adipócitos³³.

Além da medula óssea, as CTM também foram identificadas em outros tecidos adultos, como pele, vasos sanguíneos, músculos, cérebro, tecido adiposo, entre outros. No entanto são difícil de serem isoladas e mantidas *ex vivo*. O tecido adiposo tornou-se uma fonte alternativa de obtenção destas células, visto que podem ser obtidos grandes volumes desse tecido e baixa morbidade para o paciente³⁴.

Figura 7 - Plasticidade das células-tronco mesenquimais



Fonte: LERI, A.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Physiol Rev.* 2005. 85. 1373–1416.³⁵

Todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica. Deste modo, foram definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, três critérios mínimos para caracterizar as CTM. No primeiro critério as células devem ser aderentes ao plástico quando mantido em cultura celular. No segundo, as CTM precisam expressar os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressar CD45, CD 34, CD 14, CD19 ou CD11b. Já no terceiro critério devem se diferenciar em células das linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro* ³⁶.

1.3. Justificativa

Analisando a metodologia descrita nos artigos que referem o uso de PRP nas diferentes especialidades, observa-se que o termo é utilizado como um “guarda-chuva”, para metodologias as mais diversas. Este trabalho se justifica no sentido de esclarecer a comunidade acadêmica com relação ao produto efetivamente utilizado. O PRP é um produto do processamento do sangue total que, após uma primeira centrifugação, dá origem ao CH e ao PRP. Muitos artigos

descrevem metodologias de dupla, até tripla centrifugação e técnicas de lisado plaquetário e continuam usando a terminologia PRP, sabendo-se de que os produtos injetados são muitos distintos. Esta falta de padronização da terminologia é um dos grandes determinantes do status de “inconclusivo” nos estudos de metanálise. Além disto, o Brasil não possui marcos regulatórios para o uso do PRP, sendo que o CFM orienta que se trata apenas de procedimento que envolva a pesquisa, mesmo diante do grande número de países que fazem o uso do PRP como método terapêutico. A quantificação de indicadores que possam nortear a indicação clínica de forma inequívoca pode contribuir para que a ANVISA estabeleça estes marcos regulatórios.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Padronizar e validar a obtenção de hormônios derivados de plaquetas, pela técnica de lisado, comparando com o PRP e CP, em indivíduos saudáveis.

2.2. Específicos

- a) Proceder a pesquisa em base de dados biomédicos com a palavra-chave *platelet-rich plasma* correlacionando a terminologia e a metodologia utilizada em artigos científicos publicados em revistas com FI ≥ 1 .
- b) Obter PRP e monitorar indicadores de qualidade: plaquetometria pré e pós obtenção do PRP; dosagem de hormônios plaquetários;
- c) Comparar indicadores de desempenho do PRP, CP e Hormônio derivado de Plaquetas.
- d) Avaliar a curva de crescimento de CTM e o tempo de confluência a 80% na presença de PRP, CP e HDP pela técnica de lisado em comparação com cultura padrão na presença de soro fetal bovino.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

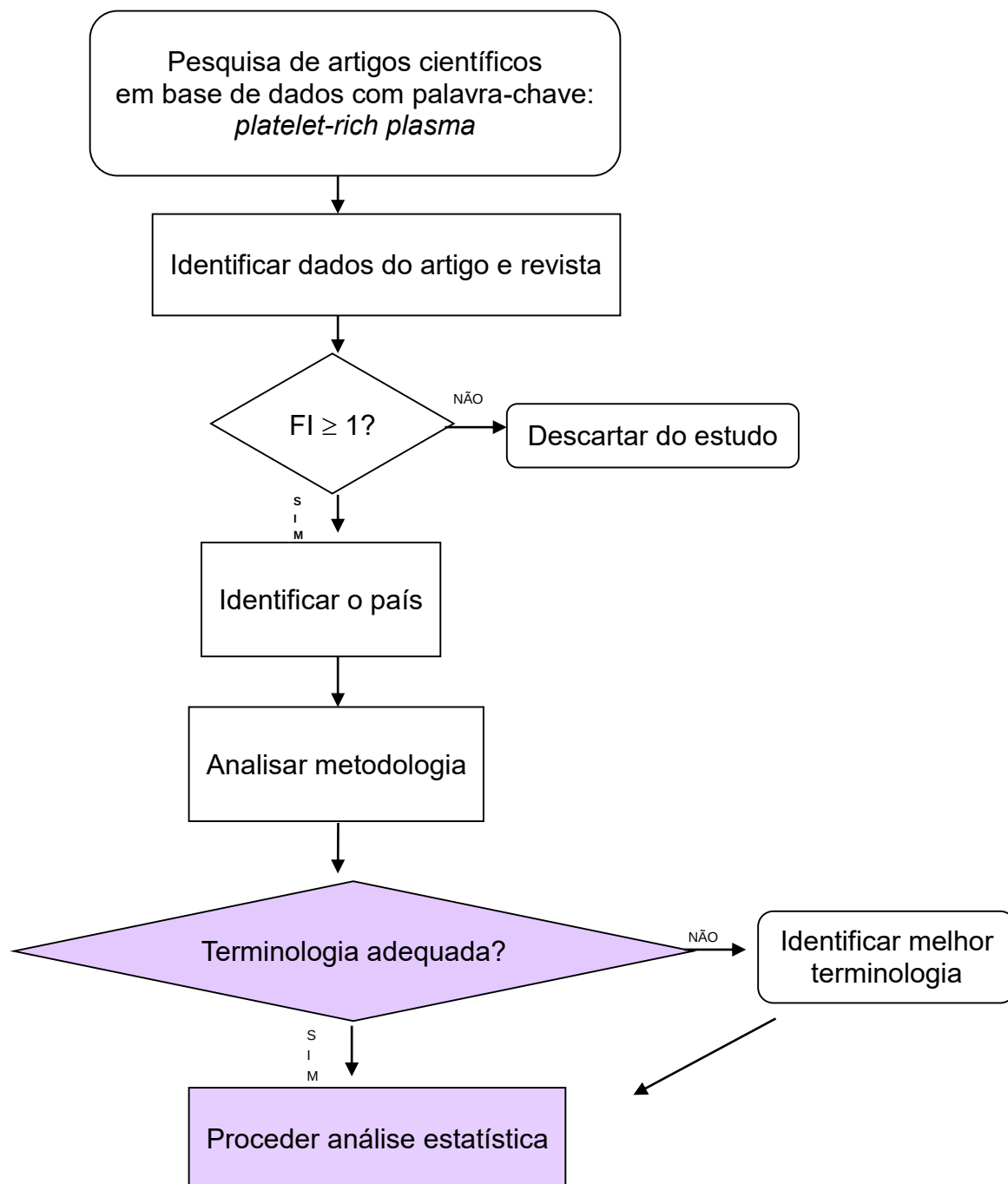
O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Celular (LEC), associado ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu. O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética e Pesquisa via cadastramento na Plataforma Brasil, tendo recebido CAAE 45254915.1.0000.5411 e pertinente aprovação.

Este trabalho foi realizado em etapas distintas. A primeira etapa, de revisão de literatura e análise da adequação da metodologia com as terminologias utilizadas quando a palavra-chave *platelet-rich plasma*, *platelet lysate* e *platelet growth factors*. A segunda etapa foi à obtenção do plasma rico em plaquetas, concentrado de plaquetas e do lisado plaquetário com a determinação laboratorial de fatores de crescimento específicos. E terceira etapa cultura de célula tronco mesenquimais com o Plasma Rico em Plaqueta (PRP), Concentrado de Plaquetas (CP) e Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP).

3.1. Análise da adequação da terminologia utilizada em artigos científicos, em revistas com fator de impacto ≥ 1 .

Para esta etapa da pesquisa, procedeu-se à busca em base de dados como *PubMed*, *Lilacs*, *Scopus*, *Webscience*, *Scholar Google* e *Scielo* com as 3 palavra-chave. A pesquisa foi dividida em décadas a partir da primeira publicação indexada. Os dados do artigo foram lançados em planilha própria para posterior verificação do indicador eleito denominado Fator de Impacto (FI) da revista. Para tal, utilizaram-se informações junto a plataforma *ISI Web Knowledge* considerada um acesso confiável para pesquisa multidisciplinar. A plataforma *Journal Citation Reports®* (JCR®) oferece meios objetivos sistemáticos para avaliar criticamente principais revistas do mundo, com informações quantificáveis e dados estatísticos baseados na citação, deste modo medir a influencia e o impacto dos artigos e nível das revistas (Figura 8).

Figura 8 - Fluxograma da análise de adequação da terminologia utilizada pelos autores *versus* metodologia empregada



3.2. Obtenção do PRP e monitoramento de indicadores de qualidade: plaquetometria pré e pós obtenção do PRP e dosagem de hormônios plaquetários.

Foram obtidas amostras de sangue venoso de 10 doadores saudáveis, candidatos à doação, previamente avaliados por hemoterapeuta, na triagem clínica, no Hemocentro do HC-FMB-UNESP, que consentiram em participar espontaneamente do projeto. Após explanação dos objetivos, e do consentimento livre e esclarecido assinado, foram coletados 30 ml de sangue em na presença de anticoagulante ACD-A1(citrato de sódio, dextrose e adenina). Foram selecionados doadores de repetição, cujas sorologias anteriores para sífilis, Chagas, HTLVII, Hepatites B e C e HIV eram não reagentes, bem como os resultados do teste por biologia molecular para HCV e HIV. Os indicadores: sexo, idade, tipagem ABO/RhD, fenotipagem Rh, Kell completos (CcEe, Kell) foram considerados na avaliação juntamente com a determinação da contagem plaquetária e a dosagem de hormônios derivados de plaquetas. Os testes imunohematológicos foram realizados pelos métodos em microplacas Biorad® padronizadas nos Laboratórios de imunohematologia do Hemocentro de Botucatu.

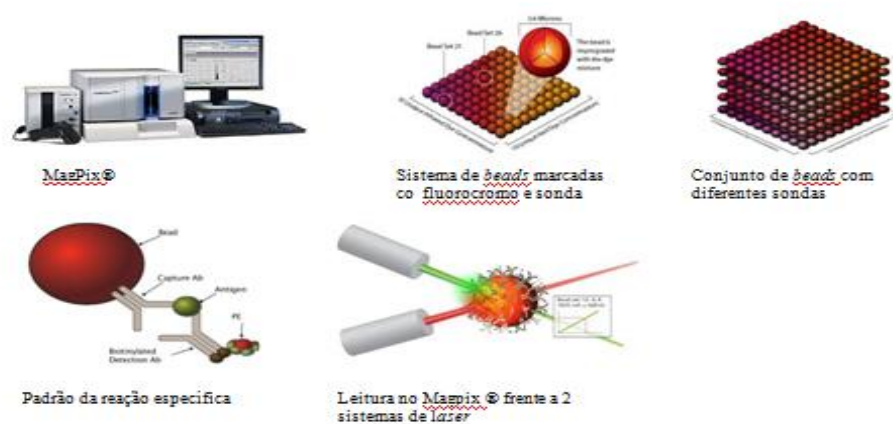
As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Engenharia Celular. Os tubos de amostras foram registrados em planilha contendo o número de doação seguido da identificação progressiva 1, 2, 3 até 10. Antes de iniciar o processamento, ambas as amostras foram analisadas no equipamento HORIBA ABX®60, para a determinação dos parâmetros hematimétricos entre eles: hematócrito, hemoglobina, contagem de glóbulos vermelhos, contagem de glóbulos brancos e plaquetometria. Logo após isto, as amostras foram processadas, na mesma centrífuga da marca Juan®, devidamente calibrada. A técnica utilizada foi padronizada pelo Setor de Produção de Hemocomponentes para a Produção de Concentrado de Plaquetas para uso clínico. Cada uma das amostras foi submetida a uma centrifugação inicial, denominada primeira centrifugação. Após a primeira centrifugação (obtenção do Plasma Rico em Plaquetas) foi procedida à alíquota para a determinação dos fatores de crescimento sendo as amostras submetidas novamente à contagem celular e posteriormente à concentração, submetidas a uma segunda centrifugação. Esta

etapa produz o Concentrado de Plaquetas (CP). Nova alíquota foi realizada para dosagem dos indicadores. A etapa sequencial foi à adição de epinefrina como agente agonista, permitindo a liberação dos hormônios armazenados nos grânulos plaquetários. A amostra foi então congelada a -80°C . Após o descongelamento, nova centrifugação será realizada para remoção dos debris da membrana plaquetária. Neste momento, a amostra passa a ser denominada de HDP, pela Técnica de Lisado.

Além da plaquetometria, foram monitorados os seguintes marcadores por meio do Kit Luminex® - Millipore®: PDGF- AA, RANTES/CCL5, PAI-1 (total), VEGF-A, FGF-1/FGF-ácido, FGF-2/FGF-básico, EGF, Angiopoietina-2, Fibrinogênio e Fator de von Willebrand (vWF).

A tecnologia Luminex original é baseada na impregnação microesferas de poliestireno com uma combinação bem regulamentada de dois corantes fluorescentes para fornecer até 100 tipos de tonalidades diferentes que podem ser identificados por sua intensidade de fluorescência. A detecção pode ser melhorada através da utilização de biotina e a sua elevada afinidade com estreptavidina marcada com ficoeritrina. O leitor Luminex é basicamente um citômetro de fluxo de duas cores onde as *beads* são adsorvidas da microplaca e aspiradas em pequeno volume de detecção da reação, onde é sondado por um laser vermelho e o resultado do ensaio por um laser verde separado, detectando a diferença de cores (Figura 9).

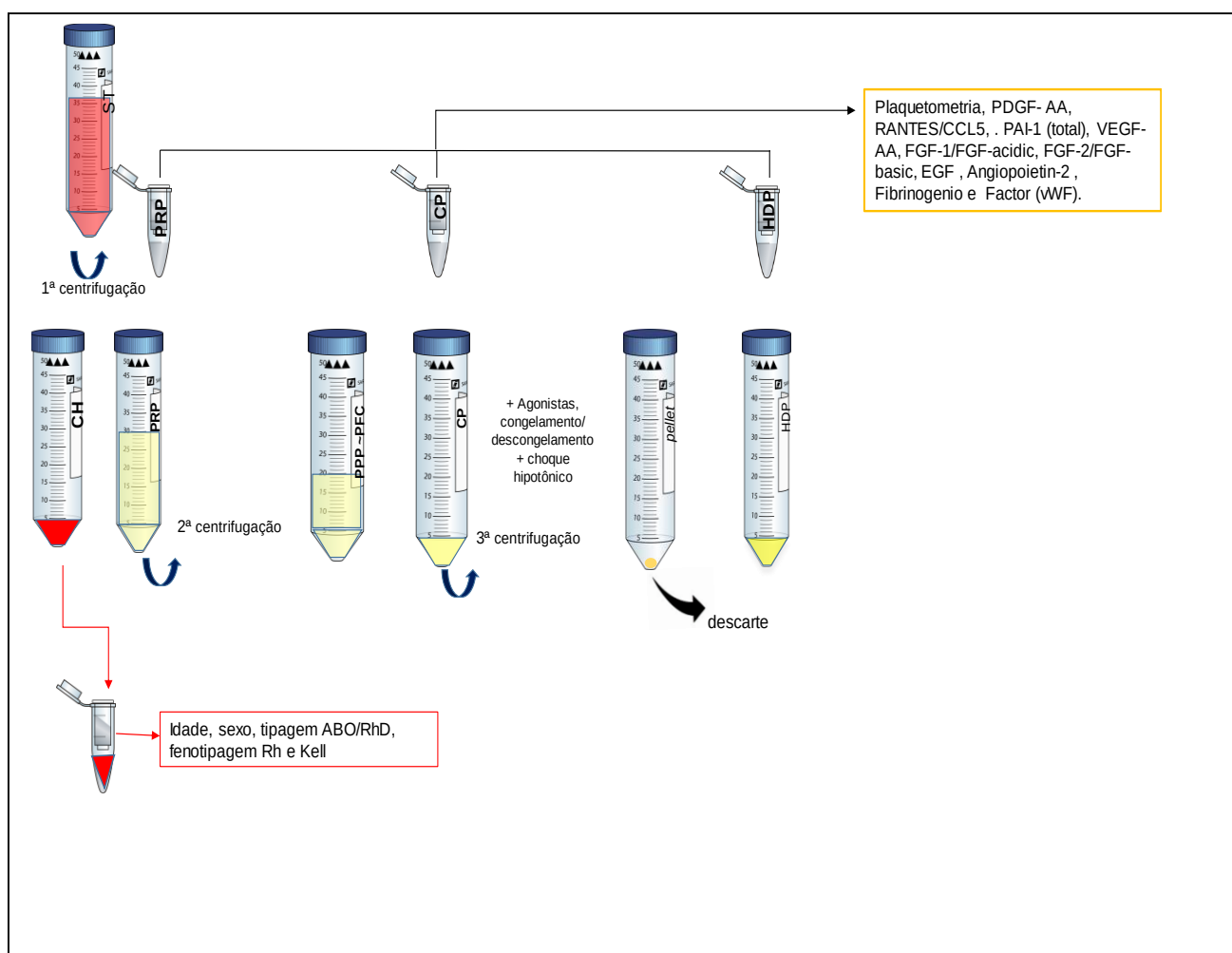
Figura 9 – Sistema Luminex – Plataforma de monitoramento dos Fatores de Crescimento



Fonte: Disponível em: < <https://www.emdmillipore.com/US/en/life-science-research/protein-detection-quantification/milliplex-multiplex-assays-using-luminex/> >

Foram comparadas as análises realizadas em 3 momentos: 1º) após a primeira centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos para realização do PRP, 2º) após a segunda centrifugação a uma rotação maior de 3000 rpm por 20 minutos para realizar o CP e 3º) por último foi realizado o preparado de HDP ou também denominado Lisado Plaquetário (LP), após ativação com agonista Epinefrina deixado a 5 minutos a temperatura ambiente e posteriormente criocongelamento /descongelamento e choque hipotônico, após descongelamento foi realizado uma última centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos com o objetivo de extrair as membranas plaquetária, após essa centrifugação final o *pellet* é descartado (Figura 10).

Figura 10 – Esquema de três diferentes preparações: PRP, CP e HDP nos indicadores monitorados



Fonte: arquivo pessoa, 2016

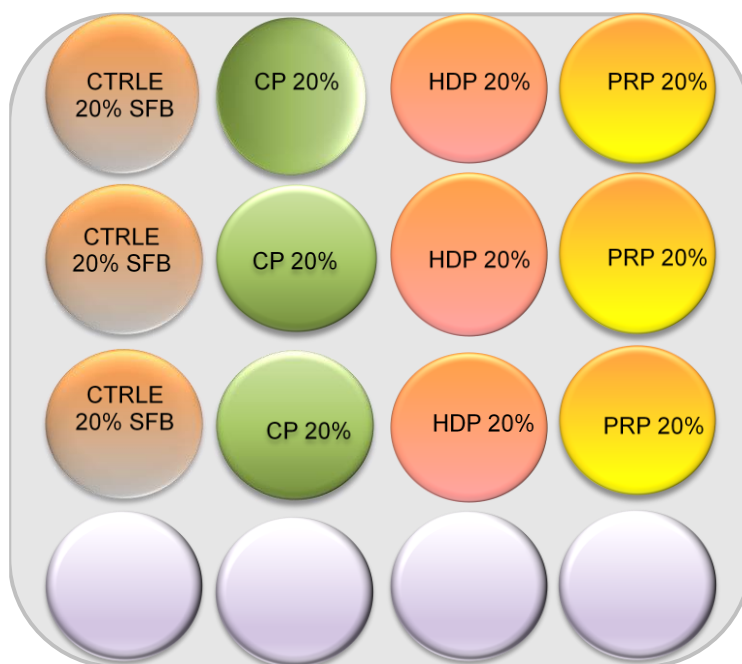
3.3. Avaliação da curva de crescimento de CTM e o tempo de confluência a 80% na presença de PRP, CP e dos HDP pela técnica de lisado em comparação com cultura padrão na presença de soro fetal bovino.

Para atender este objetivo foram utilizadas células tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo (CTMh) de paciente candidato à cirurgia estética pela Disciplina de Cirurgia Plástica, que tenha a indicação de dermolipectomia pós redução de estômago. O paciente foi convidado antes da cirurgia, a participar do projeto. Recebeu explanação, de que o que se pede corresponde a 5 g de tecido gorduroso retirado, antes do descarte do mesmo. O bloco de tecido adiposo foi transferido para o laboratório de engenharia celular. Após 24 horas em incubação fria (+4°C) com uma solução de antibióticos e antimicóticos, a amostra sofreu digestão por Colagenase tipo I (Sigma Aldrich®). As células obtidas foram quantificadas em câmara de Neubauer com determinação da viabilidade por azul de tripano, para plaqueamento em placas de 6 wells, na concentração de 10^5 células/poço. Após observação da adesão celular, do aspecto fibroblastóide e de confluência a 80%, a cultura sofreu tripsinização (Trypsina-EDTA Invitrogen®) para remoção da placa de cultura e confirmação do perfil fenotípico das células por citometria de fluxo. Foram utilizados os marcadores: CD11b, CD34 e CD45 como marcadores negativos e CD90, CD44 e CD105 como marcadores positivos. Após incubação das células com respectivos marcadores, as análises foram processadas por citometria de fluxo utilizando equipamento FacsCalibur BD® e software CellQuest Pro.

Uma vez confirmado o perfil fenotípico das células como CTMh, as mesmas foram plaqueadas 10^4 células em placas de cultura contendo: Soro Fetal Bovino Thermo Fisher® (Controle), PRP, CP e HDP (após a técnica de lisado), sempre na concentração de 20%. Foram monitorados os desempenhos das culturas celulares por observação em microscopia ótica invertida, com contraste de fase, diariamente, sendo procedida a fotomicrografia sempre que indicado, a partir do dia 0 (D0) até dia 7 (D7) (Figura 11).

As células foram monitoradas diariamente por microscopia invertida e procedida a fotomicrografia sempre que necessário. O experimento foi interrompido no D7, procedida a contagem celular fixação das células para estudo histológico.

Figura 11– Representação esquemática do ensaio com cultura celular com as 3 diferentes preparações como substituto SFB na expansão *in vitro* de CTMh



Fonte: arquivo pessoa, 2016

3.4. Análise Estatística

A primeira etapa do trabalho envolvendo o levantamento dos artigos científicos foi apresentada por métodos de estatística descritiva.

Para a interpretação dos dados biológicos obtidos e da relação entre eles, foram realizados 5 questionamentos precisos.

Os 5 pontos considerados foram:

- 1) Existem indicadores dos doadores de sangue tais como idade, sexo, tipo sanguíneo, fenótipo Rh e Kell que possam estar associados a contagem plaquetária, e determinação dos fatores de crescimento: Rantes, EGF, ANG-2, FGF-1, FGF-2, VEGF, PAI-1, PDGF, Fibrinogênio e FvW, com significância estatística?
- 2) Indivíduos do grupo A são mais secretores de FvW do que os indivíduos do grupo O, como descreve-se na literatura? Se isso for verdade, qual dos métodos analisados é melhor: PRP, CP ou HDP, obtêm maiores concentrações?

- 3) Sabendo-se que Angiopietina-2 e VEGF estão relacionados com a angiogênese, existe correlação entre estes dois fatores?
- 4) Existe correlação entre a contagem plaquetária e a concentração dos fatores de crescimento nos 3 métodos analisados?
- 5) Análise de desempenho quantitativo da dosagem de Fatores de Crescimento nos 3 métodos analisados: PRP X CP X HDP.

Para a análise dos indicadores como idade, sexo, tipagem ABO/RhD e fenotipagem eritrocitária foi realizado inicialmente o teste de Shapiro-Wilk com a finalidade de verificar se os dados correspondentes à dosagem de fatores de crescimento derivados de plaquetas para cada método obedecem a uma distribuição normal. Esse teste permite rejeitar a hipótese nula (h_0) de que os dados não provêm de uma distribuição normal (h_1), para valores de p (p -value) menor ou igual a 0,05.

Para os casos em que os dados são provenientes de uma distribuição normal (h_1), foi realizada uma análise de Característica de Operação do Receptor (denominada ROC do termo em inglês *Receiver Operating Characteristic*), a qual permite determinar o desempenho de um sistema classificador binário para discriminação de dados quantitativos. A área abaixo da curva ROC (AUC do termo inglês *Area Under the Curve*) foi utilizada como critério de decisão para aceitar (quando $AUC \geq 0,75$) ou rejeitar (quando $AUC < 0,75$) a existência de associação entre as características qualitativas dos doadores e diferenças quantitativas na dosagem de hormônio pelos métodos de Rantes, EGF, ANGP-2, FGF-1, FGF-2, VEGF, PAI-1, PDGF, Fibrinogênio e FvW. Nos casos em que $AUC \geq 0,75$ foi utilizado o algoritmo J48 do *software* Weka para determinar o limiar de discriminação dos grupos distintos e ilustrar, através de uma árvore de decisão, a divisão dos grupos segundo suas características. A árvore de decisão é apresentada apenas para os casos em que $AUC \geq 0,90$, ou seja, para os casos de maior significância.

Nos casos em que os dados não são provenientes de uma distribuição normal, foi utilizado o teste de *Wilcoxon* de duas amostras para comparar as médias de valores de atributos quantitativos de duas populações. Para rejeitar a

hipótese nula (h_0), na qual as médias não são estatisticamente diferentes, admitiram-se valores de p (p -value) menor ou igual a 0,05.

Para comparação de qual método de preparo é mais eficiente, foi utilizado o Teste T para dados pareados para verificar se a média dos valores relativos à dosagem de hormônios é diferente para os preparos PRP, CP e HDP. Na sequência é novamente apresentado um *boxplot* para ilustrar a dispersão dos dados.

Para análise da correlação entre Angiopoitina-2 e VEGF-A foi determinado o coeficiente de correlação de *Pearson* e *Spearman* para verificar se havia correlação entre todos os métodos de dosagem de hormônio e preparos utilizados na pesquisa, sendo considerado como estatisticamente correlacionados os casos em que os índices de correlação tiveram valores acima de 0,75 ou menores que -0,75. O coeficiente de correlação de *Pearson* identifica se existem métodos com valores diretamente ou inversamente proporcionais. Já o coeficiente de correlação de *Spearman* é capaz de realizar a descrição da relação entre duas variáveis sem fazer nenhuma das suposições sobre a distribuição de frequências das variáveis, diante da possibilidade de alguns resultados não mostrarem uma distribuição. Os mesmos testes foram realizados também para identificar se existe correlação entre contagem plaquetária e os métodos de dosagem de hormônio e preparos utilizados na pesquisa.

Para a comparação quantitativa entre as técnicas de dosagem de hormônio foi inicialmente utilizada uma normalização Z (z-score). Na sequência foi calculada uma média para cada método de preparo para de cada técnica de dosagem. Na sequência, foi calculada uma média geral de cada método de preparo: PRP (todos os parâmetros dosados), CP (todos os parâmetros dosados), e HDP (todos os parâmetros dosados). Por final, foi calculada a média de todas as técnicas de dosagem agrupando todos os métodos de preparo de cada técnica. Após o cálculo das médias, foi utilizado o Teste T para verificar se existem diferenças estatísticas entre cada técnica/método de preparo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Etapa 1 - Análise do levantamento de artigos publicados em periódicos com Fator de Impacto ≥ 1 .

Na primeira etapa deste trabalho, realizou-se o levantamento dos artigos publicados em periódicos indexados, com comitê editorial, Fator de Impacto ≥ 1 . Estabelecendo o critério de se analisar 50 artigos publicados, tendo em vista o grande número de publicações. Foram avaliados os artigos disponíveis no Pubmed a partir de 2012 como *free article/Open Access* uma vez que havia a necessidade de se avaliar o país de origem, a metodologia descrita e a coerência desta metodologia com procedimentos padronizados e juntamente validados na área de Hemoterapia.

Antes de se aplicar os filtros desejados para a seleção de artigos, tais como: período de tempo e Fator de Impacto na revista, identificou-se que no geral estão registrados na base de dados do Pubmed, via internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 45.816 artigos quando a busca é feita com três palavras chave: *platelet-rich plasma*, *platelet lysate* e *platelet growth factors*. Levando em consideração que o termo PRP foi publicado pela primeira em 1954, foram publicados em média 739 artigos/ano, 61 /mês reforçando a importância do tema escolhido para esta dissertação³⁷

O quadro 4 registra que o número de artigos publicados com a palavra-chave *platelet-rich plasma* em todo período de registro no Pubmed foi de 8.445, sendo que a partir de 01/01/2012 a 23/05/2016 (53 meses) o número de artigos foi 1338, perfazendo um total de 25 artigos/mês. Este número mostra a relevância que o tema vem tomando nos últimos anos. Destes 1338 artigos, 202 são *open access/free article* correspondendo a apenas 15% do que foi publicado. Isto coloca em evidência uma nova forma criativa de mercado: empresas de editoração de trabalho científico. Do total de 15% na condição *free article*, foram selecionados 29 artigos com a palavra chave PRP, por ordem cronológica decrescente (2016-2012) para a análise.

Quadro 4 – Total de artigos publicados com as palavras chave: *platelet-rich plasma*, *platelet lysate*, *platelet growth factor*, de janeiro 2012 a maio 2016.

Palavras-chave	Nº de artigos	De 01/01/2012 a 23/05/2016	De 01/01/2012 a 23/05/2016 (humanos)	De 01/01/2012 a 23/05/2016 open access	Nº artigos avaliados
<i>Platelet-rich plasma</i>	8445	2502	1338	202 (15%)	29
<i>Platelet lysate</i>	622	145	105	28	14
<i>Platelet growth factors</i>	36.749	6505	4436	>100* (17)	7
Total publicações	45.816	9152	5.879		50

Legenda:*= 17 artigos dentro do contexto de aplicabilidade do uso de HDP em humanos. Fonte: Pubmed 2016.

O total de artigos avaliados com o termo PRP foi de 29 correspondendo a 14,35% dos artigos disponíveis *open access*. Para o termo *platelet lysate* foram analisadas 14 publicações, correspondendo a 50% das disponíveis. Observa-se que com esta palavra chave o número de publicações total foi de 622 das quais, no período de 01/01/2012 a 23/05/2016 estão registrados 145 envolvendo diferentes espécies animais, mas 72% destes últimos (N=105) são trabalhos publicados referentes à espécie humana³⁷.

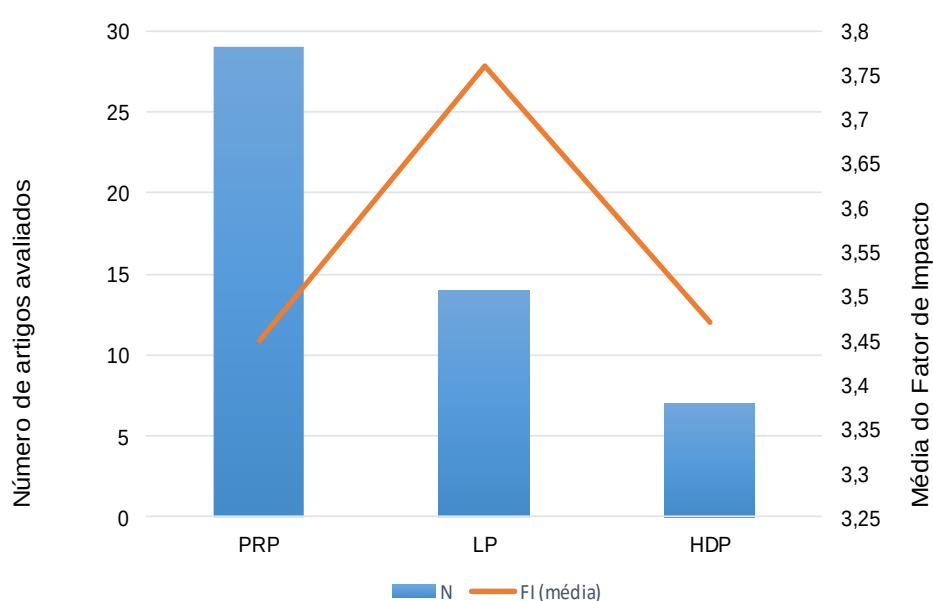
Para a palavra-chave *Platelet growth factors* número de artigos publicados foi de 36.749, sendo que no período de estudo, foram 6.505, sendo que a maioria destes foi em seres humanos (N=4.436). O número de artigos disponíveis na íntegra foi maior de 100, no entanto apenas 17 se referem ao uso dos hormônios para caracterização ou aplicação clínica em seres humanos. Destes, foram selecionados 7 (41,17%)³⁷.

Após a seleção dos 50 artigos, os mesmos foram analisados em grupos denominados: PRP, LP, HDP, levando em consideração dados gerais como FI do periódico e o país de origem do trabalho científico. Para cada um dos grupos foi calculada a média do fator de impacto das revistas. Para a palavra-chave PRP, a média do FI dos periódicos foi de 3,45 (valor min 1,26 e valor máx. 11,9) enquanto que para LP foi de 5,83 (valor min 1,8 e valor máx. de 32,24) e para HDP a média foi de 3,47 (valor min 1,4 e valor máx. 5,7), de acordo com o gráfico 1.

Para apenas um periódico o FI esteve muito acima dos demais. Isto se verificou em artigo publicado em revista com fator de impacto de 32,24: *Cell*.

Este artigo usa a técnica de LP para obtenção de fatores de crescimento para a microencapsulação de folículos ovarianos em um gel de plaqueta obtido após o preparado do LP por congelamento/descongelamento com a finalidade de poder se preservar a fertilidade das mulheres com neoplasias e que se submetem à quimioterapia ablativa e radioterapia antineoplásica. Portanto, o artigo identificado como o de maior destaque relaciona-se com a medicina regenerativa.

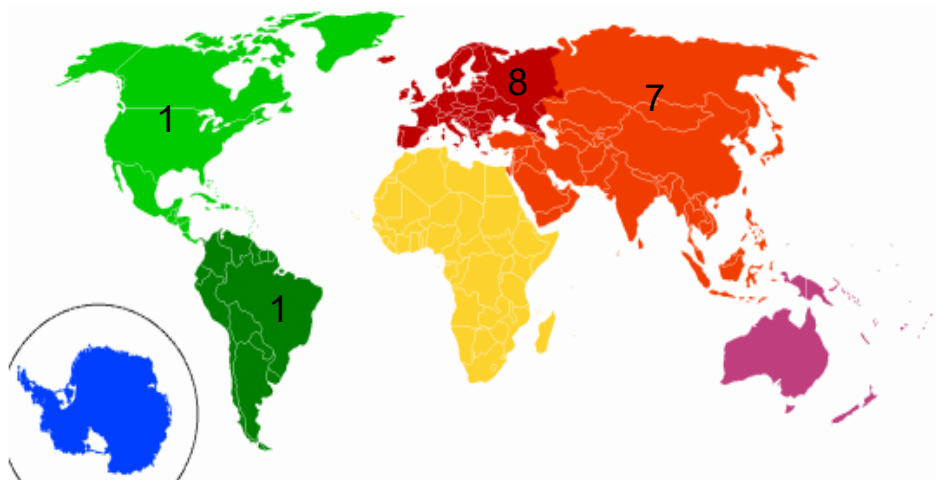
Gráfico 1 – Número de artigos disponível no Pubmed, publicados em revistas FI ≥ 1 , *open access*, utilizando a palavra-chave PRP, LP e HDP, a média do FI das revistas



Fonte: arquivo pessoal, 2016.

A figura 12 abaixo mostra os 4 continentes cujos países publicaram trabalho científico no tema, e os mesmos encontram-se na condição *open access*. Observa-se que a Europa e a Ásia são os continentes que mais disponibilizam os artigos na forma *free* correspondem também à maior produção de artigos relacionados com o tema³⁸.

Figura 12 - Localização dos 4 continentes cujos artigos foram analisados neste trabalho

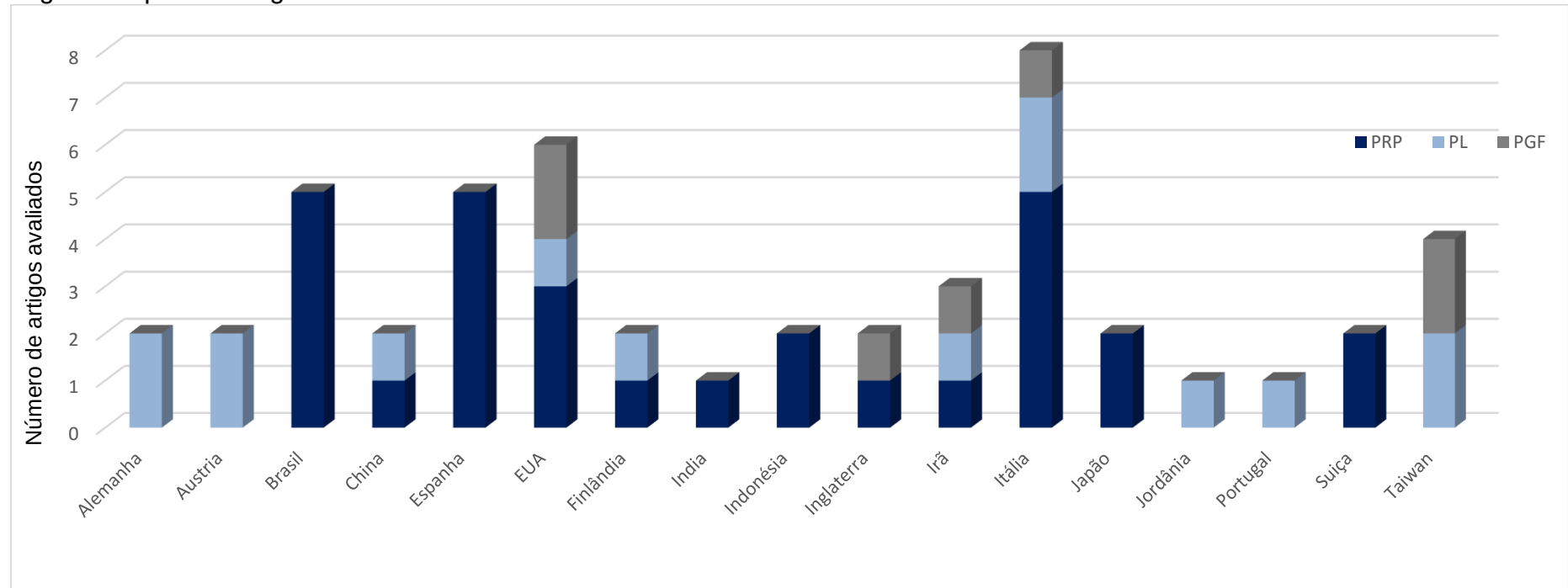


<http://denisemccloat.weebly.com/>

No gráfico 2 pode se observar o número de artigos publicados em revistas com comitê editorial sólido, cujo Fator de Impacto do periódico é ≥ 1 na condição de *open access*, com a identificação do país de origem do trabalho científico. Nesta condição foram registradas publicações feitas por 17 países. Destas, o único país da América Latina que publicou artigos foi o Brasil.

Como pode ser observada, a Itália é o país que tem produzido grande quantidade de trabalhos na área, seguida dos Estados Unidos e destaca-se também o Irã. Estes três países, representantes de continentes diferentes têm publicado artigos nas palavras chave mais frequentes: PRP, LP e HDP. O Brasil, a Espanha, Indonésia, Japão, Índia, Indonésia e Suíça tem publicado majoritariamente artigos com a palavra-chave: PRP. Já Alemanha, Áustria, Jordânia e Portugal com LP, enquanto que China e Finlândia com PRP e LP. Inglaterra: PRP e HDP. Sendo que os artigos do Taiwan abordam o LP e os HDP (Gráfico 2).

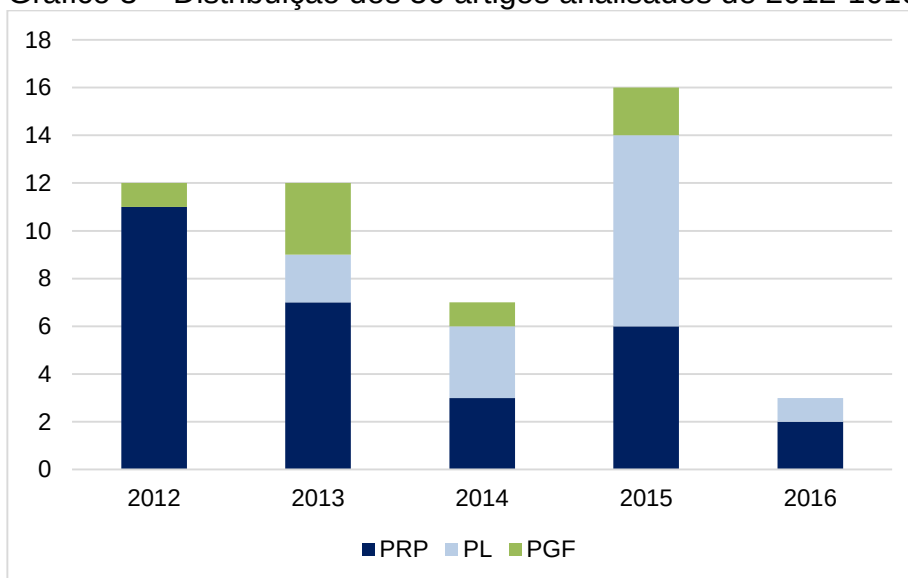
Gráfico 2 – Número de artigos disponíveis em base de dados, *open access*, $FI \geq 1$, utilizando as palavra-chave PRP, PL e PGF, segundo o país de origem.



Legenda: PRP = *Platelet-rich Plasma*; PL = *Platelet Lysate*; PGF= *Platelet Growth Factor*. Fonte: arquivo pessoal, 2016.

A distribuição dos 50 artigos avaliados, por ano, a partir de 2012 estão representados no gráfico abaixo onde se observa uma tendência natural, ano-à-ano de diminuição com o PRP propriamente dito, e aumento das outras formulações de hormônios derivados de plaquetas.

Gráfico 3 – Distribuição dos 50 artigos analisados de 2012-2016



Legenda: PRP = *Platelet-rich Plasma*; PL = *Platelet Lysate*; PGF= *Platelet Growth Factor*. Fonte: arquivo pessoal, 2016.

Dos 50 artigos analisados, 10 (20%) foram considerados inconclusivos pelos autores. Destes, 4 deles (40%) a terminologia era de PRP, a técnica utilizada era mesmo de PRP com uma única centrifugação utilizada, conforme descrito no Material e Métodos do artigo, fazendo supor de que a preparação de 1 centrifugação, que realmente corresponde a terminologia de PRP, é a principal responsável por resultados inconclusivos. Outros 4 artigos tiveram a mesma constatação, de que não foi possível afirmar a superioridade, no entanto os autores usaram HDP como terminologia e 2 artigos usaram LP. Destes últimos há que se destacar a heterogeneidade de metodologias utilizadas. Aqueles que identificam como LP, também estão produzindo HDP.

Uma publicação feita em 2009 busca o consenso sobre a terminologia e destaca o crescente aumento da aplicabilidade do PRP em Medicina. No entanto, este termo genérico e incompleto tem trazido dificuldades de interpretações nas análises de artigos científicos³⁹.

Ehrenfest em 2009 mostrou em um artigo de revisão um painel de profissionais com expertise na área para discutir e padronizar a terminologia na

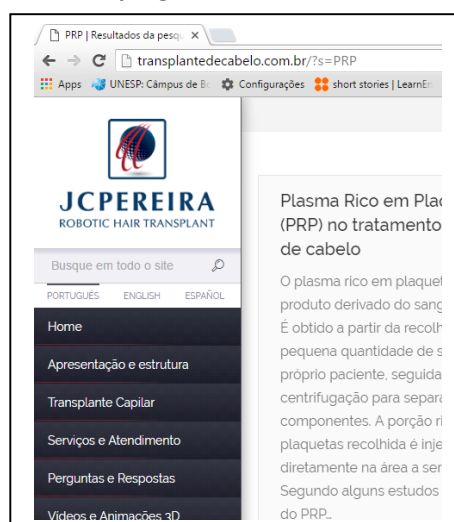
dependência de dois indicadores: presença de fibrina e leucócitos. Com isto ele define como P-PRP, o processamento clássico, de 1 centrifugação apenas, sem adição de nenhuma outra substância, poderíamos completar: PRP clássico. Outra denominação fixada é o L-PRP que corresponde ao PRP contendo leucócitos, destacando que o PRP do ciclo do sangue cujo método de coleta é a deleucocitação *in line*, não é L-PRP, e sim P-PRP.³⁹ Os métodos manuais, com amostras de menor volume, inicialmente produzem o que o autor denomina de L-PRP. A terminologia deve ser simples, precisa e pragmática. Ela deve evitar os interesses comerciais e se manter cientificamente robusta e homogênea ³⁹.

Os resultados encontrados na análise crítica dos trabalhos identificando que 10 em 29 (34,48%) artigos que denominam a metodologia como PRP, descrevem na metodologia, dupla centrifugação, portanto usaram concentrado de plaquetas. Destaca-se de que o erro de descrição ou de nominação do produto, passou pelo crivo de comitês editoriais de revistas indexadas e bem classificadas. Este achado corrobora aqueles de Ehrenfest 2014 que afirma em seu artigo: todos estes produtos oriundos de dupla centrifugação são concentrados de plaquetas, com ou sem leucócitos, com ou sem fibrina, em gel ou não, são CP⁴⁰. Esta posição do autor corrobora aquelas definidas nos marcos regulatórios brasileiros e é a posição validada pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea e Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB), os dois grandes nomes da Hemoterapia mundial^{1e} ⁴¹. Estes CP, portanto, mais concentrados, em menor volume, não estão sendo citados como deveriam na literatura, de forma equivocada.

Em 2011, Eduardo Anitua¹⁰, respeitável pesquisador da área envia uma carta ao editor da *J Shoulder Elbow Surg* alertando para o problema de seu usar o termo PRP e Plasma Rico em Fatores de Crescimento como um “guarda-chuva” que abarca termos muito diferentes entre si, levando a falsas conclusões em artigos científicos. A carta intitulada “*The importance of understanding what is platelet-rich growth factor (PRGF) and what is not*”, traz claramente a crítica de artigos publicados com a terminologia incorreta, com a falta de padronização dos processos trazem conclusões confusas que não contribuem com evidências científicas e provas de causa e efeito. A ciência só pode ser bem aplicada quando fundamentada em processos bem padronizados e validados e conhecimento clínico para a melhor indicação⁴².

Em 29 de outubro de 2015, foi publicado em diário oficial da união, Seção I, p.236 a Resolução do Conselho Federal de Medicina nº 2.128/2015 que conclui que o PRP só deve ser usado em caráter experimental, no escopo de pesquisa aprovada previamente pelo CEP/CONEP¹⁴. Esta regulamentação se fez necessária em função da utilização indevida por profissionais sem qualificação e o desvario mercantilista com a exploração da população em diversas áreas de aplicação médica (ortopedia, cirurgia plástica, estética, entre outras). No Brasil, entretanto, duas empresas maiores, a Revitalle (<http://www.revitallebrasil.com.br/areas-de-atuacao/tratamentos-de-dor/>)⁴³ e J.C.Pereira, disponibilizam o tratamento de dor para inúmeras áreas, com a produção do PRP autólogo. Destaca-se que a divulgação deste tipo de tratamento teve uma mudança importante nos últimos 60 dias. ^{14, 43, 44}.

Figura 13 – Imagem home page de JC Pereira - *Robotic Hair Transplant*



Fonte: Disponível em: < <http://transplantedecabelo.com.br/?s=PRP> >. Acesso em 01/06/2016.

Após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa deu-se início a etapa 2 do projeto com a coleta de sangue de indivíduos saudáveis (doadores de sangue) para o preparo de PRP, CP, e HDP pela técnica de lisado plaquetário.

4.2. Etapa 2 - Obtenção do plasma rico em plaquetas, concentrado de plaquetas e do lisado plaquetário com a determinação laboratorial de fatores de crescimento específicos.

Os dados brutos como idade, sexo, tipagem ABO/Rh, fenótipo Rh e Kell e as plaquetometrias em sangue total (pré) estão expressos no Quadro 5.

Quadro 5 – Parâmetros avaliados nos doadores de sangue: idade, sexo, tipagem ABO/RhD, fenótipo eritrocitário e plaquetometria em 3 momentos e índice de concentração das plaquetas.

Nº	Idade	Sexo	ABO/ RhD	Fenótipo	Plaquetometria			
					pré (X10 ³ /mm ³)	PRP (X 10 ³ /mm ³)	CP (X 10 ³ /mm ³)	IC
1	41	F	O+	CcEe, K-	208	209	330	1,58
2	41	F	O+	CcEe, K-	215	213	410	1,91
3	26	M	O+	CcEe, K-	207	207	425	2,053
4	51	F	A+	Ccee, K-	220	199	600	2,72
5	52	M	O+	CcEE, K-	191	193	279	1,46
6	45	F	O+	Ccee, K-	161	163	487	3,02
7	29	M	O+	CcEe, K-	210	207	814	3,87
8	24	M	A+	Ccee, K-	169	168	470	2,78
9	36	F	A+	Ccee, K-	233	231	736	3,15
10	59	M	A+	NR	185	185	483	2,61
Média	40,4	5M5F	6O 4A		199,9	197,5	503,4	2,51

Legenda: IC = índice de concentração. Fonte: arquivo pessoal, 2016.

A média de idade dos doadores de sangue selecionados variou de 24 a 59 anos com uma média de 40,4 anos, portanto, indivíduos adultos sem a representação de indivíduos da terceira idade, com amostras dos quais poder-se-ia encontrar alterações muito expressivas. O *sex ratio* foi de 1:1.

Quanto a distribuição dos grupos sanguíneos ABO 6 indivíduos eram do grupo O e 4 do grupo A. Em todos os casos o RhD foi positivo.

As plaquetas têm sido reconhecidas pelo seu papel na homeostase vascular além de desempenhar um papel importante na inflamação e na imunomodulação. Dados substanciais estão emergindo sobre o envolvimento patogênico de plaquetas no artrite inflamatória e doenças autoimunes, apontando a existência de *crosstalk* entre o sistema de inflamação e coagulação. Expressam na sua superfície uma série de antígenos, entre eles, alguns eritrocitários como ABO, MNSs, P1, Antígenos do Sistema de Histocompatibilidade Classe I e antígenos próprios das Plaquetas⁴⁵. Após a ativação, as plaquetas liberam substâncias pró-inflamatórias, na forma de micropartículas/microvesículas ou exossomos que interagem com leucócitos levando à inflamação⁴⁶.

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO (determinantes antigênicos A, B e H, respectivamente) são moléculas complexas sobre a superfície extracelular das hemácias. Estes antígenos estão altamente expressos na superfície de uma variedade de células e tecidos, incluindo a plaqueta como já foi citado além do epitélio, neurônios sensitivos e endotélio vascular⁴⁷. Desta forma, levando em consideração a expressão destes antígenos sobre as plaquetas humanas, estabelecer se há ou não correlação entre os grupos sanguíneos e os fatores de crescimento secretados e armazenados nas plaquetas foi uma das propostas desta pesquisa.

Além disto, esta análise levou em consideração o fato de que as funções dos antígenos A e B do grupo sanguíneo ABO não são totalmente conhecidas. Recentemente estudos têm estabelecido uma forte correlação entre tipo sanguíneo saúde e doença como: infertilidade, doenças cardíacas, neoplasias, infecciosas, entre outras ^{45,48}. Indivíduos do grupo sanguíneo O (o mais prevalente no mundo) apresentam risco reduzido de câncer, no entanto, estudos mostram que são mais vulneráveis ao norovírus e as úlceras pépticas⁴⁹. Indivíduos do grupo AB são mais frequentemente portadores de Mal de Alzheimer, e indivíduos do grupo A tem maior susceptibilidade ao câncer gástrico, fato este descrito desde 1950. Entretanto o grupo O está relacionado à úlcera péptica com infecção por *H. Pylori*⁵⁰. Além de recentemente haver a descrição de que estes indivíduos também desenvolvem mais demência e Mal de Alzheimer⁵¹. Outros trabalhos evidenciam que indivíduos de grupo sanguíneo “não O”, A, B e AB quando fumantes, fazem quadros tromboembólicos graves e isto se relaciona com a mutação do Fator V Leiden e outros fatores da coagulação⁵². Outros autores correlacionam altas concentrações de Fator Von Willebrand e de Fibrinogênio em indivíduos do grupo A ^{53,54,55,56}.

Para analisar os indicadores como idade, sexo, tipagem sanguínea, fenotipagem Rh e Kell e a dosagem dos fatores de crescimento/hormônios realizadas, houve a necessidade de se aplicar o teste de *Shapiro-Wilk* para verificar se os dados correspondentes ao parâmetro de dosagem de fatores de crescimento derivados de plaquetas para cada método provêm de uma distribuição normal. Na tabela 1, h_0 indica que os dados obedecem a uma distribuição normal e h_1 que não se pode admitir que os dados provêm de uma distribuição normal (EGF-PRP, FGF1 e FGF2 tanto no PRP como no CP).

Tabela 1 - Teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para os métodos de dosagem dos fatores de crescimento derivados de plaquetas.

Técnica	W	p-value	Hipótese
RANTES_PRP	0,91	0,280	h_0
RANTES_CP	0,94	0,500	h_0
RANTES_HDP	0,92	0,353	h_0
EGF_PRP	0,75	0,003	h_1
EGF_CP	0,93	0,496	h_0
EGF_HDP	0,88	0,157	h_0
ANGP2_PRP	0,93	0,452	h_0
ANGP2_CP	0,93	0,529	h_0
ANGP2_HDP	0,94	0,679	h_0
FGF1_PRP	0,79	0,012	h_1
FGF1_CP	0,72	0,002	h_1
FGF1_HDP	0,86	0,112	h_0
FGF2_PRP	0,71	0,001	h_1
FGF2_CP	0,83	0,041	h_1
FGF2_HDP	0,87	0,127	h_0
VEGF_PRP	0,90	0,235	h_0
VEGF_CP	0,94	0,653	h_0
VEGF_HDP	0,93	0,488	h_0
PAI1_PRP	0,95	0,691	h_0
PAI1_CP	0,89	0,167	h_0
PAI1_HDP	0,90	0,247	h_0
PDGF-AA_PRP	0,94	0,578	h_0
PDGF-AA_CP	0,81	0,019	h_0
PDGF-AA_HDP	0,98	0,935	h_0
Fibrinogênio_PRP	0,95	0,616	h_0
Fibrinogênio_CP	0,98	0,925	h_0
Fibrinogênio_HDP	0,94	0,632	h_0
FVW_PRP	0,93	0,419	h_0
FVW_CP	0,88	0,171	h_0
FVW_HDP	0,92	0,354	h_0

Legenda - h_0 : Dados são normalmente distribuídos; h_1 : Dados não são normalmente distribuídos. Fonte: arquivo pessoal, 2016.

Os resultados revelam que, para a maioria dos métodos de dosagem, os valores quantitativos da contagem de plaquetas provêm de uma distribuição normal, exceto para as técnicas: EGF-PRP, FGF1-PRP, FGF1-CP, FGF2-PRP e FGF2-CP. Isto pode ser justificado pelo tamanho amostral. Análises com N maior podem eliminar os fatores que impediram a normalização destes últimos dados.

Já os resultados de análise ROC revelam que existem características dos doadores que podem ser associadas aos dados quantitativos de técnicas de dosagem de fatores de crescimento derivados de plaquetas. A tabela 2 apresenta esses resultados, com destaque para os casos em que a $AUC \geq 0,75$. Deve-se ressaltar que a análise ROC foi realizada apenas para os casos em que os dados quantitativos provenientes da técnica de dosagem obedecem a uma distribuição normal.

Tabela 2 - AUC para a característica dos doadores como classificador para o dado quantitativo relativo à extração de plaquetas para cada técnica estudada nos trabalhos.

<i>Técnica</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Tipo Sanguíneo</i>	<i>Fenótipo CcEeKell</i>
RANTES_PRP	0,67	0,64	0,63	0,65
RANTES_CP	0,54	0,64	0,54	0,55
RANTES_HDP	0,92*	0,80*	0,58	0,65
EGF_PRP	0,74	0,50	0,74*	0,50
EGF_CP	0,39	0,50	0,56	0,53
EGF_HDP	0,61	0,75*	0,56	0,47
ANGP2_PRP	0,72	0,75*	0,56	0,60
ANGP2_CP	1,00*	0,87*	0,53	0,58
ANGP2_HDP	0,75*	0,54	0,70	0,58
FGF1_HDP	0,87*	0,69	0,53	0,67
FGF2_HDP	0,94*	0,80*	0,44	0,40
VEGF_PRP	0,52	0,64	0,85*	1,00*
VEGF_CP	0,50	0,60	0,69	0,92*
VEGF_HDP	0,56	0,70	0,83*	1,00*
PAI1_PRP	0,63	0,88*	0,42	0,60
PAI1_CP	0,63	0,56	0,38	0,50
PAI1_HDP	0,83*	0,72	0,46	0,40
PDGF-AA_PRP	0,50	0,72	0,42	0,50
PDGF-AA_CP	0,67	0,72	0,75*	0,70
PDGF-AA_HDP	0,79*	0,56	0,71	0,65
Fibrinogênio_PRP	0,75*	0,52	0,75*	0,65
Fibrinogênio_CP	1,00*	0,75*	1,00*	0,50
Fibrinogênio_HDP	0,67	0,45	0,67	0,53
FWW_PRP	0,71	0,48	0,50	0,70
FWW_CP	0,89*	0,55	0,61	0,80*
FWW_HDP	0,39	0,40	0,89*	0,73
Média AUC	0,70	0,64	0,63	0,63
Desvio Padrão	0,17	0,13	0,16	0,16

* Dados considerados estatisticamente significativos. Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Os dados revelam uma tendência de que a idade dos doadores é a característica que mais tem influência sobre a dosagem de fatores de

crescimento. Pelos dados apresentados, é significativa a influência da idade para nas técnicas RANTES HDP, ANGP2 CP, ANGP2 HDP, FGF1 HDP, FGF2 HDP, PAI1 HDP, PDGF-AA HDP, Fibrinogênio PRP, Fibrinogênio CP e FVW CP.

Outra informação relevante da tabela 2 é que a técnica de VEGF é muito sensível ao fenótipo E e ao tipo sanguíneo A dos doadores. O dado referente ao fenótipo E não tem descrição na literatura especializada, no entanto, a descrição de que indivíduos do grupo A secretam mais fatores de crescimento e ou coagulação já é fato ^{53, 56}.

Pode se observar ainda que com relação à tipagem ABO as correlações estabelecidas foram com EGF-PRP, VEGF PRP e HDP, PDGF, Fibrinogênio e Fator von Willebrand.

A correlação encontrada para o EGF neste trabalho corrobora os achados de Modisa 2013, onde identificou que indivíduos do grupo A tem sítios de ligação de mais alta afinidade e apresentam maior secreção deste hormônio⁵⁷.

MA em 2007 ⁵⁸, publica no *The Journal of International Medical Research* a relação entre elevados níveis de fibrinogênio em indivíduos do grupo AB, destaca-se que neste trabalho em função do número reduzido de amostras avaliadas, não havia a representação de indivíduos de grupo sanguíneo⁵⁸.

As tabelas 3, 4, 5 e 6 apresentam os resultados obtidos pela aplicação do algoritmo J48 para determinar o limiar de discriminação dos dados de dosagem de Fatores de Crescimento dos grupos segundo suas características. Esse limiar é apresentado apenas para os casos em que $AUC \geq 0,75$.

Para as determinações de RANTES, ANGP2, Fibrinogênio e Fator Von Willebrand houve a relação direta com a idade: menor idade, menor concentração de fator (tabela 3). O VEGF não apresenta forte correlação com a idade. Para os fatores FGF1 e 2, PAI-1 e PDGF a correlação foi inversa, ou seja, quanto maior a idade dos indivíduos, menores são as concentrações de fatores encontrados. Estes achados corroboram aqueles publicados na literatura e que mostram que o FGF1 ativa por sinais biológicos o FGF-2 e FGF-7 (também conhecido como o KGF). Isto significa que FGF-1 sinaliza o FGF-2 para continuar com crescimento de fibroblastos e produzir colágeno, ácido hialurônico e elastina, fatores estes muito diminuídos com a idade. O FGF-1 também interage com o crescimento de vasos e a angiogênese fenômenos estes também

limitados com a longevidade ^{59,60}. O FGF-1 e FGF-2 estão fortemente relacionados com a embriogênese, a formação do mesoderma e a constituição da crista neural, sendo que é neste período que se encontram as concentrações mais elevadas⁶¹.

Tabela 3 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo a idade dos doadores.

<i>Técnica</i>	<i>Limiar</i>	<i>Idade</i>
RANTES_HDP	≤ 2880	≤ 40 anos
	> 2880	> 40 anos
ANGP2_CP	≤ 192,94	≤ 40 anos
	> 192,94	> 40 anos
ANGP2_HDP	≤ 199,68	≤ 40 anos
	> 199,68	> 40 anos
FGF1_HDP	> 3,17	≤ 40 anos
	≤ 3,17	> 40 anos
FGF2_HDP	> 141,67	≤ 40 anos
	≤ 141,67	> 40 anos
PAI1_HDP	> 1501	≤ 40 anos
	≤ 1501	> 40 anos
PDGF-AA_HDP	> 100,18	≤ 40 anos
	≤ 100,18	> 40 anos
Fibrinogênio_PRP	≤ 190	≤ 40 anos
	> 190	> 40 anos
Fibrinogênio_CP	≤ 171	≤ 40 anos
	> 171	> 40 anos
FVW_CP	> 145,49	≤ 40 anos
	≤ 145,49	> 40 anos

Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

A tabela 4 representa os Fatores de Crescimento nos quais se evidenciou correlação com o sexo. Observa-se que RANTES, FGF2 e PAI-1 os maiores valores se relacionam com o sexo masculino, enquanto que para EGF, ANGP-2 e fibrinogênio as maiores concentrações foram identificadas em

amostras do sexo feminino. Estes dados confrontam com aqueles publicados em 2002 por Weibliche colaboradores⁶² que concluem que não há correlação com sexo e idade do doador. Neste artigo os autores avaliaram 158 homens e 55 mulheres com idade de 17-62 anos. Apesar do N ser maior do que o desenvolvido neste trabalho, a idade média foi maior e a metodologia usada para a determinação de fatores foi a de enzima imunoensaio, técnica sabidamente menos sensível do que a plataforma utilizada neste trabalho Multiplex.

Tabela 4 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo o sexo dos doadores.

<i>Técnica</i>	<i>Limiar</i>	<i>Sexo</i>
RANTES_HDP	> 2452	M
	≤ 2452	F
EGF_HDP	≤ 104,44	M
	> 104,44	F
ANGP2_PRP	≤ 699	M
	> 699	F
ANGP2_CP	≤ 549,69	M
	> 549,69	F
FGF2_HDP	> 184,84	M
	≤ 184,84	F
PAI1_PRP	> 1083	M
	≤ 1083	F
Fibrinogênio_CP	≤ 223	M
	> 223	F

Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Na tabela 5 pode se observar que para a dosagem do VEGF, PDGF e FvW, as maiores concentrações estão em indivíduos do grupo A. Estes dados estão apresentados na literatura como descrevem Sode *et al*, 2013 com a relação de indivíduos denominados não O (majoritariamente grupo A) com maior risco de trombose. Este fato está relacionado a capacidade do organismo em

produzir concentrações mais elevadas de fatores da coagulação, entre eles, o FvW⁶³.

Tabela 5 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo o tipo sanguíneo dos doadores.

<i>Técnica</i>	<i>Limiar</i>	<i>Tipo Sanguíneo</i>
VEGF_PRP	≤ 296,33	O+
	> 296,33	A+
VEGF_HDP	≤ 229,07	O+
	> 229,07	A+
PDGF-AA_CP	≤ 58,11	O+
	> 58,11	A+
Fibrinogênio_PRP	> 226	O+
	≤ 226	A+
Fibrinogênio_CP	> 223	O+
	≤ 223	A+
FvW_HDP	≤ 230,68	O+
	> 230,68	A+

Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

No entanto as maiores concentrações de fibrinogênio foram encontradas em doadores do grupo sanguíneo O.

Quanto ao limiar de discriminação da dosagem dos fatores de crescimento correlacionando com o fenótipo Rh e Kell observou-se que a presença do alelo E correlaciona-se negativamente com a secreção de VEGF (Tabela 6). Ou seja, indivíduos **ee** apresentam as maiores concentrações do fator. Destaca-se que os grupos sanguíneos do sistema Rh são exclusivamente eritrocitários, não se expressando em tecidos, e mais especificamente os alelos Ee estão relacionados com transporte de íons amônia pela hemácia⁶⁴. Observa-se ainda que esta relação entre o fenótipo e a maior secreção de VEGF e FvW merece um estudo de casos com amostragem maior para se depurar a eventual causalidade com grupo sanguíneo ABO.

Tabela 6 - Limiar de discriminação dos dados de dosagem de fatores de crescimento dos grupos segundo o fenótipo E dos doadores.

<i>Técnica</i>	<i>Limiar</i>	<i>Fenótipo CcEeKell</i>
VEGF_PRP	$\leq 296,33$	CcEe, K-
	$> 296,33$	Ccee, K-
VEGF_CP	$\leq 774,83$	CcEe, K-
	$> 774,83$	Ccee, K-
VEGF_HDP	$\leq 447,37$	CcEe, K-
	$> 447,37$	Ccee, K-
FvW_CP	$\leq 128,90$	CcEe, K-
	$> 128,90$	Ccee, K-

Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

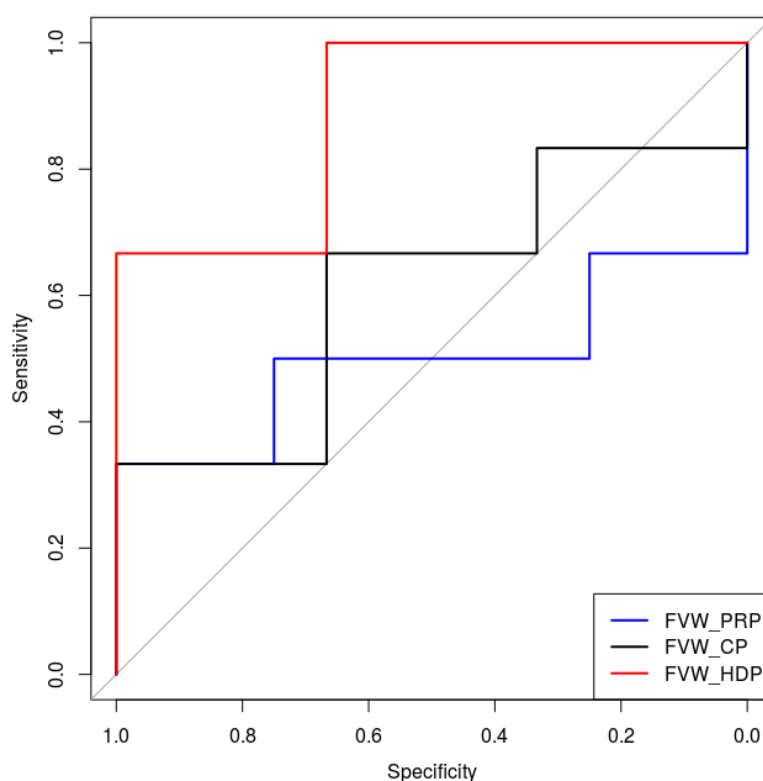
Com a finalidade de se verificar se os indivíduos do grupo A+ são mais secretores de FvW do que os indivíduos do grupo O+ utilizou-se novamente a análise ROC e determinação da AUC para cada método de preparo. Na sequência, para os métodos de preparo com diferença estatística significativa, é apresentado um *boxplot* para ilustração das médias e da dispersão dos valores relativos aos grupos de indivíduos A+ e O+.

Para comparação de qual método de preparo é mais eficiente, foi utilizado o Teste T para dados pareados para verificar se a média dos valores relativos à dosagem de hormônios é diferente para os preparos PRP, CP e HDP. Na sequência é novamente apresentado um *boxplot* para ilustrar a dispersão dos dados.

Os dados da tabela 5 apresentada anteriormente revelam que apenas para o preparo HDP há discriminação significativa entre o tipo sanguíneo dos doadores e a determinação do FvW. Para ilustrar o exposto, foram determinadas as curvas ROC para os três métodos de preparo: HDP, CP e PRP para a dosagem do hormônio FvW, as quais são ilustrados no gráfico 4 com destaque para o tracejado em vermelho, nitidamente superior, correspondendo a dosagem de FvW na amostragem pelo método de preparo HDP. Isto pode ser justificado, pois este fator é circulante, portanto nas amostras de plasma e de concentrado de plaquetas, que possuem plasma sobrenadante, encontra-se detectável. É

bem descrito também na literatura a existências de FvW nos grânulos plaquetário, portanto, ao lisar as plaquetas, o conteúdo do grânulo foi liberado aumentando a concentração final do fator. Os resultados encontrados são os esperados, pois o PRP, proporcionalmente conterá menos plaquetas em relação ao plasma sobrenadante. Já no método de preparo de CP, a quantidade de plasma sobrenadante é menor, e receberá progressivamente a liberação de fatores dos grânulos plaquetário, justificando desta forma o aumento deste fator na forma de preparo denominada CP. Portanto podemos afirmar que para as dosagens de Fator Von Willebrand (FvW) as concentrações estão nesta sequência: HDP>CP>PRP.

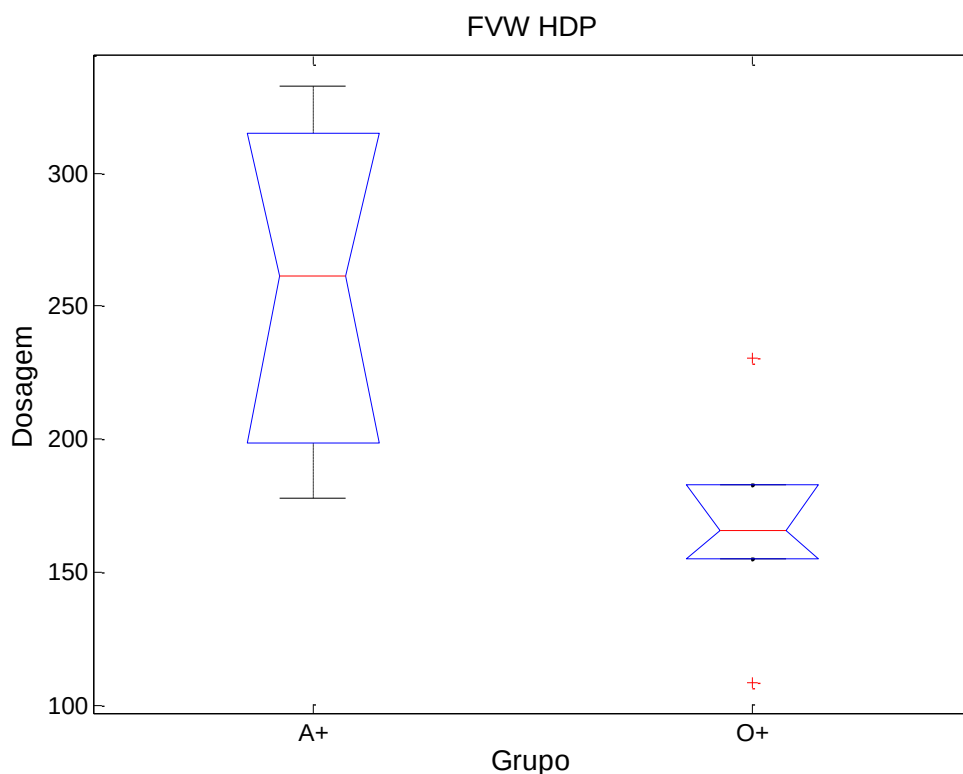
Gráfico 4 - Curvas ROC para os três métodos de preparo: HDP, CP e PRP da técnica FvW para discriminação dos indivíduos dos grupos sanguíneos A+ e O+.



Fonte: arquivo pessoal, 2016

O *boxplot* apresentado no gráfico 5 ilustra a diferença estatística entre a concentração de FvW para os grupos sanguíneos A+ e O+, sendo que para o grupo A+ a dosagem de fatores de crescimento é significativamente maior. Este fato é representativo para os demais fatores de crescimento.

Gráfico 5 - *Boxplot* que ilustra a diferença entre a concentração de FvW para os grupos sanguíneos A+ e O+ para a técnica HDP.



Fonte: arquivo pessoal, 2016

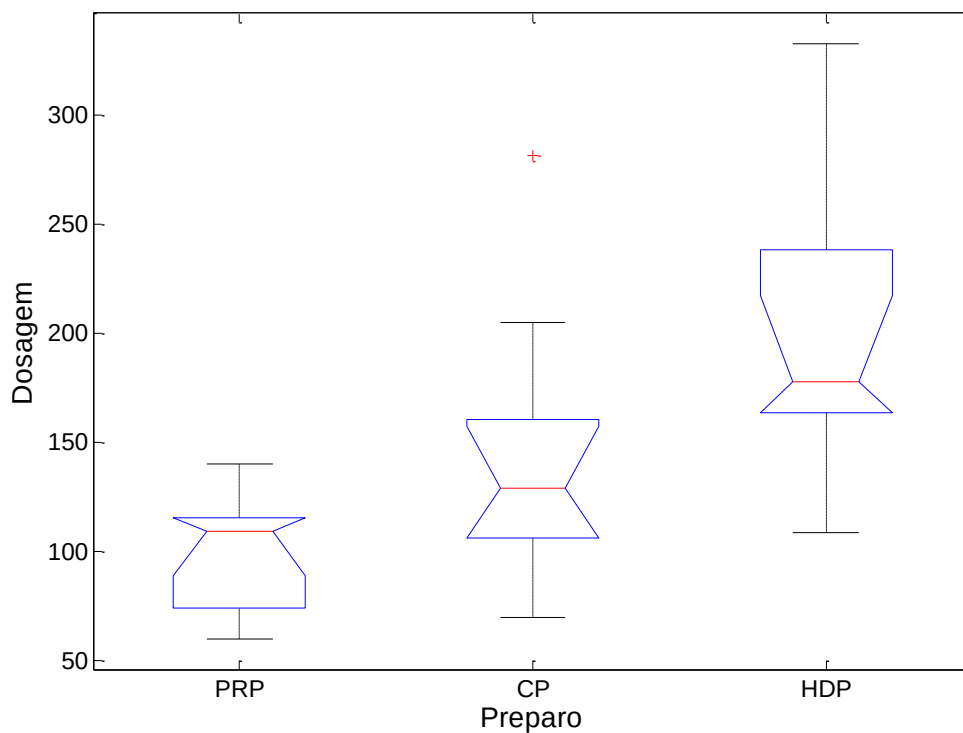
Já o Teste T para verificar se a média dos valores relativos à dosagem de hormônios é diferente para os preparos PRP, CP e HDP para o hormônio FvW revelou que há diferença estatisticamente significativa apenas entre os métodos PRP e HDP, no entanto, na amostragem deste trabalho não foi identificado diferença estatística significativa entre CP e HDP. Esses resultados são apresentados na tabela 7 e no gráfico 6.

Tabela 7 - Comparação entre os métodos PRP, CP e HDP para a técnica FvW.

Métodos Comparados	Teste T p-value
FvW PRP x FvW CP	0,05375
FvW PRP x FvW HDP	0,002681*
FvW CP x FvW HDP	0,1679

* Médias consideradas estatisticamente diferentes para valores de $p \leq 0,05$
 Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Gráfico 6 - *Boxplot* que ilustra a dispersão dos dados para os métodos de preparo PRP, CP e HDP para a determinação do FvW.



Fonte: arquivo pessoal, 2016

Os resultados mostram que o método de preparo HDP é significativamente melhor apenas que o PRP.

A Angiopoietina é Fatores de Crescimento que regulam o desenvolvimento e a maturação de vasos sanguíneos e linfáticos e possuem propriedades anti-inflamatórias, tendo, portanto, papel importante na angiogênese embrionária e pós-natal^{65,66}. O VEGF, também conhecido como fator de permeabilidade vascular, estimula a proliferação de células endoteliais através de receptores específicos de tirosina-quinase, FLT-1 e Flk / KDR, expressa-se quase exclusivamente em células endoteliais. Mais recentemente, uma nova família de fatores de crescimento, as angiopoietinas, que também são típicas para o endotélio vascular, foram identificados. Eles são ligantes do receptor tirosina quinase Tie2. Angiopoietina-1 serve como um fator de sobrevivência para o endotélio e promove o recrutamento de pericitos e células do músculo liso, servindo assim para estabilizar a rede vascular^{67,68}. A

Angiopoietina-2 é um antagonista biológico da Angiopoietina-1 e é expresso de forma extraordinária em locais de remodelação vascular. Ele reduz a estabilidade vascular e facilita o acesso de VEGF a células endoteliais⁶⁹.

Diante destes conhecimentos optou-se por avaliar estatisticamente se havia correlação entre as dosagens de Angiopoietina-2 e VEGF nas amostras dos 3 métodos de preparo: PRP, CP e HDP. Foi determinado o coeficiente de correlação de *Pearson* e *Spearman* para verificar se há correlação entre todos os métodos de dosagem de hormônio e preparos utilizados na pesquisa, sendo considerado como estatisticamente correlacionados os casos em que os índices de correlação tiveram valores acima de 0,75 ou menores que -0,75. O coeficiente de correlação de *Pearson* identifica se existem métodos com valores diretamente ou inversamente proporcionais. Já o coeficiente de correlação de *Spearman* é capaz de realizar a descrição da relação entre duas variáveis sem fazer nenhuma das suposições sobre a distribuição de frequências das variáveis, uma vez que os testes de normalidade mostraram que nem todos grupos amostrais possuem distribuição normal. Os mesmos testes foram realizados também para identificar se existe correlação entre contagem plaquetária e os métodos de dosagem de hormônio utilizados na pesquisa.

Os resultados de correlação entre contagem plaquetária e os métodos de dosagem de hormônio e preparos utilizados na pesquisa são apresentados na tabela 8 e 9 (correlação de *Pearson*) e tabela 10 e 11 (correlação de *Spearman*). Como pode ser observado na tabela 9, os dados marcados com verde claro representam a correlação direta e em rosa a inversa. Desta forma, O PAI-1 -CP apresenta correlação direta com RANTES-CP; PDGF-PRP com RANTES-PRP, PDGF-HDP com RANTES-HDP, Fibrinogênio-CP com ANGP-2-HDP, FGF-1-PRP com FGF-2 entre outras. Correlações inversas foram determinadas entre ANGP2-CP e RANTES-HDP, Fibrinogênio e FGF-2.

Os resultados mostram que não existe correlação significativa entre os métodos ANGP-2 e VEGF. Contudo, os resultados mostram que existe correlação direta significativa entre os métodos FGF-1 e FGF-2 e correlação inversa entre os métodos FGF-1- CP e Fibrinogênio PRP, CP e HDP.

Tabela 8 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as dosagens de hormônios plaquetários e método de preparo.

	<i>RANTES PRP</i>	<i>RANTES CP</i>	<i>RANTES HDP</i>	<i>EGF PRP</i>	<i>EGF CP</i>	<i>EGF HDP</i>	<i>ANGP2 PRP</i>	<i>ANGP2 CP</i>	<i>ANGP2 HDP</i>	<i>FGF1 PRP</i>	<i>FGF1 CP</i>	<i>FGF1 HDP</i>	<i>FGF2 PRP</i>	<i>FGF2 CP</i>	<i>FGF2 HDP</i>	<i>VEGF PRP</i>	<i>VEGF CP</i>	<i>VEGF HDP</i>	<i>PAI1 PRP</i>	<i>PAI1 CP</i>	<i>PAI1 HDP</i>	<i>PDGFAA PRP</i>	<i>PDGFAA CP</i>	<i>PDGFAA HDP</i>	<i>Fibrin PRP</i>	<i>Fibrin CP</i>	<i>Fibrin HDP</i>	<i>FVW PRP</i>	<i>FVW CP</i>	<i>FVW HDP</i>
RANTES PRP	1,00																													
RANTES CP	0,58	1,00																												
RANTES HDP	0,06	0,56	1,00																											
EGF PRP	-0,18	-0,02	-0,40	1,00																										
EGF CP	-0,22	0,09	-0,52	0,66	1,00																									
EGF HDP	-0,08	0,09	0,18	0,48	-0,06	1,00																								
ANGP2 PRP	-0,14	-0,29	-0,35	0,39	-0,16	0,32	1,00																							
ANGP2 CP	-0,47	-0,56	-0,97	0,47	0,62	-0,24	0,41	1,00																						
ANGP2 HDP	0,54	0,06	-0,01	-0,29	-0,49	0,00	0,85	0,19	1,00																					
FGF1 PRP	-0,50	-0,27	0,42	0,05	-0,36	0,54	0,28	-0,14	0,08	1,00																				
FGF1 CP	-0,44	-0,02	0,48	-0,08	0,17	-0,12	-0,66	-0,13	-0,87	0,86	1,00																			
FGF1 HDP	0,02	0,18	0,66	-0,03	-0,51	0,72	0,32	-0,67	0,25	0,35	-0,43	1,00																		
FGF2 PRP	-0,19	-0,06	0,29	0,21	0,00	0,33	-0,01	-0,04	-0,23	0,85	0,83	-0,22	1,00																	
FGF2 CP	-0,35	0,08	0,45	0,14	0,26	0,39	-0,53	-0,26	-0,84	0,75	0,88	0,00	0,82	1,00																
FGF2 HDP	0,13	0,08	0,42	0,30	-0,28	0,52	0,08	-0,58	-0,08	0,62	0,04	0,54	0,44	0,42	1,00															
VEGF PRP	0,15	0,25	0,14	-0,20	-0,01	-0,11	0,10	-0,06	0,27	-0,01	0,08	0,24	-0,09	0,12	-0,15	1,00														
VEGF CP	0,16	0,09	0,05	-0,45	-0,46	-0,51	0,09	-0,16	0,33	-0,24	-0,17	0,10	-0,35	-0,20	-0,19	0,94	1,00													
VEGF HDP	0,18	0,38	0,35	-0,24	-0,01	0,02	-0,05	-0,26	0,13	-0,08	0,21	0,41	-0,23	0,30	-0,09	0,96	0,84	1,00												
PAI1 PRP	-0,06	0,11	0,53	-0,61	-0,23	-0,44	-0,78	-0,38	-0,39	0,43	0,69	-0,43	0,42	0,47	-0,30	-0,13	-0,18	-0,07	1,00											
PAI1 CP	0,16	0,82	0,52	0,03	0,13	0,30	-0,32	-0,50	-0,27	-0,27	-0,05	0,28	-0,20	0,09	0,01	0,08	-0,05	0,29	0,04	1,00										
PAI1 HDP	-0,25	0,24	0,53	-0,59	-0,28	-0,26	-0,52	-0,46	-0,58	-0,10	0,12	0,05	-0,29	-0,01	-0,24	-0,16	0,08	0,01	0,49	0,54	1,00									
PDGFAA PRP	0,78	0,59	0,46	-0,46	-0,42	0,05	-0,28	-0,72	0,37	-0,08	0,03	0,25	0,13	0,12	0,14	0,44	0,36	0,49	0,29	0,26	-0,03	1,00								
PDGFAA CP	0,31	0,75	0,59	-0,20	0,02	0,17	-0,55	-0,67	-0,36	-0,15	0,09	0,37	-0,09	0,36	0,17	0,50	0,33	0,69	0,16	0,75	0,35	0,60	1,00							
PDGFAA HDP	0,02	0,37	0,82	-0,60	-0,51	0,23	-0,46	-0,86	-0,28	0,28	0,36	0,68	0,11	0,42	0,17	0,31	0,23	0,53	0,52	0,49	0,58	0,55	0,72	1,00						
Fg PRP	0,15	-0,27	-0,49	-0,41	-0,30	-0,54	0,30	0,39	0,46	-0,53	-0,53	-0,42	-0,55	-0,79	-0,72	-0,02	0,35	-0,17	-0,14	-0,26	0,13	-0,08	-0,44	-0,32	1,00					
Fg CP	0,23	-0,69	-0,43	-0,24	-0,34	-0,68	0,60	0,44	0,85	0,06	-0,53	-0,04	-0,25	-0,85	-0,72	-0,21	-0,14	-0,32	0,12	-0,86	-0,38	-0,16	-0,76	-0,44	0,96	1,00				
Fg HDP	-0,09	-0,33	-0,41	-0,37	-0,19	-0,59	0,30	0,47	0,47	-0,40	-0,40	-0,50	-0,36	-0,80	-0,71	-0,14	0,17	-0,30	0,15	-0,35	0,17	-0,25	-0,63	-0,39	0,97	0,93	1,00			
FVW PRP	0,38	-0,07	0,12	-0,37	-0,62	-0,10	0,19	-0,44	0,48	-0,09	-0,28	0,53	-0,20	-0,19	0,42	0,55	0,75	0,51	-0,26	-0,31	-0,22	0,46	0,18	0,22	0,11	0,13	-0,15	1,00		
FVW CP	-0,36	-0,35	0,18	-0,26	-0,23	-0,28	-0,33	-0,53	-0,51	0,24	0,21	0,13	-0,13	0,36	0,42	0,08	0,63	0,09	0,05	-0,27	0,24	-0,17	0,11	0,22	-0,24	-0,37	-0,28	0,53	1,00	
FVW HDP	0,02	-0,10	-0,22	-0,10	-0,29	0,09	0,43	0,24	0,38	0,18	0,10	-0,19	0,29	-0,02	-0,29	0,36	0,47	0,21	-0,20	-0,08	-0,19	0,24	-0,10	0,01	0,50	-0,37	0,36	0,17	-0,36	1,00

Fg- fibrinigênio. Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Pearson entre contagem plaquetária e dosagem dos hormônios nos diferentes métodos.

	<i>RANTES PRP</i>	<i>RANTES CP</i>	<i>RANTES HDP</i>	<i>EGF PRP</i>	<i>EGF CP</i>	<i>EGF HDP</i>	<i>ANGP2 PRP</i>	<i>ANGP2 CP</i>	<i>ANGP2 HDP</i>	<i>FGF1 PRP</i>	<i>FGF1 CP</i>	<i>FGF1 HDP</i>	<i>FGF2 PRP</i>	<i>FGF2 CP</i>	<i>FGF2 HDP</i>	<i>VEGF PRP</i>	<i>VEGF CP</i>	<i>VEGF HDP</i>	<i>PAI1 PRP</i>	<i>PAI1 CP</i>	<i>PAI1 HDP</i>	<i>PDGFAA PRP</i>	<i>PDGFAA CP</i>	<i>PDGFAA HDP</i>	<i>Fibrin PRP</i>	<i>Fibrin CP</i>	<i>Fibrin HDP</i>	<i>FVW PRP</i>	<i>FVW CP</i>	<i>FVW HDP</i>
Plaquetometria pré X10³mm	-0,26	-0,10	-0,21	0,07	0,00	0,34	-0,15	-0,08	-0,67	-0,43	-0,44	0,12	-0,46	-0,20	0,00	-0,13	0,06	-0,03	-0,39	0,38	0,37	-0,25	0,22	0,13	0,17	-0,73	-0,17	-0,09	0,22	0,17
Plaquetometria -PRP X 10³mm	-0,17	0,01	-0,12	0,13	0,07	0,44	-0,30	-0,23	-0,79	-0,44	-0,45	0,23	-0,45	-0,14	0,18	-0,25	-0,12	-0,10	-0,35	0,46	0,37	-0,20	0,31	0,17	-0,02	-0,72	-0,39	-0,13	0,24	-0,11
Plaquetometria CP X 10³mm	0,03	0,20	0,44	-0,17	-0,62	0,39	0,29	-0,57	0,17	0,07	-0,13	0,60	-0,06	0,00	0,46	0,39	0,67	0,42	-0,32	0,31	0,18	0,31	0,39	0,51	-0,05	-0,72	-0,25	0,57	0,25	0,43
Índice de concentração	0,11	0,21	0,53	-0,18	-0,67	0,31	0,41	-0,57	0,45	0,27	0,04	0,64	0,13	0,07	0,51	0,47	0,68	0,46	-0,21	0,14	0,01	0,40	0,29	0,46	-0,12	-0,32	-0,21	0,66	0,20	0,41

Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Tabela 10 - Coeficientes de correlação de Spearman entre as dosagens de hormônios plaquetários e método de preparo.

	<i>RANTES PRP</i>	<i>RANTES CP</i>	<i>RANTES HDP</i>	<i>EGF PRP</i>	<i>EGF CP</i>	<i>EGF HDP</i>	<i>ANGP2 PRP</i>	<i>ANGP2 CP</i>	<i>ANGP2 HDP</i>	<i>FGF1 PRP</i>	<i>FGF1 CP</i>	<i>FGF1 HDP</i>	<i>FGF2 PRP</i>	<i>FGF2 CP</i>	<i>FGF2 HDP</i>	<i>VEGF PRP</i>	<i>VEGF CP</i>	<i>VEGF HDP</i>	<i>PAI1 PRP</i>	<i>PAI1 CP</i>	<i>PAI1 HDP</i>	<i>PDGFAA PRP</i>	<i>PDGFAA CP</i>	<i>PDGFAA HDP</i>	<i>Fibrin PRP</i>	<i>Fibrin CP</i>	<i>Fibrin HDP</i>	<i>FVW PRP</i>	<i>FVW CP</i>	<i>FVW HDP</i>
RANTES PRP	1,00																													
RANTES CP	0,65	1,00																												
RANTES HDP	0,14	0,48	1,00																											
EGF PRP	-0,13	-0,18	-0,24	1,00																										
EGF CP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN																									
EGF HDP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN																								
ANGP2 PRP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN																							
ANGP2 CP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN																						
ANGP2 HDP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN																					
FGF1 PRP	0,03	-0,22	0,34	0,31	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	1,00																				
FGF1 CP	0,03	0,09	0,35	0,20	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,43	1,00																			
FGF1 HDP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN																		
FGF2 PRP	-0,27	-0,36	0,05	0,52	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,72	0,30	NaN	1,00																	
FGF2 CP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN																
FGF2 HDP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN															
VEGF PRP	0,21	0,47	0,26	-0,10	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,12	0,23	NaN	-0,37	NaN	NaN	1,00														
VEGF CP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN													
VEGF HDP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN												
PAI1 PRP	0,08	-0,02	0,47	-0,22	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,38	0,68	NaN	0,38	NaN	NaN	-0,30	NaN	NaN	1,00											
PAI1 CP	0,18	0,78	0,41	-0,15	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,24	0,13	NaN	-0,07	NaN	NaN	0,21	NaN	NaN	0,08	1,00										
PAI1 HDP	-0,07	0,42	0,65	-0,55	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,37	0,09	NaN	-0,27	NaN	NaN	-0,09	NaN	NaN	0,38	0,60	1,00									
PDGFAA PRP	0,83	0,70	0,47	-0,29	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,29	0,21	NaN	-0,01	NaN	NaN	0,33	NaN	NaN	0,32	0,41	0,18	1,00								
PDGFAA CP	0,56	0,83	0,67	-0,26	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,09	0,49	NaN	-0,20	NaN	NaN	0,58	NaN	NaN	0,32	0,64	0,48	0,79	1,00							
PDGFAA HDP	0,03	0,35	0,68	-0,46	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,29	0,27	NaN	0,14	NaN	NaN	0,21	NaN	NaN	0,42	0,58	0,64	0,50	0,61	1,00						
Fibrin PRP	0,09	-0,09	-0,26	-0,79	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,54	-0,55	NaN	-0,50	NaN	NaN	-0,21	NaN	NaN	-0,05	-0,18	0,20	0,02	-0,20	-0,09	1,00					
Fibrin CP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN			
Fibrin HDP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN		
FVW PRP	0,37	0,16	0,35	-0,07	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,27	-0,21	NaN	-0,21	NaN	NaN	0,43	NaN	NaN	-0,31	-0,22	-0,05	0,39	0,30	0,20	-0,04	NaN	NaN	1,00		
FVW CP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
FVW HDP	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN

Legenda: NaN indica que o teste de correlação não pode ser realizado devido a dados faltantes para os métodos de preparo. Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Tabela 11 - Coeficientes de correlação de Spearman entre contagem plaquetária e dosagem dos hormônios nos diferentes métodos.

	<i>RANTES PRP</i>	<i>RANTES CP</i>	<i>RANTES HDP</i>	<i>EGF PRP</i>	<i>EGF CP</i>	<i>EGF HDP</i>	<i>ANGP2 PRP</i>	<i>ANGP2 CP</i>	<i>ANGP2 HDP</i>	<i>FGF1 PRP</i>	<i>FGF1 CP</i>	<i>FGF1 HDP</i>	<i>FGF2 PRP</i>	<i>FGF2 CP</i>	<i>FGF2 HDP</i>	<i>VEGF PRP</i>	<i>VEGF CP</i>	<i>VEGF HDP</i>	<i>PAI1 PRP</i>	<i>PAI1 CP</i>	<i>PAI1 HDP</i>	<i>PDGFAA PRP</i>	<i>PDGFAA CP</i>	<i>PDGFAA HDP</i>	<i>Fibrin PRP</i>	<i>Fibrin CP</i>	<i>Fibrin HDP</i>	<i>FVW PRP</i>	<i>FVW CP</i>	<i>FVW HDP</i>
Plaquetometriapré X10³mm	-0,31	0,02	-0,30	-0,07	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,49	-0,31	NaN	-0,15	NaN	NaN	-0,06	NaN	NaN	-0,43	0,41	0,27	-0,22	-0,07	0,25	0,09	NaN	NaN	-0,07	NaN	NaN
Plaquetometria -PRP X 10³mm	-0,22	-0,05	-0,27	0,18	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,35	-0,26	NaN	0,03	NaN	NaN	-0,38	NaN	NaN	-0,29	0,34	0,22	-0,26	-0,19	0,17	-0,13	NaN	NaN	-0,13	NaN	NaN
Plaquetometria CP X 10³mm	0,03	0,26	0,33	-0,07	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,19	-0,20	NaN	-0,04	NaN	NaN	0,60	NaN	NaN	-0,42	0,16	0,07	0,31	0,37	0,41	-0,10	NaN	NaN	0,75	NaN	NaN
Índice de concentração	-0,02	0,27	0,55	-0,01	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,35	-0,13	NaN	0,05	NaN	NaN	0,58	NaN	NaN	-0,31	0,18	0,13	0,28	0,38	0,47	-0,26	NaN	NaN	0,75	NaN	NaN

Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Também foi utilizado para verificar se a contagem plaquetária tem correlação com as concentrações de hormônios os coeficientes de correlação de *Pearson* e *Spearman*. Os resultados mostram que, de maneira geral, a contagem plaquetária não tem correlação com os métodos de dosagem de hormônios, exceto para o método FvW- PRP, conforme indicado na tabela 11.

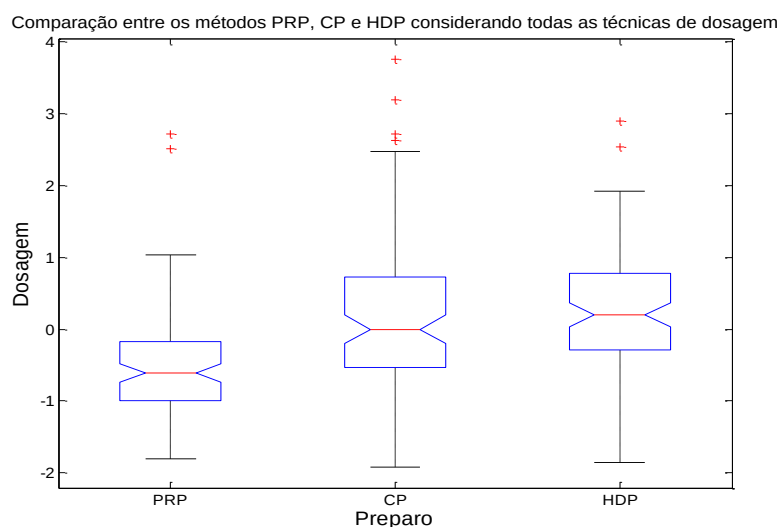
Os resultados apresentados na tabela 12 e no gráfico 7 mostram que os métodos de preparo CP e HDP são significativamente mais eficientes que o método PRP. Contudo, não há diferença estatisticamente significativa entre os métodos CP e HDP.

Tabela 12 - Comparação entre os métodos PRP, CP e HDP considerando todas as técnicas de dosagem de hormônio.

<i>Métodos Comparados</i>	<i>Teste T p-value</i>
PRP x CP	4.349e-10*
PRP x HDP	1.51e-12*
CP x HDP	0.8288

Legenda: * Médias consideradas estatisticamente diferentes. Fonte: arquivo pessoal, 2016

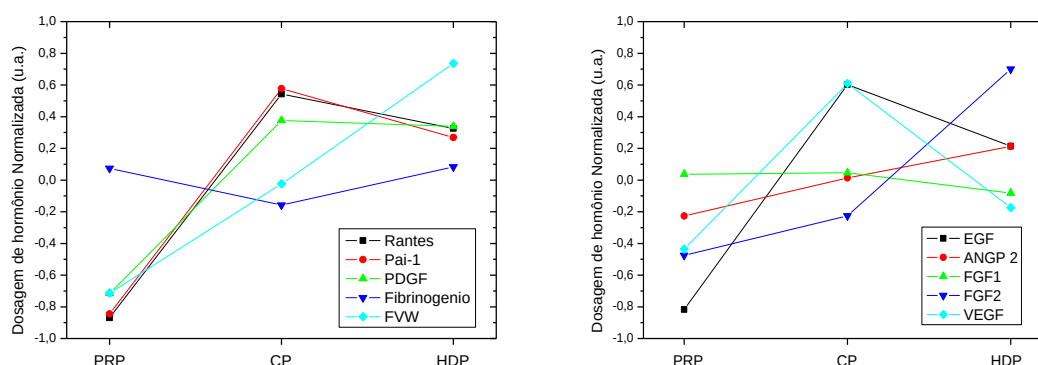
Gráfico 7 - *Boxplot* que ilustra a dispersão dos dados para os métodos de preparo PRP, CP e HDP para todas as técnicas de dosagem de hormônios de crescimento.



Fonte: arquivo pessoal, 2016

Para a comparação entre os métodos de dosagem de hormônio, foi utilizada a normalização z-score. As análises estatísticas mostraram que não existe diferença significativa entre os métodos, contudo, através do gráfico é possível observar a evolução dos dados referentes aos diferentes métodos CP, PRP e HDP, gráficos 8 e 9. Destacam-se com valores maiores em HDP, o FwW e o FGF-2. O PRP tem os menores valores em todas as dosagens efetuadas e a metodologia de CP é a que obteve as maiores concentrações. Há que se destacar que a utilização de plaqueta íntegra limita a técnica exclusivamente em uso autólogo, tendo em vista a grande variedade de antígenos que a plaqueta expressa: ABO, HLA e antígenos próprios plaquetários (Hpa). Estes antígenos estão envolvidos em resposta imune como a rejeição.

Gráfico 8 - Dispersão dos dados para as técnicas de dosagem de hormônio considerando os 3 métodos de preparo.



Fonte: arquivo pessoal, 2016

4.3. Etapa 3 - Cultura de célula tronco mesenquimais com o Plasma Rico em Plaqueta (PRP), Concentrado de Plaquetas (CP) e Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP).

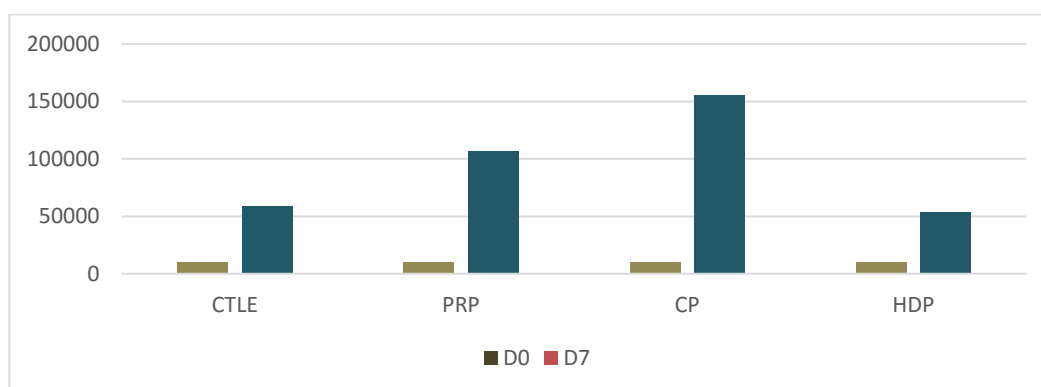
A última etapa do trabalho foi avaliar a curva de crescimento de CTM e o tempo de confluência a 80% na presença de PRP, CP e HDP pela técnica de lisado em comparação com cultura padrão na presença de soro fetal bovino. O soro fetal bovino foi adicionado ao meio de cultura DMEM-F12 aditivado na concentração de 20%. Para efeitos de comparação, os preparados de PRP, CP e HDP foram adicionados ao meio de cultura na mesma concentração do SFB. Para o experimento optou-se por utilizar SFB *Certified, Qualified, Mycoplasma free*, de origem americana, com elevado padrão de controle da qualidade (Sigma-Aldrich®). Foi distribuída em

cada poço de cultura uma quantidade de 10^4 células com viabilidade de 95%. Todo o experimento foi realizado em triplicata. As células foram observadas diariamente por microscopia invertida. A primeira constatação foi a de que ao adicionar o PRP, CP e HDP nos frascos de meio de cultura com alta concentração de cálcio em sua composição houve a formação de uma malha de gel de diferente consistência conforme o produto adicionado.

O método de PRP gerou a formação de fibrina frouxa, a de HDP, uma formação mais densa, mas foi o método de concentrado de plaquetas que gerou o gel mais consistente. Vinte e quatro horas após o plaqueamento já se observava nos poços em triplicata contendo SFB, adesão e prolongamentos fibroblastóides nas células. O mesmo não foi observado nos experimentos aditivados com PRP, CP e HDP. As CTM estavam 100% presas na malha de fibrina o que dificultou a avaliação da confluência. Optou-se por monitorar durante 7 dias, quando os poços alimentados com SFB apresentavam 85% de confluência. Dos três poços dos demais experimentos, utilizou-se dois para a realização da contagem em duplicata promovendo uma vigorosa homogeneização com a micropipeta. No terceiro poço, coletou-se o gel ou coágulo de fibrina para processamento histológico, uma vez que a observação por microscopia invertida não foi possível por não haver translucidez suficiente. Após a fixação o material foi emblocado e procedido aos cortes e coloração com hematoxilina-eosina.

Quanto à contagem celular a média da contagem em D+7 foi de $5,8 \times 10^4$ para o controle, $1,07 \times 10^5$ para PRP, $1,5 \times 10^5$ para CP e $5,4 \times 10^4$ para HDP. No entanto observou-se que nos experimentos, havia grande quantidade de células presas na malha de fibrina, razão pela qual foi procedido a análise histológica.

Gráfico 9 - Média das contagens celulares no cultivo de CTM em D0 e D7, frente às 4 fontes de fator de crescimento: SFB, PRP, CP e HDP.

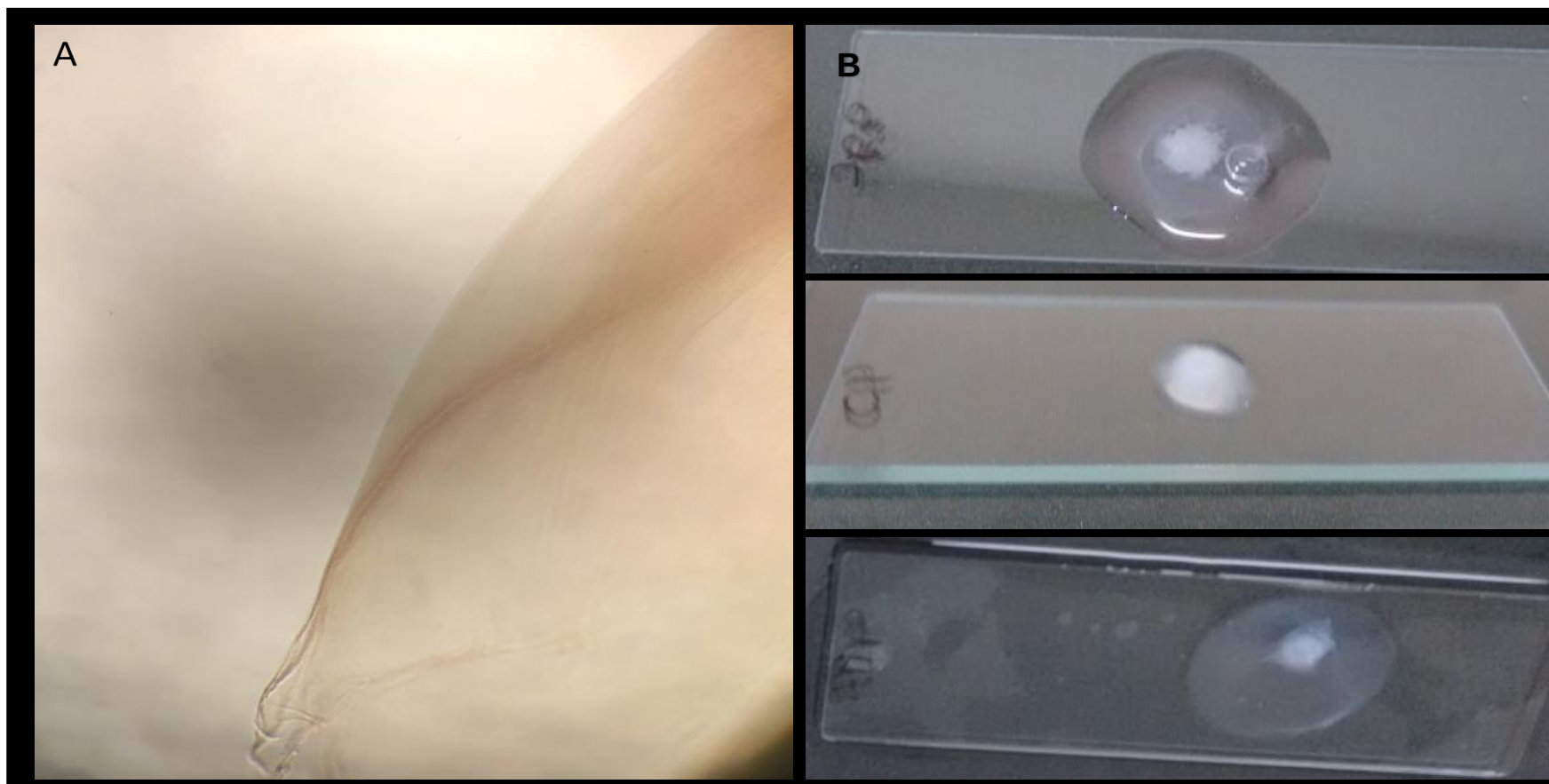


Fonte: arquivo pessoal, 2016

Como pode ser observado na figura 14 a fotomicrografia A representa a microscopia invertida da formação do gel, que no detalhe não apresenta célula. É uma formação tênue, delicada de fibras na forma de coágulo de fibrina, de densidades e consistências visualmente diferentes. Esta formação flutuava dentro do poço de cultura, não se observando nenhuma aderência de células ao longo dos 7 dias. As CTM tiveram a adesão a esta malha tridimensional que funcionou como um *scaffold* (arcabouço) para a adesão e proliferação das mesmas. Já na figura 14 B demonstra-se as três lâminas identificam o gel formado com o PRP, CP e HDP consecutivamente. O gel mais consistente foi aquele formado com a adição de concentrado de plaquetas. O PRP formou o gel mais frágil, com bordas irregulares. O HDP induziu a formação de um gel firme no centro e com menor consistência na periferia, mas ainda assim de consistência superior ao PRP.

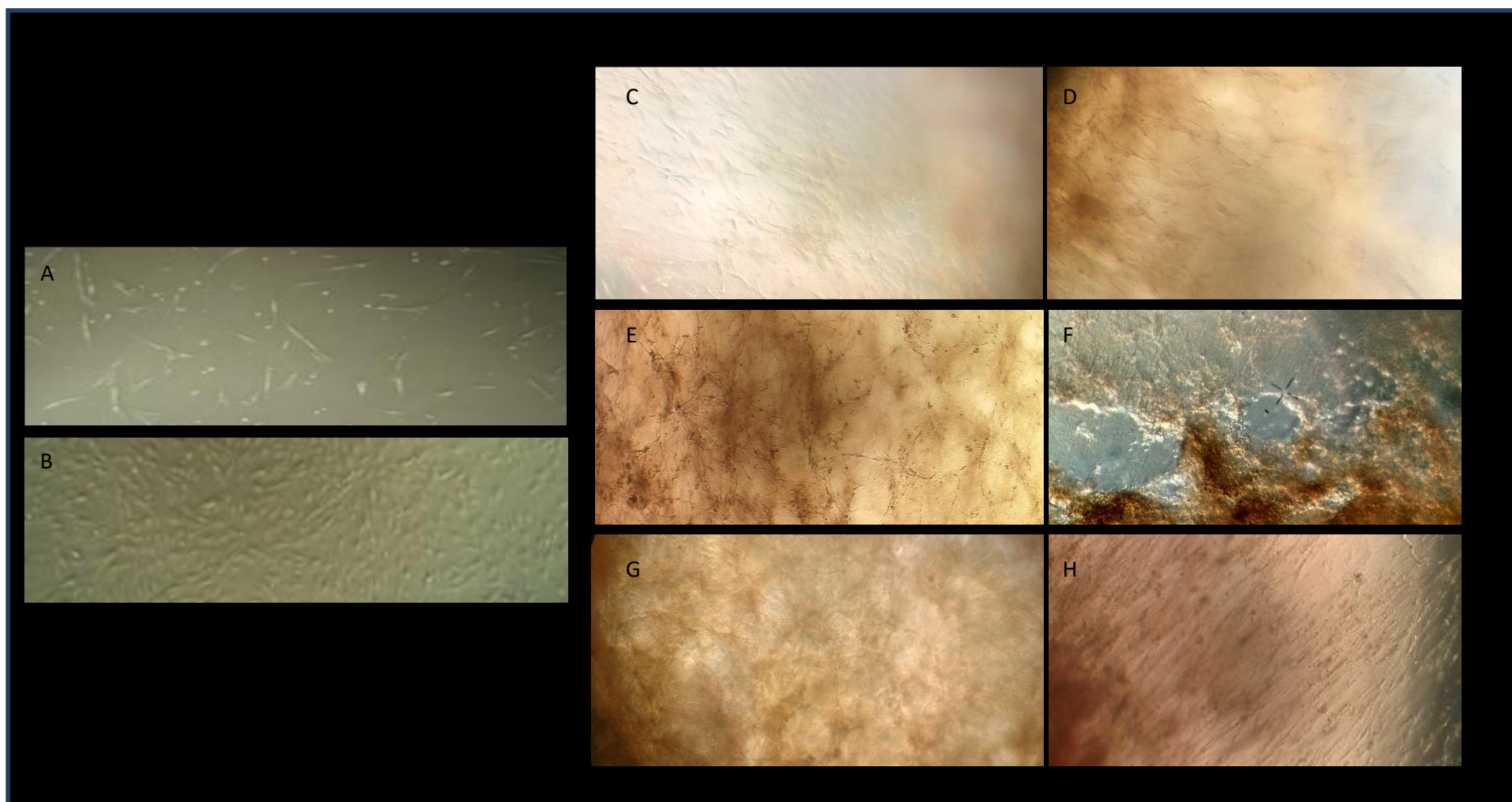
Na figura 15 está representada a microfotografia obtida por microscopia invertida, contraste de fase. Em A e B (Controle), aumento de 10X, aspecto da formação de colônias de células aderentes ao plástico, de aspecto fibroblastóides com grandes prolongamentos após 4 dias de plaqueamento dos poços em triplicata do controle.

Figura 14 – Identificação da rede de fibrina formada nos poços de cultura que receberam PRP, CP e HDP



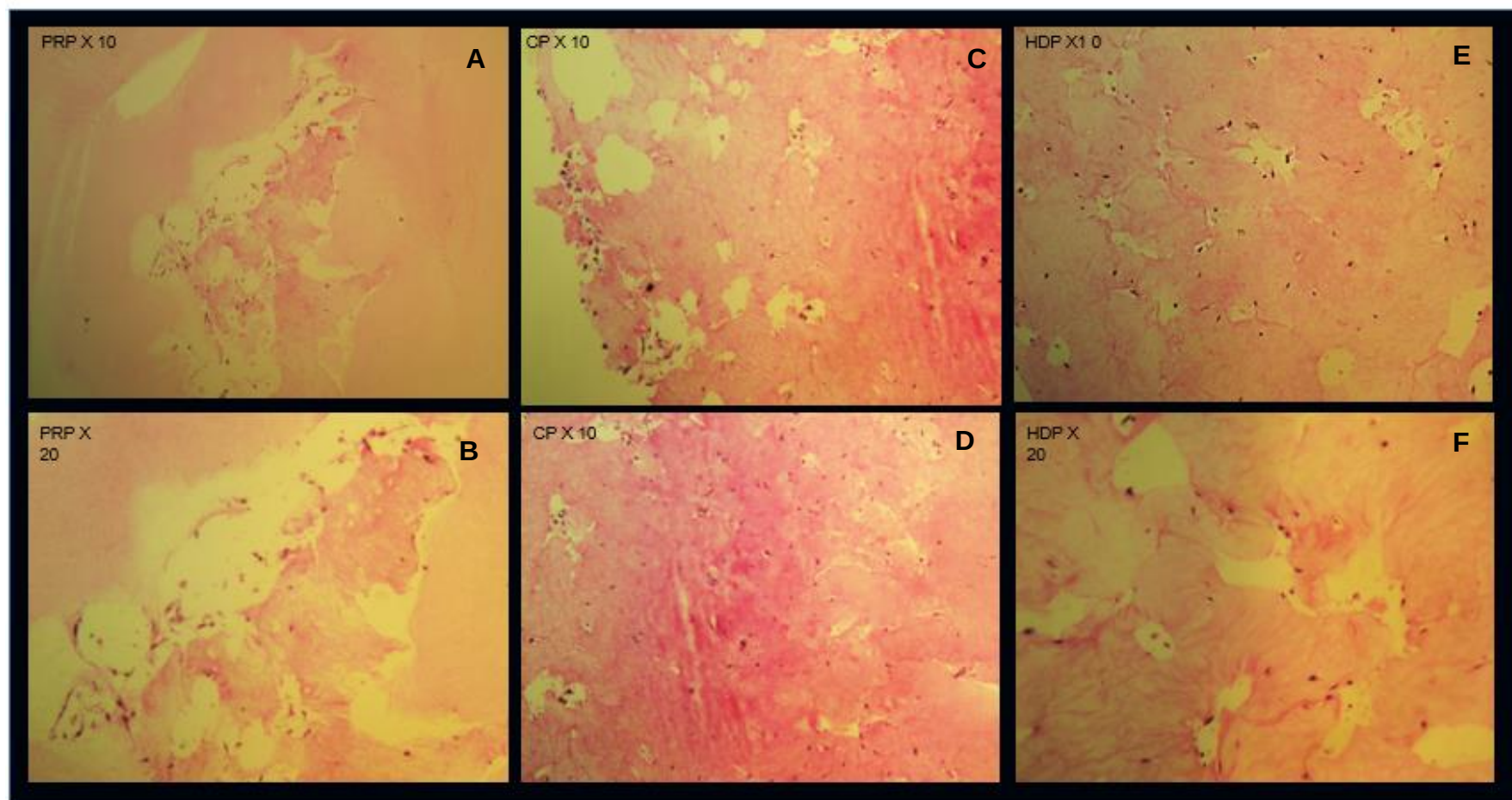
Legenda: A= fotomicrografia por microscopia invertida do gel de fibrina formado. Aumento 10X. Em B= 3 lâminas contendo o gel após 7 dias de cultura. De cima para baixo: PRP, CP e HDP. Fonte: arquivo pessoal, 2016.

Figura 15 – Aspecto da cultura com quatro e sete dias após plaqueamento das CTMh.



Legenda: A=cultura de CTM controle (SFB) 4 dias; B=CTM controle (SFB) 7 dias; C=cultura com PRP 4 dias, D= cultura com PRP 7 dias; E=cultura com CP 4 dias; F=cultura com CP 7 dias; G=cultura com HDP 4 dias; H=cultura com HDP 7 dias. Fonte: arquivo pessoal, 2016.

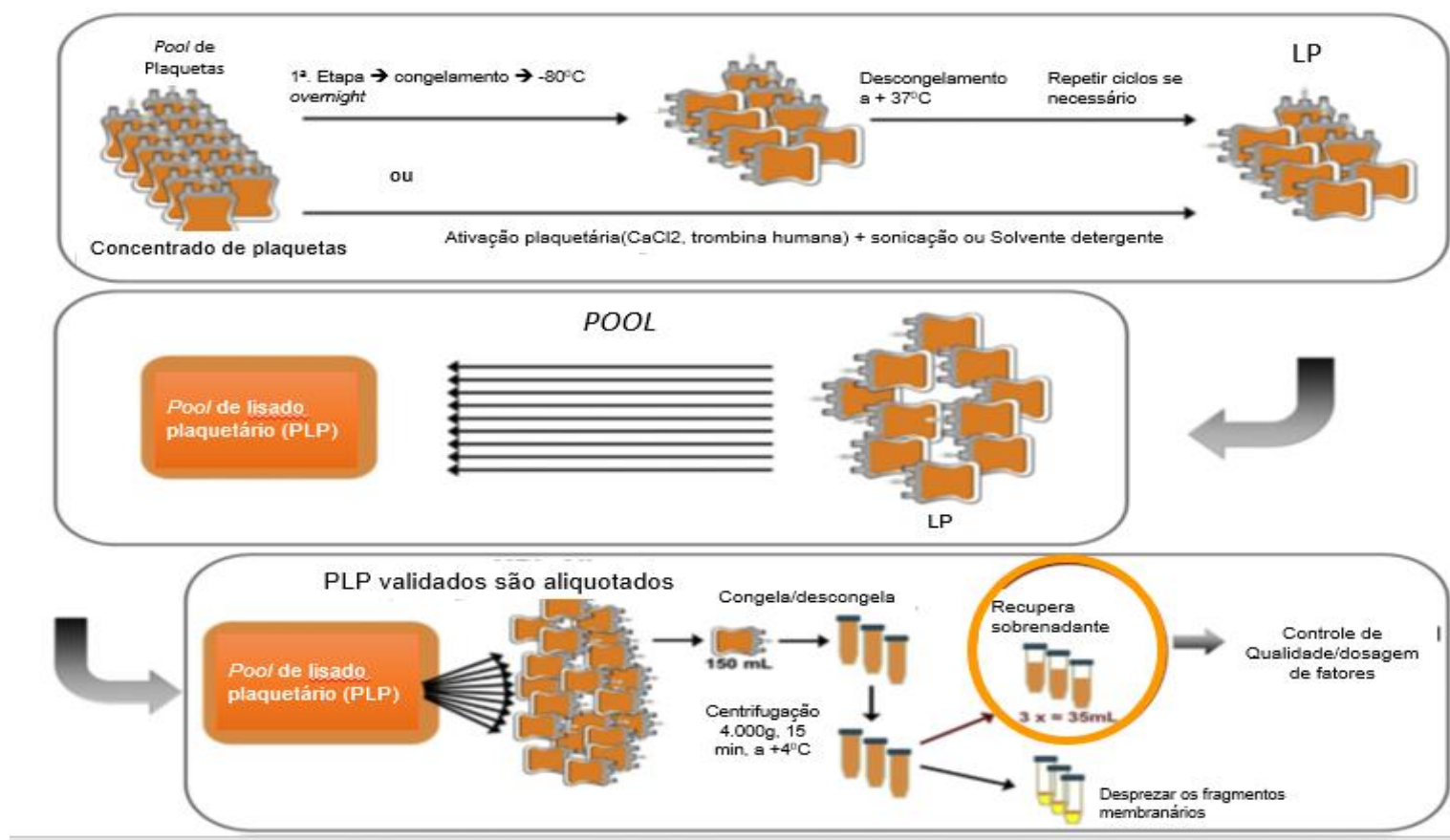
Figura 16 – Aspecto da cultura nos scaffold de PRP, CP e HDP sete dias após plaqueamento das CTMh, corados com hematoxilina eosina.



Legenda: A e B= cultura com PRP 20% com aumento 10X e 20X, respectivamente. C e D= cultura com CP 20% com aumento 10X. E e F= cultura com HDP 20% com aumento 10X e 20X, respectivamente. Fonte: arquivo pessoal, 2016.

Na figura 16 observam-se os cortes histológicos do gel formado no cultivo de CTMh na presença de PRP, CP e HDP, fixados e processados em métodos histológicos corados com hematoxilina-eosina. Na foto superior encontram-se sequencialmente as imagens com aumento de 10X e nos inferiores aqueles de 20X. A identificação fotográfica não comprova de fato, o que se observa com muita nitidez na observação microscópica: o PRP tem a massa amorfa do gel com distribuição mais frouxa, e a concentração de células é menor e arranjada em círculos sugerindo a indução da formação de neovasos. A observação do corte de CP mostra evidente e clara superioridade do número de células, muitas com aspecto histológico arredondado, e outras com prolongamentos fibroblastóides. Na lâmina do corte que recebeu HDP observa-se uma formação do gel mais enovelado, como flocos de algodão em grandes pedaços circulares, celularidade discretamente menor do que no CP, mas nitidamente superior ao PRP. Isto leva a afirmar que a cultura com a adição de HDP tem um desempenho melhor do que o PRP. Estes resultados corroboram os de Burnouf, 2016 publicado em periódico de alta relevância científica (FI=6,55) que mostra que hormônios derivados de plaquetas pela técnica de lisado correspondem ao padrão ouro para a substituição do soro fetal bovino na expansão de células com vistas à Medicina Regenerativa/Terapia Celular⁷⁰. O autor propõe em seu artigo o ciclo produtivo de HDP, pela técnica LP, como demonstra a figura 17, isto no sentido de atender a demanda da expansão ex-vivo de CTMh.

Figura 17 – Esquema produtivo de HDP, pela técnica de lisado plaquetário, proposto por Burnouf, para atender necessidades da Medicina Regenerativa



Fonte: Modificado de Burnouf T, Strunk D, Koh M, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 2016,76:371-38

5. CONCLUSÕES

- ✓ Foram analisados 50 artigos entre 2012-2016, destes, 29 com a palavra-chave *platelet-rich plasma*, 14 *platelet lysate (PL)* e 7 *platelet growth factor (PGF)*. Os artigos publicados com a palavra-chave PL são de periódicos com maior FI e maior coerência com a metodologia, seguida do PGF e por último PRP. Contata-se que a maioria dos trabalhos com a terminologia PRP foi empregada de forma equivocada.
- ✓ Foi padronizado e validada a obtenção de hormônios derivados de plaquetas, pela técnica de lisado plaquetário.
- ✓ Não foi identificada correlação estatisticamente significativa entre a contagem plaquetária e a dosagem dos fatores de crescimento RANTES, PAI1, angiopoietina-2, VEGF-AA, PDGF-AA, FGF-1, FGF-2, EGF, FvW e fibrinogênio em indivíduos saudáveis.
- ✓ A idade dos indivíduos está inversamente relacionada com a concentração de fator, à exceção do FGF.
- ✓ Não há correlação da quantidade de fatores de crescimento e sexo.
- ✓ Indivíduos do grupo sanguíneo A, e fenótipo **ee** são melhores secretores de hormônios de crescimento quando se comparam os 3 métodos analisados, o CP e o HDP são estatisticamente superiores ao PRP quanto à dosagem de fatores de crescimento.
- ✓ A análise desempenho dos preparados, na concentração de 20% quando comparado com o Soro Fetal Bovino na mesma concentração, identifica que o melhor desempenho quantitativamente foi CP>PRP> HDP= CTLE.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde, Gabinete do Ministro. Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016, DOU de 05/02/2016 (nº 25, seção 1, pág. 37).
- 2 - Cohn E. The Separation of Blood into Fractions of Therapeutic Value. *Ann. Int. Med.*, 1947, 26:341-352.
3. Amorim L. Aspectos técnicos da produção de Hemoderivados. Rio de Janeiro: Hemorio (aula disponível em pdf), 2008.
4. Sequeira, CD. Como o governo deixou estragar 55 mil bolsas de sangue. *Revista Isto É*, nº2234, de 05/09/2012. [Acesso em 10/02/2016]. Disponível em: <http://istoe.com.br/234306_COMO+O+GOVERNO+DEIXOU+ESTRAGAR+55+MIL+BOLSAS+DE+SANGUE/>.
5. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Reviews*, 2013, 27: 77–89.
6. Bausset O, Giraudo L, Veran J, et al. Formulation and Storage of Platelet-Rich Plasma Homemade Product. *BioResearch*, 2012, 1: 115-123.
7. Ubezio G, Ghio M, Contini P, et al. Bio-modulators in platelet-rich plasma: a comparison of the amounts in products from healthy donors and patients produced with three different techniques. *Blood Transfus.*, Jan 2013, 23: 1-8.
8. Kakudo N, Morimoto N, Kushida S, et al. Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo. *Med Mol Morphol*, 2013.
9. Anitua E, SÁnchez M., Orive G, et al. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *Wiley InterScience*, 2008 jul: 1262-63.
10. Anitua E, Sánchez M, Orive G. The importance of understanding what is platelet-rich growth factor (PRGF) and what is not. *J Shoulder Elbow Surg.*, 2011, 20: 23-24.
11. Relatório Platelet Rich Plasma Market - Asia Pacific Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2015 – 2023. ReportBuyer Feb 29, 2016: 17- 29. [Acesso em: 15/01/2016] Disponível em: <<http://www.prnewswire.com/news-releases/platelet-rich-plasma-market---asia-pacific-industry-analysis-size-share-growth-trends-and-forecast-2015---2023-300228056.html>>.
12. Advanced cell based solution and Services, 2014. [Acesso em: 12/03/2016]. Disponível em: <<http://www.zen-bio.com/products/serum/human-blood-products.php>>.
13. KOL Opinions Company Reports, Expert Interviews, Investing Publications, Press Release and TMR Analysis. 2014.

14. Conselho Federal De Medicina, Resolução CFM nº 2.128/2015(Publicado no D.O.U. de 29 de out. de 2015, Seção I, p. 236) [Acesso em 24/05/2016]. Disponível em: <http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/CFM/2015/2128_2015.pdf>.
15. Everts PAM, Knape TAJ, Weibrich G, et al. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. *J Extra CorporTechn.*, 2006, 38: 174-187.
16. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. *Rev EspCardiol.*, 2009, 62 (10): 1161-78.
17. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol.*, 2012, 210: 3-22.
18. Dolder J, Mooren R, Vloon APG, et al. Platelet-Rich Plasma: Quantification of Growth Factor Levels and the Effect on Growth and Differentiation of Rat Bone Marrow Cells. *Tissue Engineering*, 2006, 12 (11): 3067-73.
19. Gonzales VK, Mulder ELW, Boer T, et al. Platelet-Rich Plasma Can Replace Fetal Bovine Serum in Human Meniscus Cell Cultures. *Tissue Engineering*, 2013, 19 (11): 1-8.
20. Lubkowska A, Dolegowska B, Banfi G. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents*, Abr-Jun 2012, 26: 3-22.
21. Conti P, Digioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc*, May-Jun 2001, 22 (3): 133-137.
22. Martínez CE, Patricio CS, Alvarado VAP. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise up date. *Frontiers in Physiology*, Oct 2015, 6 (290): 1-7.
23. Felcht M, Luck R, Schering A, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *TheJournal of Clinical Investigation*, 2012, 122 (6): 1991-2005.
24. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters*, 2013, 328: 18–26.
25. Li X, Wang C, Xiao J, et al. Fibroblast growth factors, old kids on the new block. *Semin Cell Dev Biol*, 2015: 1-13.
26. Mimuro J. Type 1 plasminogen activator inhibitor: its role in biological reactions. *Rinsho Ketsueki*, May 1991, 32 (5): 487-9.
27. James HL, Ganguly P. Identity of human platelet fibrinogen. *April 1975*, 63 (3): 659-662.
28. Meyer D, Baumgartner HR. Role of Von Willebrand Factor in platelet adhesion to the subendothelium. *Jul 2008*.

29. Pawitan JA. Platelet Rich Plasma in Xeno-Free Stem Cell Culture: The Impact of Platelet Count and Processing Method. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2012, 7: 329-335.
30. Pascale M.R, et al. Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update. *Transfusion Medicine Reviews*, 2015, 29: 52–61.
31. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol*, 2010, 85: 647-56.
32. Meirelles LS, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*, 2009, 14: 4281-4298.
33. Friedenstein AJ, Piatetzky SII, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966, 16: 381–390.
34. Rodriguez AM, et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 2005, 87: 125-128.
35. Leri, A, Kajstura, J, Anversa, P. Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Physiol Rev.*, 2005, 85:1373–1416.
36. Dominici, M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8 (4): 315-317.
37. Pubmed, Base de Dados, US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2016. [Acesso em: 24/05/2016]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>.
38. Adaptado de Mccloat's, 2016. [Acesso em: 25/05/2016]. Disponível em <<http://denisemccloat.weebly.com>>.
39. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrina (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 2009, 27 (3).
40. Ehrenfest DMD, *et al.* Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2014; 4 (1): 3-9
41. Mintz, P. Transfusion Therapy: clinical principles and practice. AABB PRESS, 1999.
42. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. Wiley InterScience, 2008: 1262-1263.
43. Revitalle Medicina Integrada e Regenerativa. [Acesso em 18/12/2015]. Disponível em: <<http://www.revitallebrasil.com.br>>.

44. Pereira JC. Robotic Hair Transplant. [Acesso em 01/06/2016]. Disponível em: <<http://transplantedecabelo.com.br/pt/home/>>
45. Mourant AE, Domaniewska-Sobczak K, Kopec AC. Blood Groups and Diseases: A Study of Associations of Diseases with Blood Groups and Other Polymorphisms. Book reviews, 1978: 241-242.
46. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte cross talk: Linking pro inflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res*, 2013, 131(3):191-7.
47. Liumbruno GM, Franchini M. Beyond immunohaematology: the role of the ABO blood group in human diseases. *Blood Transfus.*, 2013; 11: 491-9.
48. Grotto RM, Picelli N, Souza LR, et al. Human Platelet Polymorphism can be a genetic marker associated with HIV/HCV coinfection. *J Med Virol.*, 2015, 87(10):1677-81.
49. Garraty G. Blood groups and disease: A historical perspective. *Transfus Med Rev.* 2000, 14(4):291-301.
50. Edgren G, Hjalgrim H, Rostgaard K, Norda R, Wikman A, Melbye M, Nyrén O. Risk of gastric cancer and peptic ulcers in relation to ABO blood type: a cohort study. *Am J Epidemiol.*, 2010, 172(11):1280-5.
51. Vasan SK, Rostgaard K, Ullum H, Melbye M, Hjalgrim H, Edgren G. ABO Blood Group and Dementia Risk - A Scandinavian Record. *PLoS One*, 2015, 10(6).
52. El-Galaly TC, Kristensen SR, Overvad K, Steffensen R, Tjønneland A, Severinsen MT. Interaction between blood type, smoking and factor V Leiden mutation and risk of venous thromboembolism: a Danish case-cohort study. *J Thromb Haemost.*, 2012, 10(10):2191-3.
53. Alpoim PN, Gomes KB, Godoi LC, Rios DR, Carvalho MG, Fernandes AP, Dusse LM. ADAMTS13, FVIII, von Willebrand factor, ABO blood group assessment in preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2011, 20 (412):2162-6.
54. Rios DR, Fernandes AP, Figueiredo RC, Guimarães DA, Ferreira CN, Simões E Silva AC, Carvalho MG, Gomes KB, Dusse LM. Relationship between ABO blood groups and von Willebrand factor, ADAMTS13 and factor VIII in patient under going hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis.*, 2012, 33(4):416-21.
55. O'Donnell J, Laffan MA. The relationship between ABO histo-bloodgroup, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med.*, 2001, 11(4):343-51.
56. Jenkins PV, O'Donnell JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all?. *Transfusion.* 2006, 46(10):1836-44.

57. Motswaledi MS, Kasvosve I, Oluwafemi O. Oguntibeju. The Role of Red Blood Cells in Enhancing or Preventing HIV Infection and Other Diseases. *BioMed Research International*. BioMed Research International, 2013: 1-7.
58. Y MA, Qian Y, W LV. The Correlation between Plasma Fibrinogen Levels and the Clinical Features of Patients with Ovarian Carcinoma. *The Journal of International Medical Research*. 2007, 35: 678-684.
59. Le Blanc S, Simann M, Jakob F, Schütze N, Schilling T. Fibroblast growth factors 1 and 2 inhibit adipogenesis of human bone marrow stromal cells in 3D collagengels. *ExpCell Res.*, 2015, 338(2):136-48
60. Onuma Y, Higuchi K¹, Aiki Y, Shu Y, Asada M, Asashima M, Suzuki M, Imamura T, Ito Y. A stable chimeric fibroblast growth factor (FGF) can success fullyre place basic FGF in human pluripotent stemcell culture. *PLoSOne*, 2015, 10(4).
61. Thisse B., Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during Embryonic development. *Developmental Biology*, 2005, 287: 390-402.
62. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio maxilla fac Surg*. 2002, 30(2):97-102.
63. Sode BF, Allin KH, Dahl M, Gyntelberg F, Nordestgaard BG. Risk of venous thromboembolism and myocardial infarction associated with factor V Leiden and prothrombin mutations and blood type. *CMAJ.*, 2013, 185 (5).
64. Westhoff. CM. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. *Semin Hematol.*, 2007, 44(1): 42–50.
65. Felcht, M., et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 6.
66. Fagiani, E. Gerhard Christofori Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters*, 2013, 328: 18-26.
67. Eklund L, Saharinenb P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental Cell Research*, 2013, 3 (19): 1271-1280
68. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zag D, et al. Vessel co-option, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 199, 284: 1994-1998.
69. Lauren J, Gunji Y, Alitalo K. Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? *Am J Pathol*, 1998, 153: 1333-1339.
70. Burnouf T, Strunk D, Koh M, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 2016,76:371-387.