



Ação antibacteriana e regenerativa da fibrina rica em plaquetas e leucócitos: um estudo *in vitro*

Bruna Somílio da Fonseca*; Jorge Alberto Achcar*; Fernanda de Freitas Aníbal**; Wilton Rogério Lustri*; André Capaldo Amaral*

*Universidade de Araraquara – UNIARA, Brasil.

**Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, Brasil.

*Autor para correspondência e-mail: brunasomilio@msn.com

Palavras-chave

Medicina regenerativa
Biomodulação
Fibrina
Cicatrização
Antimicrobiano

Keywords

Regenerative medicine
Biomodulation
Fibrin
Healing
Anti-bacterial

Resumo: Introdução: A medicina regenerativa envolve, entre outras estratégias bioestimuladoras, a utilização de derivados sanguíneos com a finalidade de regular e acelerar o processo cicatricial. A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF), é uma resultante plaquetária com 3 subprodutos: soro acelular sobrenadante (SAS), coágulo e exsudato. Apesar de promissora, são escassas as pesquisas que caracterizam a real influência deste concentrado das plaquetas sobre o reparo das feridas cutâneas. Objetivos: Avaliar, dentro de uma abordagem investigativa *in vitro*, através da análise antibacteriana e da dosagem de citocinas e fator de crescimento, a influência imunomodulatória da L-PRF. Método: Foram selecionadas 10 voluntárias clinicamente saudáveis. Algumas mulheres praticavam atividade física diária e outras semanais. Para a obtenção dos derivados da L-PRF, foi realizada coleta de amostra de sangue, com o montante de 4 tubos de 5 mL de sangue de cada candidata. A avaliação do potencial de propriedades antibacterianas das voluntárias, no *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciou ação positiva em 40% do total dos subprodutos da L-PRF. Resultados: Houve seletividade e diferenciação, na individualidade intrínseca de cada voluntária, ao compararmos os 3 elementos da L-PRF na inibição do halo de crescimento. Em seguida, veio mais uma etapa do presente estudo, a dosagem das citocinas e fator de crescimento, respectivamente: fator de necrose tumoral (FNT), interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação e crescimento beta (FTC- β) no SAS e exsudato. Conclusão: Diante da determinação do efeito antibacteriano dos subprodutos da L-PRF, exsudato e coágulo, evidencia-se resultados também promissores, em relação ao efeito biomodulatório evidenciado nesta última etapa, ao comparar o SAS e exsudato.

Antibacterial and regenerative action of fibrin rich in platelets and leukocytes: an *in vitro* study

Abstract: Introduction: Regenerative medicine involves, among other biostimulating strategies, the use of blood derivatives in order to regulate and accelerate the healing process. Fibrin rich in platelets and leukocytes (L-PRF) is a resultant platelet with 3 by-products: acellular supernatant serum (SAS), clot and exudate. Despite being promising, there are few studies that characterize the real influence of this platelet concentrate on the repair of cutaneous wounds. Objective: To evaluate, within an *in vitro* investigative approach, through antibacterial analysis and cytokine and growth factor dosage, the immunomodulatory influence of L-PRF. Method: 10 clinically healthy volunteers were selected. Some women practiced physical activity daily and others weekly. To obtain the L-PRF derivatives, a blood sample was collected, with the amount of 4 tubes of 5 mL of blood from each candidate. Results: The evaluation of the potential antibacterial properties of the volunteers, on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, showed positive action in 40% of the total L-PRF by-products. There was selectivity and differentiation, in the intrinsic individuality of each volunteer, when comparing the 3 elements of L-PRF in the inhibition of the growth zone. Then came another stage of the present study, the dosage of cytokines and growth factor, respectively: tumor necrosis factor (TNF), interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor b (TGF- β) in SAS and exudate. Conclusion: In view of the determination of the antibacterial effect of the by-products of L-PRF, exudate and clot, promising results are also evident, in relation to the biomodulatory effect evidenced in this last step, when comparing the SAS and exudate.

Recebido em: 15/12/2023

Aprovação final em: 20/03/2024



Introdução

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

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

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

Uma das estratégias consiste no uso de fatores de crescimentos autólogos, projetando descobertas que contribuem para sua relevância no cenário médico da atualidade. Demonstra significativas singularidades na esfera orçamental, pois a baixa onerosidade é ilustrada ao ser abordada uma técnica na fração de concentrados plaquetários derivada do próprio sangue do indivíduo, como por exemplo, o plasma rico em plaquetas (PRP) que usa anticoagulante no seu processamento, e a fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) que absente o impedimento da formação de coágulo no sangue. Ambos atuam como matriz regenerativa autóloga (CHOUKROUN *et al.*, 2006a).

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

Material e Método

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

Para a confirmação da inclusão na pesquisa, estas voluntárias assinaram um Termo de



Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) que explicava todo o procedimento a serem submetidas, assim como seus riscos e benefícios, em linguagem coloquial e na presença do pesquisador para elucidar possíveis dúvidas a respeito.

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

Experimentos *in vitro*

Obtenção da L-PRF

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

Imediatamente após a coleta de sangue, os tubos destinados à obtenção dos subprodutos da L-PRF foram imediatamente centrifugados a força G de 1.473 por 12 minutos. Terminada a centrifugação, foi aguardado repouso no período de 60 minutos, em temperatura climatizada a 22°C, para a progressão do processo de ativação plaquetária.

Concluída a etapa de ativação, foram realizadas a remoção e o armazenamento, em microtubos estéreis, do soro acelular sobrenadante (SAS). Na sequência, houve a retirada do coágulo de L-PRF e transferido para outro tubo de coleta e finalmente submetido a um processo de agitação mecânica vigorosa em Vórtex por 5 minutos. Os subprodutos obtidos, coágulo e exsudato (EXS), foram aliquotados e acondicionados separadamente em microtubos para utilização nos experimentos.

Potencial antibacteriano da L-PRF

Para a determinação da ação antibacteriana, a referência elencada para o método de difusão, foi segundo os padrões da *Clinical and Laboratory Standart Institute* (CLSI 2021). As culturas das cepas Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), aeróbia estrita, e Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), anaeróbia facultativa, mantidas em estoque sob refrigeração a -20°C, foram suspensas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), reativadas mediante incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 16-18 horas, e posteriormente, semeadas em placas de Petri de 150 mm de diâmetro contendo ágar Mueller Hinton (MH).

Para a realização destes ensaios foram utilizados os três subprodutos do L-PRF: SAS, coágulo e EXS. No estudo do SAS, o material foi aliquotado em poços com 6 mm de diâmetro confeccionados diretamente no ágar MH semeados com as culturas bacterianas. Para a análise do exsudato, o teste de difusão em disco utilizando papel Whatman n° 3 foi selecionado. Já os coágulos, inicialmente fracionados em fragmentos de aproximadamente 3 mm de diâmetro, foram depositados diretamente sobre a superfície das culturas. Após 16 horas de cultivo, em estufa bacteriológica a 37°C, foi estabelecida a atividade antibacteriana de cada subproduto pela medida halos de inibição de crescimento formados ao redor das amostras. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Potencial regenerativo da L-PRF

Para estabelecer o potencial regenerativo dos subprodutos da L-PRF, foram selecionadas, para dosagem, 3 biomoléculas dentre as reconhecidamente relacionadas com os efeitos biológicos e terapêuticos associados aos concentrados plaquetários e leucocitários: Fator de Transformação e Crescimento beta (FTC- β), interleucina 10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral (FNT). Para a análise foi utilizado o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) direto, seguindo o protocolo abaixo descrito pelo fabricante dos kits comerciais. Os experimentos foram realizados no laboratório



de inflamação e doenças infecciosas (LIDI) do Departamento de morfologia e patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Para este procedimento, foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços para ELISA (Kit OptEIATM, BDBiosciences). Entre cada etapa as placas foram lavadas com 300 µL/poço de solução de lavagem (PBS 1X [Tampão fosfato salino: 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,15 g de Na₂HPO₄; 0,2 g de KH₂PO₄ e 1 L de água destilada] + tween 20 a 0,05%, pH7,4). Após a sensibilização das placas com 100 µL/poço de anticorpo de captura específico em tampão carbonato (7,13 g de NaHCO₃ e 1,59 g de Na₂CO₃ para 1 L de água mili-q) na proporção 1:250, passou-se pela incubação por 16 horas a 4 °C.

Em seguida, foi efetuada a etapa de bloqueio com 200 µL/poço com albumina 1%, seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, foram introduzidos 50 µL das amostras e da curva de titulação dos padrões de citocinas com incubação de 2 horas em temperatura climatizada a 22°C. O anticorpo de captura conjugado com a enzima peroxidase foi em seguida adicionado em 100 µL/poço ao abrigo de luz por 1 hora e 30 minutos e incubação a temperatura climatizada 22°C em albumina 1X na proporção 1:250 de enzima e anticorpo. Ademais, o próximo passo foi realizado ao abrigo de luz, no qual foram aplicados 100 µL/poço do substrato da enzima TMB (3,3'; 5,5' – Tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas de 15 a 30 minutos aproximadamente em temperatura climatizada a 22°C. A reação enzimática foi interrompida com a aplicação de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2M e a leitura das placas foi realizada no comprimento de onda de 450 nm no espectrofotômetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), sendo as concentrações calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em µL/mL. Similarmente, os controles brancos com os anticorpos de detecção e captura foram diluídos em albumina 1X. Em todos os subprodutos os estudos foram realizados em duplicata.

Análise estatística

Os dados deste estudo foram analisados através de métodos quantitativos, usando metodologia estatística descritiva e testes de hipóteses. Os experimentos resultaram em dados contínuos em amostras pequenas, com 10 voluntárias cada. Como foram realizadas réplicas de cada amostra, inicialmente foi feita uma análise entre as réplicas das amostras através de testes de hipóteses *t-student* pareados para verificar se as médias das réplicas para cada voluntária eram estatisticamente iguais, tornando as leituras confiáveis para serem usadas nas médias finais de interesse para os respectivos subprodutos. Para todos os testes realizados (hipótese de nulidade: sem diferença de médias versus a hipótese alternativa: as médias são diferentes), consideramos um nível de significância igual a 5% (valor- $p < 0,05$).

Resultado e Discussão

Caracterização da Amostra – Sujeitos

Embora a elegibilidade das voluntárias tenha sido estabelecida considerando o *status* de clinicamente saudável pela manifestação clínica de cada voluntária, optou-se por realizar exames laboratoriais bioquímicos complementares que pudessem confirmar o *status* de saúde das voluntárias. A primeira etapa, portanto, consistiu em analisar os resultados dos exames bioquímicos das voluntárias. Os resultados estão inseridos na Tabela 1.

Em relação aos valores obtidos de hematócrito, PCR e plaquetas, 100% das voluntárias apresentaram resultados dentro dos valores de referência de normalidade. Uma das voluntárias apresentou leucocitose, em contrapartida, sem alterações nos parâmetros avaliados para atividades inflamatórias: VHS e PCR. Ademais, durante a anamnese, negou hábitos ou condições ineligíveis, que foram fatores relevantes, portanto, para a sua permanência no elenco de voluntárias do estudo.

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

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

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

Em relação aos valores obtidos de hematócrito, PCR e plaquetas, 100% das voluntárias apresentaram resultados dentro dos valores de referência de normalidade. Uma das voluntárias apresentou leucocitose, em contrapartida, sem alterações nos parâmetros avaliados para atividades inflamatórias: VHS e PCR. Ademais, durante a anamnese, negou hábitos ou condições ineligíveis, que foram fatores relevantes, portanto, para a sua permanência no elenco de voluntárias do estudo.

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

Obtenção da L-PRF

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

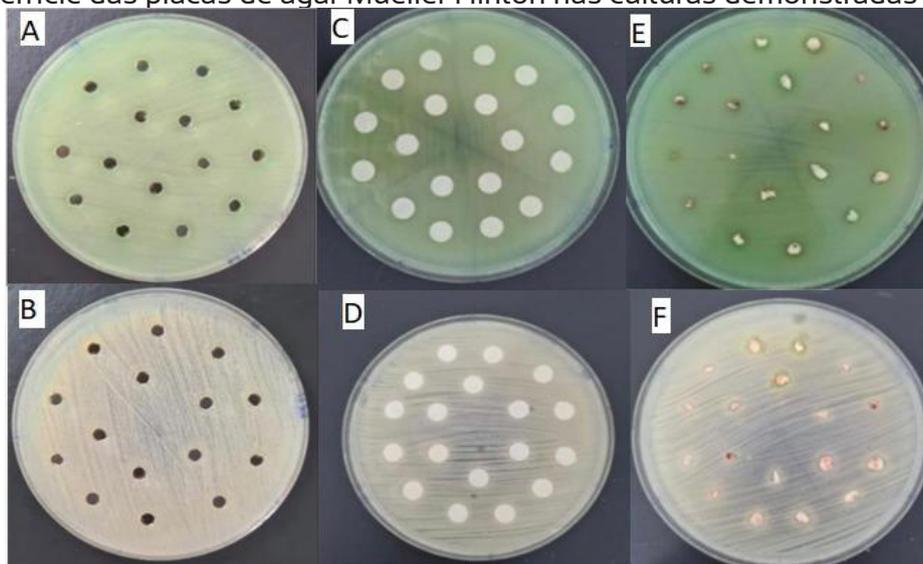
Em relação ao SAS, não foi evidenciada diferença significativa entre as voluntárias. Já em relação ao coágulo, foram evidenciadas características físico químicas distintas, tanto no que tange às dimensões quanto na consistência. Como consequência desta distinção, foi também notificada uma diferença no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

Potencial antibacteriano da L-PRF

A sequência de imagens da Figura 1, ilustra os resultados alcançados ao final do ensaio antibacteriano em suas respectivas frações de L-PRF: SAS, exsudato e coágulo.



Figura 1 – Ensaio antibacteriano baseado no método de difusão com SAS depositados em poços nas culturas bacterianas de *P. aeruginosa* (A) e *S. aureus* (B), exsudato colocado sobre discos de papel Whatman n° 3 nas culturas bacterianas (C, D) e fibrina como complemento final encimada na superfície das placas de ágar Mueller Hinton nas culturas demonstradas (E, F).



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

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

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

Como identificado na tabela, os resultados permitem constatar que em 60% das voluntárias não houve nenhum tipo de ação antibacteriana. Nos 40% que exibiram influência inibitória de crescimento bacteriano, foi possível identificar que não houve influência antibacteriana relacionada ao SAS em nenhuma voluntária. Houve ação apenas no exsudato e coágulo, tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*.

Levando em consideração apenas as voluntárias que apresentaram atividade antibacteriana do presente estudo, metade destas voluntárias apontaram ação antibacteriana na análise do exsudato



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

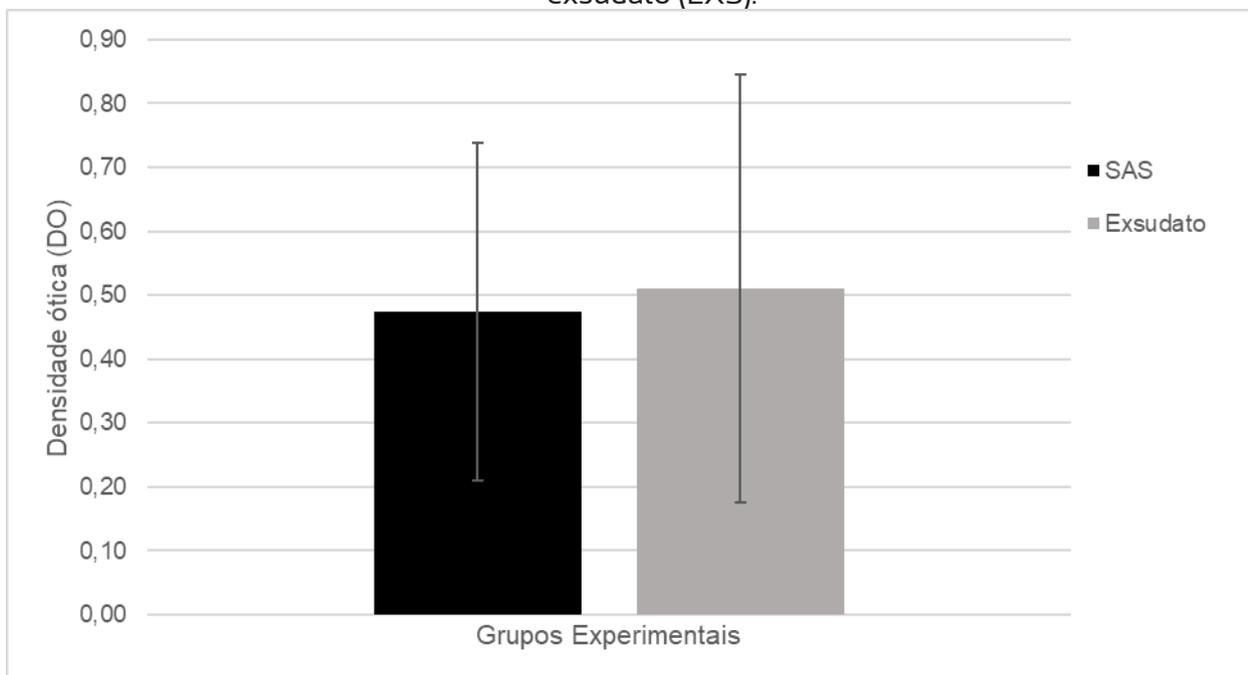
Potencial Regenerativo da L-PRF

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

FTC- β

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

Gráfico 1 – Valores de média e desvio padrão ($M \pm DP$) correspondentes à densidade ótica (DO) do Fator de Transformação e Crescimento beta (FTC- β) no soro acelular sobrenadante (SAS) e no exsudato (EXS).



IL-10

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



Gráfico 2 - Valores de média e desvio padrão ($M \pm DP$) correspondentes à concentração (pg/mL) da Interleucina 10 (IL-10) no soro acelular sobrenadante (SAS) e no exsudato (EXS).

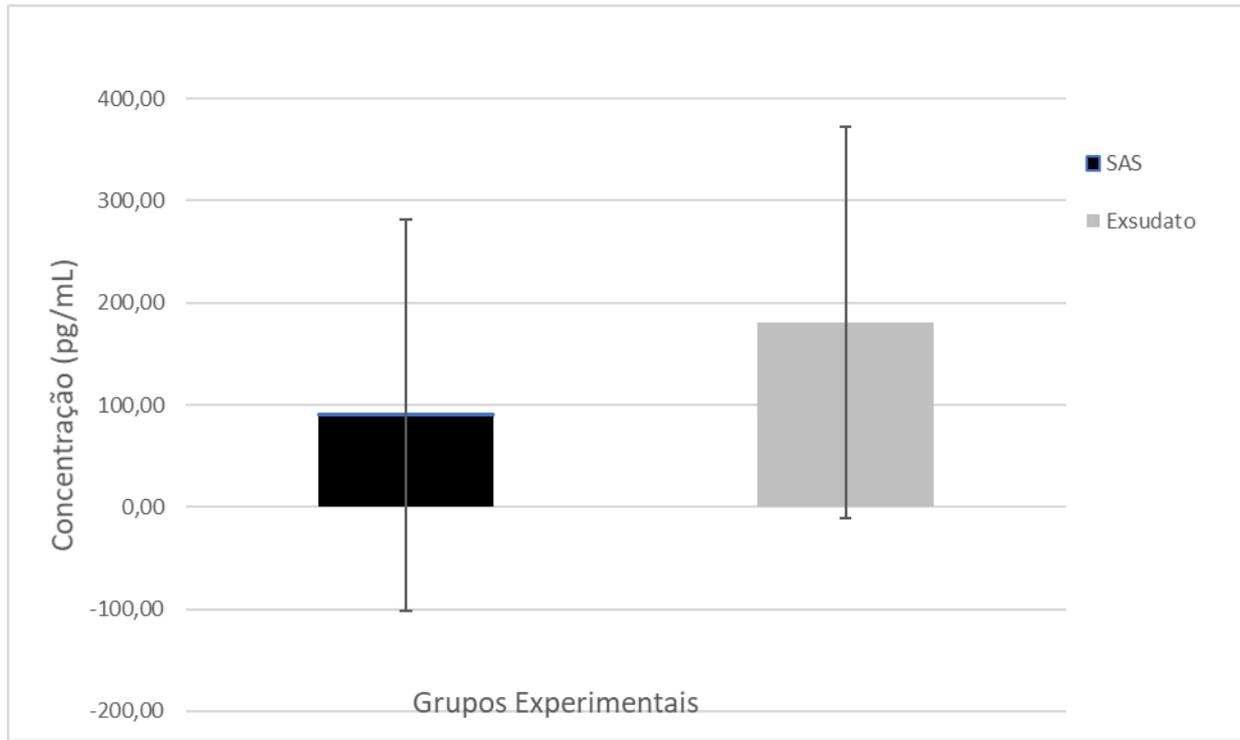
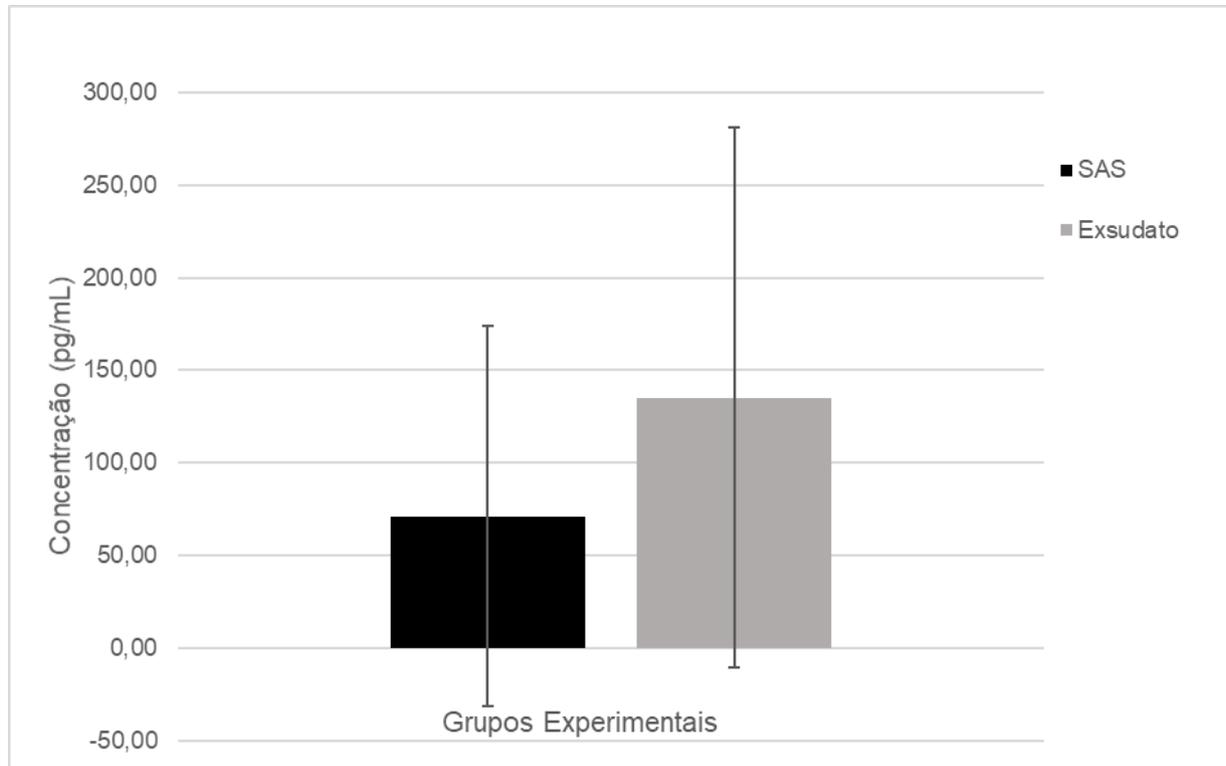


Gráfico 3 - Valores de média e desvio padrão ($M \pm DP$) correspondentes à concentração (pg/mL) do Fator de Necrose Tumoral (FTN) no soro acelular sobrenadante (SAS) e no exsudato (EXS).





FTN

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

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

As pesquisas realizadas, dentro da temática dos concentrados plaquetários, apresentaram uma grande diferença dentro do perfil da amostra em cada trabalho. Houve variação tanto no sexo quanto na faixa etária, condições clínicas e perfil da amostra. Predominam na literatura trabalhos utilizando ambos os sexos e número pequeno de voluntários, como Bilgen *et al.* (2021) que incluíram 9 homens e 7 mulheres. Tal fato pode estabelecer diferenças na pesquisa, considerando condições hormonais e metabólicas, com variações na amostra selecionada, além de interferir na característica dos subprodutos da L-PRF. Dohan *et al.* (2006a), selecionaram 15 voluntários do sexo masculino, priorizando a padronização do sexo para homogeneizar a amostra elencada.

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

Desde o protocolo desenvolvido inicialmente por Choukron *et al.* (2006) no final da década de 1990, com centrifugação em torno de 2.700 a 3.000 RPM e 12 minutos, os trabalhos encontrados na literatura fazem mudanças na metodologia para a compreensão da diversidade de produtos plaquetários, que depende dos critérios de processamento do sangue.

Recentemente, Castro *et al.* (2021) compararam diferenças do impacto da força G e do tempo nas características da L-PRF em um trabalho com 8 voluntários. Evidenciou que uma menor força G reduz a tração do coágulo e o tempo no processo de preparação é significativo. Destacou-se a relevância do tempo entre a coleta do sangue e a centrifugação, que influenciou fortemente a dimensão e estrutura da L-PRF. Ainda encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as comparações de coágulo imediatamente após a centrifugação e os preparados após 2 ou 3 horas. Segundo o autor, quanto maior o tempo de ativação, maior a dosagem de subprodutos plaquetários difundidos no exsudato.

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

Apenas 40% das voluntárias apresentaram positividade nas duas bactérias selecionadas para análise, entretanto, com diferentes respostas do SAS, coágulo e exsudato. Os resultados evidenciados em relação ao subproduto SAS, evidenciaram a inexistência de uma ação antibacteriana, independentemente do tipo de bactéria estudada. A inexistência de ação antibacteriana no SAS também foi descrita por Leal *et al.* (2022) realizando um estudo com as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na cavidade oral de 16 cães, que também não evidenciou a ação antibacteriana do SAS, sugerindo a inexistência deste tipo de influência sobre determinados microrganismos. Ambos resultados, assim como relatado por outros pesquisadores, permitem sugerir que a inexistência desta ação antibacteriana possa estar relacionada à menor concentração dos subprodutos difundidos no SAS, capazes de efetuar qualquer tipo de ação antibacteriana.

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



subprodutos plaquetários (JOHANSSON; SHANNON; RASMUSSEN, 2011).

Fato é que, uma diferença entre Gram positivo e Gram negativo relevante, está na abordagem da estrutura protetora das bactérias. Evidenciam-se duas membranas no *P. aeruginosa* contrapondo-se a uma parede de peptídeoglicanos ao redor do *S. aureus*. Contudo, atravessar paredes celulares implica mecanismos diferentes de permear membranas envoltórias (XIONG *et al.*, 2021) A maior apresentação de atividades antimicrobianas do *S. aureus*, pode ter embasamento nos estudos mais recentes, que demonstraram que as plaquetas exercem atividade antiestafilocócica significativa, tanto diretamente quanto por meio da potencialização de macrófagos (SHANNON, 2017; DOHAN *et al.*, 2006b).

Outro objetivo desta pesquisa foi caracterizar o potencial efeito regenerativo destes subprodutos plaquetários. Para tal, optou-se por avaliar um alvo correspondente ao fator de crescimento que, sabidamente, interfere no processo de reparo tecidual. Um destes ativos foi o FTC- β , com demonstração na sua dosagem de quantidades muito semelhantes, sem diferença significativa na sua concentração em relação aos subprodutos SAS e exsudato. Dohan *et al.* (2006a) também observaram resultados semelhantes do FTC- β nas quantificações ELISA.

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

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

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

Considerando a evidência do efeito antibacteriano ser extremamente individualizada, não se pode antecipar o seu potencial, por mais que a literatura apresente os mecanismos de ação em cada subproduto. Trabalhos clínicos visam a otimização do fechamento de feridas cutâneas, com o favorecimento da parte regenerativa sincronicamente à ação antibacteriana dos subprodutos da técnica de L-PRF, como apresentado nos resultados de Godoi *et al.* (2022), demonstrando a parte translacional do estudo em um relato de caso de uma mordida canina na face de uma paciente jovem e a sua evolução clínica.

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



concentrados plaquetários e atividade antibacteriana somados ao potencial regenerativo.

Conclusões

A avaliação dos resultados do potencial antibacteriano da L-PRF sugere a existência de um efeito antibacteriano proporcionado pela técnica de L-PRF. O efeito antibacteriano apresenta um comportamento com características de seletividade em relação a cepa bacteriana e dependência do subproduto específico de L-PRF em cada indivíduo. Em relação ao efeito biomodulatório dos subprodutos SAS e exsudato, embora o potencial regenerativo seja associado à técnica, sua mensuração é um grande desafio, assim como o potencial antibacteriano, ou seja, o que se administra não tem controle coletivo, destacando a individualidade biológica e regenerativa das voluntárias. Novas pesquisas precisam ser conduzidas para a caracterização dos mecanismos envolvidos neste potencial antibacteriano, dos fatores envolvidos na seletividade do efeito e da influência dos parâmetros de obtenção da L-PRF.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela taxa concedida, que possibilitou o empenho por 24 meses. Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP – Processo nº 2021/07458-9). Ao Laboratório de Análises Clínicas São Lucas de Araraquara agradecimento pela colaboração na realização dos exames laboratoriais bioquímicos. À equipe do laboratório de inflamação e doenças infecciosas (LIDI) do Departamento de morfologia e patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), agradecimento pela contribuição na dosagem de citocinas e fator de crescimento. Neste estudo não houve conflito de interesses.

Referências

- AIRES, F. T.; BERNARDO, W. M. Tratamento do cisto pilonidal: cicatrização por segunda intenção ou sutura primária em linha média?. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 55, p. 508, 2009.
- BILGEN, F.; URAL, A.; BEKERECIOGLU, M. Platelet-rich fibrin: an effective chronic wound healing accelerator. **J. Tissue Viability**, v. 30, n. 4, p. 616-620, 2021.
- CASTRO, A. B. *et al.* Impacto da força g e do tempo nas características de matrizes de fibrina rica em plaquetas. **Relatórios Científicos**, n. 11, p. 6038, 2021.
- CHOUKROUN, J. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 101, n. 3, p. E56-60., 2006a.
- CHOUKROUN, J. *et al.* Affiliations expand Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 101, n. 3, p. 299-303, 2006b.
- DOHAN, D. M. *et al.* Gogly Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 101, n. 3, p. e51-55, 2006a.
- DOHAN, D. M. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 101, n. 3, p. e45-50, 2006b.
- GODOI, V. R. F.; OLIVEIRA NETO, J. L.; PEREIRA, L. C.; MACEDO, C. J. O.; CORAL, A. J. Platelet and leucocyte rich fibrin (L-PRF) applied in necrotizing Fasciitis treatment: case report. **Braz. J. Development.** v. 8, n. 8, p. 58258-73, 2022.
- JOHANSSON, D.; SHANNON, O.; RASMUSSEN, M. Platelet and neutrophil responses to Gram posi-



- tive pathogens in patients with bacteremic infection. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e26928, 2011.
- LEAL, B. P. V.; VILHENA, H. **Estudo da atividade antimicrobiana da fibrina rica em plaquetas (PRF) de origem canina**. 2022. Tese (Doutorado) – Escola Universitaria Vasco da Gama, 2022.
- NGUYEN, P. A.; PHAM, T. A. V. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration in vitro. **J. Applied Oral Science**. v. 26, p. 1-9, 2018.
- OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 71-109, 2011.
- PEGORARO, A. F.; FREDBERG, J.; CHEN, Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.
- ROJAS, B. S. M.; DE-LA-HOZ, J. L.; FACCHINI, G.; SILVA, G. H.; PINHEIRO, A. L. T. A.; EBERLIN, S. Estudo comparativo para avaliação da eficácia cicatrizante de formulações tópicas contendo *Triticum aestivum* L. (sinônimo *Triticum vulgare*) em modelo de pele humana. **Surg. Cosmet. Dermatol.**, v. 14, p. e20220118, jan.-dez. 2022.
- SAMPOGNA, G.; GURAYA, S. Y.; FORGIONE, A. Regenerative medicine: historical roots and potential strategies in modern medicine. **J. Microscopy Ultrastructure**, v. 3, n. 3, p. 101-107, 2015.
- SHANNON, O. Determining platelet activation and aggregation in response to bacteria. **Methods Mol. Biol.**, v. 1535, p. 267-273, 2017.
- SILVA, M. S. *et al.* Citocinas. **ACTA MSM**, n. 4, p. 205217, 2019.
- TZAVLAK, K.; MOUSTAKAS, A. TGF- β Signaling. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 487, 2020.
- XIONG, M. *et al.* The novel mechanisms and applications of exosomes in dermatology and cutaneous medical aesthetics. **Pharmacol. Res.**, v. 166, p. 105490, 2021.