



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ATIVAÇÃO DO BIOMATERIAL DERIVADO
DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS CONGELADO CANINO**

KAUANA MAGAGNIN DE NOVAES

Foz do Iguaçu
2023

**PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ATIVAÇÃO DO BIOMATERIAL DERIVADO
DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS CONGELADO CANINO**

KAUANA MAGAGNIN DE NOVAES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz

Foz do Iguaçu
2023

KAUANA MAGAGNIN DE NOVAES

**AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DE ATIVAÇÃO DO BIOMATERIAL DERIVADO DO
PLASMA RICO EM PLAQUETAS CONGELADO CANINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maria Ruiz
UNILA

Coorientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes
UNILA

Mestra Priscila Pereira
UNILA

Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa
UNILA

Foz do Iguaçu, 23 de outubro de 2023.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Kauana Magagnin de Novaes

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento	
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: _

PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ATIVAÇÃO DO BIOMATERIAL DERIVADO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS CONGELADO CANINO

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Jorge Maria Ruiz

Data da Defesa: 23/10/2023

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 9 de novembro de 2023.

Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Marlene de Novaes e Dionisio Magagnin por todo apoio, confiança e encorajamento nessa jornada acadêmica. Vocês me deram a educação, o apoio emocional e os valores que me guiaram ao longo do caminho. Vocês sacrificaram tanto para que eu pudesse ter as oportunidades que tive, e sou profundamente grata por tudo que fizeram por mim.

À minha família, quero expressar minha profunda gratidão a cada um de vocês por todo o apoio inabalável, amor e compreensão que me proporcionaram ao longo da minha jornada acadêmica. Seu apoio foi fundamental para que eu pudesse alcançar este marco em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Maria Ruiz pela paciência, agilidade e prontidão nesse valioso processo de aprendizado. Agradeço suas sugestões pertinentes que ajudaram a elevar a qualidade deste trabalho a um nível que eu nunca teria alcançado sozinho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Pablo Henrique Nunes, pela disposição e pelos ensinamentos, por tornar este processo de pesquisa uma experiência enriquecedora e educativa.

À Universidade Federal Latino-Americana pelo seu compromisso incansável em fornecer uma educação de alta qualidade. Agradeço também por todas as instalações e recursos de pesquisa que a universidade ofereceu, que foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e para a realização de projetos de pesquisa significativos.

À Fundação Araucária, pela bolsa que apoiou meu trabalho. Agradeço por acreditar no meu potencial e por investir em minha formação. Tal apoio fortaleceu minha determinação em contribuir de maneira positiva para a sociedade e retribuir, no futuro, a oportunidade que me foi concedido

Ao meu noivo Diego, que sempre acreditou no meu potencial e me apoiou em momentos difíceis e celebrou comigo nas conquistas. Me acompanhou desde a escolha do curso, palestrou na semana acadêmica do meu curso e foi minha inspiração nesse percurso acadêmico. Espero que este seja apenas o começo de nossa jornada juntos.

Aos amigos que a UNILA me proporcionou, que me ajudaram nos desafios, me fizeram rir em momentos de descontração e me acompanharam todos os dias nesses cinco anos de trajetória. Sou muito grata pela amizade e parceria de todos.

Ao meu colega de trabalho, Luis Beltrán, que me ajudou com entusiasmo no dia a dia e contribuiu para a concepção desse trabalho.

*O que eu penso não muda nada além do meu
pensamento. O que eu faço a partir disso muda
tudo!*

Leandro Karnal

RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) emerge como um subproduto sanguíneo que captura a atenção da comunidade de saúde, sobretudo devido ao seu notável potencial na regeneração tecidual e cicatrização de lesões, atributos que emanam do seu elevado conteúdo de fatores de crescimento. Na área da medicina veterinária, os bancos de sangue frequentemente geram uma grande quantidade de PRP com aplicação clínica limitada, resultando em seu armazenamento em estado congelado e subsequente descarte. O propósito deste estudo consistiu em avaliar a aptidão do PRP congelado para a produção de um biomaterial com capacidade de suporte celular, que pudesse ser empregado na manutenção de células-tronco mesenquimais caninas. A abordagem metodológica empregada se pauta na ativação do PRP por meio de ciclos de congelamento e descongelamento, bem como ensaios voltados para a formação de coágulos, desencadeados tanto por energia mecânica quanto pela introdução de agentes coagulante, juntamente com a análise do coágulo a partir da inclusão de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo canino (ASCs). A posterior avaliação do coágulo foi conduzida por de microscopia ótica, de fluorescência e eletrônica de varredura. O coágulo derivado do plasma canino alcançou configuração eficiente a partir da adição de CaCl_2 , e foi induzido pela incorporação do meio de cultura DMEM e pelo cultivo à temperatura fisiológica de 37°C. O biomaterial resultante foi submetido a análises sob microscopia ótica, com coloração H&E (hematoxilina e eosina) e azul de bromofenol, revelando a presença de células dentro da estrutura fibrinosa no interior do coágulo. A aplicação de ASCs na coagulação do PRP foi analisada por microscopia de fluorescência, mediante o uso de corantes Faloidina e DAPI, permitindo a visualização das células entrelaçadas na tridimensionalidade da estrutura do coágulo. Por fim, a análise sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) envolveu a fixação, desidratação e secagem do biomaterial, seguido pelo processo de metalização em *sputtering*, possibilitando a observação detalhada de sua estrutura macromolecular. Em suma, constata-se que o biomaterial obtido a partir do plasma rico em plaquetas canino congelado ostenta um notável potencial como matriz para o cultivo tridimensional de células.

Palavras-chave: PRP; fibrina; biomaterial; microscopia; padronização.

RESUMEN

El plasma rico en plaquetas (PRP) emerge como un subproducto sanguíneo que ha captado la atención de la comunidad médica, principalmente debido a su notable potencial en la regeneración de tejidos y la curación de heridas, atributos que provienen de su alto contenido de factores de crecimiento. En el campo de la medicina veterinaria, los bancos de sangre a menudo generan una cantidad significativa de PRP con una aplicación clínica limitada, lo que lleva a su almacenamiento en estado congelado y su posterior eliminación. El propósito de este estudio fue evaluar la idoneidad del PRP congelado para la producción de un biomaterial compatible con las células que podría utilizarse para mantener las células madre mesenquimales caninas. El enfoque metodológico empleado se basa en la activación del PRP a través de ciclos de congelación y descongelación, así como en ensayos centrados en la formación de coágulos, desencadenados tanto por energía mecánica como por la introducción de agentes coagulantes. Además, se realizó un análisis de la capacidad de soporte celular del coágulo al incorporar células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo (ASCs) en la formación de coágulos en placas de 6 pozos. La evaluación posterior del coágulo se llevó a cabo mediante microscopía óptica, fluorescencia y microscopía electrónica de barrido. El coágulo derivado del plasma canino logró una configuración eficiente con la adición de CaCl_2 , inducida por la incorporación del medio de cultivo DMEM y el cultivo a una temperatura fisiológica de 37°C . El biomaterial resultante se sometió a un análisis mediante microscopía óptica con tinción H&E (hematoxilina y eosina) y azul de bromofenol, revelando la presencia de células dentro de la estructura fibrinosa dentro del coágulo. La aplicación de ASCs en la coagulación del PRP se analizó mediante microscopía de fluorescencia, utilizando tintes de Falloídina y DAPI, lo que permitió la visualización de células entrelazadas en la tridimensionalidad de la estructura del coágulo. Finalmente, el análisis mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) implicó la fijación, deshidratación y secado del biomaterial, seguido del proceso de metalización por pulverización, lo que permitió una observación detallada de su estructura macromolecular. En resumen, es evidente que el biomaterial obtenido a partir del plasma rico en plaquetas canino congelado exhibe un notable potencial como matriz para el cultivo tridimensional de células.

Palabras clave: PRP; fibrina; biomaterial; canino; estandarización.

ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP) emerges as a blood-derived byproduct that has captured the attention of the healthcare community, primarily due to its remarkable potential in tissue regeneration and wound healing, attributes stemming from its high content of growth factors. In the field of veterinary medicine, blood banks often generate a significant quantity of PRP with limited clinical application, leading to its storage in a frozen state and subsequent disposal. The purpose of this study was to assess the suitability of frozen PRP to produce a cell-supporting biomaterial that could be employed in maintaining canine mesenchymal stem cells. The methodological approach employed is based on the activation of PRP through cycles of freezing and thawing, as well as assays focused on clot formation, triggered by both mechanical energy and the introduction of clotting agents. Furthermore, an analysis of the clot's cell-supporting capacity was conducted by incorporating adipose-derived canine mesenchymal stem cells (ASCs) into the clot formation in 6-well plates. Subsequent clot evaluation was performed using light microscopy, fluorescence, and scanning electron microscopy. The clot derived from canine plasma achieved efficient configuration with the addition of CaCl_2 , induced by the incorporation of DMEM culture medium and cultivation at a physiological temperature of 37°C . The resulting biomaterial was subjected to analysis under light microscopy with H&E (hematoxylin and eosin) and bromophenol blue staining, revealing the presence of cells within the fibrin structure inside the clot. The application of ASCs in PRP clotting was analyzed by fluorescence microscopy, using Phalloidin and DAPI dyes, allowing visualization of cells intertwined in the three-dimensionality of the clot structure. Finally, scanning electron microscopy (SEM) analysis involved fixation, dehydration, and drying of the biomaterial, followed by sputtering metallization, enabling a detailed observation of its macromolecular structure. In summary, it is evident that the biomaterial obtained from frozen canine platelet-rich plasma exhibits remarkable potential as a matrix for three-dimensional cell culture.

Key words: PRP; fibrin; biomaterial; microscopic; standardization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do Fibrinogênio por cristalografia de raio X.	20
Figura 2 – Diagrama esquemático da quebra do fibrinogênio pela trombina.	21
Figura 3 – Etapas do processamento do PRP	24
Figura 4 – Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas	28
Figura 5 – Delineamento Experimental Resumido	29
Figura 6 – Coágulo de plasma rico em plaquetas centrifugado	34
Figura 7 – Coágulo de plasma rico em plaquetas com meio DMEM	35
Figura 8 – Células ASCs caninas dispostas dentro de matriz fibrinosa (MI)	36
Figura 9 – Células ASCs caninas dispostas dentro de matriz fibrinosa (H&E)	37
Figura 10 – Estrutura fibrinosa da matriz de plasma rico em plaquetas.....	37
Figura 11 – Células ASC caninas dispostas em monocamada	38
Figura 12 – MF de células dispostas em coágulo de PRP	40
Figura 13 – Imagens sobrepostas de células-tronco caninas por MF	41
Figura 14 – Imagem eletrônica de PRP induzido por DMEM.....	42
Figura 14 – Biomaterial derivado do PRP e CaCl ₂	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	do inglês: <i>Adipose Stem Cell</i>
FDA	do inglês: <i>Food And Drug Administration</i>
FGF	do inglês: <i>Fibroblast growth factor</i>
FPA	Fibrinopeptídeo A
FPB	Fibrinopeptídeo B
H&E	Hematoxilina e Eosina
IGF-I	do inglês: <i>insulin-like growth factor type I</i>
L-PRF	do inglês: <i>Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin</i>
L-PRP	do inglês: <i>Leukocyte-and Platelet-Rich Plasma</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MF	Microscopia de Florescência
MI	Microscópio Invertido
PBS	do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	do inglês: <i>Platelet derived growth fator</i>
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
P-PRF	do inglês: <i>Pure Platelet-Rich Fibrin</i>
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
P-PRP	do inglês: <i>Pure Platelet-Rich Plasma</i>
TGF- β	do inglês: <i>Transforming growth factor β</i>
VEGF	do inglês: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. DESENVOLVIMENTO	17
2.1. BIOMATERIAL	17
2.2. FIBRINA	18
2.2.1. Bioquímica da Fibrina	19
2.3. APLICAÇÕES DO COÁGULO DE FIBRINA	21
2.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS	22
2.5. COÁGULO DE FIBRINA CANINO	25
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO GERAL	27
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIAS E MÉTODOS	28
5.1. ATIVAÇÃO DO PRP CONGELADO CANINO	28
5.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	29
5.3. PREPARO DO BIOMATERIAL	31
5.3.1. Preparo do Biomaterial para Microscopia Ótica	31
5.3.2. Preparo do Biomaterial para Microscopia de Florescência	31
5.3.3. Preparo do Biomaterial para a Microscopia de Varredura	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1. ATIVAÇÃO DO PRP CONGELADO CANINO	33
6.2. COÁGULO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS	33
6.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO BIOMATERIAL	35
6.3.1. Microscopia Ótica do Coágulo	35
6.3.2. Microscopia de Fluorescência do Coágulo	39
6.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura do Coágulo	41
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de adjuvantes cirúrgicos para a estimulação local da cicatrização é um importante campo de pesquisa em biomateriais e ciências farmacêuticas (EHRENFEST *et al.*, 2012). Haja visto a relevância do tema, novos horizontes na pesquisa de biomateriais estão em ascensão devido as inovações da biotecnologia, seja na elaboração de novos materiais, como no aperfeiçoamento e análise deles.

Assim sendo, o aprimoramento de técnicas de obtenção de biomateriais é realizado com finalidade de acelerar o processo no qual o produto é obtido ou melhorar a qualidade final do material. A fibrina é considerada um biomaterial desde meados do século XX, mas seu aperfeiçoamento continua em curso atualmente (MIRON; ZHANG, 2018).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um subproduto sanguíneo obtido por meio de centrifugações e subsequente separação dos elementos sanguíneos. As plaquetas são responsáveis pela produção e liberação de fatores que favorecem o reparo de diferentes tecidos (VIEIRA, 2017). O PRP pode ser armazenado congelado, entretanto, ao ser descongelado, algumas proteínas serão desnaturadas no descongelamento, dependendo da temperatura de armazenamento, duração do armazenamento e método de ativação (KIM *et al.*, 2020).

A padronização do coágulo de fibrina, originado a partir do plasma rico em plaquetas congelado canino é um tema ausente nos artigos científicos, já que na literatura científica o PRP geralmente é aplicado fresco, logo após sua extração (CATERINO *et al.*, 2022). Entretanto, o protocolo que envolve a utilização do PRP congelado auxilia quanto ao armazenamento do biomaterial, podendo ser preparado e conservado como prevenção ou durante um tratamento mais longo (EKER *et al.*, 2020).

Na área da medicina veterinária, os bancos de sangue frequentemente acabam produzindo uma grande quantidade de PRP com limitações na aplicação clínica, o que leva ao seu congelamento e posterior descarte. Dado o potencial promissor do biomaterial derivado do PRP na entrega de fatores de crescimento às células, como demonstrado por Kazemi *et al.* em 2017, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do PRP congelado em produzir um biomaterial capaz

de sustentar células-tronco mesenquimais caninas.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. BIOMATERIAL

Biomaterial pode ser definido como um material viável utilizado em um dispositivo médico, destinado a interagir com o sistema biológico (LEDERMAN, 1976). Também existe outra definição mais abrangente e atual, definindo um biomaterial como, “material usado para substituir uma parte ou uma função do corpo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável” (WAGNER *et al.*, 2020). Sendo assim, biomaterial é uma substância de origem natural, sintética ou híbrida que é planejada e utilizada com a finalidade de diagnosticar, tratar, reparar ou substituir tecidos, órgãos ou funções que fazem parte de um sistema biológico.

A ciência de biomateriais é relativamente nova, com cerca de 60 a 70 anos, entretanto, a utilização dos biomateriais data de períodos pré-civilização, como o caso arqueológico dos restos mortais de um humano que foi encontrado em Kennewick, Washington, nos Estados Unidos. Os arqueologistas notaram que nele havia uma ponta de lança cravada no quadril, mas essa não foi a causa de sua morte, portanto, pode ser o primeiro humano a viver com um implante, mesmo que acidental (RATNER; ZHANG, 2020).

Com o passar dos anos, os biomateriais foram sendo cada vez mais utilizados, dessa vez intencionalmente, na forma de implantes dentários datados de 200 anos A.C. (CRUBEZY *et al.*, 1998). Os usos de biomateriais evoluíram para suturas, lentes de contato, próteses ósseas, órgãos artificiais, enxertos vasculares, implantes de silicone, marca passo e válvulas coronárias (RATNER, 2013).

Os biomateriais são classificados de acordo com a sua origem, podendo ser sintéticos ou naturais. Os biomateriais sintéticos são compostos de metais, como platina, ouro, prata, cerâmicos, ou materiais poliméricos, como o ácido poliglicólico. Já os naturais são derivados de proteínas ou polissacarídeos, por exemplo o colágeno, o alginato, o ácido hialurônico e a fibrina. (DE LA PUENTE; LUDEÑA, 2014)

Na área da saúde, ciência de biomateriais aborda tanto a terapêutica quanto o diagnóstico. Abrange ciências básicas como a biologia, física e química, até áreas avançadas, como a engenharia e a medicina. O sucesso de um biomaterial ou de um implante, em geral, depende de três fatores: as propriedades e a biocompatibilidade do implante, a condição de saúde do paciente e a competência dos profissionais que irão implantar o biomaterial e monitorá-lo (PARK; LAKES, 2007).

Os biomateriais são principalmente usados na medicina, embora possam ser empregados no cultivo celular, na testagem de proteínas em laboratórios clínicos, em implantes para regular a fertilidade bovina, como matriz em sequenciamento, em diversas aplicações biotecnológicas, até em computadores neuronais (BISWAL; BADJENA; PRADHAN, 2020). Visto a vasta utilização desses compostos, existe um crescente interesse em entender e desenvolver novos materiais que tenham a possibilidade de interagir com o sistema biológico.

Posto isto, é importante mencionar que desde o final da Segunda Guerra Mundial até meados de 1960, alguns cirurgiões se aventuraram na criação de implantes utilizando polímeros e metais disponíveis da época e os aplicando em dispositivos médicos e clinicamente, sem uma testagem prévia e sem regulação. Essa onda de experimentação causou descobertas fantásticas e erros dramáticos, o que levou a criação da bioengenharia, entre os anos 1970 e 1980, que contava com a colaboração de cientistas, engenheiros e médicos (RATNER; ZHANG, 2020).

Por conseguinte, os pesquisadores concordaram que antes de aplicar os materiais, é necessário analisar e controlar sua composição, pureza e propriedades físicas. Logo, houve uma corrida para o desenvolvimento de novos materiais para o uso terapêutico, assim surgem os polímeros biodegradáveis, carbono pirolítico, silicones de “grau médico”, e vidros e cerâmicas bioativos. (RATNER, 2013). Mais recentemente, houve um aumento no interesse em utilizar tecidos e polímeros naturais em combinação com células vivas, área de estudo da engenharia de tecidos, que se concentra na regeneração de tecidos e órgãos naturais, sendo um grande exemplo a o polímero natural fibrina.(DE LA PUENTE; LUDEÑA, 2014)

A engenharia de tecidos é uma área científica interdisciplinar, que tem como objetivo recuperar ou melhorar as funções biológicas de tecidos danificados ou que já não executam sua função corretamente. Nesse caso, os biomateriais entram como estruturas tridimensionais que derivadas de um sistema biológico, que levam auxiliam na regeneração do tecido (GAHARWAR; SINGH; KHADEMOSSEINI, 2020).

2.2. FIBRINA

Fibrina é um clássico biomaterial e tem sido amplamente usufruído em uma variedade de aplicações desde que foi purificada pela primeira vez em grande escala, nos anos 1940 (COHN *et al.*, 1946). Entretanto, a fibrina já é aplicada desde 1909, no

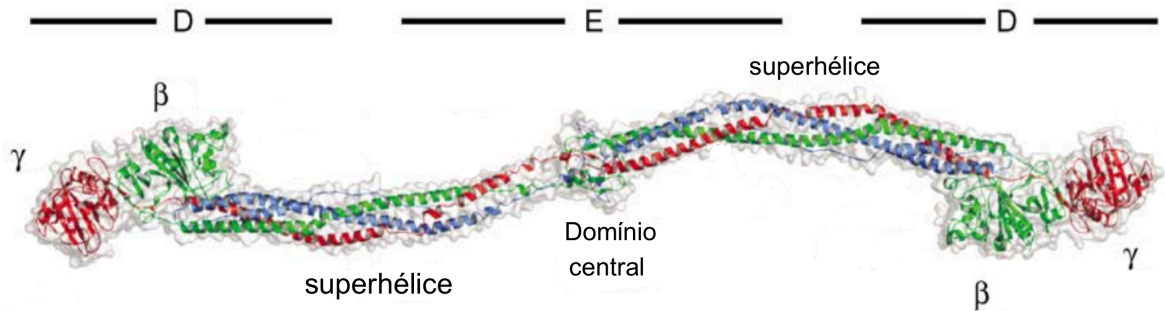
qual foi descrita sua utilidade como agente hemostático (BERGEL, 1909). O aproveitamento dessa proteína é devido a sua rica bioatividade, assim como sua facilidade de manipulação, a modificação da dinâmica de polimerização da fibrina afeta diretamente a porosidade, a espessura da fibra e o grau de ramificação do gel polimerizado, o que, por sua vez, afeta as propriedades mecânicas. (BROWN; BARKER, 2014)

O uso da fibrina na medicina regenerativa começou em meados dos anos 1944, quando o gel de fibrina foi usado como enxerto de pele para tratar queimaduras em soldados (CRONKITE; LOZNER; DEEVER, 1944). Meio século após esses estudos, em 1998, a entidade federal que controla a liberação de medicamentos e alimentos nos Estados Unidos (FDA) aprovou o primeiro selante de tecido de fibrina, Tisseel®. (WRIGHT *et al.*, 1998). Posteriormente, muitos selantes de fibrina foram aprovados pela FDA, utilizados no tratamento de queimaduras, enxertos de pele, como agente hemostático e selantes no fechamento da colostomia (SPOTNITZ, WILLIAM D., 2010).

2.2.1. Bioquímica da Fibrina

A fibrina está no ponto principal da cascata de coagulação, ela é formada a partir da polimerização do fibrinogênio, processo que é ativado em resposta a lesão (BROWN; BARKER, 2014). O fibrinogênio é uma molécula inativa precursora da fibrina, é uma glicoproteína alongada de 45 nm e 340 kD, hexâmera, representada na Figura 1. As moléculas de fibrinogênio são estruturas que consistem em dois domínios D externos, cada um conectado por um segmento espiralado ao seu domínio E central (MOSESSON, M. W., 2005). Os domínios são compostos por 3 cadeias polipeptídicas que se repetem duas vezes cada uma, sendo 2 A α , 2 B β e 2 γ , que são unidas no N-terminal do domínio E-central, por cinco pontes dissulfeto simétricas. (HENSCHEN *et al.*, 1983)

Figura 1 - Estrutura do Fibrinogênio por cristalografia de raio X.

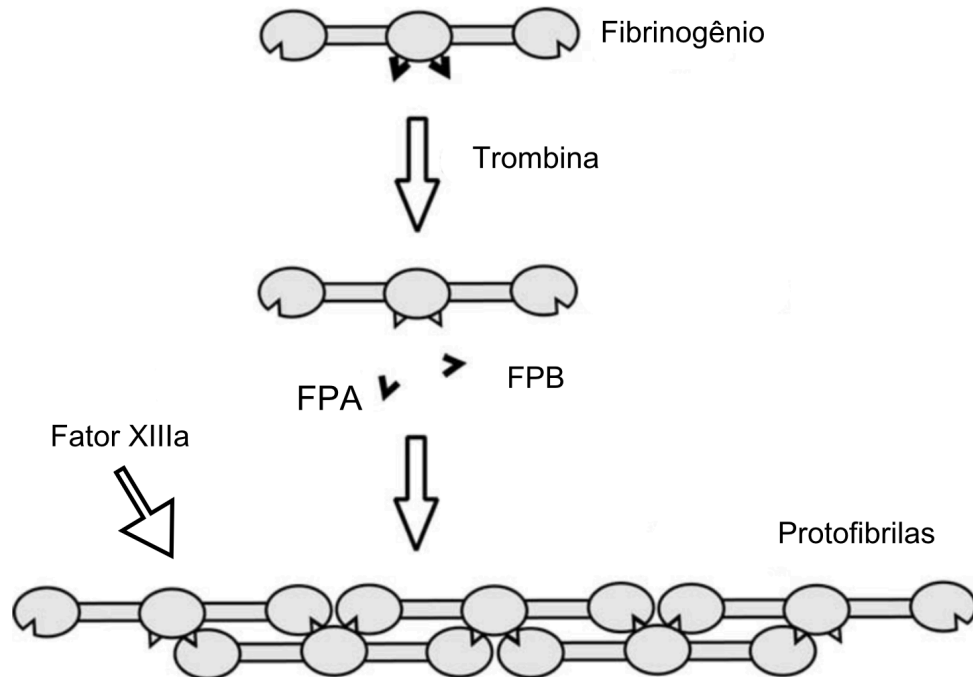


As cadeias α são azuis, enquanto as cadeias β são verdes e as cadeias γ são vermelhas. Adaptado de (WEISEL, 2005).

O fibrinogênio é expresso e regulado em hepatócitos, e então é excretado para o sangue em sua forma madura (FISH; NEERMAN-ARBEZ, 2012). O fibrinogênio é convertido para fibrina por proteólise mediada pela enzima trombina (Figura 2), a trombina catalisa a quebra da molécula de fibrinogênio em fibrinopeptídeo A (FPA) e fibrinopeptídeo B (FPB) a partir da porção amino-terminal da molécula (CLARK, 2003).

Em seguida, após a liberação do FPA, são geradas novas extremidades aminoterminais da cadeia que interagem com sítios nos terminais carboxílicos da cadeia de moléculas adjacentes para promover a montagem lateral não covalente. (PIETERS; WOLBERG, 2019). A remoção do FPB acontece logo após, e cria novas extremidades amino-terminais da cadeia que também se interligam com os locais nos terminais carboxílicos da cadeia de moléculas adjacentes, reforçando a agregação lateral e levando à formação de fibras mais espessas. (WHELAN; CAPLICE; CLOVER, 2014).

Figura 2 - Diagrama esquemático da quebra do fibrinogênio pela trombina.



A molécula de fibrina então se polimeriza em protofibrilas, processo no qual a transglutaminase plasmática (fator XIIIa) catalisa. Adaptado de (WEISEL, 2005).

A fibrina é uma proteína que consegue se polimerizar e de maneira sobreposta e escalonada em protofibrilas, realizando a coagulação do sangue (WEISEL; LITVINOV, 2017). Para uma hemostasia duradoura, o coágulo fibrina deve interagir com as plaquetas, que é mediada pelo receptor de membrana plaquetária GPIIb-IIIa (Integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$) (MA; QIN; PLOW, 2007). A estabilidade do coágulo é conferida pela reticulação covalente de protofibrilas adjacentes, as ligações cruzadas são formadas pela transglutaminase plasmática (fator XIIIa) que catalisa ligações isopeptídicas (CLARK, 2003).

2.3. APLICAÇÕES DO COÁGULO DE FIBRINA

Na circulação sanguínea, o coágulo de fibrina é formado para servir como um tampão hemostático. (GURTNER *et al.*, 2008) Entretanto, ele tem a capacidade de oferecer várias outras funções, como cicatrizante, fornecendo proteção para a migração e proliferação celular, como um reservatório de proteases, inibidores de proteases e principalmente, fatores de crescimento (WHELAN; CAPLICE; CLOVER, 2014).

As maiores aplicações do coágulo de fibrina estão ligadas à sua capacidade de

se ligar com diferentes tipos de fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I, do inglês: *insulin-like growth factor type I*), o fator de crescimento transformante beta (TGF- β , do inglês: *Transforming growth factor β*), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês: *Vascular endothelial growth factor*), o fator de crescimento fibroblástico (FGF, do inglês: *Fibroblast growth factor*), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF: do inglês: *platelet derived growth factor*). (MARTINO *et al.*, 2013; MOSESSON, M. W., 2005)

Os primeiros estudos clínicos envolvendo o coágulo de fibrina foram no desenvolvimento de selantes a base de fibrina (MATRAS, 1982), entretanto, para que o desempenho cicatrizante do coágulo seja efetivo, é necessário mimetizar toda fisiologia que o envolve. Já que a verdadeira força de uma matriz de fibrina e suas propriedades estão relacionadas às interações entre o fibrinogênio circulante, o fibrinogênio plaquetário, os próprios agregados plaquetários e as muitas moléculas liberadas pelas plaquetas (MOSESSON, M. W.; SIEBENLIST; MEH, 2001).

A evolução coerente dos selantes de fibrina foi, portanto, incorporar plaquetas no seu processamento (ROSENTHAL *et al.*, 1978). Devido a identidade imunológica, tais produtos enriquecidos com plaquetas devem ser autólogos e produzidos com o próprio sangue do paciente. O primeiro caso clínico de sucesso foi demonstrado em 1986, dando início a sua trajetória de sucesso (KNIGHTON *et al.*, 1986).

2.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um derivado do sangue total com alta concentração de plaquetas e, portanto, fonte de fatores biológicos fundamentais para processos de regeneração e reparo tecidual, cicatrização, modulação da resposta inflamatória, mobilização e proliferação de células-tronco teciduais e neoangiogênese (NANI, 2022)

O coágulo de fibrina acontece a partir da cascata de coagulação sanguínea, no entanto, o mesmo pode ser mimetizado *in vitro*, a partir do uso de PRP. Esse termo se popularizou no final do século XX (MARX *et al.*, 1998), que pode ser definido como um concentrado de plaquetas que tem diferentes propriedades e utilizações, dependendo do seu método de processamento (BIELECKI; M. DOHAN EHRENFEST, 2012).

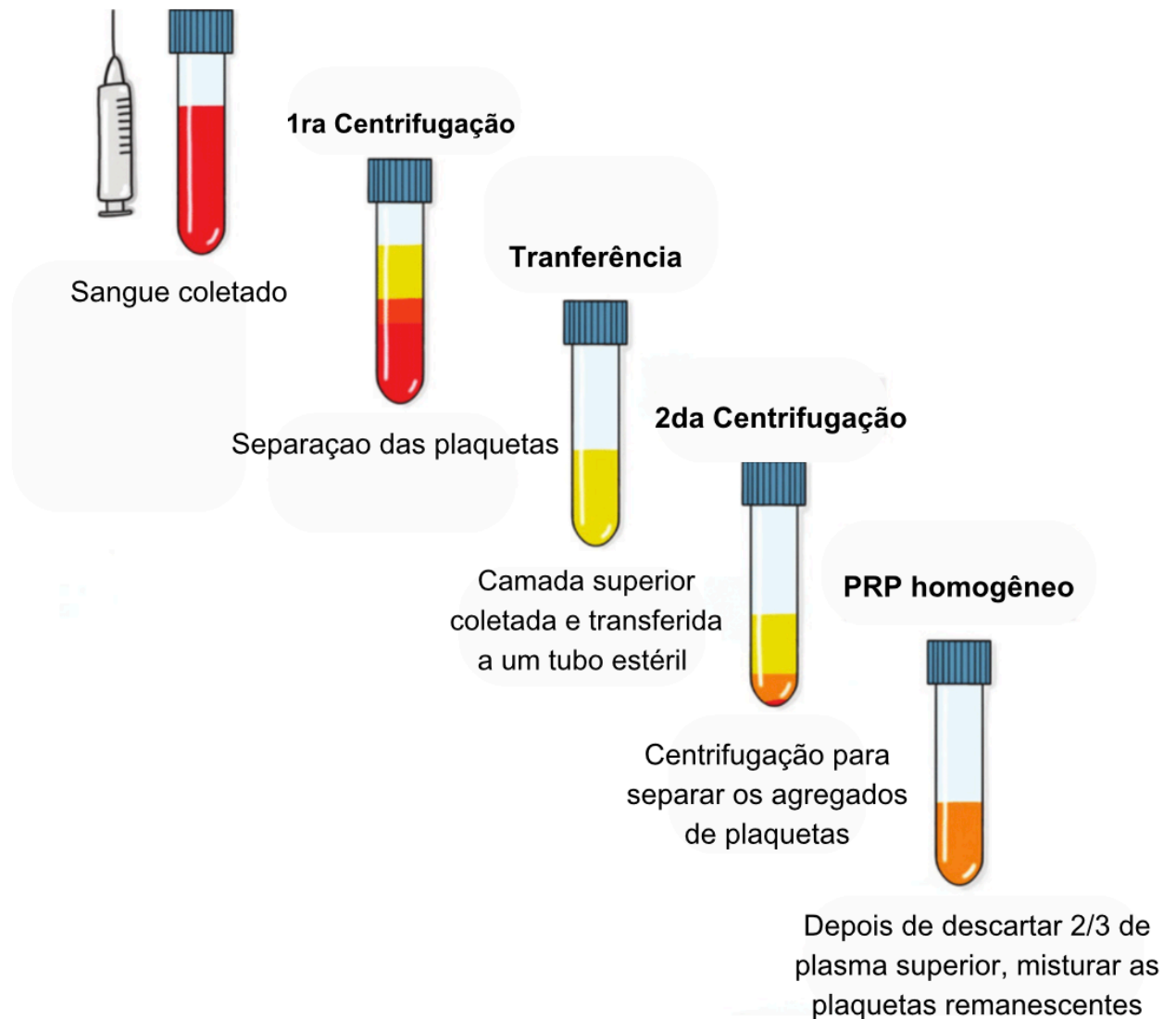
A terminologia para definição dos concentrados de plaquetas foi

demasiadamente discutida nos últimos anos, finalmente, os produtos do PRP foram divididos em quatro famílias, com base em seu conteúdo de leucócitos e fibrina. As suspensões líquidas de concentrado de plaquetas (antes da ativação) foram denominadas 1) P-PRP: “do inglês: *Pure Platelet-Rich Plasma*” sem leucócitos, 2) L-PRP “do inglês: *Leukocyte-and Platelet-Rich Plasma*” (L-PRP) com leucócitos. Ao contrário, os biomateriais sólidos concentrados de plaquetas, com uma forte arquitetura de fibrina (e, portanto, sempre ativada), foram chamados de 3) P-PRF: “do inglês: *Pure Platelet-Rich Fibrin*” sem leucócitos, 4) L-PRF “do inglês: *Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin*” com leucócitos (FANG; VANGSNESS, 2021).

Atualmente, as aplicações clínicas do PRP reúnem evidências em diversas áreas da medicina, como na dermatologia (ZHENG *et al.*, 2022), cardiologia (SPARTALIS *et al.*, 2015), neurologia (NEBIE *et al.*, 2019), oncologia (LUZO *et al.*, 2020), ortopedia (JOHAL *et al.*, 2019) e odontologia (FRANCHINI *et al.*, 2019), entre outros.

Diversos protocolos convergem nos princípios da obtenção do PRP, o sangue do paciente é coletado com anticoagulante, centrifugado para separar os vários componentes do sangue pela sua densidade. Inicialmente, é feita uma primeira centrifugação para a retirada dos glóbulos vermelhos que são densos e estão em grande quantidade. Logo é realizada uma segunda centrifugação que separa as plaquetas e leucócitos do plasma acelular (PPP) (ANITUA *et al.*, 2012). Em seguida, dois terços do PPP são descartados e o PRP é obtido assim como representa a Figura 3.

Figura 3 - Etapas do processamento do PRP



Adaptado de (FANG; VANGSNESS, 2021)

O processamento do PRP sem a presença de anticoagulante dá origem ao biomaterial derivado, conhecido como coágulo de fibrina, do inglês “clot” ou “*fibrin scaffold*”. Tal material tem propriedades biomecânicas interessantes, como sua viscoelasticidade, sendo a viscosidade resultante do deslizamento das protofibrilas e a elasticidade, consequência da flexibilidade das superhélices presentes em sua estrutura molecular (LIU *et al.*, 2006).

Devido a suas propriedades biomecânicas e bioquímicas, o coágulo de fibrina também pode ser aplicado em outras áreas, como um sistema de entrega de medicamentos (antibióticos, quimioterápicos), na liberação de fatores de crescimento e células em procedimentos estéticos, e como um suporte tridimensional para o cultivo

e diferenciação de células (DE LA PUENTE; LUDEÑA, 2014).

2.5. COÁGULO DE FIBRINA CANINO

No ramo da veterinária, nos últimos anos, alguns protocolos já foram publicados envolvendo o uso de PRP e de coágulos autólogos de fibrina advindos do PRP, seja na área odontológica (KORNSUTHISOPON *et al.*, 2020), como na área ortopédica (KAZEMI *et al.*, 2017), que demonstraram benefícios em relação a cicatrização. Ademais, Caterino e colaboradores (2022) realizaram recentemente uma padronização de protocolo para obtenção de coágulo rico em fibrina, com e sem a presença de leucócitos. Os autores quantificaram a presença de fatores de crescimento e obtiveram resultados robustos, semelhantes as propriedades descritas do coágulo de fibrina humano (CATERINO *et al.*, 2022).

Entretanto, as transfusões e bancos de sangue caninos não são comuns, muitas vezes devido ao tamanho do animal. Visto isso, o sangue canino precisa ser aproveitado e armazenado para que sua vida útil e as possibilidades de estudá-lo não sejam restringidas devido à sua falta. A criopreservação do sangue completo não é possível, pois as hemácias são anucleares e se deterioram rapidamente. Os subprodutos como o PRP podem ser armazenados por até seis meses, sem a presença das hemácias, a sua viabilidade já foi testada por outros pesquisadores (MCCLAIN; MCCARREL, 2019).

Em síntese, a ciência de biomateriais avança conforme novos desafios são apresentados, seja nos tratamentos disponíveis ou em novas enfermidades que acometem os mamíferos. Dessa forma, o PRP, subproduto do sangue, pode ser uma ferramenta para obtenção do coágulo de fibrina, um biomaterial com propriedades terapêuticas, de rápida preparação e autólogo. O PRP congelado pode ter propriedades semelhantes ao fresco, se ele for ativado corretamente, sendo assim, é necessário avaliar o melhor protocolo para sua ativação.

3. JUSTIFICATIVA

Na natureza, a fibrina desempenha predominantemente um duplo papel: como agente hemostático, pois sua formação permite estancar o sangramento e como uma matriz provisória e remodelável, que é reprocessada durante o processo de cicatrização (VAUGHAN ROBERTS *et al.*, 2020). As propriedades da fibrina podem ser empregadas na concepção de biomateriais biocompatíveis e com efeitos benéficos aos sistemas biológicos.

O plasma rico em plaquetas é um subproduto do sangue completo, na clínica veterinária é descartado pela maior aplicabilidade de compostos ricos em hemácias. O aproveitamento do PRP se faz necessário pelo seu fornecimento de fibrina, onde diversos fatores de crescimento tem a capacidade de se ligar, transformando o coágulo em um veículo de entrega de fatores de crescimento (EVERTS *et al.*, 2020). O maior desafio atualmente é o armazenamento do plasma rico em plaquetas e a posterior ativação do PRP, pois o processo acarreta a perda da viabilidade celular e o decaimento de proteínas que compõe o quadro de fatores de crescimento (VIEIRA, 2017).

A ativação cuidadosa do plasma rico em plaquetas congelado é essencial para assegurar a remoção das células não viáveis e permitir a formação consistente e integral do coágulo. O propósito deste estudo é estabelecer um protocolo padronizado para a ativação do PRP, visando sua aplicabilidade na clínica veterinária, evitando o descarte de um material tão rico e permitindo sua utilização em diversas áreas, como no cultivo celular e na medicina regenerativa.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar o protocolo de obtenção do biomaterial coágulo de fibrina a partir de plasma rico em plaquetas (PRP) congelado.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da técnica de ativação na formação do biomaterial, seja por meio de agentes ativadores e uso de energia mecânica na formação do biomaterial.
- Examinar a estrutura do coágulo de fibrina a partir da sua imagem microscópica.

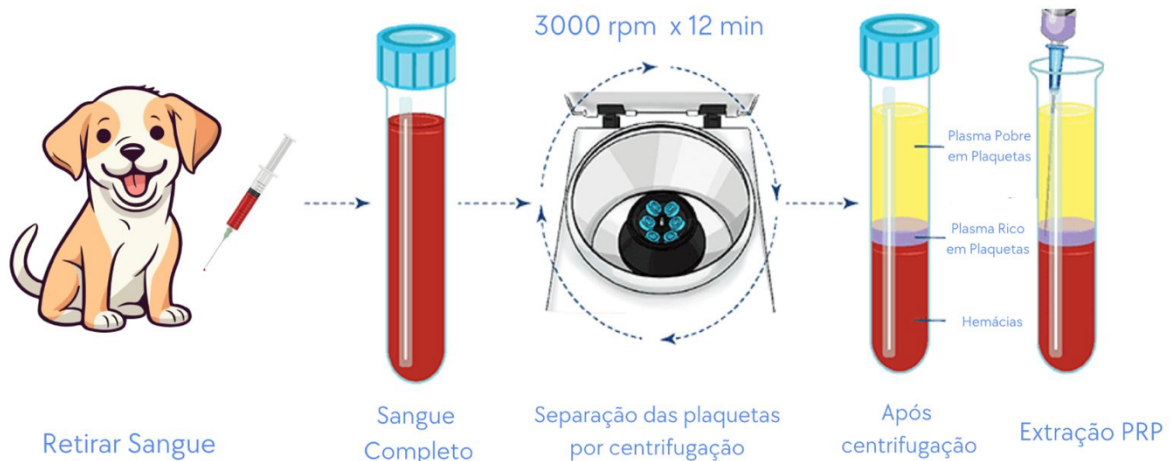
5. MATERIAS E MÉTODOS

5.1. ATIVAÇÃO DO PRP CONGELADO CANINO

Os procedimentos para a ativação e obtenção do coágulo a partir do PRP foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde (Lab G004) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) – Campus Jardim Universitário.

O PRP canino utilizado foi doado pelo Laboratório de Análises Clínicas e Banco de Sangue Canino VetQualis no ano de 2020, localizado na cidade de Foz do Iguaçu. O plasma canino foi obtido por meio da centrifugação do sangue completo conforme descrito na Figura 4, PRP foi armazenado em bolsas próprias para armazenamento de compostos sanguíneos a -20°C até o momento do processamento.

Figura 4. Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas



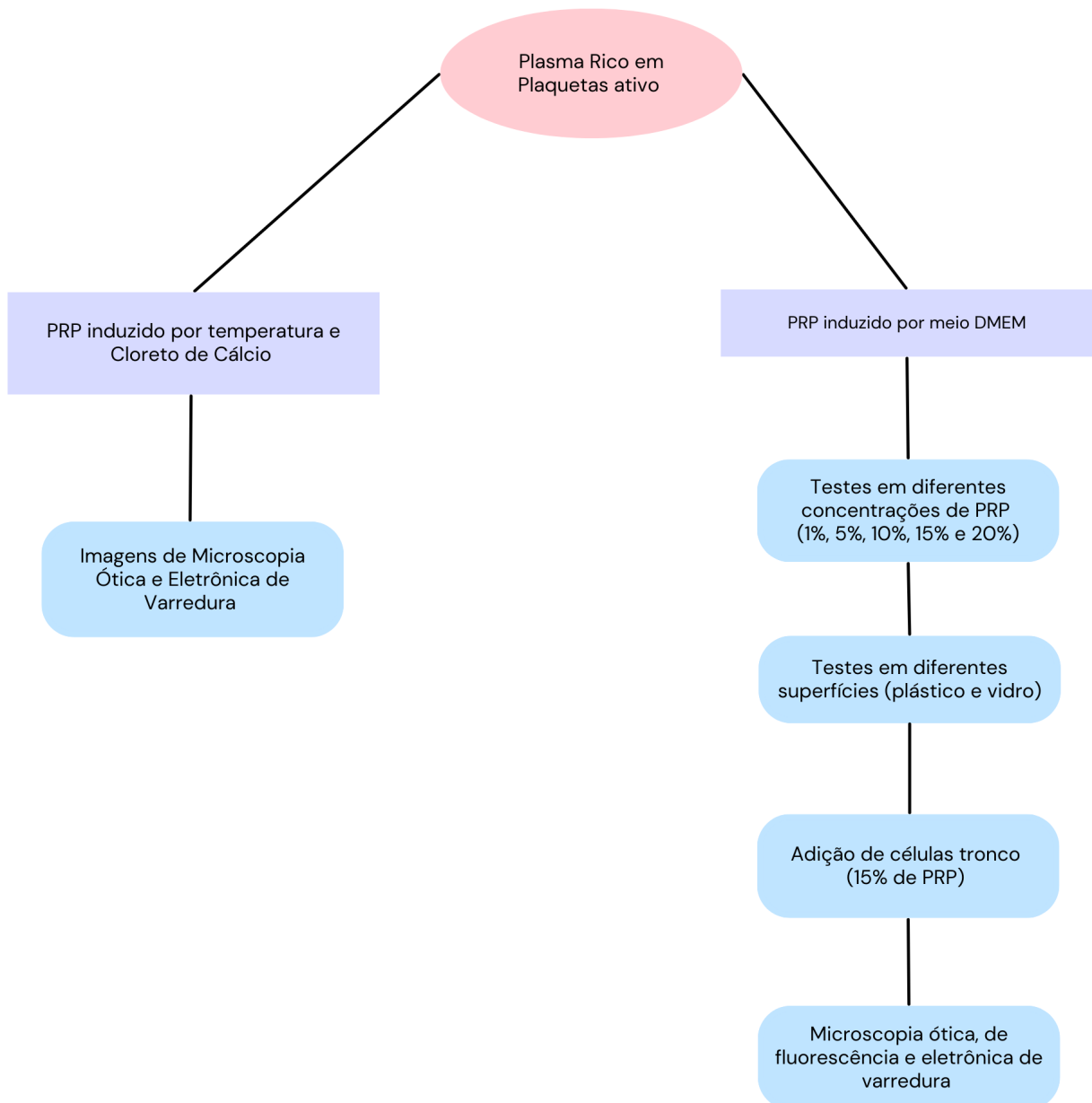
Adaptado de (Esco – LifeScience Group, 2022)

O processo de ativação do PRP foi adaptado do protocolo baseado em ciclos de congelamento e descongelamento (WASTERLAIN; BRAUN; DRAGOO, 2012). Foram selecionadas 3 bolsas de PRP de três cães diferentes, por volta de 80mL cada bolsa. O PRP foi descongelado a temperatura ambiente por 30 minutos e congelado a -20°C novamente por 2h, repetindo esse ciclo por três vezes. Logo, o PRP foi centrifugado em tubos de polipropileno de 50mL a $3200\times g$ por 10 minutos, o sobrenadante obtido foi imediatamente preparado ou foi armazenado a -20°C até o momento de seu uso. Todos os experimentos descritos posteriormente foram repetidos por mínimo 3 vezes.

5.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A partir do PRP ativo por meio dos ciclos de congelamento e descongelamento, os seguintes experimentos seguiram por duas vertentes que estão exemplificadas na Figura 5. O protocolo de centrifugação é adaptado do protocolo apresentado por Suelzu e colaboradores (SUELZU *et al.*, 2020), que consiste adicionar, em tubos de polipropileno de 15 mL, 365 μ L de CaCl_2 10% em 14,5mL de PRP, previamente ativado como descrito na seção 4.1, e homogeneizar por inversão. Logo, incubar em banho-maria a 37°C por 1h e centrifugar 4000 RPM por 10 min, usando uma centrífuga de mesa com um raio de rotor de 95 mm (Daiki 80-2B).

Figura 5. Delineamento Experimental Resumido



Ao final da centrifugação, o coágulo de fibrina formou-se pela extensão do tubo de polipropileno. O biomaterial adquirido foi transportado para a cabine de segurança biológica e foi removido o sobrenadante da centrifugação. O biomaterial obtido foi lavado por três vezes com o tampão salino e foi fixado com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (pH 7,2) e armazenado a -4 °C, até o momento de sua análise, para evitar sua deterioração.

Ademais, também foram preparadas amostras de PRP coagulado em meio de cultivo DMEM (Dulbecco). O meio DMEM foi preparado conforme as instruções do fabricante, as alíquotas de 10 mL de meio foram preparadas em condições estéreis, contendo 1%, 5%, 10%, 15% e 20% de PRP. As alíquotas então foram vertidas em placas de Petri de 8,5 cm² estéreis e foram mantidas em estufa a 37,5°C e 5% CO₂ por 24h. Foram testadas placas de Petri de vidro e de plástico, a formação do coágulo foi testada em placa de 21,2 cm² contendo 15 mL de meio de cultivo juntamente com concentrações de PRP já sugeridas. O coágulo formado em cada placa de Petri foi isolado e lavado por três vezes com PBS, logo foi fixado com glutaraldeído 2,5% por no mínimo 24h, os coágulos foram armazenados a -4°C até sua posterior análise.

Também foram preparadas amostras de PRP contendo células-tronco derivadas de tecido adiposo (do inglês: ASCs) canino, protocolo adaptado de (FERRARAZ *et al.*, 2019). As amostras foram preparadas em placa de cultivo de 6 poços, contendo 10⁶ células/mL, as células foram cedidas pelo mestrando Luis Beltrán que as isolou e caracterizou. As amostras contendo células foram preparadas com concentração de 15% de PRP e meio DMEM, a concentração de PRP foi escolhida devido a sua maior estabilidade em meio DMEM, o motivo será desmiuçado mais adiante. O meio suplementado foi adicionado a placa, posteriormente foram adicionadas as células e o conteúdo total foi pipetado para homogeneizar a solução. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ e alta umidade por 24h, posteriormente, o meio foi retirado e os coágulos foram lavados por 3 vezes com PBS. O coágulo foi fixado com glutaraldeído 2,5% e analisado futuramente.

5.3. PREPARO DO BIOMATERIAL

5.3.1. Preparo do Biomaterial para Microscopia Ótica

O material fixado passou pelo processo de coloração H&E (Hematoxilina e eosina). A hematoxilina foi adicionada em gotas até cobrir todo material e foi deixada por 5 minutos, logo após o material foi lavado até retirar todos os resíduos de hematoxilina. Em seguida, o corante eosina foi adicionado e foi cronometrado 3 minutos, depois o corante foi lavado por três vezes da amostra, que foi transferida para uma lâmina. A lâmina foi examinada por microscópio ótico (Primo Tech, ZEISS, Alemanha). Outra amostra de material foi preparada para a visualização de sua estrutura fibrinosa por microscopia ótica, o material foi fixado com glutaraldeído 2,5%, e foi corado com azul de bromofenol por 2h, em seguida o material foi lavado com ácido acético e analisado em Microscópio Invertido (ECLIPSE Ti, Nikon, Japão).

5.3.2. Preparo do Biomaterial para Microscopia de Florescência

O biomaterial fixado então passou pela incubação por 10 min com 2:500 Faloidina (FITC) + 1: 1000 DAPI. Posteriormente, o coágulo foi lavado com PBS para a retirada da solução de coloração. O coágulo foi transferido para lâmina e foi analisado em microscópio de fluorescência (ECLIPSE Ni, Nikon, Japão)

5.3.3. Preparo do Biomaterial para a Microscopia de Varredura

A captura da imagem foi realizada pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) (EVO-MA10, Zeiss, Alemanha). Inicialmente, o biomaterial foi preparado como descrito anteriormente no item 5.2, em seguida foi fixado com um agente fixador glutaraldeído 2,5% por 24h, logo depois foi pós-fixado com tetraóxido de ósmio 1% por 30min. A seguir, foi realizada a desidratação a fim de remover a água do coágulo de fibrina. A desidratação foi através de uma série de banhos de etanol, começando por uma concentração mais baixa (50%), até chegar a uma concentração mais alta (100%). Então, o biomaterial foi secado por completo a temperatura ambiente em dessecador, para sua visualização no MEV, o material passou por um processo de metalização em *sputtering*. A metalização é o processo de pulverizar a superfície da amostra com uma fina camada de metal, nesse caso por uma liga de Ouro (Au) e Paládio (Pd). A superfície metalizada da amostra permite o feixe de elétrons do MEV

interagir com os átomos da amostra e serem refletidos ou dispersos, sendo coletados por detectores do microscópio, gerando assim a imagem aproximada da amostra.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ATIVAÇÃO DO PRP CONGELADO CANINO

A ativação do plasma rico em plaquetas funciona através da degranulação dos grânulos alfa nas plaquetas, que contêm os fatores de crescimento sintetizados e pré-embalados, logo após, ocorre a clivagem do fibrinogênio para iniciar formação da matriz (WASTERLAIN; BRAUN; DRAGOO, 2012). Existem basicamente três processos conhecidos para a ativação do PRP, (1) adição de cloreto de cálcio e trombina, (2) exposição direta ao colágeno *in vivo* e (3) ciclos de congelamento/descongelamento (JOHNSON *et al.*, 2011).

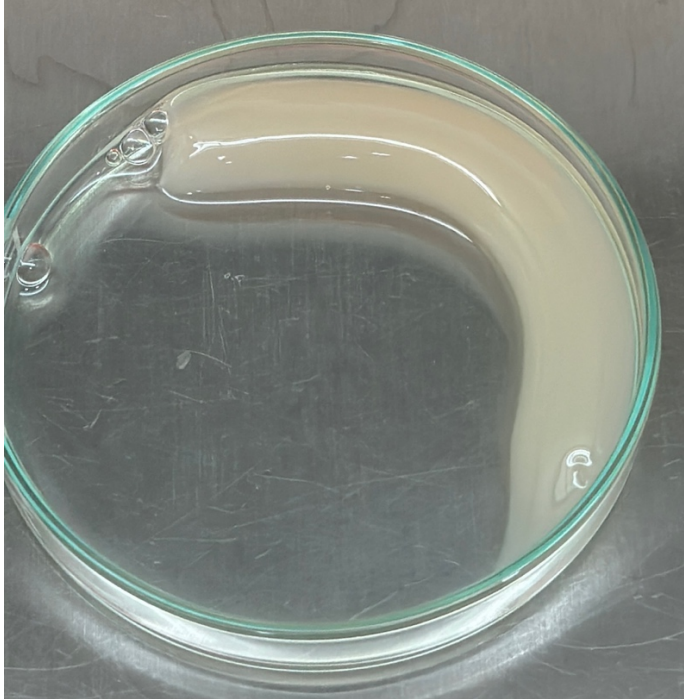
Os ciclos de congelamento/descongelamento são usados para aplicações *in vitro* de PRP. O PRP é estável por alguns dias à temperatura ambiente e por períodos prolongados quando congelado. O descongelamento subsequente quebra as plaquetas e libera o conteúdo dos alfa-grânulos das plaquetas (CAVALLO *et al.*, 2016). O objetivo da ativação por congelamento/descongelamento é lesionar fisicamente as plaquetas para iniciar a degranulação (WASTERLAIN; BRAUN; DRAGOO, 2012).

O plasma rico em plaquetas em questão passou por três ciclos de congelamento e descongelamento que o ativaram de maneira satisfatória, pois na próxima etapa foi obtido um coágulo íntegro e estável, pelos dois protocolos realizados.

6.2. COÁGULO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O biomaterial derivado do PRP possui uma sensibilidade térmica a partir de sua ativação, e possui um pH de 6,5 a 6,7, em comparação com um coágulo sanguíneo maduro que varia de 7,0 a 7,2 (MARX, 2004; SUN *et al.*, 2023). O PRP ativo por ciclos de congelamento/descongelamento precisa ser induzido para proliferação das fibrinas e conseqüente formação do coágulo. As maneiras escolhidas foram energia mecânica/centrifugação e indução por agentes coagulantes. O protocolo de adição de CaCl_2 e centrifugação e foi realizado, foi possível obter um biomaterial uniforme com viscoelasticidade, essa propriedade foi determinada devido ao estiramento com a pipeta e em seguida o retorno ao formato original. O coágulo se formou por toda extensão do tubo após a centrifugação (Figura 6), o sobrenadante obtido variou entre 2 a 3mL.

Figura 6. Coágulo de plasma rico em plaquetas centrifugado

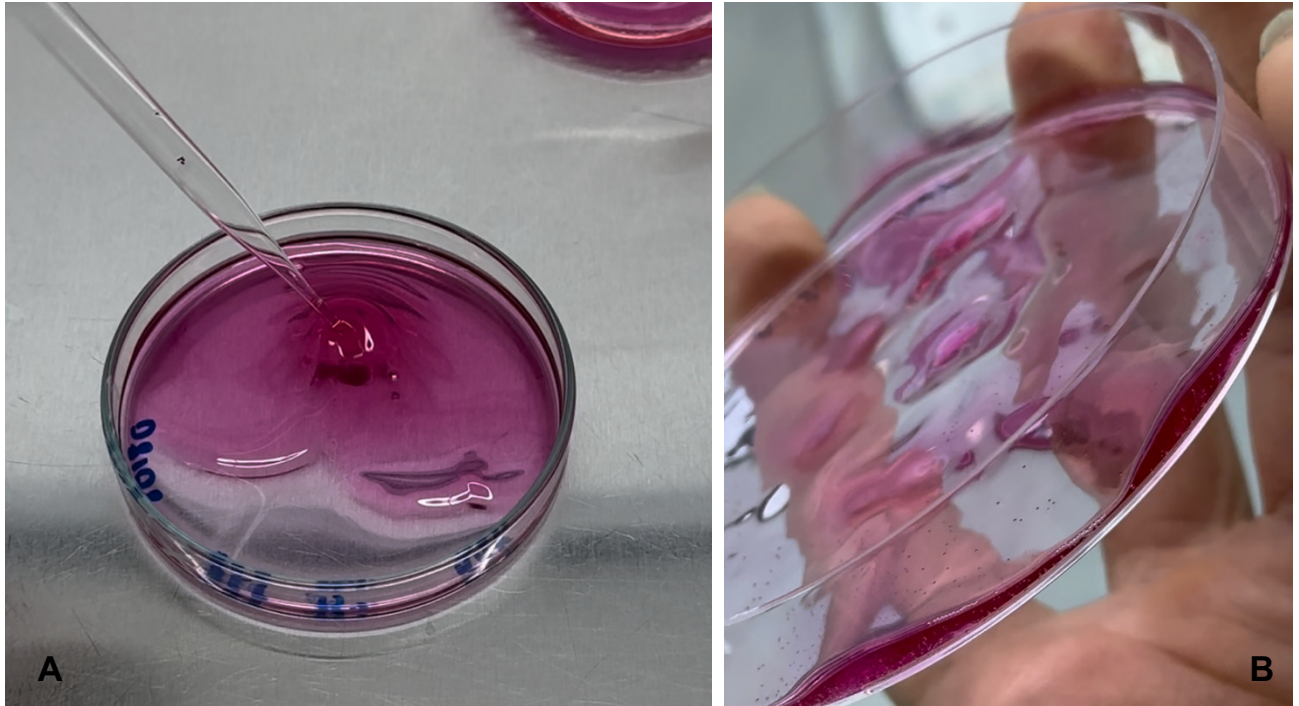


O coágulo foi gerado a partir dos ciclos de congelamento/descongelamento, incubação com CaCl_2 e centrifugação, o conteúdo do tubo de 15mL foi vertido em placa de Petri para melhor visualização.

O resultado mais interessante foi a obtenção do coágulo a partir da associação com o meio de cultivo DMEM à temperatura fisiológica de 37°C , alcançou sua configuração mais eficiente a partir da proporção de plasma rico em plaquetas de 15%, formando um gel uniforme e espesso. As concentrações de 1% e 20% não formou coagulado, 5% e 10% formaram coágulo, no entanto o coágulo formado era muito delicado e difícil de ser manuseado. A placa de Petri também influenciou no processo, em que a placa vidro permitiu que a mobilidade da matriz (Figura 7A), ao mesmo tempo, a placa de plástico fez com que a matriz se aderisse a placa (Figura 7B), dificultando sua posterior análise.

É importante mencionar que o coágulo obtido se assemelha ao formato em que foi centrifugado, portanto, a conformação do biomaterial pode ser moldada de acordo com o recipiente onde é gerado, apresentando a capacidade de assumir configurações diversas para atender a várias aplicações.

Figura 7. Coágulo de plasma rico em plaquetas com meio DMEM.



A Figura 7A representa a matriz de 15% de PRP em placa de Petri de vidro. A Figura 7B representa o biomaterial em placa de plástico a 15% de PRP.

Além disso, as ASCs que foram adicionadas ao meio e ao PRP, anteriormente a formação do coágulo, então o coágulo se forma com as células já no seu interior. As células-tronco se distribuíram de maneira irregular no coágulo e mudaram sua conformação celular. Nessa perspectiva, é pertinente apontar que existem estudos que comprovam que o plasma rico em plaquetas canino e a matriz formada pelo coágulo de fibrina podem ser usados como substituto do soro fetal bovino (SFB) (SUELZU *et al.*, 2020). O PRP também tem o potencial de fornecer um ambiente para a proliferação celular, devido a sua alta concentração de fatores de crescimento. As células obtêm da matriz a estrutura biocompatível que permite a adesão e proliferação celular (FERRARAZ *et al.*, 2019).

6.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO BIOMATERIAL

6.3.1. Microscopia Ótica do Coágulo

Visto a importância da arquitetura e disposição da fibrina para os seus processos fisiológicos e até para a liberação de fatores de crescimento (MOSESSON; SIEBENLIST; MEH, 2001), a análise de sua estrutura macromolecular e a disposição

de células pela estrutura da matriz se faz necessária. Sendo assim, o coágulo de fibrina foi analisado por microscopia ótica. Previamente foi fixado com glutaraldeído 2,5% (Fig. 8) e fixado e corado com coloração H&E (Fig. 9) Foi possível visualizar as células e possíveis fibrinas nos coágulos, que foram analisados microscópio ótico e microscópio invertido (Fig. 10).

Figura 8. Células ASCs caninas dispostas dentro de matriz fibrinosa

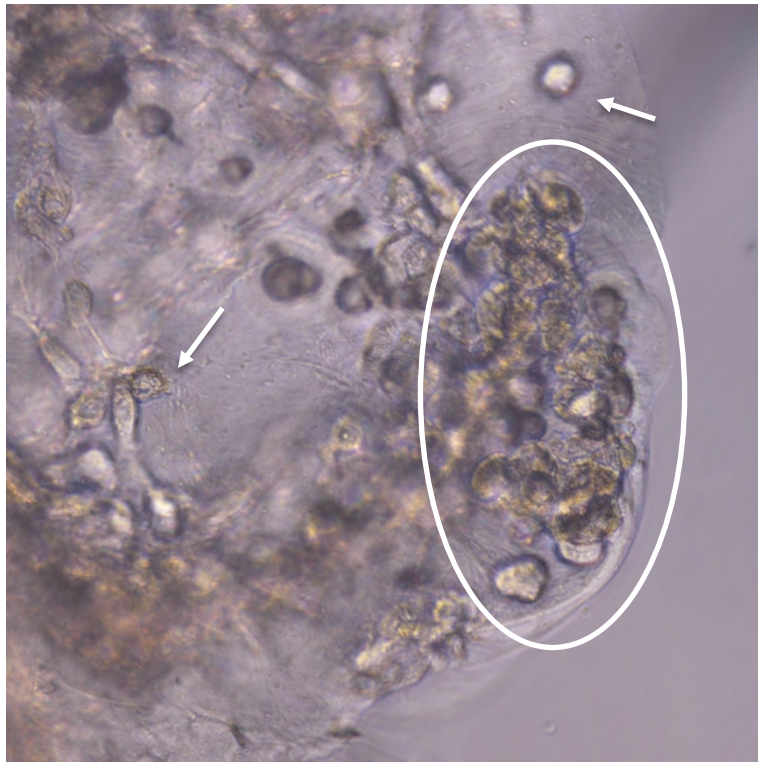


Imagem realizada em microscópio invertido (10x), fixado em glutaraldeído 2,5% sem coloração. A figura apresenta a borda de um coagulado fibrinoso com alta concentração celular, as setas brancas indicam células no interior do coágulo, já a área circutada é de alta densidade celular.

Figura 9. Células ASCs caninas dispostas dentro de matriz fibrinosa

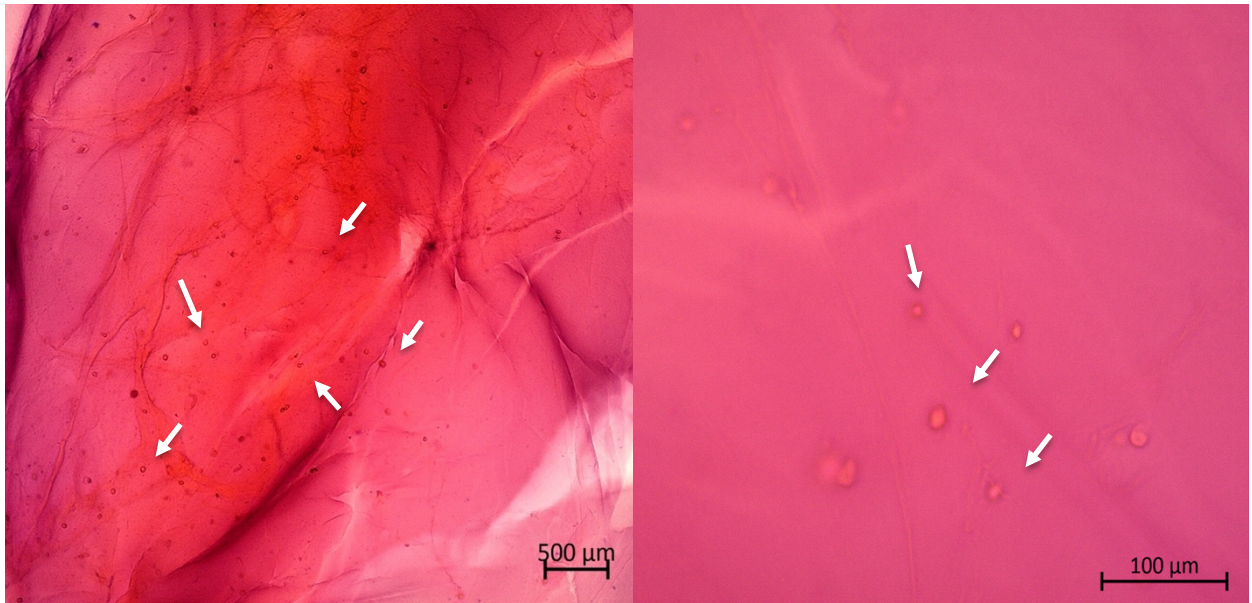
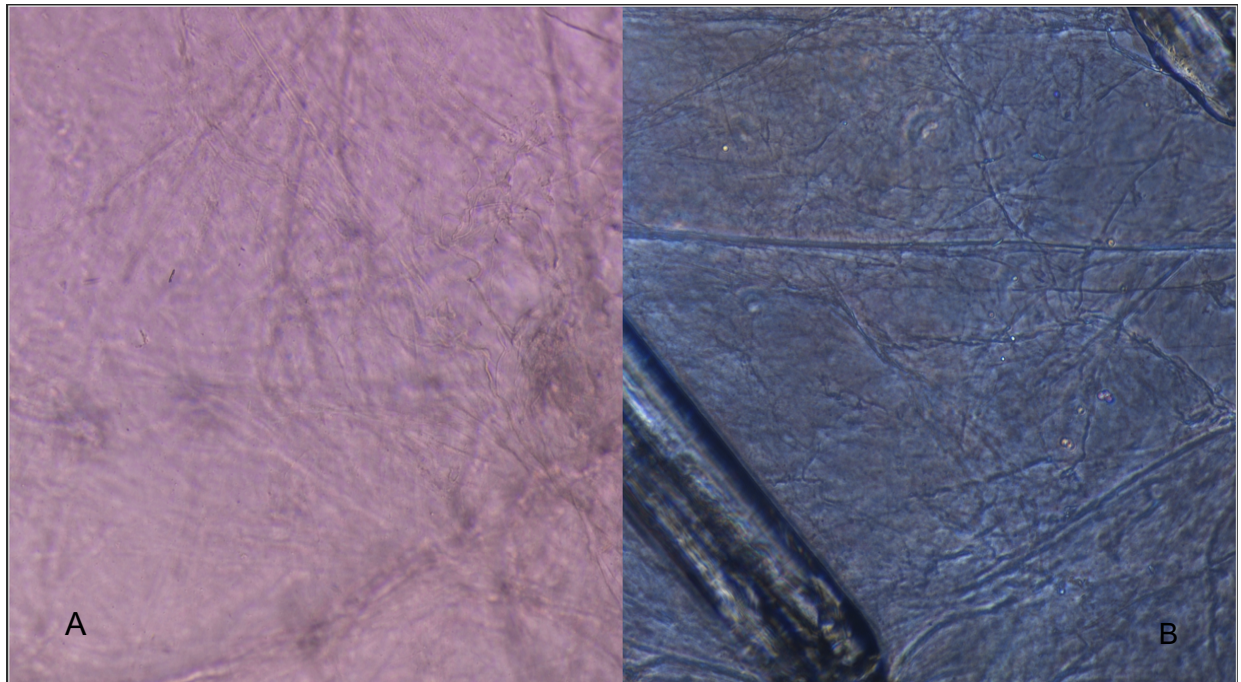


Imagem feita após fixação com glutaraldeído 2,5% e coloração H&E em microscópio ótico. As setas brancas indicam células ASCs caninas.

Figura 10. Estrutura fibrinosa da matriz de plasma rico em plaquetas sanguíneo



Ambas as imagens foram obtidas em microscópio invertido, na figura 10A é possível visualizar uma rede desordenada de possíveis fibrinas. Já a figura 10B foi fixada com glutaraldeído 2,5% e corada com azul de bromofenol, que cora proteínas, também demonstrando uma rede de estruturas similares a fibras.

As células que se encontram dispostas dentro da matriz fibrinosa não tem a mesma morfologia que as células que crescem em monocamada em garrafas de cultivo (Fig 11). É importante mencionar que a forma e função celular estão altamente relacionadas, a forma celular muitas vezes é usada na caracterização celular e como um preditor de função (PRASAD; ALIZADEH, 2019). No entanto, estudos sustentam que a matriz composta por PRP é um ambiente adequado para a proliferação e diferenciação de células-tronco caninas (KAZEMI *et al.*, 2017).

Devido a isso, no cultivo celular, a matriz de PRP canino congelado pode servir como um suporte para o crescimento de células tronco ou outros tipos celulares, entregando fatores de crescimento e dispensando o uso de soro fetal bovino. Existem um extenso número de dados na literatura que empregam diferentes tipos celulares na matriz fibrinosa (DOHAN EHRENFEST; DOGLIOLI; *et al.*, 2010; FERRARAZ *et al.*, 2019), obtendo resultados positivos.

Figura 11. Células ASC caninas dispostas em monocamada

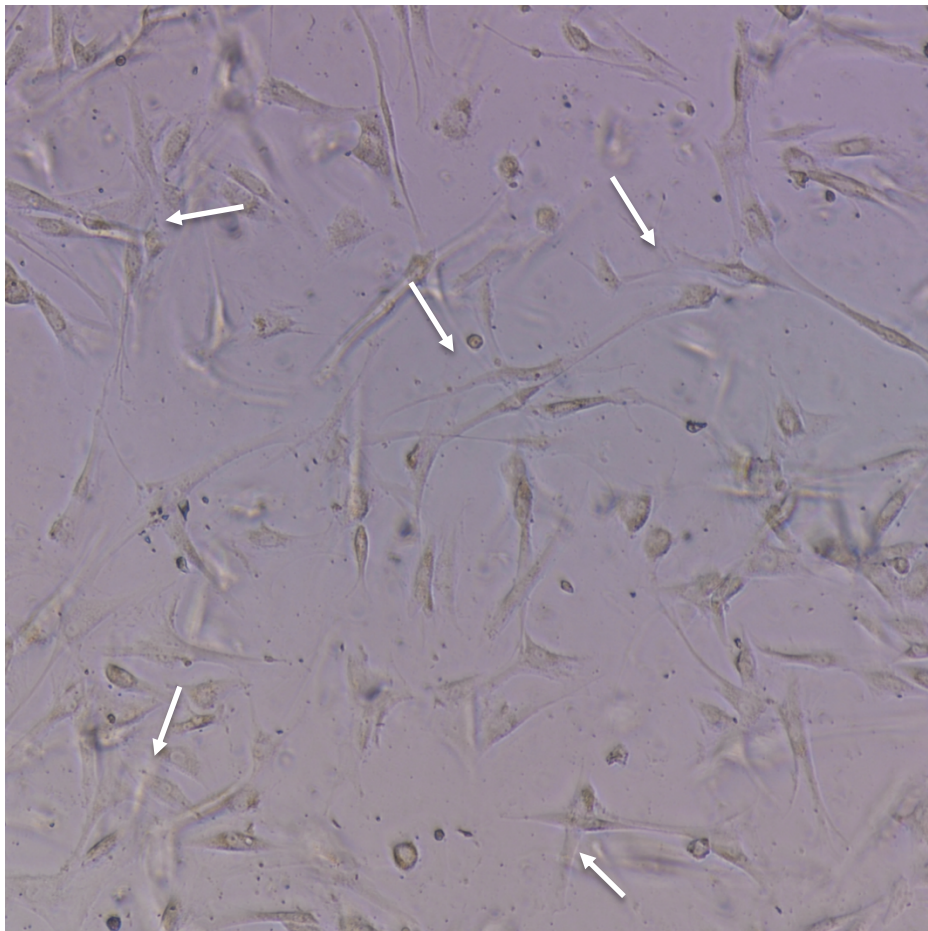


Imagem realizada em microscópio invertido (4x). As setas brancas indicam para ASCs na

Figura. É possível notar um aspecto alongado das células, sendo característico de células tronco.

6.3.2. Microscopia de Fluorescência do Coágulo

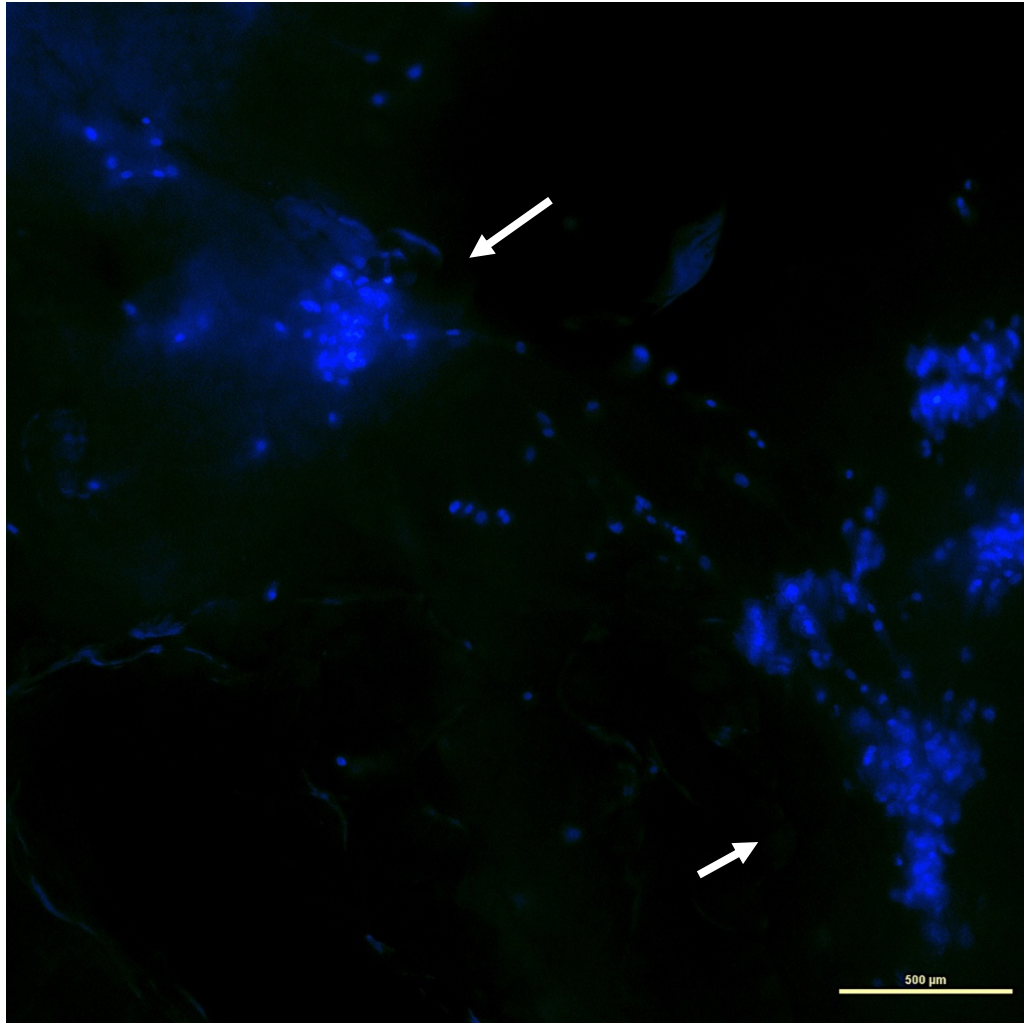
A microscopia fluorescente permeia desde a biologia celular até a biologia molecular, no entanto, existem múltiplos fatores que contribuem na obtenção de uma imagem de qualidade. Alguns principais fatores que influenciam na microscopia de fluorescência são os próprios fluoróforos e sua concentração, a intensidade e o comprimento de onda da luz incidida, e a autofluorescência do fundo onde está a amostra (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005).

Nesse âmbito, é importante mencionar que já existem referências na literatura que descrevem a presença de fibroblastos dentro de matrizes ricas em plasma rico em plaquetas (WANG *et al.*, 2019). Tal estudo confirmou por meio de imagens de microscopia de fluorescência que o coágulo de PRP suporta a migração e a proliferação de fibroblastos, além de melhorar a síntese de colágeno dessas células.

Ademais, outro grupo de pesquisadores desenvolveram um novo produto advindo do plasma rico em plaquetas, no qual tubos de titânio (Ti) são empregados no processo de obtenção do coágulo, com o objetivo de usar materiais biocompatíveis para a formulação de biomateriais (TUNALI *et al.*, 2014). O estudo citado faz uma análise da arquitetura da fibrina por microscopia fluorescente com fluoróforos específicos, sem a presença de células, trazendo uma correlação entre os métodos de estudo.

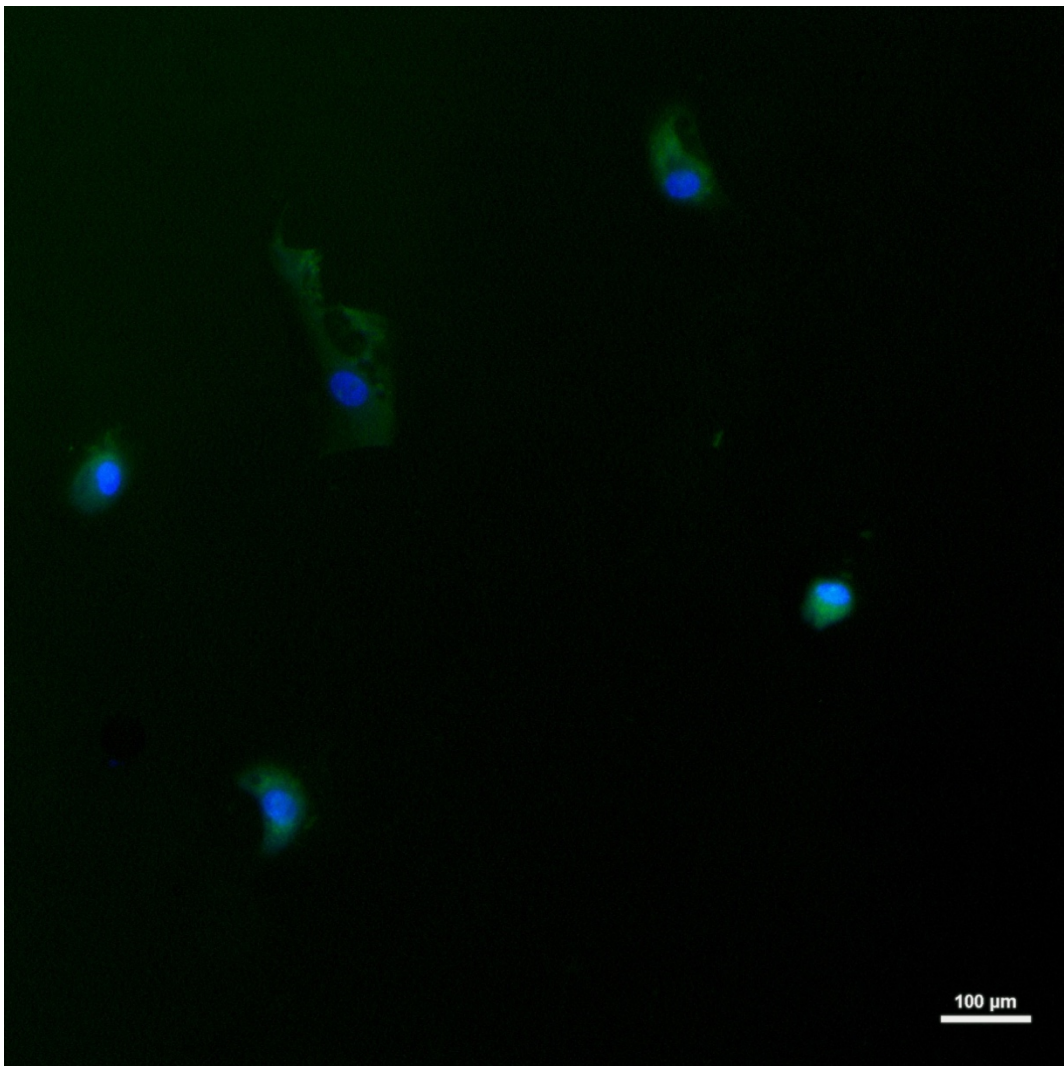
Sendo assim, o biomaterial derivado de plasma rico em plaquetas canino congelado foi avaliado por microscopia de fluorescência, conforme a Figura 12, em que é possível notar a presença de células na estrutura 3D no coágulo. Em sequência, a Figura 13 exhibe a estrutura celular com maior aumento. É possível notar que houve uma aglomeração de algumas células na matriz e houve uma mudança na conformação celular, comparada a morfologia celular em monocamada (Fig. 11)

Figura 12. Microscopia de fluorescência de células dispostas em coágulo de PRP.



O corante DAPI marca o núcleo celular, ao ligar-se fortemente com o DNA. As setas brancas indicam áreas de alta concentração celular.

Figura 13. Imagens sobrepostas de células-tronco caninas por microscopia de fluorescência



A Figura 13 evidencia as células ASC caninas dispostas no coagulado do plasma sanguíneo, a coloração azul advém do corante DAPI, que se liga ao DNA e conseqüentemente cora o núcleo celular, já a Faloidina (corante verde) se liga aos microtúbulos e indica a localização citoplasma celular. As imagens foram realizadas com diferentes filtros e depois foram sobrepostas.

6.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura do Coágulo

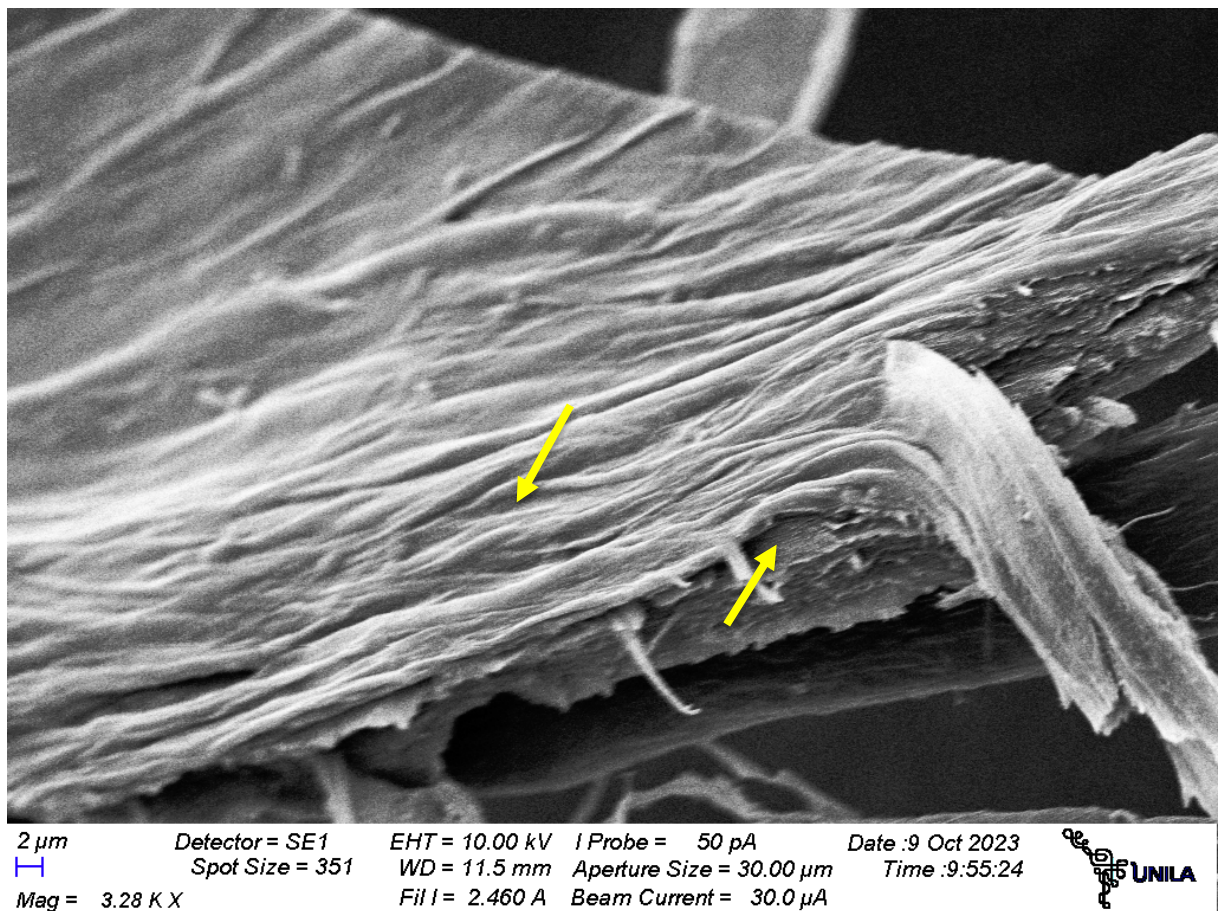
A microscopia eletrônica de varredura é empregada em amostras biológicas para a análise minuciosa da superfície macromolecular do composto, todavia, é fundamental uma preparação meticulosa da amostra para a obtenção de imagens de alto padrão. A microscopia de varredura é capaz de produzir imagens alta resolução em uma escala micrométrica, no entanto, amostras biológicas devem passar por um

extenso processo de preparação antes de serem analisadas (INKSON, 2016).

Posto isto, a maioria dos artigos que examina a imagem eletrônica do PRP realiza o procedimento padrão, fixação com glutaraldeído 2,5% e pós fixação com tetraóxido de ósmio 1%, desidratação com séries de álcool e uso de dessecador de ponto crítico (ANITUA *et al.*, 2015). No caso do biomaterial em questão, seguiu o mesmo processo indicado acima, exceto pela desidratação, que foi realizada apenas por meio da série crescente de banhos de etanol.

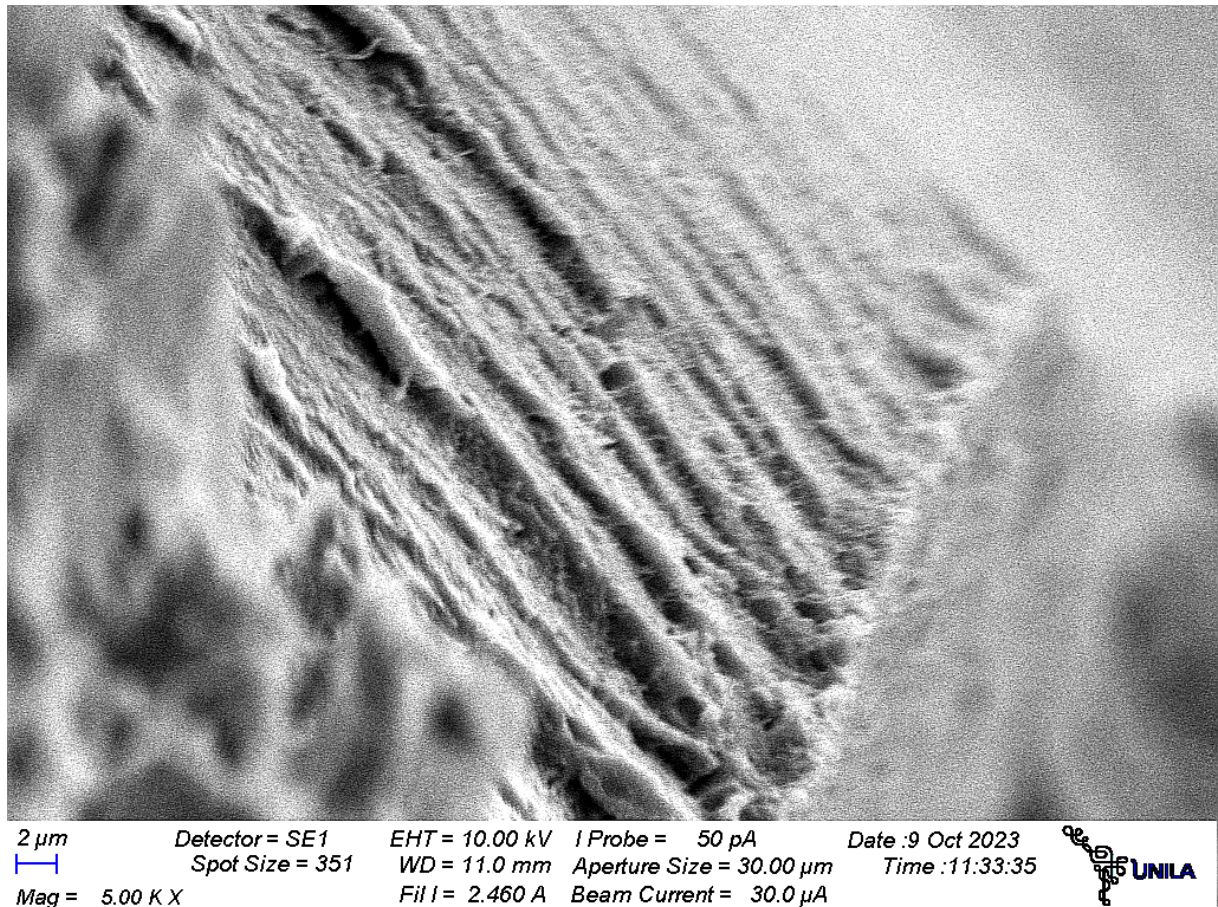
A Figura 14 exibe uma parcela de PRP induzido por meio DMEM, no qual é possível notar a presença de fibras na longitude da amostra. Um feixe de fibras se desprende da amostra, e as fibras se dobram junto com ele. Já a Figura 15 é evidencia o biomaterial induzido pela adição de CaCl_2 10%, na imagem é possível visualizar as fibras organizadas e na mesma direção.

Figura 14. Imagem eletrônica de PRP induzido por DMEM.



A seta amarela indica feixe de fibras

Figura 15. Biomaterial derivado do PRP e CaCl_2 .



A imagem evidencia feixes de fibrina presentes na amostra.

As imagens adquiridas através da microscopia de varredura assemelham-se às representações encontradas na literatura especializada (DOHAN EHRENFEST; MARCO; et al., 2010; TUNALI et al., 2014). Embora não tenhamos a capacidade de distinguir cada fibra individualmente, foi possível identificar estruturas fibrilares ou aglomerados com características de feixes de fibras. É importante mencionar que uma possível influência sobre esses resultados pode estar relacionada ao método de secagem do material, o qual divergiu do procedimento descrito na literatura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao iniciar este trabalho, foi afirmado que o plasma rico em plaquetas (PRP) possui um grande potencial regenerativo devido à sua elevada concentração de fatores de crescimento e à sua rica arquitetura de fibrina. No entanto, na literatura, há pouca discussão sobre a aplicação e avaliação do PRP após o congelamento, principalmente devido ao aumento da toxicidade decorrente de resíduos celulares remanescentes no concentrado. Para a área veterinária, o PRP frequentemente é tratado como um subproduto, muitas vezes destinado ao descarte, desperdiçando assim seu potencial como biomaterial.

Portanto, o objetivo deste estudo foi padronizar o protocolo para a obtenção do biomaterial de coágulo de fibrina a partir do PRP congelado. Foi necessário analisar a influência das técnicas de ativação usando agentes ativadores e energia mecânica, além de examinar a estrutura do coágulo de fibrina por meio de imagens microscópicas para determinar se o coágulo mantinha a mesma estrutura mesmo após o congelamento

Foi descoberto que o plasma rico em plaquetas canino congelado se forma de maneira semelhante ao fresco, descrito na literatura, pela aplicação da técnica de ciclo de congelamento e descongelamento, e a incubação com CaCl_2 para mimetizar a cascata de coagulação fisiológica. Além disso, foi possível induzir o coágulo combinando-o com meio de cultura DMEM, onde as mudanças de pH e a temperatura da incubadora induziram a formação de uma estrutura semelhante a um gel com a capacidade de promover a proliferação celular.

Além disso, a configuração macromolecular foi observável por meio de microscopia óptica, fluorescente e eletrônica. A microscopia óptica e a fluorescente revelaram a disposição espacial das células dentro da matriz de fibrina, enquanto a microscopia eletrônica de varredura forneceu uma visão de alta resolução e ampliada da rede de fibrina.

Os resultados indicam que a formação de PRP congelado é factível e muito semelhante aos coágulos frescos descritos na literatura, a conformação do biomaterial pode ser moldada de acordo com o recipiente onde é gerado, apresentando a capacidade de assumir configurações diversas para atender a várias aplicações. Essa metodologia também tem o potencial de suporte para o crescimento celular e como veículo para a entrega de fatores de crescimento.

No entanto, houve algumas limitações na pesquisa deste composto. Infelizmente, faltaram reagentes importantes necessários para a execução fidedigna de protocolos descritos na literatura. Também faltaram equipamentos específicos necessários para etapas críticas na preparação da amostra, o que exigiu a adaptação de técnicas já descritas na literatura.

Vale ressaltar que são necessários estudos adicionais para confirmar a viabilidade do PRP congelado como uma matriz ideal para o desenvolvimento celular. As células sofreram uma mudança na morfologia ao serem incluídas na matriz de fibrina, o que pode indicar uma alteração em sua função, possivelmente favorecendo a diferenciação celular.

A interação entre as células dentro da matriz também precisa ser estudada mais profundamente. Protocolos para a remoção de células de dentro da matriz devem ser formulados, considerando que esse processo diferiria das células que crescem em monocamadas em frascos de cultura. Ensaios de proliferação e morte celular devem ser conduzidos em comparação com os frascos de cultura para determinar se existem vantagens em usar a matriz como suporte celular.

Além disso, são necessários estudos que quantifiquem o conteúdo de fatores de crescimento após o congelamento do plasma. A capacidade deste biomaterial fresco em fornecer fatores relacionados à coagulação e reparação de tecidos é bem documentada; no entanto, esses fatores podem ter desnaturado ou perdido sua função após o período de congelamento.

REFERÊNCIAS

- ANITUA, Eduardo *et al.* Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. **PLoS ONE** v. 10, n. 3, 30 mar. 2015.
- ANITUA, Eduardo *et al.* Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. **Operative Techniques in Orthopaedics** v. 22, n. 1, p. 25–32, 1 mar. 2012.
- BERGEL, Salo. Ueber Wirkungen des Fibrins. **DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift** v. 35, n. 15, p. 663–665, 15 abr. 1909.
- BIELECKI, Tomasz; M. DOHAN EHRENFEST, David. Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. **Current pharmaceutical biotechnology** v. 13, n. 7, p. 1121–1130, 12 jun. 2012.
- BISWAL, Trinath; BADJENA, Sushant Kumar; PRADHAN, Debabrata. Sustainable biomaterials and their applications: A short review. **Materials Today: Proceedings** v. 30, p. 274–282, 1 jan. 2020.
- BROWN, Ashley C.; BARKER, Thomas H. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. **Acta Biomaterialia**. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2014
- CATERINO, Chiara *et al.* Production Protocol Standardisation, Macroscopic and Histological Evaluation, and Growth Factor Quantification of Canine Leukocyte-and Platelet-Rich Fibrin Membranes. **Frontiers in Veterinary Science** v. 9, 15 abr. 2022.
- CAVALLO, Carola *et al.* Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. **BioMed research international** v. 2016, 2016.
- CLARK, Richard A.F. Fibrin is a many splendored thing. **The Journal of investigative dermatology** v. 121, n. 5, 2003.
- COHN, E. J. *et al.* Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of the American Chemical Society** v. 68, n. 3, p. 459–475, 1 mar. 1946.
- CRONKITE, Eugene P.; LOZNER, Eugene L.; DEEVER, Joshua M. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting: preliminary report. **JAMA** v. 124, n. 14, p. 976–978, 1 abr. 1944.
- CRUBEZY, E. *et al.* False teeth of the Roman world. **Nature** v. 391, n. 6662, p. 29, 1 jan. 1998.
- DE LA PUENTE, Pilar; LUDEÑA, Dolores. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. **Experimental Cell Research**. v. 10, n.1 p. 1-11, 10 mar. 2014
- DOHAN EHRENFEST, David M. *et al.* Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. **Archives of Oral Biology** v. 55, n. 3, p. 185–194, 1 mar. 2010.

EKER, İbrahim *et al.* A Cycle of Freezing and Thawing as a Modified Method for Activating Platelets in Platelet-rich Plasma to Use in Regenerative Medicine. **Panamerican Journal of Trauma, Critical Care & Emergency Surgery** v. 9, n. 2, p. 101–104, 18 nov. 2020.

EVERTS, Peter *et al.* Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. **International Journal of Molecular Sciences** v. 21, n. 20, p. 7794, 21 out. 2020.

FANG, William H.; VANGSNESS, C. Thomas. Food and Drug Administration's Position on Commonly Injected Biologic Materials in Orthopaedic Surgery. **American Journal of Sports Medicine** v. 49, n. 12, p. 3414–3421, 1 out. 2021.

FERRARAZ, Débora Carajiliascov *et al.* Platelet-rich plasma as supplement and scaffold for the culture of Vero cell line. **Research on Biomedical Engineering** v. 35, n. 1, p. 1–9, 1 mar. 2019.

FISH, Richard J.; NEERMAN-ARBEZ, Marguerite. Fibrinogen gene regulation. **Thrombosis and haemostasis** v. 108, n. 3, p. 419–426, set. 2012.

FRANCHINI, Massimo *et al.* The use of platelet-rich plasma in oral surgery: a systematic review and meta-analysis. **Blood Transfusion** v. 17, n. 5, p. 357, 2019.

GAHARWAR, Akhilesh K.; SINGH, Irtisha; KHADEMHOSEINI, Ali. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. **Nature Reviews Materials** 5, n. 9, p. 686–705, 6 jul. 2020.

GURTNER, Geoffrey C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature** v. 453, n. 7193, p. 314–321, 14 maio 2008.

HENSCHEN, Agnes *et al.* Covalent structure of fibrinogen. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 408, n. 1, p. 28–43, 1983.

INKSON, B. J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. **Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods** p. 17–43, 1 jan. 2016.

JOHAL, Herman *et al.* Impact of Platelet-Rich Plasma Use on Pain in Orthopaedic Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. **Sports health** v. 11, n. 4, p. 355–366, 1 jul. 2019.

JOHNSON, L. N. *et al.* Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. **Cryobiology** v. 62, n. 2, p. 100–106, abr. 2011.

KAZEMI, D. *et al.* Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin: Macroscopic and histological assessments. **Bone and Joint Research** v. 6, n. 2, p. 98–107, 1 fev. 2017.

KIM, Joong Il *et al.* Effect of Storage Conditions and Activation on Growth Factor Concentration in Platelet-Rich Plasma. **Journal of Orthopaedic Research®** v. 38, n. 4, p. 777–784, 1 abr. 2020.

KNIGHTON, D. R. *et al.* Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). **Annals of surgery** v. 204, n. 3, p. 322–330, 1986.

KORNSUTHISOPON, Chatvadee *et al.* Autologous platelet-rich fibrin stimulates canine periodontal regeneration. **Scientific Reports** v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

LEDERMAN, M. Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, 1986, Vol. 4, Elsevier, New York. **Journal of the Royal Society of Medicine** v. 69, n. 11, p. 859 , 1976.

LICHTMAN, Jeff W.; CONCHELLO, José Angel. Fluorescence microscopy. **Nature Methods** 2005 2:12 v. 2, n. 12, p. 910–919 , 18 nov. 2005.

LIU, W. *et al.* Fibrin Fibers Have Extraordinary Extensibility and Elasticity. **Science (New York, N.Y.)** v. 313, n. 5787, p. 634 , 8 ago. 2006.

LUZO, Angela C.M. *et al.* What is the potential use of platelet-rich-plasma (PRP) in cancer treatment? A mini review. **Heliyon** v. 6, n. 3 , 1 mar. 2020.

MA, Y. Q.; QIN, J.; PLOW, E. F. Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: Activation mechanisms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 5, n. 7, p. 1345–1352, jul. 2007.

MARTINO, Mikaël M. *et al.* Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 110, n. 12, p. 4563–4568, 19 mar. 2013.

MARX, Robert E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** v. 62, n. 4, p. 489–496, 2004.

MARX, Robert E. *et al.* Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics** v. 85, n. 6, p. 638–646, 1998.

MATRAS, Helene. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** v. 40, n. 10, p. 617–622, 1982.

MCCLAIN, Andrew K.; MCCARREL, Taralyn M. The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months. **BMC Veterinary Research** v. 15, n. 1, p. 1–9, 14 ago. 2019.

MIRON, Richard J.; ZHANG, Yufeng. Autologous liquid platelet rich fibrin: A novel drug delivery system. **Acta Biomaterialia**. v.15, n. 75, p. 35-51, 15 jul. 2018.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of thrombosis and haemostasis** v. 3, n. 8, p. 1894–1904 , 2005.

MOSESSON, Michael W.; SIEBENLIST, Kevin R.; MEH, David A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 936, p. 11–30, 2001.

NANI, Luiz Augusto Silva. Padronização do processamento do plasma rico em plaquetas e lisado de plaquetas para uso clínico. **Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Medicina, USP.** 2022.

NEBIE, Ouada *et al.* The neuroprotective activity of heat-treated human platelet lysate biomaterials manufactured from outdated pathogen-reduced (amotosalen/UVA) platelet concentrates. **Journal of Biomedical Science** v. 26, n. 1, p. 89, 31 out. 2019.

PARK, Joon; LAKES, Roderic S. **Biomaterials: an introduction**. Third Edition ed. [S.l.]: Springer Science, Business Media, LLC, 2007.

PIETERS, Marlien; WOLBERG, Alisa S. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis** v. 3, n. 2, p. 161–172, 1 abr. 2019.

PRASAD, Ashok; ALIZADEH, Elaheh. Cell Form and Function: Interpreting and Controlling the Shape of Adherent Cells. **Trends in Biotechnology**. Elsevier Ltd., 1 abr. 2019

RATNER, Buddy D. *et al.* Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. **Third Edition**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2013. p. 6–9.

RATNER, Buddy D.; ZHANG, Guigen. A History of Biomaterials. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine** p. 21–34, 1 jan. 2020.

ROSENTHAL, A. Ralph *et al.* Use of platelet-fibrinogen-thrombin mixture to seal experimental penetrating corneal wounds. **Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology** v. 207, n. 2, p. 111–115, jun. 1978.

SPARTALIS, E *et al.* Role of platelet-rich plasma in ischemic heart disease: An update on the latest evidence. **World journal of cardiology** v. 7, n. 10, p. 665, 2015.

SPOTNITZ, WD. Fibrin sealant in the United States: clinical use at the University of Virginia. **Thromb Haemost.** v74(1):482-5. Jul. 1995.

SPOTNITZ, William D. Fibrin sealant: Past, present, and future: A brief review. **World Journal of Surgery** v. 34, n. 4, p. 632–634, abr. 2010.

SUELZU, Caterina M. *et al.* Xenobiotic-Free Medium Guarantees Expansion of Adipose Tissue- Derived Canine Mesenchymal Stem Cells Both in 3D Fibrin-Based Matrices and in 2D Plastic Surface Cultures. **Cells** v. 9, n. 12, 2 dez. 2020.

SUN, Yang *et al.* Duo-role Platelet-rich Plasma: temperature-induced fibrin gel and growth factors' reservoir for microneedles to promote hair regrowth: Duo-role Platelet-rich Plasma promote hair regrowth on microneedles. **Journal of Advanced Research**, 2023.

TUNALI, Mustafa *et al.* A novel platelet concentrate: Titanium-prepared platelet-rich fibrin. **BioMed Research International** v. 2014, 2014.

VAUGHAN ROBERTS, Iwan *et al.* Fibrin Matrices as (Injectable) Biomaterials: Formation, Clinical Use, and Molecular Engineering. **Macromolecular Bioscience** v. 20, n. 1, p. 1900283, 1 jan. 2020.

VIEIRA, Raissa Brauner Kamla. Preservação de plasma rico em plaquetas de coelhos em nitrogênio líquido e freezer. **Dissertação Pós-graduação Ciências Veterinárias**. Universidade Federal de Uberlândia. p. 29, 2017.

- WAGNER, William R. *et al.* Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine** p. 1–1586, 1 jan. 2020.
- WANG, Xuzhu *et al.* Fluid platelet-rich fibrin stimulates greater dermal skin fibroblast cell migration, proliferation, and collagen synthesis when compared to platelet-rich plasma. **Journal of Cosmetic Dermatology** v. 18, n. 6, p. 2004–2010, 1 dez. 2019.
- WASTERLAIN, Amy S.; BRAUN, Hillary J.; DRAGOO, Jason L. Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. **Operative Techniques in Orthopaedics** v. 22, n. 1, p. 33–42, 1 mar. 2012.
- WEISEL, John W. Fibrinogen and Fibrin. **Advances in Protein Chemistry** v. 70, p. 247–299, 1 jan. 2005.
- WEISEL, John W.; LITVINOV, Rustem I. Fibrin formation, structure and properties. **Sub-Cellular Biochemistry** v. 82, p. 405–456, 1 jan. 2017.
- WHELAN, D.; CAPLICE, N. M.; CLOVER, A. J.P. Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications. **Journal of Controlled Release**. v. 8, n.196, p. 1-8, 28 dez. 2014
- WRIGHT, Martha M. *et al.* Laser-Cured Fibrinogen Glue to Repair Bleb Leaks in Rabbits. **Archives of Ophthalmology** v. 116, n. 2, p. 199–202, 1 fev. 1998.
- ZHENG, Wang *et al.* Effectiveness of platelet rich plasma in burn wound healing: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of dermatological treatment** v. 33, n. 1, p. 131–137, 2022.