UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS

PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA *IN VITRO* DA FIBRONECTINA EM AMOSTRAS DE L-PRF: ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

PETROLOLINA-PE
2018

PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA *IN VITRO* DA FIBRONECTINA EM AMOSTRAS DE L-PRF: ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, Campus Petrolina, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciências, com ênfase linha de pesquisa: Saúde, Sociedade e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Bento Moreira
Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciana Lirani
Co-orientador: Prof.Dr. Ricardo Santana de Lima

PETROLINA-PE

2018

	Lopes, Pedro Henrique de Souza.
L864a	Avaliação morfométrica *in vitro* da fibronectina em amostras de l-prf: estudo imuno-histoquímico / Pedro Henrique de Souza Lopes. -- Petrolina, 2018.
	xix, 63 f. : il. ; 29 cm.
	Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, 2018.
	Orientador (a): Prof.(a) Drª Márcia Bento Moreita Banca examinadora: Prof. Dr. Alexandre Henrique dos Reis, Prof. Dr. José Carlos de Moura
	Referências.
	1. Fibrina. 2. Engenharia tecidual. 3. Células sanguíneas. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco
	CDD 611.0185

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas da UNIVASF.
Bibliotecário: Fabio Oliveira Lima - CRB-4/2097.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pedro Henrique de Souza Lopes

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA *IN VITRO* DA FIBRONECTINA EM AMOSTRAS DE L-PRF: ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Dissertação apresentada como requisito parcial do Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde e Biológicas, para obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 04/09/2018

Banca Examinadora

_____

Profa. Dra. Márcia Bento Moreira, UNIVASF
Orientadora

_____

Prof. Dr. Alexandre Henrique dos Reis – UNIVASF
Examinador Externa

_____

Prof. Dr. José Carlos de Moura - UNIVASF
Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família.

Minha esposa **Aline** que está ao meu lado há 10 anos, minha companheira, mãe de meus filhos, que sempre acreditou que juntos poderíamos estar aqui. Não descuidou de nós em nenhum momento. Não daria para chegar aqui só....

Aos meus filhos **Pedro Filho** e **Heitor Henrique**, fonte de inspiração. Mesmo tão pequenos são capazes de nos motivar diariamente!

Ao meu **Pai** e minha **Mãe**, foi por eles que pude galgar os primeiros passos no mundo, os primeiros passos no colégio, os primeiros passos na academia. Foram eles responsáveis pelos nossos princípios, foram eles que estavam as vezes em outras cidades mas acreditando no nosso trabalho.

Ao meu irmão **João Paulo**, sua simplicidade me orgulha, seu companheirismo me encoraja, sua índole é um exemplo. Estaremos juntos sempre!

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO – UNIVASF POR TER PROPICIADO UM AMBIENTE ACADÊMICO A PERMITIR A EXPANSÃO DO MEUS CONHECIMENTOS.

AO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVASF, O LABOR DIÁRIO, QUE ME PERMITIU CONHECER PESSOAS QUE AJUDARAM ATIVAMENTE NESSA CAMINHADA.

A PROFESSORA MÁRCIA BENTO MOREIRA, MINHA ORIENTADORA, PRIMEIRAMENTE PELA CONFIANÇA DEPOSITADA DESDE O PRIMEIRO DIA. PELA PACIÊNCIA E PELOS ENSINAMENTOS AO LONGO DESTA JORNADA. NÃO FORAM POUCOS OS PERCALÇOS, NÃO FORAM POUCOS OS “NÃOS” QUE RECEBEMENTOS, NÃO FOI FÁCIL. QUEM DISSE QUE SERIA? VENCEMOS TODOS ELE. EM FRENTE SEMPRE.

AO PROFESSOR RICARDO SANTANA DE LIMA QUE NÃO POUPOU ESFORÇOS PARA PERMITIR QUE ESTA PESQUISA FOSSE REALIZADA.

A TODOS OS DOCENTES DO MESTRADO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E BIOLÓGICAS POR TEREM PARTILHADO SEUS CONHECIMENTOS.

AOS COLEGAS DE CLASSE QUE DIVIDIRAM OS MOMENTOS DE ALEGRIA E DE ANGUSTIA DENTRO E FORA DO PROGRAMA. UNIDOS TODOS CHEGAREMOS LÁ.

AOS MEUS AMIGOS QUE FIZERAM PARTE DA CONSTRUÇÃO DESSA ESTRADA. SÃO MUITOS, NOMEÁ-LOS ME FARÁ CORRER UM RISCO GRANDE. MAS TODOS SABEM DE SUA IMPORTÂNCIA. DA INFÂNCIA, DA FACULDADE, DA RESIDÊNCIA, DA VIDA....

" Quem passou pela vida em branca nuvem
E em plácido repouso adormeceu,
Quem não sentiu o frio da desgraça,
Quem passou pela vida e não sofreu,
Foi espectro de homem, e não homem,
Só passou pela vida, não viveu."

Francisco Otaviano (1826-1889)

RESUMO

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia, biologia e ciências clínicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam manter, restaurar, ou melhorar a função de órgãos e tecidos. A Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) consiste em um agregado leucoplaquetário não transfusional com uma matriz de fibrina polimerizada após um protocolo de centrifugação obtido a através de venopunção. **Objetivos**: Estudar a malha de L-PRF em diferentes tempos de permanência no tubo de ensaio após a centrifugação, analisando e descrevendo macro e microscopicamente com auxílio das marcações imuno-histoquímicas para a glicoproteína fibronectina. **Métodos**: Estudo experimental *in vitro*, duplo-cego, descritivo, onde a amostra foi composta pelo sangue venoso coletado de dois voluntários e divididos sob o critério do tempo de permanência dos tubos em repouso após a centrifugação em Grupo 01 (0 minutos), Grupo 02 (60 minutos), Grupo 03 (120 minutos). Cada amostra foi submetida a inclusão em parafina e feitos cortes histológicos para análise histopatológica com o uso de marcadores celulares. Foi realizado análise imuno-histoquímica para fibronectina e as lâminas submetidas ao estudo microscópico descritivo, quali e quantitativo. **Resultado:** Foi observado uma melhor organização da malha de fibrina e o aparecimento de grânulos citoplasmáticos nos Grupos 02 e 03. Não houve diferença significante estatisticamente entre os diferentes tempos. **Conclusão:** o tempo de permanência dos tubos em repouso parece influenciar positivamente na organização do coágulo.

Palavras-Chaves: Fibrina Rica em Plaquetas; Engenharia Tecidual; Células Sanguíneas.

ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies principles of engineering, biology and clinical sciences to the development of biological substitutes that can maintain, restore, or enhance the function of organs and tissues. Leukocyte Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) consists of a non-transfusional leuco-platelet aggregate with a polymerized fibrin matrix obtained after a centrifugation protocol through venipuncture. **Objectives**: To study the L-PRF mesh in different times of permanence in the test tube after the centrifugation, analyzing and describing macro and microscopically with the aid of the immunohistochemical markings for fibronectin glycoprotein. **METHODS**: In vitro, double-blind, descriptive study, in which the sample was composed of venous blood collected from two volunteers and divided according to the rating time of the tubes at rest after centrifugation in Group 01 (0 minutes), Group 02 (60 minutes), Group 03 (120 minutes). Each sample was submitted to paraffin inclusion and histological sections were made. Immunohistochemical analysis was performed for fibronectin, and the slides were subjected to a descriptive qualitative and quantitative microscopic study. Result: A better organization of the fibrin mesh and the appearance of cytoplasmic granules were observed in Groups 02 and 03. There was no statistically significant difference between the different times. Conclusion: the residence time of the tubes at rest seems to positively influence the organization of the clot.

Keywords: Platelet-Rich Fibrin; Tissue Engineering; Blood Cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da amostra segundo os tempos de estudo, sendo que cada 10mL estão acondicionados em um tubo de plástico com identificação codificada. **01**

Figura 2. Imagem demonstrando a integridade da peça formolizada ao chegar no laboratório onde foi realizada a análise imuno-histoquímica. **02**

Figura 3. Comprimento do *plug* de fibrina. Nota: após a remoção dos tubos os coágulos são geralmente manipulados sobre uma caixa inox perfurada que auxilia na prática clínica e permite alterar as formas dos coágulos de fibrina, fazendo com que por exemplo, possam sem modelados em forma de membranas, pequenos êmbolos ou possam sem picotados para ser usados com outros biomateriais. **03**

Figura 4. Logo após a centrifugação é possível ver as três camadas compostas pelo sobrenadante ou plasma pobre em plaquetas, o coágulo de fibrina rica em plaquetas e leucócitos e o tampão ou coágulo de hemácias. **04**

Figura 5. Tubo ao ser removido da centrífuga após 60 minutos, apresentando o *plug* fibrinoso separado do tampão de hemácias. É possível ver o *pelet* leucoplaquetário (seta vermelha) e sua distribuição ao longo de parte da parede do tubo (setas pretas), região rica em células capazes de produzir fatores de crescimento dentre outros mediadores. **05**

Figura 6. Fotomicrografia em aumento de 10x mostrando a zona intermediária entre a porção basal rica em células e a porção intermediária composta pela malha de fibrina e permeado de plaquetas..... **06**

Figura 7. Fotomicrografia com aumento de 10x pertencente ao grupo 3 mostrando um caráter mais celular em sua região inferior, correspondente a posição mais próxima ao *pelet* leucoplaquetário..... **07**

Figura 8. Fotomicrografia com aumento de 40x (A) e 100x (B) mostrando a presença de α-grânulos distribuídos junto aos leucócitos dentro da L-PRF no grupo 2 (60 minutos)..... **08**

Figura 9. Fotomicrografia com aumento de 10x dos Grupos 1 (A), 2 (B) e 3(C). Na região central do grupo 1 observa-se uma maior presença de espaço em brancos, sugerindo uma menor densidade neste local..... **09**

Figura 10. Fotomicrografia com aumento de 100x (Grupo 1), mostrando a presença de células marcadas para a glicoproteína fibronectina (setas verdes) e células não-marcadas (setas vermelhas)..... **10**

Figura 11. Gráfico de linha com marcadores descritivo visualizando a diferença na contagem de células nos diferentes tempos (G1 x G2 x G3) para ambos doadores..... **11**

Figura 12. Figura 10: Fotomicrografia de um corte histológico de L-PRF associado a um modelagem computadorizada demonstrando a presença de glicoproteínas estruturais (fibronectina) e citocinas extrínsecas embebidas em uma matriz de fibrina. Nota-se a arquitetura estrutural das ligações equivalentes formadas através de uma polimerização lenta, gradativa e natural, transformando em uma estrutura com maior resistência que o PRP, a exemplo. (1) Citocinas retidas intrisicamente na rede fibrino-fibrilas; (2) Citocinas plaquetárias em solução (extrinsecamente associado com polímeros de fibrina); (3) Cadeiras glicanas associadas a fibrina; (4) **12**

Fibronectina circulante; (5) Fibrina associadas com cadeiras glicanas e citocinas intrínsecas. Adaptado de (Dohan *et al.*, 2006b) .....

Figura 13. Fotomicrografia com aumento de 10x em um corte histológico do grupo 3 demonstrando além da grande quantidade de leucócitos e plaquetas no local, uma alta taxa de marcação celular positiva para fibronectina..... **13**

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1. Distribuição da amostra segundo os tempos de estudo, sendo que cada 10mL estão acondicionados em um tubo de plástico com identificação codificada..... **01**

Tabela 2. Apresentação do percentual da contagem de **células marcadas** utilizando a fotomicrografia com aumento de 100x no comparativo entre os grupos G1 x G2 x G3 e entre os doadores D1 e D2..... **02**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UNIVASF	**Universidade Federal do Vale do São Francisco**
PE	Pernambuco
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CEDEP	Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas
PRP	Platelet-Rich Plasma (Plasma Rico em Plaquetas)
PRF	Platelet Rich Fibrin (Fibrina Rica em Plaquetas)
L-PRF	Leucocyte Platelet Rich Fibrin (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos)
Dr	Doutor
e.g.	Exempli gratia (Por Exemplo)
TGFβ-1	Transforming Growth Factor Beta -1 (Fator de Crescimento Transformante β -1)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas)
IGF I - II	Insuline Growth Factor I – II (Fator de Crescimento semelhante a Insulina I e II)
VEGF A-B	Vascular Endothelial Growth Factor A-B (Fator de Crescimento Endotelial Vascular A-B
nº	Número
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
kg	Kilogram (quilograma)
mL	Mililitro
CFO	Conselho Federal de Odontologia
TNT	Tecido Não-Tecido
%	Porcentagem
G	Gauge

º	Graus
RPM	Rotações por Minuto
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
%v/v	Percentual em volume
APC	Apoio em Patologia Cirúrgica
SP	São Paulo
ºC	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
µL	Microlitro
CA	Califórnia
USA	United States of America (Estados Unidos das América)
Ltda	Limitada
Inc.	Incorporation (Incorporação)
®	Marca Registrada
µm	Micrômetro
cM	Centímetro
α	Alfa
SPSS	*Statistical Package for Social Science*
FCR	Força Centrífuga Relativa

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21
2. REFERENCIAL TEÓRICO 24
2.1 A História dos Concentrados Plaquetários: da Fibrina à L-PRF 24
2.2 L-PRF 25
2.3 Matriz Extracelular 26
2.4 Plaquetas 26
2.5 Os Principais Fatores de Crescimento 27
2.6 Fibrina 28
2.7 Fibronectina 28
3.OBJETIVOS 30
3.1 Geral 30
3.2 Específicos 30
4. MATERIAL E MÉTODOS 32
4.1 Considerações Éticas da Pesquisa 32
4.2 Delineamento Experimental 32
4.2.1 Caracterização da Amostra 32
4.3 Coleta Sanguínea 34
4.4 Centrifugação 35
4.5 Processamento 36
4.5.1 Análise Imuno-histoquímica 37
4.5.2 Microscopia 38
4.6 Análise Estatística 39
5. RESULTADOS 42
5.1 Análise e Descrição das Características Macroscópicas e Morfométricas da Malha de L-PRF 42
5.1.1 Macroscopia 42
5.1.2 Microscopia 45
5.2 Avaliação, Mensuração e Registro Fotográfico das Marcações por Imuno-histoquímica das Moléculas de Fibronectina nos Diferentes Tempos de Repouso da Malha após a Centrifugação 50
5.3 Estudo e Descrição das Correlações Clínico-Laboratoriais da L-PRF Obtida nos Diferentes Tempos 52

6. DISCUSSÃO 56
7. CONCLUSÃO 61
REFERÊNCIAS 62
8. NORMAS UTILIZADAS 74
9. APÊNDICE A 76
10. ANEXO A 80

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Avanços na área de biologia molecular e celular têm contribuído para o desenvolvimento de técnicas de reparo ou, até mesmo, de regeneração de órgãos e tecidos danificados por doenças, traumas e deformidades congênitas. A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia, biologia e ciências clínicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam manter, restaurar, ou melhorar a função de órgãos e tecidos. Essa nova ciência está embasada em três pontos: células, matrizes biocompatíveis e moléculas bioativas responsáveis pelos sinais morfogênicos.(CASAGRANDE *ET AL.*, 2009; CHEN E LIU, 2016)

O conceito de biomateriais de origem humana em terapias regenerativas tem suporte na literatura por vasto número de estudos demonstrando o uso de hemoderivados ricos em fatores de crescimento como Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fibrina Rica em Plaquetas (L-PRF) (SHAH *ET AL.*, 2014; ALI *ET AL.*, 2015; OZGUL *ET AL.*, 2015; AL-HAMED *ET AL.*, 2017; ALZAHRANI *ET AL.*, 2017).

Vários concentrados sanguíneos são usados para o suporte da regeneração tecidual e reparo de feridas em diferentes áreas. Um destes sistemas é o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), uma técnica desenvolvida para uso na prática clínica e terapias de regeneração tecidual. O PRP é preparado por múltiplos passos de centrifugação usando o sangue do paciente e anticoagulantes são adicionados para que seja possível a obtenção da mesma. Entretanto, na busca de minimizar o risco de contaminação, eliminar o uso de anticoagulantes e fazer uso da capacidade de reparo autólogo e totalmente natural, um novo sistema, a Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF), foi introduzida como o primeiro concentrado sanguíneo sem o uso adicional de anticoagulantes (CHOUKROUN *ET AL.*, 2001).(EL BAGDADI *ET AL.*, 2017)

A Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (PRF) consiste em um concentrado sanguíneo obtido do sangue periférico venoso do paciente e submetido ao processo de centrifugação de passo único sem a utilização de anticoagulantes ou qualquer outra substância.(WEND *ET AL.*, 2017) Esta matriz

de fibrina rica com plaquetas, que contém uma reserva de células que incluem ainda linfócitos B e T, monócitos, células indiferenciadas e neutrófilos (GHANAATI *ET AL.*, 2014), com capacidade de liberação de amplo espectro de fatores de crescimento (TGFβ-1, PDGF-AB, VEGF,TSP-1) (Dohan Ehrenfest, De Peppo*, et al.*, 2009) e de fácil manuseio, tem se mostrado eficiente como opção terapêutica em diversas áreas da saúde (CHEN E LIU, 2016). Além destes fatores de crescimento mencionados, as plaquetas contidas na malha de fibrina são capazes de liberar algumas moléculas como von Willebrand, P-selectina, fibrinogênio, vitronectina e fibronectina (GHANAATI *ET AL.*, 2014).

Fibronectina, a primeira entre as glicoproteínas a ser intensamente estudada, é composta de moléculas de alto peso e desempenha papel fundamental na montagem da matriz extracelular, na adesão celular e condução, migração, morfologia, organização do citoesqueleto e até na transformação oncogênica (LABAT-ROBERT, 2012).

O objetivo deste trabalho é realizar um estudo acerca da malha de fibrina (PRF) em diferentes tempos de permanência no tubo de ensaio após a centrifugação.

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A História dos Concentrados Plaquetários: da Fibrina à L-PRF

O uso de fibrina tópica para hemostasia foi discutida pela primeira vez por Bergel em 1909 (BERGEL, 1909.), quando foi empregado o uso de trombina bovina com plasma humano na sua confecção. O emprego deste derivado para fins cirúrgicos era restrito, até que em meados dos anos 50 o Dr. Edwin J. Cohn na Universidade de Harvard, utilizou manualmente as primeiras técnicas de plasmaferase possibilitando a separação proteica para purificação da trombina humana (RESTREPO *ET AL.*, 2009). Porém, como o produto final era derivado de plasma humano homólogo havia um risco potencial em relação a transmissão de patógenos, como por exemplo o vírus da hepatite e logo surgiram os primeiros casos relatados (SUNDARAM E SUNDARAM CP, 2010). Em 1974 (KUDERNA E MATRAS, 1975) utilizaram uma mistura de solução crioprecipitada de plasma autólogo obtido de sangue venoso e uma mesma quantidade de trombina. Em 1998 a *Food and Drug Administration* aprovou o uso das colas de fibrina que eram formadas pela polimerização do fibrinogênio com trombina e cálcio, disponíveis para a comercialização desde 1982.

Isso levou ao desenvolvimento de uma alternativa com uso de sangue autólogo chamado Plasma Rico em Plaquetas. O uso desta técnica iniciou-se em 1975 empregando-o como adesivo para reparos em córneas e reparo de tecido nervoso. Despertou-se então uma série de pesquisas sobre o assunto e a PRP ocupou lugar de destaque por muitos anos, onde culminou nos anos 90 com o emprego na odontologia para regeneração óssea.(SUNDARAM E SUNDARAM CP, 2010)

Apesar de todas as vantagens, o protocolo de confecção com várias etapas, o uso de trombina bovina que ameaçava a saúde humana por estar associada a algumas coagulopatias somada ao curto tempo de liberação de

fatores de crescimento, levaram aos pesquisadores a busca de outra alternativa (NANDITHA *ET AL.*, 2017).

No início do século, em Nice – França, Choukroun e sua equipe (CHOUKROUN *ET AL.*, 2001) desenvolveram o que é conhecido hoje como a segunda geração de concentrados plaquetários. O protocolo de preparação demonstrou-se relativamente simples, pois envolvia a coleta de sangue do próprio paciente e imediata centrifugação em etapa única e sem aditivo de qualquer outra substância xenógena; assim nascia a Fibrina Rica em Plaquetas – PRF (CHOUKROUN *ET AL.*, 2001).

2.2 L-PRF

L-PRF consiste em um concentrado sanguíneo leucoplaquetário autólogo obtido através de venopunção e posterior centrifugação, em etapa única, sem aditivo de substâncias de qualquer natureza. A ausência de anticoagulantes faz com que haja a ativação em poucos minutos da maioria das plaquetas contidas na amostra de sangue em contato com as paredes do tubo, liberando assim a cascata de coagulação (DOHAN *ET AL.*, 2006A).

O fibrinogênio que está inicialmente concentrado na parte superior do tubo é transformado em fibrina pela trombina circulante. Dessa forma é obtido o coágulo de fibrina que fica na parte central do tubo, acima do tampão de hemácias e abaixo da porção acelular plasmática sobrenadante(DOHAN *ET AL.*, 2006A).

A L-PRF demonstra uma matriz densa de fibrina incluindo a presença de várias células presentes no processo inflamatório, como leucócitos e plaquetas, combinado a uma série de proteínas plasmáticas, fatores de crescimento, glicoproteínas e micropartículas circulantes fortemente aderidos a esta malha fibrinosa. (DOHAN *ET AL.*, 2006B)

A conformação tridimensional da malha de fibrina é capaz de mimetizar a matriz extracelular em termos estruturais, criando um ambiente funcionalmente ótimo para a proliferação celular e reparo tecidual (GHANAATI *ET AL.*, 2014),

onde as propriedades de imuno-estimulação e de controle da inflamação já estão clinicamente estabelecidas.(DOHAN *ET AL.*, 2006C)

2.3 Matriz Extracelular

Matriz extracelular é um meio complexo, dinâmico, composto por uma variedade de macromoléculas pertencentes a quatro famílias distintas: colágeno(s), elastina(s), glicosaminoglicanos e glicoproteínas.(LABAT-ROBERT, 2012)Essa matriz extracelular apresenta diferentes propriedades físicas e bioquímicas variando de acordo com o tipo do tecido (*e.g.* entre o epitélio e o tecido conjuntivo é formado a lâmina basal que se trata de uma forma especializada de ME), que tem papel-chave no comportamento celular (GAND *ET AL.*, 2017), no desenvolvimento morfogênico e no reparo de feridas.(MIRON-MENDOZA *ET AL.*, 2017).

2.4 Plaquetas

Produzidas na medula óssea a partir de células chamadas megacariócitos, as plaquetas são células anucleadas, possuem uma membrana composta por uma camada dupla de fosfolipídeos com uma série de receptores para diversas moléculas (colágeno, trombina...), tem formato discoide, citoplasma contendo uma grande quantidade de grânulos que são secretados quando ativadas, tempo de vida entre 8 a 10 dias e com reconhecido papel na hemostasia primária e na formação de trombos(DOHAN *ET AL.*, 2006B). Além disso, são importantes moduladoras em processos fisiopatológicos incluindo a inflamação e reparo tecidual.(EL BAGDADI *ET AL.*, 2017; ETULAIN, 2018) Sua capacidade de aderir ao tecido subendotelial exposto, agregar e facilitar a produção de trombina fazem com que as plaquetas formem um *plug* hemostático e promova a formação de uma malha de fibrina e um coágulo sanguíneo. Plaquetas são recrutadoras de leucócitos e células progenitoras nos locais de danos vasculares e inflamação. Elas induzem a permeabilidade celular

promovem quimiotaxia e proliferação celular, etapas fundamentais ao reparo tecidual.(NURDEN, 2017)

2.5 Os Principais Fatores de Crescimento

TGFβ-1 (Fator de Crescimento Transformante β -1) faz parte de uma superfamília com mais de 30 membros, presente não somente nos α-grânulos plaquetários, mas também nas sinalizações intercelulares. In vitro, tem efeitos variados, mas de modo geral, participa na indução da proliferação celular e síntese de matrizes celulares como colágeno I e fibronectina, sendo considerado um regulador da inflamação.(DOHAN *ET AL.*, 2006B)

PDGF (Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas) são reguladores essenciais da migração, proliferação e reprodução da linhagem de células mesenquimais. Dessa forma, esse fator de crescimento tem papel principal nos mecanismos da cicatrização fisiológicos e na patologia de algumas doenças (ex: neoplasias pulmonares).(NISHIMOTO *ET AL.*, 2015)

IGF I – II (Fator de Crescimento semelhante a Insulina I e II) são reguladores positivos da proliferação e diferenciação da maioria dos tipos celulares, que infelizmente incluem também os tumores. É considerado um dos principais fatores de sobrevivência celular adquirido nos milhões de anos de evolução pois aumenta a proliferação celular mitótica e bloqueia a apoptose.(FRYSTYK, 2004)

VEGF A-B (Fator de Crescimento Endotelial Vascular A-B) A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes em um processo envolvendo migração e proliferação de células endoteliais já existentes. É um processo complexo e requer um delicado balanço entre promotores e inibidores. Assim o VEGF desempenha importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico.(DOHAN EHRENFEST, DE PEPPO*, ET AL.*, 2009)

2.6 Fibrina

Fibrina é a forma ativada da molécula plasmática do fibrinogênio. Essa molécula fibrilar solúvel está presente tanto no plasma quanto nos grânulos-α e tem papel determinante na agregação plaquetária durante a hemostasia, transformando-se em uma espécie de “cola biológica” capaz de manter inicialmente o tampão plaquetário estável, constituindo uma malha protetora no vaso sanguíneo lesionado durante a coagulação. O fibrinogênio é transformado em fibrina pela trombina tornando-se insolúvel constituindo uma matriz cicatricial aos tecidos que sofreram algum tipo de agressão. (DOHAN *ET AL.*, 2006A)

2.7 Fibronectina

A Fibronectina é uma proteína adesiva secretada por algumas células que facilitam a ligação de outras proteínas, inclusive a fibrina, da matriz extracelular.(MIRON-MENDOZA *ET AL.*, 2017)

A Fibronectina existe em duas conformações diferentes *in vivo*: globular ou solúvel, presente no plasma e fluidos biológicos, tendo demonstrado potencial a estimulação da angiogênese, redução da resposta inflamatória e fechamento de feridas(CHANTRE *ET AL.*, 2018), e a forma fibrilar ou insolúvel, presente nos tecidos e sintetizada por fibroblastos, células epiteliais e outros tipos de células diferenciadas.(LABAT-ROBERT, 2012)

A Fibronectina tem um papel crucial na cicatrização de feridas promovendo um substrato para a adesão celular durante a formação do tecido de granulação.(GALLI *ET AL.*, 2016; FILLA *ET AL.*, 2017) Alguns achados sugerem que as células secretam e organizam a Fibronectina em sua trajetória quando migram sobre a matriz de fibrina. Esses “rastros” devem então servir como sinalizações para outras células.(MIRON-MENDOZA *ET AL.*, 2017)

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a malha de fibrina rica em plaquetas (L-PRF) em diferentes tempos de permanência no tubo de ensaio após a centrifugação.

3.2 Específicos

- Analisar e descrever as características macroscópicas e morfométricas da malha de L-PRF nos diferentes tempos;

- Avaliar, mensurar e registrar fotograficamente as marcações por imuno-histoquímica das moléculas de fibronectina nos diferentes tempos de repouso da malha após a centrifugação;

- Estudar e descrever as correlações clínico-laboratoriais da L-PRF obtida nos diferentes tempos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas da Pesquisa

O presente estudo foi APROVADO pela Comissão de Ética e Pesquisas - CEP do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sob o protocolo nº 2.200.157 / 2017 CEP/CEDEP/UNIVASF e respeitou os princípios éticos presentes na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (Brasil, 2013) e conforme a declaração de Helsinque (World Medical Association Recommendation 2011).

Todos os voluntários da pesquisa foram esclarecidos sobre o propósito do projeto, caráter metodológico e foram convidados a participar espontaneamente do estudo; após o aceite eles leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os pesquisadores em questão assumiram a responsabilidade frente à privacidade e à confidencialidade dos relatos apresentados, preservando integralmente o anonimato dos sujeitos da pesquisa.

4.2 Delineamento Experimental

4.2.1 Caracterização da Amostra

A amostra foi composta pelo sangue venoso coletado de voluntários, do sexo masculino, com idade entre 30 e 40 anos, com peso médio entre 70 e 80kg e saudáveis clinicamente.

O sangue foi coletado por venopunção na sala preparada para a realização do experimento no Espaço Plural, campus Juazeiro da Univasf por um cirurgião dentista, habilitado para tal atividade. Foram coletados de cada participante voluntário 60mL de sangue distribuídos em seis (06) tubos de ensaio de plástico com capacidade para 10mL cada, todos foram identificados individualmente por códigos e centrifugados neste mesmo ambiente.

A amostra foi distribuída em três grupos como pode ser visto no organograma (Figura 01) a seguir:

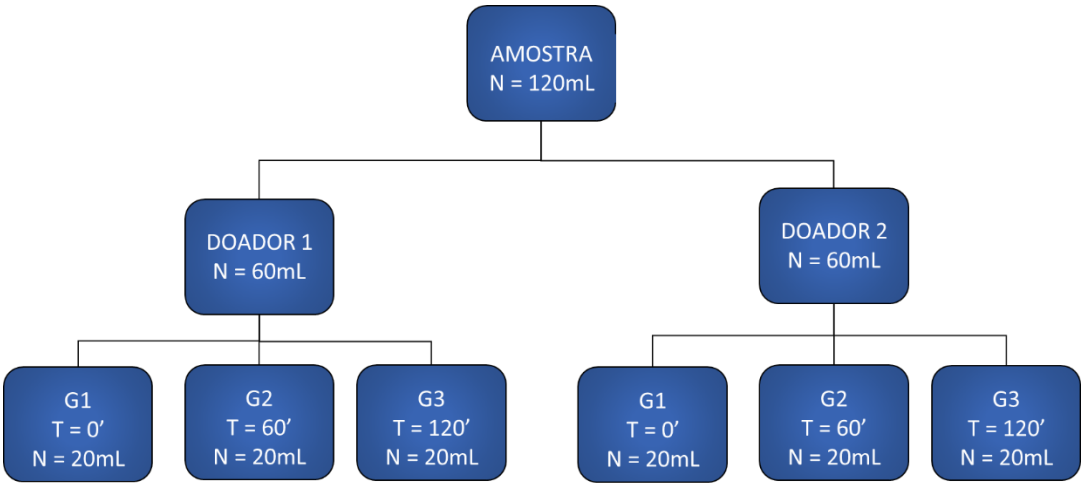

Figura 01 – Distribuição da amostra segundo os tempos de estudo, sendo que cada 10mL estão acondicionados em um tubo de plástico com identificação codificada. **Fonte:** própria autoria, 2018.

4.2.1.1 Critérios de Inclusão

Os voluntários que foram incluídos nesta pesquisa não poderiam ser fumantes, deveriam estar com a pele integra no local da punção e sem descamações ou lesões aparentes; sem histórico de uso, de Aspirina e/ou qualquer outra medicação que pudessem interferir na coagulação, nas últimas duas semanas que antecedessem a venopunção para o experimento;

4.2.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos da pesquisa os voluntários que apresentaram doenças sistêmicas tais como: diabetes não-controlada, doenças autoimunes, doenças infectocontagiosas, imunodeficiência, insuficiência renal e hepática; histórico de doação sanguínea e/ou hemotransfusão nos últimos dois meses, voos ou

mergulhos nas últimas vinte e quatro horas e que não aceitassem assinar o TCLE voluntariamente.

4.3 Coleta Sanguínea

A coleta sanguínea de cada voluntário participante da pesquisa foi realizada por Cirurgião-Dentista, devidamente respaldado para a prática de tal atividade pela resolução 158/2015 do Conselho Federal de Odontologia (CFO).

Após conferir o material para realização da coleta, comprovando que os mesmos estivessem inviolados e estéreis, prosseguiu-se a coleta. O doador voluntário foi acomodado em posição sentada e confortável; orientado para a retirada de acessórios como pulseiras e relógio do membro superior; em seguida foi apoiado o membro superior no suporte apropriado e expondo a fossa antecubital. Foi realizado garroteamento com dispositivo elástico na porção média do braço e manualmente foram realizados movimentos ascendentes suaves na face anterior do antebraço para melhor ingurgitamento dos vasos sanguíneos. O flebotomista realizou a assepsia de suas mãos com solução de clorexidine degermante a 2% e após calçar as luvas de procedimento iniciou assepsia prévia do local da punção com tecido de TNT embebido em álcool isopropílico 70%. A venopunção foi realizada na veia cefálica após confirmação visual, utilizando Escalpe Safety-Lok ™ 21 G/ 7" (BD Vacutainer®) de uso descartável, com o bisel da agulha voltado para cima e angulação de 15º a 30º em movimento único, podendo ser confirmado o posicionamento intravascular da agulha através da visualização do retorno venoso dentro do escalpe. Foram coletados seis (06) tubos (BD Vacutainer® Vermelho Seco 10ml de plástico com ativador de coágulo jateado nas paredes Ref 367820 – NJ - USA) de cada doador, o equivalente a 60mL de cada, de modo que cada tubo foi introduzido dentro do adaptador que foi posicionado na ponta oposta do escalpe. O garroteamento foi removido após a coleta do primeiro tubo. Após a coleta do último tubo, foi removido o escalpe e realizado compressão no local da punção com gaze estéril por três minutos; sendo o voluntário orientado a não realizar a

flexão do braço e nem carregar peso no lado do braço puncionado, momentaneamente. O escalpe foi descartado de maneira segura obedecendo a orientação do fabricante quanto ao uso e depositado em coletor para material perfurocortante. Confirmando-se a hemostasia, foi realizado curativo local adesivado e feita a orientação a não realizar esforço intenso nas próximas duas horas.

4.4 Centrifugação

As amostras colhidas foram imediatamente centrifugadas durante dez minutos a 1750 RPM (aproximadamente 200*g / FCR*), em uma centrífuga de mesa modelo 80-2B com rotor fixo de 45º (Centribio® -China), tendo como limite de tempo de dois minutos entre a coleta e o início da centrifugação calculadas de acordo com a equação [RCF (Força Centrífuga Relativa) ou Força G = 1,12 x R x $(RPM/1000)^2$].

Os tubos foram previamente numerados, sendo para o Doador 1 tubos de 1 a 6 e para o Doador 2 tubos de 7 a 12. Após a centrifugação dos tubos de números 1 a 6 permaneceram em repouso no interior da centrífuga, após a centrifugação por diferentes intervalos de tempos, como descrito a seguir: Grupo 1 (G1) foi retirado da centrífuga imediatamente após a centrifugação; Grupo 2 (G2) permaneceu dentro da centrífuga por sessenta (60) minutos e o Grupo 3 (G3) ficou acondicionado por cento e vinte (120) minutos (Quadro 01); após o tempo pré-determinado os tubos retirados da centrífuga eram manuseados para a realização da remoção do coágulo a ser estudado.

Os coágulos removidos compreendiam a malha de L-PRF e foram removidos de cada tubo de ensaio com auxílio da pinça Dietrich, separados do coágulo de hemácias com uma tesoura Goldman Fox e imediatamente colocados em um tubo tipo *Eppendorf* com capacidade para 50mL, preenchido com 45mL de solução de formaldeído tamponado a 10% (v/v); em seguida foram mantidos sob temperatura ambiente de 20ºC, em local seco e protegido da luz por 72 horas para posterior marcação celular e análise histopatológica. O mesmo processo foi realizado com as amostras coletadas do Doador 2.

	0 MINUTOS	*60 MINUTOS*	*120 MINUTOS*
DOADOR #1	1-2	3-4	5-6
DOADOR #2	7-8	9-10	11-12
	G1	**G2**	**G3**

Quadro 01 – Apresentando o esquema de distribuição das amostras coletadas dos respectivos doadores e a relação da amostra com o tempo estudado. Fonte: autoria própria, 2018.

4.5 Processamento

Os tubos *Eppendorf* foram lacrados e acondicionados em caixa rígida preenchendo-se os espaços vazios com plástico tipo bolha e enviados via transportadora ao Laboratório APC Apoio em Patologia Cirúrgica (São Paulo/SP) para a realização do processamento e análise imuno-histoquímica. O tempo de transportamento foi de três dias.

Chegando ao laboratório, os tubos foram avaliados quanto a integridade dos mesmos (Figura 2), avaliou-se possíveis vazamentos e as peças foram avaliadas macroscopicamente para averiguar possíveis danos. Constatou-se que não houve nenhum dano durante o transporte e foi iniciado o processamento dos mesmos.

Figura 2: Imagem demonstrando a integridade da peça formolizada no laboratório onde foi realizada a análise imuno-histoquímica. FONTE: própria autoria, 2018.

4.5.1 Análise Imuno-histoquímica

Em cada espécime foram feitas 4 passagens em álcool absoluto (1 hora em cada) trocando se o álcool por completo a cada passagem (Desidratação) e feitas 2 passagens em xilol, 30 minutos cada passagem (Diafanizacao). Para a fixação do espécime, foram feitas duas passagens em parafina líquida com temperatura máxima de 70ºC de 01 hora cada. Os blocos foram colocados no freezer a -20ºC, após o seu resfriamento, foram feitos cortes de 2 a 5 micras em micrótomo manual (Micrótomo Leica RM 2125 RTS -Nussloch – Germany). Foram produzidos 3 cortes (triplicata) longitudinais e centrais de cada espécime, produzindo ao final 36 lâminas. Os cortes foram colocados em banho maria a aproximadamente 65º C e pescados nas lâminas silanizadas (Dako – CA – USA) já identificadas com designação interna. As lâminas foram colocadas em penais de madeira em pé, levadas a estufa (MEDCLAVE ES 200 – SP BR) a 80-90º C por 120 minutos. Logo em seguida são retiradas da estufa e colocadas para esfriar. As lâminas são colocadas em berços de coloração para serem distribuídas nos tanques do módulo de pré-tratamento com água deionizada para desparafinização, reidratação e recuperação de epítopos (PT Link – Dako – CA - USA) com a solução de recuperação antigênica (EnVision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION LOW pH (50x) – Dako – CA -USA) de pH baixo a temperatura de 97ºC por 40 minutos. Após esta etapa, foram abertas as tampas do PT Link, retirados os carrinhos, lavados quatro vezes com solução tampão (EnVision Flex Wash Buffer 20x -Dako – CA - USA) e deixados nas cubas em repouso. Em seguida foram retiradas as lâminas dos carrinhos uma a uma em ordem, secadas nos arredores dos fragmentos com campos cirúrgicos tomando o devido cuidado para não danificar o fragmento e feito um círculo com caneta hidrofóbica ao redor do fragmento delimitando-o e distribuindo as lâminas lado-a-lado em caixa acrílica. Foi preenchido toda a área delimitada com peróxido (EnVision Flex Peroxidade-Blocking Reagent – Dako – CA - USA), a caixa foi fechada e deixada em repouso por 10 minutos em repouso. Ainda nesta caixa, as lâminas foram lavadas com solução tampão e colocadas em uma caixa seca e fechada. As caixas foram abertas, retirados o excesso de solução com um jato leve de ar sobre as lâminas.

A incubação do anticorpo primário (Anti Fibronectin –Policlonal de Coelho cód. ORB156875 – lot. E10525 - Biorbyt – CA – USA) foi realizada diluindo-se o anticorpo primário com diluente DAKO com titulação 1:300. Foram colocadas as lâminas dentro de uma caixa acrílica, utilizando pipeta automática, foi pingado 100µl do anticorpo primário em cima do corte, incubando por 35 minutos em temperatura ambiente.

Lavou-se novamente as lâminas nas caixas acrílicas com solução tampão e colocou-se em uma caixa seca, onde foi retirado a solução tampão com um jato leve de ar sobre as lâminas. Foi instilado 100µL Linker Rabbit (EnVision Flex Rabbit – CA – USA) sobre o corte e incubado por aproximadamente 20 minutos, lavado com solução tampão, colocados em uma caixa seca, retirou-se o excesso da solução tampão com um jato leve de ar sobre as lâminas. Pipetou-se o polímero (EnVision Flex/ HRP – Dako- CA -USA) e deixado para incubação por aproximadamente 25 minutos. Lavou-se novamente as lâminas nas caixas acrílicas com solução tampão e colocou-se em uma caixa seca, onde foi retirado a solução tampão com um jato leve de ar sobre as lâminas. Pipetou-se cromógeno (EnVision Flex DAB+Chromogen, diluído em EnVision Flex Substrate Buffer – Dako – CA - USA) e deixado em reação por 7 minutos. Logo após lavou-se as lâminas com água corrente e as mesmas colocadas em berços. Os berços foram imergidos em hematoxilina (Hematoxilina de Harris - QEEL - Química Especializada Erich Ltda – SP – BR) por 8 segundos e lavados em seguida sob água corrente por 2 minutos. Passou-se os berços por 4 banhos de álcool, cada um por cerca de 15 segundos. Finalizou-se com 10 banhos em xilol, cada um por cerca de 15 segundos. Os berços foram colocados na máquina de montagem de lâminas (Dako Glycergel Mounting Medium – CA – USA).

4.5.2 Microscopia

Foi utilizado um microscópio trinocular Lx 500 acoplado a um sistema de câmera iVu 5000 (Labo America Inc., CA – USA) auxiliado por um software de captura de imagens (ProRes® CapturePro versão 2.9.0.1) que após a calibração utilizando uma Câmara de Neubauer (hemocitômetro) (Global Optics, Dorset –

UK) para a correta proporção de escalas, e realizado o balanço de branco utilizando a própria ferramenta do aplicativo, as lâminas foram submetidas a análise por dois avaliadores experientes, duplo-cegos, onde foram realizadas a varredura em cada uma das lâminas sob os aumentos de 10x, 20x e 40x respectivamente e redigidas anotações discricionais sobre os aspectos histomorfológicos. Ao fim da observação de cada lâmina, foram realizadas quatro fotomicrografias em aumento de 100x posicionadas e distribuídas de maneira uniforme na região do pelet leucoplaquetário. Cada fotomicrografia foi delimitada com o auxílio do software por um círculo possuindo um raio de (20 ±1 µm). Os avaliadores realizaram a contagem das células leucocitárias marcadas positivamente (coloração acastanhada) e contagem das células leucocitárias não-marcadas (coloração azul-arroxeada) com o auxílio do software ImageJ (versão 1.44p, National Institute of Health – USA). Não foram contabilizadas as células que não estivessem totalmente inseridas na demarcação.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram coletados e calculados conforme descrição anterior. Em seguida, foram codificados e transferidos para um banco de dados no *Microsoft Excel* (versão 365), onde foram tabulados. Parte das análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software *Programa Statistical Package for Social Science versão 19.0.0 (SPSS 19.0.0)* para Windows.

A caracterização geral dos resultados foi realizada por análise descritiva das variáveis, por meio de dados absolutos e relativos, medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão ou erro padrão), conforme indicado nas legendas dos gráficos.

Inicialmente, foram calculadas a média dos 4 *trials* de coleta do estudo para cada lâmina tanto para o número de células “Não Marcadas” como para número de células “Marcadas”. Posteriormente calculados o porcentual para cada tipo de célula em relação ao total dos tipos de células (Não Marcadas +

Marcadas), assim obtivemos ‘Porcentagem de células Não Marcadas’ e ‘Porcentagem de células Marcadas’.

Comparativos entre os efeitos de Grupo de tempo (0 min x 60 min x 120 min) e os doadores quanto ao **Percentual de Marcadas** e **Percentual de Não Marcadas** foram realizados. Para os comparativos entre os tempos foram utilizados testes não-paramétricos de Kruskall-Wallis, com comparações múltiplas de Tukey 2 a 2 para identificar onde estão as diferenças. Para os comparativos entre os grupos foram utilizados testes de Mann-whitney.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análise e Descrição das Características Macroscópicas e Morfométricas da Malha de L-PRF

5.1.1 Macroscopia

Macroscopicamente observamos no tubo a formação de três fases. Um sobrenadante de cor amarelo-claro na parte superior que se trata do plasma pobre em plaquetas. Na região intermediária, apresenta-se o coágulo de fibrina com consistência densa e elástica e de cor amarelada, medindo aproximadamente 2,5cM (Figura 3). Na parte inferior do tubo está presente o tampão ou coágulo de hemácias, fração esta que foi descartada em nosso estudo. (Figura 4)

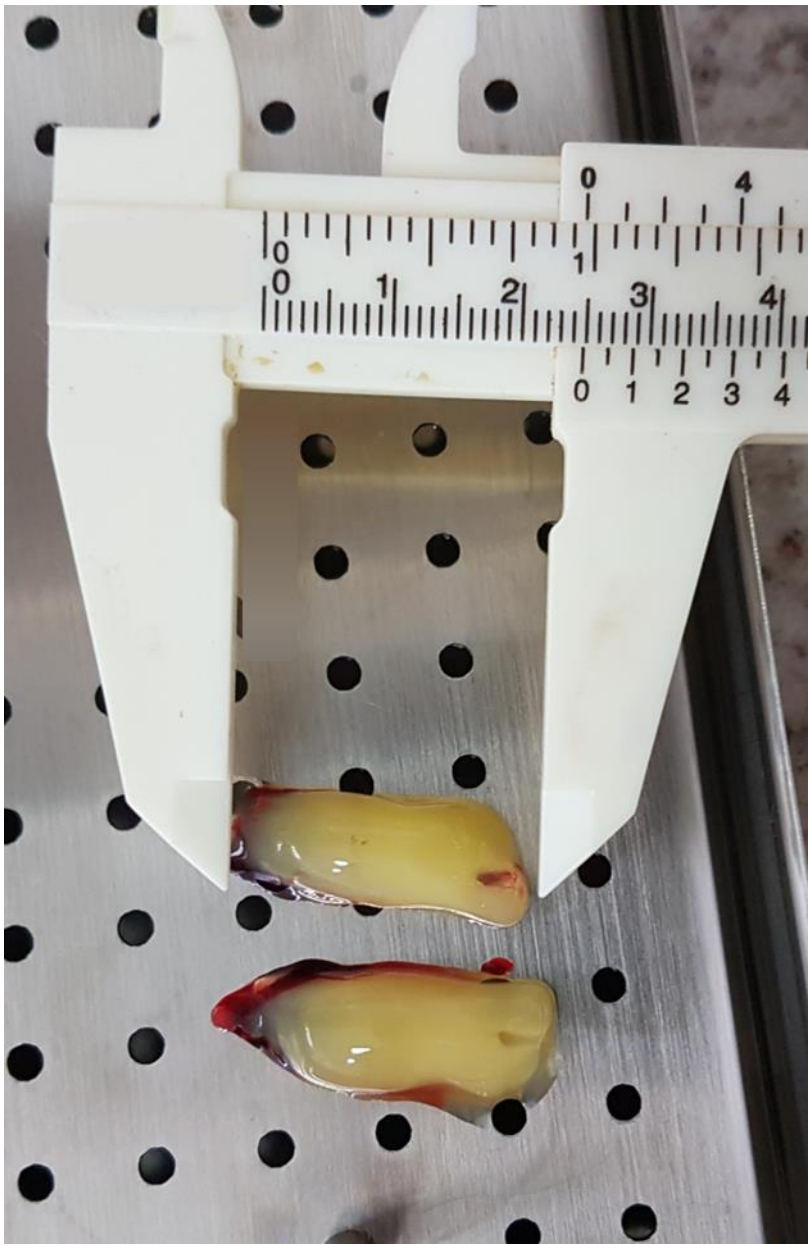

Figura 3: Comprimento do *plug* de fibrina. Nota: após a remoção dos tubos os coágulos são geralmente manipulados sobre uma caixa inox perfurada que auxilia na prática clínica e permite alterar as formas dos coágulos de fibrina, fazendo com que por exemplo, possam sem modelados em forma de membranas, pequenos êmbolos ou possam sem picotados para ser usados com outros biomateriais. FONTE: própria autoria, 2018.

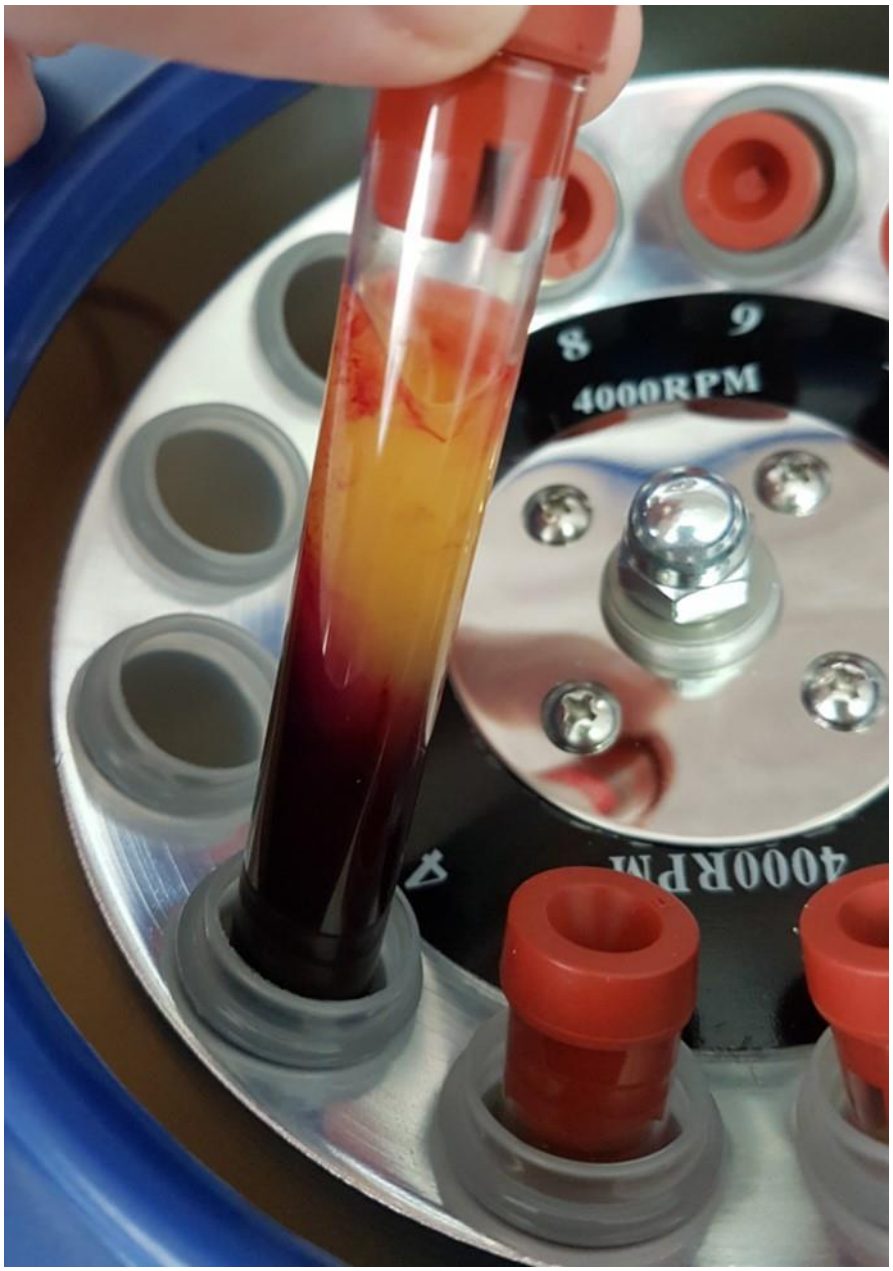

Figura 4: Logo após a centrifugação é possível ver as três camadas compostas pelo sobrenadante ou plasma pobre em plaquetas, o coágulo de fibrina rica em plaquetas e leucócitos e o tampão ou coágulo de hemácias. FONTE: própria autoria, 2018.

Ainda foi possível notar no tubo a presença do *pellet*[1] leucoplaquetário, região rica em células capazes de secretar uma gama de fatores de crescimento, sendo uma região de interesse em seu uso clínico, devendo-se ser preservada no momento da separação do tampão de hemácias. (Figura 5)

[1] Termo em inglês que significa "pequena pedaço redondo; espécie de matéria comprimida em forma de disco. Dicionário Collins da Língua Inglesa.

Figura 5: Tubo ao ser removido da centrífuga após 60 minutos, apresentando o *plug* fibrinoso separado do tampão de hemácias. É possível ver o *pellet* leucoplaquetário (seta vermelha) e sua distribuição ao longo de parte da parede do tubo (setas pretas), região rica em células capazes de produzir fatores de crescimento dentre outros mediadores. FONTE: própria autoria, 2018.

As ligações equilaterais obtidas através de uma polimerização lenta e natural, determinantes na arquitetura tridimensional da malha de fibrina, proporcionam um biomaterial flexível, elástico e extremamente resistente, características que fazem com que seu emprego na cobertura e auxílio no reparo de feridas seja feito em diversas áreas da saúde.

5.1.2 Microscopia

Na análise microscópica a L-PRF mostra-se com formato elipsoide em seu conjunto, apresenta uma base rica em células leucocitárias e plaquetárias permeada por uma matriz extracelular densa e algumas estrias esbranquiçadas, distribuída ao longo da intersecção entre esta região e a porção intermediária

(Figura 6) constituída de uma malha de fibrina com presença de plaquetas distribuídas de forma levemente maior na região central e discretamente menor na região apical.(Figura 7)

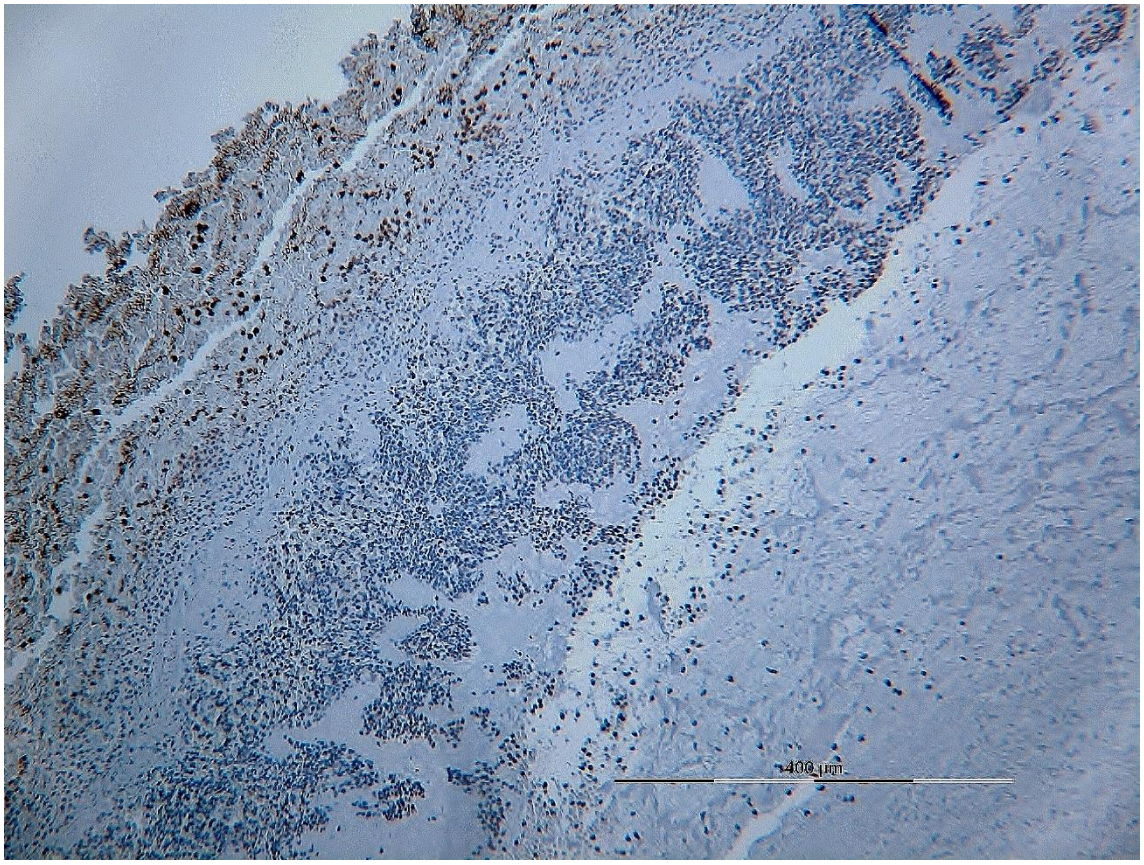

Figura 6: Fotomicrografia em aumento de 10x mostrando a zona intermediária entre a porção basal rica em células e a porção intermediária composta pela malha de fibrina e permeado de plaquetas. FONTE: própria autoria, 2018.

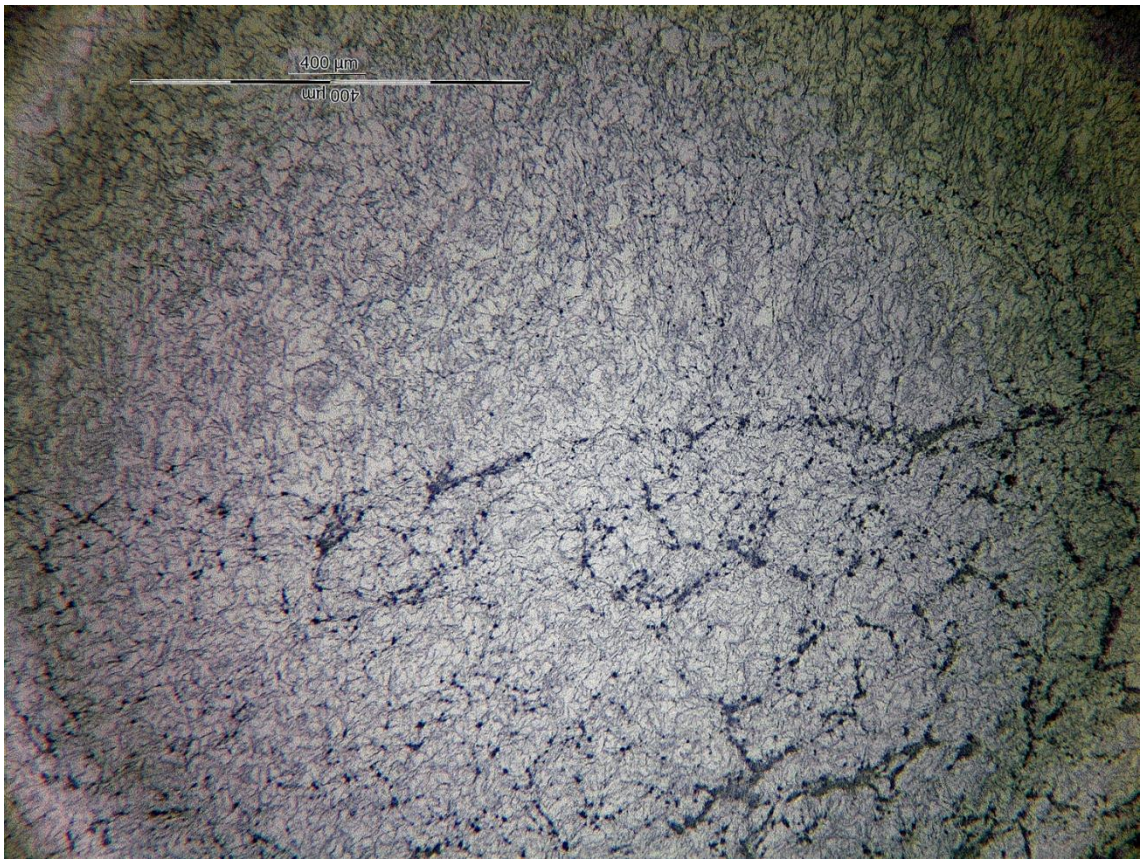

Figura 7: Fotomicrografia com aumento de 10x pertencente ao grupo 3 mostrando um caráter mais celular em sua região inferior, correspondente a posição mais próxima ao *pelet* leucoplaquetário. FONTE: própria autoria, 2018.

Os α-Grânulos contém uma série de proteínas plaqueta específicas (β-tromboglobulina) e não-plaqueta específicas como a fibronectina. Neste estudo não foi possível sua identificação no grupo 1, porém é possível observar não raramente nos grupos 2 e 3 a presença destes grânulos distribuídos na região de maior concentração leucoplaquetária. São fortemente marcados na reação de imuno-histoquímica para fibronectina e são encontrados no meio intra e extracelular (Figura 8).

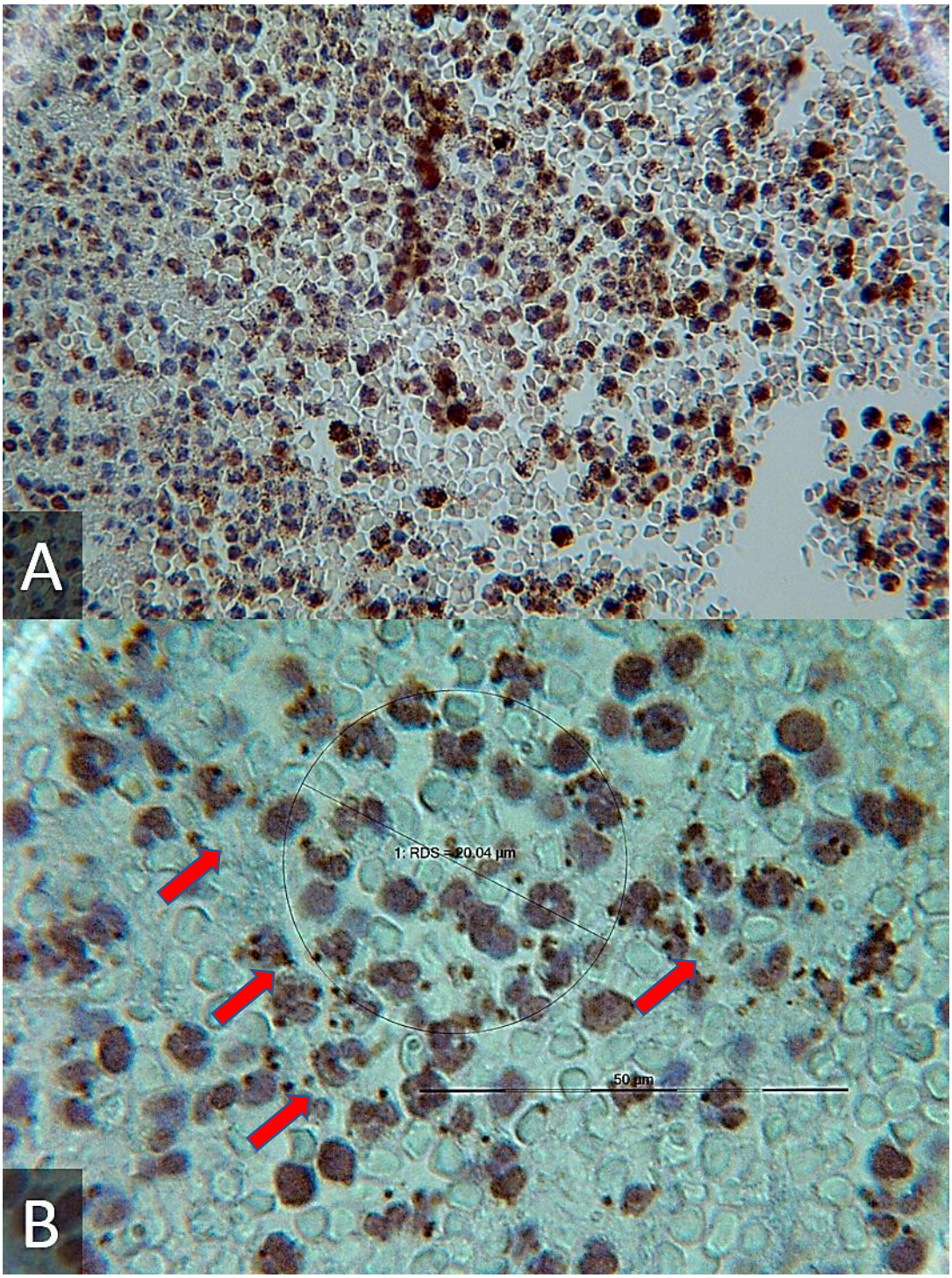

Figura 8: Fotomicrografia com aumento de 40x (A) e 100x (B) mostrando a presença de α-grânulos distribuídos junto aos leucócitos dentro da L-PRF no grupo 2 (60 minutos). FONTE: própria autoria, 2018.

Na região central da malha de fibrina, observa-se uma maior densidade nos grupos 2 e 3, depondo a favor de um entendimento onde um maior tempo

de espera dos tubos após a centrifugação permite que haja uma maior organização da trama fibrino-fibrilar (Figura 9).

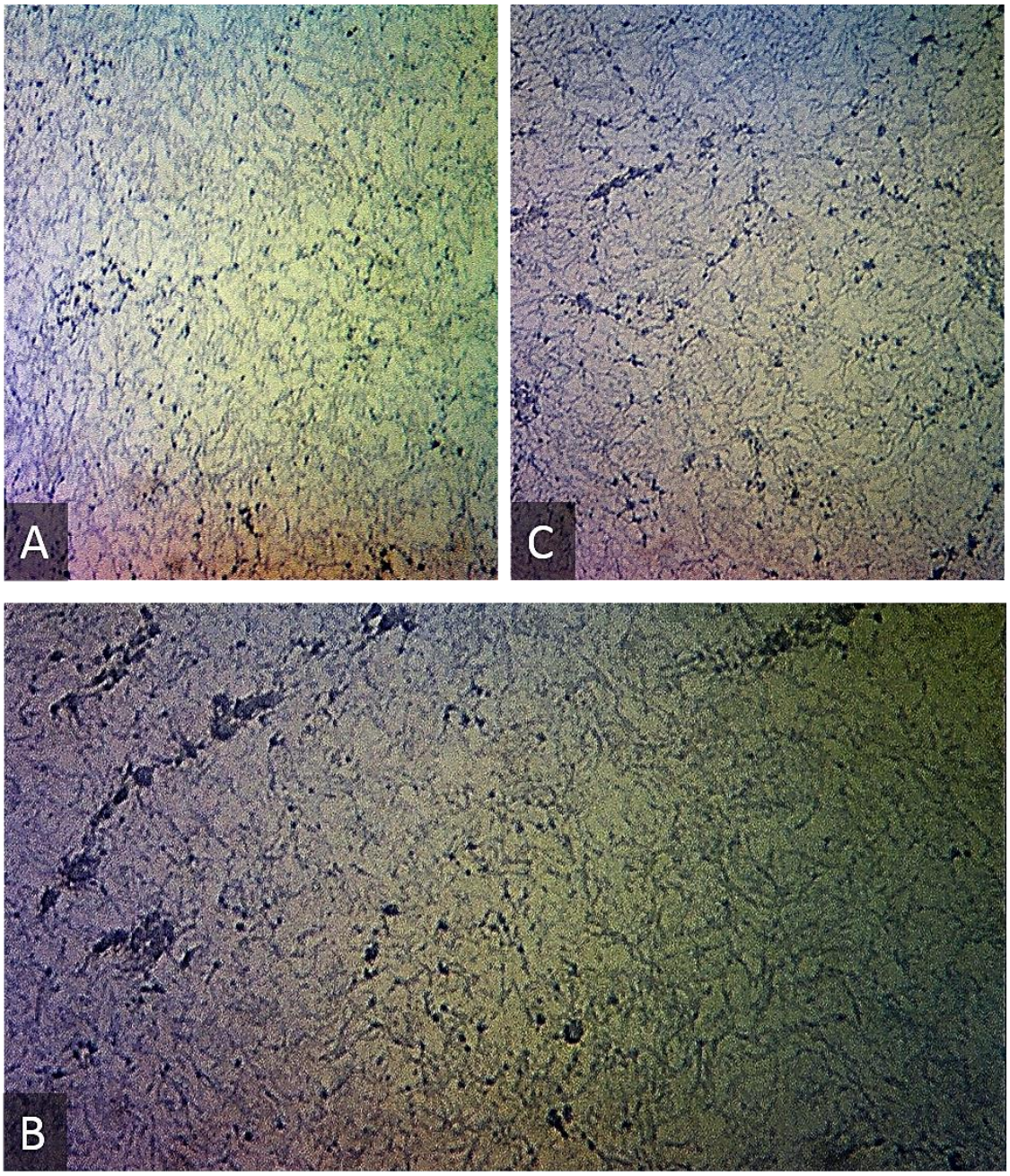

Figura 9: Fotomicrografia com aumento de 10x dos Grupos 1 (A), 2 (B) e 3(C). Na região central do grupo 1 observa-se uma maior presença de espaço em brancos, sugerindo uma menor densidade neste local. FONTE: própria autoria, 2018.

5.2 Avaliação, Mensuração e Registro Fotográfico das Marcações por Imuno-histoquímica das Moléculas de Fibronectina nos Diferentes Tempos de Repouso da Malha após a Centrifugação

As trinta e seis (36) lâminas obtidas foram randomizadas e avaliadas às cegas[2] por um examinador experiente. Foram realizadas as contagens das células contidas totalmente dentro da demarcação proposta na metodologia com um círculo de raio 20 ±1 µm marcadas positivamente e não-marcadas (Figura 10). Os dados foram tabulados e posteriormente processados para análise estatística.

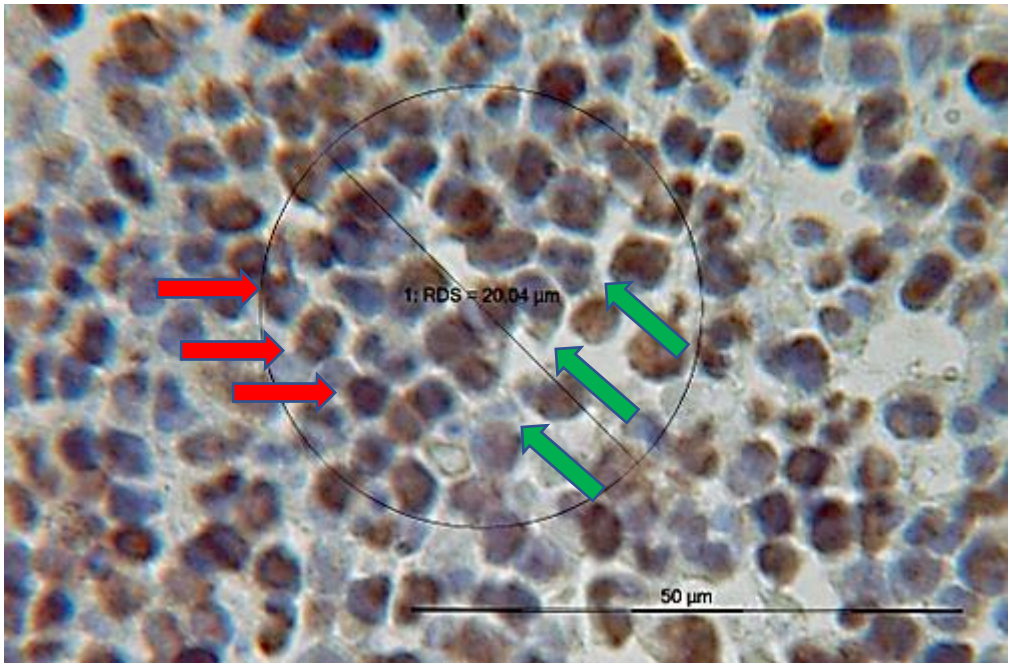

Figura 10: Fotomicrografia com aumento de 100x (Grupo 1), mostrando a presença de células marcadas para a glicoproteína fibronectina (setas verdes) e células não-marcadas (setas vermelhas). FONTE: própria autoria, 2018.

A tabela 2 apresenta o comparativo de células marcadas para a glicoproteína fibronectina durante a contagem utilizando fotomicrografias das lâminas com aumento de 100x entre os tempos de G1 x G2 x G3 e os doadores quanto a percentual de células marcadas, apresentando a média, mediana e

[2] Sem prévio conhecimento do grupo ao qual a amostra fazia parte.

desvio-padrão. O doador 1 (D1) apresentou uma diferença estatisticamente significante entre os tempos 0 minutos e 120 minutos, enquanto não houve diferença na comparação dos demais tempos. O doador 2 (D2) apresentou uma diferença na contagem de células marcadas entre os três grupos, sendo progressivamente maior a contagem de células dentre estes do ponto de vista estatístico. Ainda na tabela 1, a comparação entre o número de células marcadas entre D1 e D2 demonstrou resultados semelhantes no G1 e G2, entretanto no G3 o D2 apresentou um número maior comparado ao D1.

Tabela 2: Apresentação do percentual da contagem de **células marcadas** utilizando a fotomicrografia com aumento de 100x no comparativo entre os grupos G1 x G2 x G3 e entre os doadores D1 e D2.

Doador		Grupo 0 min	Grupo 60 min	Grupo 120 min	Teste de Kruskall-Wallis (p)	Comparações múltiplas (p)	Resultado
1	Média	47,2	60,9	67,8		(0 x 60) (p)=0,063	
	Mediana	41,9	58,8	69,2	0,038*	(0 x 120)(p)=0,006*	(0 < 60 = 120)
	Desvio-padrão	13,1	6,3	8,0		(60 x 120)(p)=0,453	
	n	6	6	6			
2	Média	53,4	68,5	79,8		(0 x 60) (p)<0,001*	
	Mediana	54,4	68,8	80,5	0,001*	(0 x 120)(p)<0,001*	(0 < 60 < 120)
	Desvio-padrão	3,8	5,2	3,0		(60x120)(p)=0,001*	
	n	6	5	6			
Teste de Mann-Whitney (p)		0,310	0,052	0,004*			
Resultado		D1=D2	D1=D2	D1<D2			

FONTE: própria autoria, 2018.

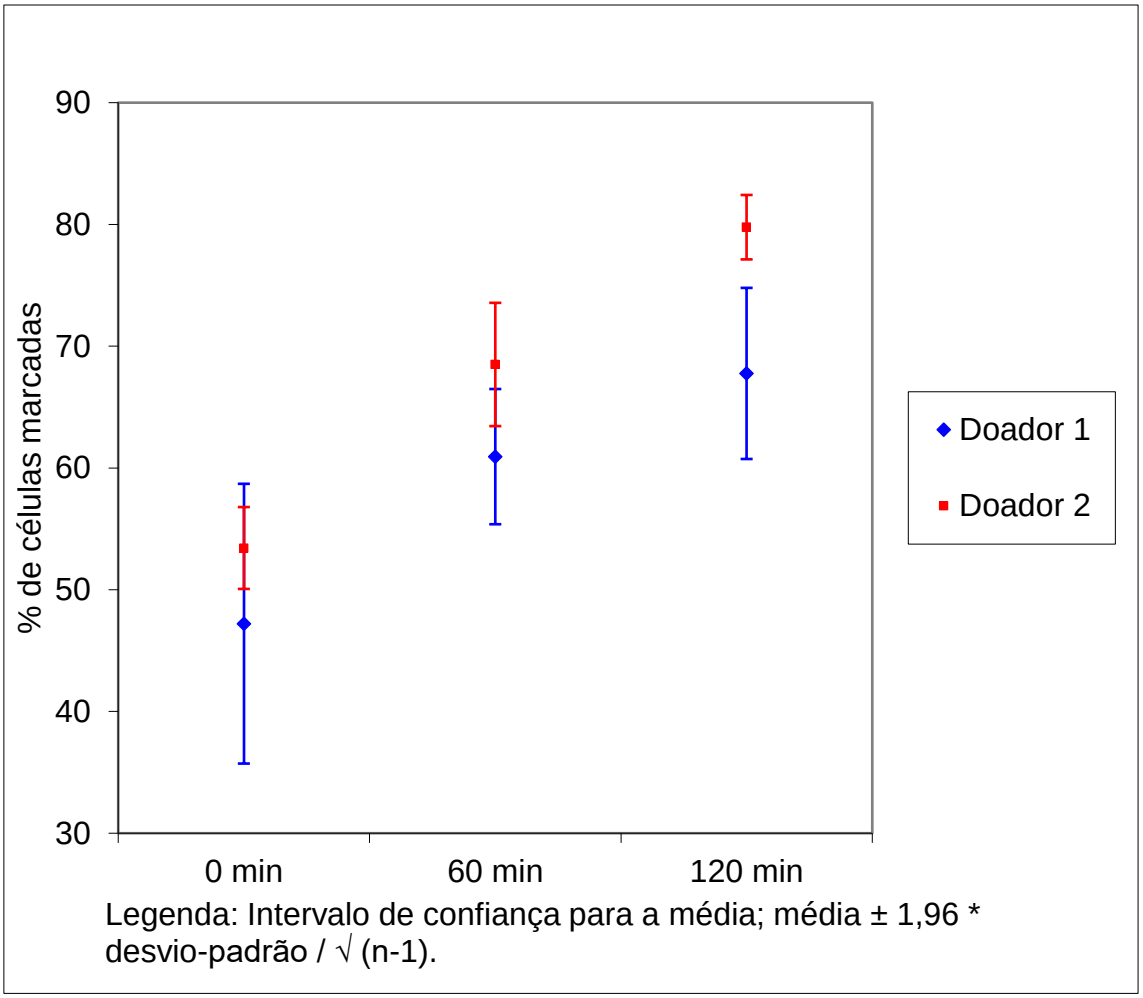

Figura 11: Gráfico de linha com marcadores descritivos visualizando a diferença na contagem de células nos diferentes tempos (G1 x G2 x G3) para ambos doadores. FONTE: própria autoria, 2018.

5.3 Estudo e Descrição das Correlações Clínico-Laboratoriais da L-PRF Obtida nos Diferentes Tempos

A densa malha de fibrina contendo grande número de plaquetas distribuídas em sua extensão, servindo de arcabouço para a migração de células participantes da cadeia de inflamação, associada a um *pellet* extremamente celularizado, capaz de prover sinais moduladores como fatores de crescimento para indução e aceleração das etapas reparadoras teciduais, formam um biomaterial autólogo com excelentes características bioquímicas e biofísicas (Figura 12).

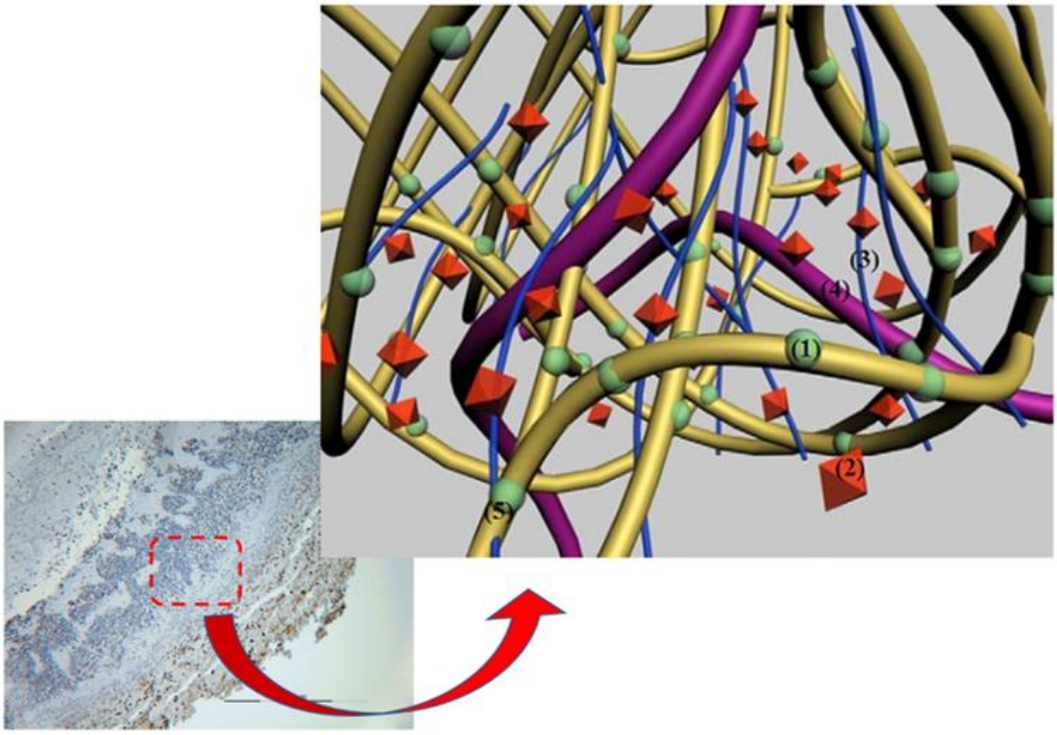

Figura 12: Fotomicrografia de um corte histológico de L-PRF associado a uma modelagem computadorizada demonstrando a presença de glicoproteínas estruturais (fibronectina) e citocinas extrínsecas embebidas em uma matriz de fibrina. Nota-se a arquitetura estrutural das ligações equivalentes formadas através de uma polimerização lenta, gradativa e natural, transformando em uma estrutura com maior resistência que o PRP, a exemplo. (1) Citocinas retidas intrisicamente na rede fibrino-fibrilas; (2) Citocinas plaquetárias em solução (extrinsecamente associado com polímeros de fibrina); (3) Cadeiras glicanas associadas a fibrina; (4) Fibronectina circulante; (5) Fibrina associadas com cadeiras glicanas e citocinas intrínsecas. FONTE: Adaptado de (Dohan *et al.*, 2006b).

O sobrenadante composto por um plasma pobre em plaquetas não é incorporado a matriz de fibrina. As células vermelhas que pouco seriam úteis no processo de reparo tecidual também são desprezadas na utilização do emprego da L-PRF. Com isso os resultados obtidos microscopicamente fortificam a teoria que sustenta o uso da L-PRF na prática clínica, além de ser sugestivo o posicionamento da extremidade contendo o *pelet* leucoplaquetário na área de maior relevância durante sua aplicabilidade clínico-cirúrgica (Figura 13).

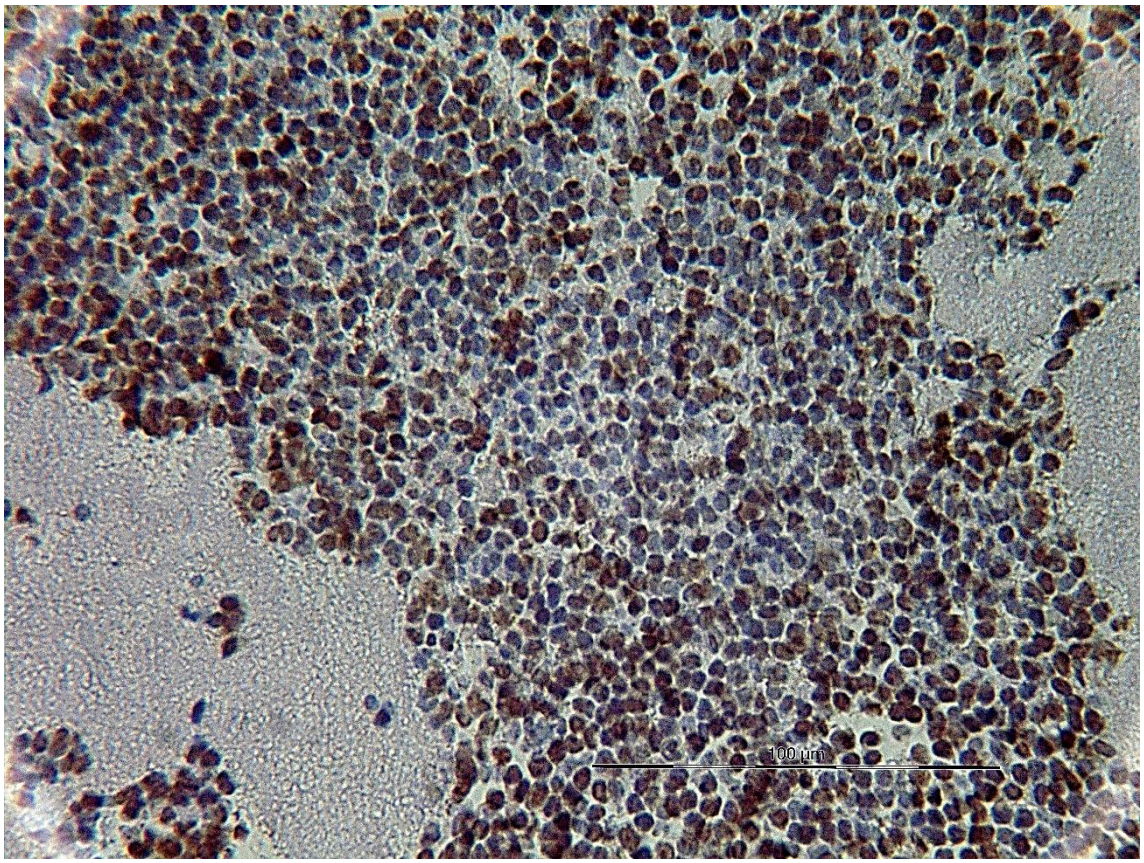

Figura 13: Fotomicrografia com aumento de 10x em um corte histológico do grupo 3 demonstrando além da grande quantidade de leucócitos e plaquetas no local, uma alta taxa de marcação celular positiva para fibronectina. FONTE: própria autoria, 2018.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Avanços no entendimento de biomateriais com capacidade regenerativa e as funções que estes desempenham na formação de novos tecidos abrem fronteiras para o desenvolvimento de estudos com células-tronco (SOUZA *ET AL.*, 2018), matrizes extracelulares e formulações enriquecidas com fatores de crescimento endógeno(CASAGRANDE *ET AL.*, 2009; CHEN E LIU, 2016) A exemplo deste último, podemos citar a L-PRF, apresenta alguns fatores citados por (DOHAN EHRENFEST, RASMUSSON*, ET AL.*, 2009) que facilitam a reprodutibilidade da técnica: o uso de centrífugas compactas, duração do procedimento, baixo custo comparado a outros concentrados plaquetários, técnica simples, bom volume final de matriz fibrinosa comparado ao volume inicial de volume sanguíneo coletado (maior que 25%), eficiência na captação de plaquetas e leucócitos para a matriz (maior que 80%), preservação de forma saudável do componente leucoplaquetário, alta densidade da rede de fibrina e alta concentração de fibrinogênio, além de obter-se um tipo de polimerização de ligações resistentes (trimolecular).

A FCR e o tempo de centrifugação são elementos chaves que podem modificar a estrutura e composição celular da L-PRF. Os primeiros protocolos utilizavam forças que variavam entre 60G a 966G e tempos de centrifugação que alcançavam até 14 minutos (DOHAN *ET AL.*, 2006B; GHANAATI *ET AL.*, 2014; MIRON *ET AL.*, 2017). No presente estudo foi utilizada uma força de 200G embasado em estudos recentes (EL BAGDADI *ET AL.*, 2017; WEND *ET AL.*, 2017; CHOUKROUN E GHANAATI, 2018; KUBESCH *ET AL.*, 2018) que demonstraram um aumento significativo de células inflamatórias, plaquetas e maior liberação de fatores de crescimento.

Quando observamos através da microscopia o nível de organização do coágulo, a distribuição celular supra-fisiológica, o potencial de um produto capaz de agregar um *scaffold*[3] a permitir um meio para a propagação celular e um

[3] Termo vastamente utilizado na literatura de língua inglesa que significa “estrutura semelhante a um andaime que serve de plataforma temporária na qual trabalhadores podem construir ou reparar partes altas de edifício. Dicionário Collins da Língua Inglesa.

centro (*pellet* leucoplaquetário) produtor de mediadores e fatores de crescimento já discutido na literatura (DOHAN EHRENFEST, DE PEPPO*, ET AL.*, 2009), sugerindo ser uma vantagem biológica quando comparamos ao uso de outros agregados plaquetários (DOHAN E CHOUKROUN, 2007; DOHAN EHRENFEST *ET AL.*, 2010). Em 2009, (DOHAN EHRENFEST, RASMUSSON*, ET AL.*, 2009) cita que o PRP contém uma malha de fibrina imatura consistindo principalmente em fibrilas com diâmetros reduzidos, o que faz com que este agregado possa ser utilizado durante procedimentos cirúrgicos, porém com dissolução muito rápida, semelhante a cola de fibrina, não permitindo tempo suficiente para migração celular para o *scaffold* criado.

A liberação de mediadores quimiotáxicos foram estudados por diversos autores (DOHAN EHRENFEST, DE PEPPO*, ET AL.*, 2009; NISHIMOTO *ET AL.*, 2015; HONG *ET AL.*, 2018) que demonstraram o potencial das membranas de L-PRF em desempenhar papel fundamental no reparo tecidual, induzindo a migração celular, controle do processo inflamatório e até mesmo na imunomodulação (DOHAN *ET AL.*, 2006C). Nesse aspecto, foi possível demonstrar neste estudo que a liberação de α-grânulos, ricos em proteínas como a fibronectina, após curtos períodos de tempo (120 minutos) antes da manipulação dos coágulos e utilização no leito cirúrgico pode acelerar o processo de liberação de mediadores, com isso o profissional pode programar o início da coleta sanguínea de acordo com a perspectiva de tempo necessário para a aplicação clinico-cirúrgica no paciente. São necessários estudos clínicos para comprovação da hipótese.

A importância dos α-grânulos presentes nas fotomicrografias apresentadas nos resultados é baseada em trabalhos científicos (DIGIOVANNI E PETRICEK, 2010) e apontam que fatores de crescimento como o PDGF são liberados por estes grânulos nas fases precoces do reparo tecidual tendo um potencial para o recrutamento de várias outras células como fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas e osteoblastos.

Segundo (DOHAN *ET AL.*, 2006C) demonstrando a função das citocinas (ex: interleucinas) e o papel no controle da inflamação, além do poder de angiogênese atribuído principalmente aos altos índices de VEGF, pode-se

considerar a L-PRF como participante na reação imunológica capaz de estimular mecanismos de defesa. A presença dos α-grânulos encontrados nos cortes histológicos do presente trabalho vem ao encontro destes achados e sugere que a permanência de 120 minutos de repouso dos tubos após a centrifugação possa trazer benefícios na aplicabilidade, necessitando tal afirmação de estudos clínicos para comprovação da teoria.

Diversos autores têm demonstrado a importância clínica no uso da L-PRF com trabalhos de revisões sistemáticas e meta-análises (SHAH *ET AL.*, 2014; ALI *ET AL.*, 2015; OZGUL *ET AL.*, 2015; AL-HAMED *ET AL.*, 2017; ALZAHRANI *ET AL.*, 2017) apresentando resultados animadores, onde aplicaram protocolos semelhantes de centrifugação e processamento. A avaliação da permanência mínima dos tubos em repouso após o fim da centrifugação pode contribuir com melhoria no emprego da L-PRF visto acreditar-se numa melhor organização da malha de fibrina e melhor liberação de mediadores quimiotáxicos como pode ser observado nos cortes histológicos dos grupos 2 e 3.

O papel da fibronectina no auxílio a propagação de outras células foi confirmado pelos autores (MIRON-MENDOZA *ET AL.*, 2017) onde em seu experimento foi adicionado um anticorpo (HFN 7.1) que se liga à fibronectina e impede a adesão celular, onde desta forma as células que apresentaram esse anticorpo não se propagaram na matriz de fibrina. Foi possível confirmar, com o auxílio da marcação imuno-histoquímica, a presença de moléculas da glicoproteína fibronectina distribuídas ao longo do corte histológico representante da L-PRF, principalmente no *pellet* leucoplaquetário (*buffy coat*)[x4], confirmando a descrição de (DOHAN *ET AL.*, 2006B), onde os autores afirmam haver uma maior quantidade de plaquetas, consequentemente uma maior liberação de citocinas, como a fibronectina e a vitronectina.

Nos últimos anos, L-PRF tem ganhado ênfase em diversas linhas de pesquisa e apresentado uma variedade de aplicações clínicas em diversas áreas. Na Odontologia tem sido usado no tratamento de alvéolos pós-extração

---

[4] [x] termo em inglês que significa “camada de cor clara na parte superior de um coágulo sanguíneo. Dicionário Collins da Língua Inglesa

(KUMAR *ET AL.*, 2015; OZGUL *ET AL.*, 2015; AL-HAMED *ET AL.*, 2017; CANELLAS *ET AL.*, 2017), recessões gengivais (KECELI *et al.*, 2015; AMINE *et al.*, 2018), fechamento de fendas palatinas (FEMMINELLA *ET AL.*, 2016; EL-AHMADY *ET AL.*, 2018), cirurgias parendodônticas (DHIMAN *ET AL.*, 2015; GOEL *ET AL.*, 2017; PINTO *ET AL.*, 2017; SHARMA *ET AL.*, 2018), osteonecroses dos maxilares pelo uso de bisfosfonatos (PARK *ET AL, 2016.*) e reparo de defeitos periodontais (SU *ET AL.*; SHAH *ET AL.*, 2014; SALGADO-PERALVO *ET AL.*, 2017). Na medicina tem sido aplicada com sucesso no tratamento de ulcerações de difícil remissão como úlceras em pé diabético e úlceras varicosas de membros inferiores, defeitos de tecidos moles em face, colecistecomia laparoscópica, uretroplastias (GUINOT *ET AL.*, 2014) sulco nasolabial profundo, cicatrizes por acne, ruptura do manguito rotador e até perfurações timpânicas traumáticas (FU *ET AL.*, 2016). Diante da vasta aplicabilidade juntamente com resultados preliminares *in vitro* obtidos neste estudo, encorajamos novas pesquisas para comprovação *in vivo* da possibilidade de aceleração no reparo tecidual utilizando-se a L-PRF após um tempo mínimo de repouso após a centrifugação.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nessa dissertação de mestrado, pode-se concluir que existe uma distribuição da glicoproteína fibronectina ao longo do coágulo de L-PRF, prevalentemente na região do *pellet* leucoplaquetário. Foi possível observar nos diferentes tempos de permanência dos tubos em repouso após a centrifugação que houve diferença significante estatisticamente quanto ao grupo 3 (120 minutos). Ainda foi possível observar que nos grupos 2 (60 minutos) e 3 (120 minutos) houve uma melhor organização da malha de fibrina e o aparecimento de α-grânulos no meio intra e extra-celular.

Trata-se de um estudo *in vitro* de um agregado plaquetário que possui diversas variáveis, sendo necessário estudos com maiores tempos de permanência e marcação para outras glicoproteínas. Ainda se acredita na necessidade de outras pesquisas *in vivo* para comprovação das hipóteses sugeridas na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

AL-HAMED, F. S. et al. Efficacy of Platelet-Rich Fibrin After Mandibular Third Molar Extraction: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,** v. 75, n. 6, p. 1124-1135, 2017. ISSN 0278-2391. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239117301076 >.

ALI, S.; BAKRY, S. A.; ABD-ELHAKAM, H. Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Augmentation: A Systematic Review. **J Oral Implantol,** v. 41, n. 6, p. 746-53, Dec 2015. ISSN 0160-6972.

ALZAHRANI, A. A.; MURRIKY, A.; SHAFIK, S. Influence of platelet rich fibrin on post-extraction socket healing: A clinical and radiographic study. **The Saudi Dental Journal,** v. 29, n. 4, p. 149-155, 2017. ISSN 1013-9052. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1013905217300536 >.

AMINE, K. et al. Alternatives to connective tissue graft in the treatment of localized gingival recessions: A systematic review. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery,** v. 119, n. 1, p. 25-32, 2018. ISSN 2468-7855. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468785517301544 >.

BERGEL, S. Uber die wirkung des fibrins. **Dtsch Med Wochenschr,** v. 35, 1909.

CANELLAS, J. V. D. S.; RITTO, F. G.; MEDEIROS, P. J. D. Evaluation of postoperative complications after mandibular third molar

surgery with the use of platelet-rich fibrin: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,** v. 46, n. 9, p. 1138-1146, 2017. ISSN 0901-5027. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0901502717314145 >.

CASAGRANDE, L.; LAUXEN, I. D. S.; FERNANDES, M. I. **O Emprego da Engenharia Tecidual na Odontologia**. Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre. 50**:** 20-23 p. 2009.

CHANTRE, C. O. et al. Production-scale fibronectin nanofibers promote wound closure and tissue repair in a dermal mouse model. **Biomaterials,** v. 166, p. 96-108, 2018. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961218301650 >.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Prog Polym Sci,** v. 53, p. 86-168, Feb 1 2016. ISSN 0079-6700 (Print)0079-6700. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004 >.

CHOUKROUN, J. et al. Une opportunite´ en paro-implantologie: Le PRF. 2001-01-02 2001. Disponível em: < https://www.scienceopen.com/document?vid=a1a5f6be-e645-4718-8e53-dbb6870c25e0 >.

CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. **Eur J Trauma Emerg Surg,** v. 44, n. 1, p.

87-95, Feb 2018. ISSN 1863-9933. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00068-017-0767-9 >.

DHIMAN, M. et al. Effect of Platelet-rich Fibrin on Healing of Apicomarginal Defects: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Endodontics,** v. 41, n. 7, p. 985-991, 2015. ISSN 0099-2399. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239915003398 >.

DIGIOVANNI, C. W.; PETRICEK, J. M. The evolution of rhPDGF-BB in musculoskeletal repair and its role in foot and ankle fusion surgery. **Foot Ankle Clin,** v. 15, n. 4, p. 621-40, Dec 2010. ISSN 1083-7515. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.fcl.2010.07.001 >.

DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J. PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC … How to find your way in the jungle of platelet concentrates? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology,** v. 103, n. 3, p. 305-306, 2007. ISSN 1079-2104. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210406008109 >.

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology,** v. 101, n. 3, p. e37-e44, 2006a. ISSN 1079-2104. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107921040500586X >.

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology,** v. 101, n. 3, p. e45-e50, 2006b. ISSN 1079-2104. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210405005871 >.

DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology,** v. 101, n. 3, p. e51-e55, 2006c. ISSN 1079-2104. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210405005883 >.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. **Growth Factors,** v. 27, n. 1, p. 63-9, Feb 2009. ISSN 0897-7194. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1080/08977190802636713 >.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: growth factor release and contradictory results. In: (Ed.). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. United States, v.110, 2010. p.418-21; author reply 421-2. ISBN 1528-395X (Electronic)

1079-2104 (Linking).

DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSON, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF).

Trends Biotechnol, v. 27, n. 3, p. 158-67, Mar 2009. ISSN 0167-7799 (Print)0167-7799. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009 >.

EL BAGDADI, K. et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). **Eur J Trauma Emerg Surg**, Mar 21 2017. ISSN 1863-9933. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00068-017-0785-7 >.

EL-AHMADY, H. H. et al. Combining Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells seeded on Collagen sponge with Nano Hydroxyapatite, and Platelet-rich Fibrin: Reporting a Novel Strategy for Alveolar Cleft Bone Regeneration. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, 2018. ISSN 1010-5182. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101051821830355X >.

ETULAIN, J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. **Platelets**, p. 1-13, Feb 14 2018. ISSN 0953-7104. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2018.1430357 >.

FEMMINELLA, B. et al. Clinical Comparison of Platelet-Rich Fibrin and a Gelatin Sponge in the Management of Palatal Wounds After Epithelialized Free Gingival Graft Harvest: A Randomized Clinical Trial. **J Periodontol,** v. 87, n. 2, p. 103-13, Feb 2016. ISSN 0022-3492.

FILLA, M. S. et al. Disruption of fibronectin matrix affects type IV collagen, fibrillin and laminin deposition into extracellular matrix of human trabecular meshwork (HTM) cells. **Experimental Eye Research,** v. 165, p. 7-19, 2017. ISSN 0014-4835. Disponível em: <

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483517300490 >.

FRYSTYK, J. Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. **Growth Horm IGF Res,** v. 14, n. 5, p. 337-75, Oct 2004. ISSN 1096-6374 (Print)1096-6374. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2004.06.001 >.

FU, C. J. et al. Evaluation of platelet-rich plasma and fibrin matrix to assist in healing and repair of rotator cuff injuries: A systematic review and meta-analysis. **Clin Rehabil**, Feb 29 2016. ISSN 0269-2155.

GALLI, C. et al. Improved scaffold biocompatibility through anti-Fibronectin aptamer functionalization. **Acta Biomaterialia,** v. 42, p. 147-156, 2016. ISSN 1742-7061. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706116303695 >.

GAND, A. et al. Fibronectin-based multilayer thin films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 156, p. 313-319, 2017. ISSN 0927-7765. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776517302813 >.

GHANAATI, S. et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. **J Oral Implantol,** v. 40, n. 6, p. 679-89, Dec 2014. ISSN 0160-6972 (Print)0160-6972. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00138 >.

GOEL, S.; NAWAL, R. R.; TALWAR, S. Management of Dens Invaginatus Type II Associated with Immature Apex and Large Periradicular Lesion Using Platelet-rich Fibrin and Biodentine. **Journal of Endodontics,** v. 43, n. 10, p. 1750-1755, 2017. ISSN 0099-2399. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009923991730417X >.

GUINOT, A. et al. Preliminary experience with the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane for urethroplasty coverage in distal hypospadias surgery. **J Pediatr Urol,** v. 10, n. 2, p. 300-5, Apr 2014. ISSN 1477-5131.

HONG, S.; CHEN, W.; JIANG, B. A Comparative Evaluation of Concentrated Growth Factor and Platelet-rich Fibrin on the Proliferation, Migration, and Differentiation of Human Stem Cells of the Apical Papilla. **Journal of Endodontics,** v. 44, n. 6, p. 977-983, 2018. ISSN 0099-2399. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239918301687 >.

KECELI, H. G. et al. The Adjunctive Effect of Platelet-Rich Fibrin to Connective Tissue Graft in the Treatment of Buccal Recession Defects: Results of a Randomized, Parallel-Group Controlled Trial. **J Periodontol,** v. 86, n. 11, p. 1221-30, Nov 2015. ISSN 0022-3492.

KUBESCH, A. et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. **Platelets**, p. 1-12, 2018. ISSN 0953-7104. Disponível em: < https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1445835 >.

KUDEMA H, MATRAS H: Die klinische Anwendung der Klebung von Nervenanastomosen bei der Rekonstruktion verletzter peripherer Nerven. Wien Klin Wochenschr 87:495, 1975

KUMAR, N. et al. Evaluation of Treatment Outcome After Impacted Mandibular Third Molar Surgery With the Use of Autologous Platelet-Rich Fibrin: A Randomized Controlled Clinical Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,** v. 73, n. 6, p. 1042-1049, 2015. ISSN 0278-2391. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239114017200 >.

LABAT-ROBERT, J. Cell–Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. **Pathologie Biologie,** v. 60, n. 1, p. 15-19, 2012. ISSN 0369-8114. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811411001416 >.

MIRON, R. J. et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? **Clin Oral Investig,** v. 21, n. 8, p. 2619-2627, Nov 2017. ISSN 1432-6981. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00784-017-2063-9 >.

MIRON-MENDOZA, M. et al. Fibroblast-fibronectin patterning and network formation in 3D fibrin matrices. **Matrix Biology,** v. 64, p. 69-80, 2017. ISSN 0945-053X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X17301051 >.

NANDITHA, S. et al. Apprising the diverse facets of Platelet rich fibrin in surgery through a systematic review. **International Journal of Surgery,** v. 46, p. 186-194, 2017. ISSN 1743-9191. Disponível em: <

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919117312177 >.

NISHIMOTO, S. et al. Growth Factor Measurement and Histological Analysis in Platelet Rich Fibrin: A Pilot Study. **J Maxillofac Oral Surg,** v. 14, n. 4, p. 907-13, Dec 2015. ISSN 0972-8279 (Print)

0972-8270.

NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis,** v. 105, 2017/12/06 2017. ISSN 0340-6245. Disponível em: < https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1160/THS10-11-0720 >.

OZGUL, O. et al. Efficacy of platelet rich fibrin in the reduction of the pain and swelling after impacted third molar surgery: randomized multicenter split-mouth clinical trial. **Head Face Med,** v. 11, p. 37, 2015. ISSN 1746-160x.

PARK, J.-H.; KIM, J.-W.; KIM, S.-J. Does the Addition of Bone Morphogenetic Protein 2 to Platelet-Rich Fibrin Improve Healing After Treatment for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, ISSN 0278-2391. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239116312150 >.

PINTO, N. et al. An Innovative Regenerative Endodontic Procedure Using Leukocyte and Platelet-rich Fibrin Associated with Apical Surgery: A Case Report. **Journal of Endodontics,** v. 43, n. 11, p. 1828-1834, 2017. ISSN 0099-2399. Disponível em: <

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239917308543 >.

RESTREPO, C. A.; MÁRQUEZ, E.; SANZ, M. F. Plasmaféresis terapéutica, tipos, técnica e

indicaciones en medicina interna. **Acta Med Colomb,** v. 34, p. 23-32, 2009.

S., B. Uber die wirkung des fibrins. **Dtsch Med Wochenschr,** v. 35, 1909.

SALGADO-PERALVO, Á. O.; SALGADO-GARCÍA, Á.; ARRIBA-FUENTE, L. Nuevas tendencias en regeneración tisular: fibrina rica en plaquetas y leucocitos. **Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial,** v. 39, n. 2, p. 91-98, 2017/6// 2017. ISSN 1130-0558. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130055816300089 >.

SHAH, M. et al. Effectiveness of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: A systematic review and meta-analysis. **J Indian Soc Periodontol,** v. 18, n. 6, p. 698-704, Nov-Dec 2014. ISSN 0972-124X (Print)

0972-124x.

SHARMA, S. et al. Large Periapical or Cystic Lesions in Association with Roots Having Open Apices Managed Nonsurgically Using 1-step Apexification Based on Platelet-rich Fibrin Matrix and Biodentine Apical Barrier: A Case Series. **Journal of Endodontics,** v. 44, n. 1, p. 179-185, 2018. ISSN 0099-2399. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239917310373 >.

SOUZA, F. G. D. et al. Proliferation and differentiation of stem cells in contact with eluate from fibrin-rich plasma membrane. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition),** v. 53, n. 1, p. 45-52, 2018. ISSN 2255-4971. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2255497117301994 >.

SU, N.-Y.; YANG, L.-C.; CHANG, Y.-C. Platelet-rich fibrin is the first-line treatment option for periodontal regeneration. **Journal of Dental Sciences**, ISSN 1991-7902. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1991790217300351 >.

SUNDARAM; SUNDARAM CP, K. A. Evolution of hemostatic agents in surgical practice. 2010-7-1 2010. Disponível em: < http://www.indianjurol.com/article.asp?issn=0970-1591 >.

WEND, S. et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. **J Mater Sci Mater Med,** v. 28, n. 12, p. 188, Oct 25 2017. ISSN 0957-4530. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s10856-017-5992-6 >.

NORMAS UTILIZADAS

8. NORMAS UTILIZADAS

- NORMA 01/2014 - Instruções e Procedimentos Normativos para a Defesa de Dissertação no PPGCSB;

- Norma instituída pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), foi utilizada para estruturar a apresentação dessa Dissertação, como consta no Manual de Normatização de Trabalhos Acadêmicos da UNIVASF, confeccionado pelo Sistema Integrado de Bibliotecas da UNIVASF (SIBI);

- Nômina Anatômica Humana, ano 2010.

APÊNDICES

9. APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: "**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA *IN VITRO* DA FIBRONECTINA EM AMOSTRAS DE L-PRF: ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO**"
Nome do (a) Pesquisador (a): **PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES**
Nome do (a) Orientador (a): **PROFª MÁRCIA BENTO MOREIRA**

1. **Natureza da pesquisa**: o sra (sr.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade *analisar as possíveis diferenças microscópicas e imuno-histoquímicas entre hemoderivados proveniente do sangue periférico produzidos após centrifugação com o intuito de comprovar a eficácia do procedimento, tornando-o mais acessível sendo portanto passível de execução em Universidades, rede credenciada SUS etc*. Os voluntários serão levados, após o término das atividades acadêmicas do período matutino, para a realização da punção venosa (retiradas de sangue do braço) que terá a duração de aproximadamente 01 (hum) minuto na sala preparada no Espaço Plural, campus Juazeiro – BA da UNIVASF sendo que o trajeto da UNIVASF – Laboratório Laboratório – UNIVASF será realizado com carro oficial da Universidade.

2. **Participantes da pesquisa**: 02 (dois) participantes

3. **Envolvimento na pesquisa**: ao participar deste estudo a sra (sr) permitirá que o (a) profissional qualificado(a) para este procedimento *colete 06 tubos de sangue*. A sra (sr.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para a sra (sr.) bem como poderá retirar consentimento para a guarda e utilização do material biológico sendo possível retirar a qualquer momento pelo proprietário às amostras. Terá o direito de pedir indenização caso se sinta lesado através de ação na justiça comum. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

4. **Sobre as entrevistas**: ---

5. **Riscos e desconforto**: a participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas*, tendo como possível desconforto o momento da punção (picada) para a retirada do sangue, podendo ter como complicações incomuns, porém documentadas na literatura: 1- Flebite todo tipo de inflamação da parede das veias; 2- Extravasamento e 3- Hematoma*. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. No intuito de minimizar os riscos previstos na participação do presente projeto por parte do público alvo foi convidado um profissional da área de Odontologia com experiência em punção venosa. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Ao participante voluntário da pesquisa será fornecido o telefone dos pesquisadores dando total liberdade a este para contatar em eventual desconforto real ou suspeito. Neste momento

agendado para recebimento deste participante em uma reunião juntamente com o pesquisador principal e o profissional responsável pela flebotomia para constatação dos fatos e tomadas de providência.

6. **Confidencialidade**: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) e seu (sua) orientador (a) (e/ou equipe de pesquisa) terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa. ”O material biológico ao término da pesquisa será descartado pelo técnico responsável do Espaço Plural, campus Juazeiro – BA da UNIVASF juntamente com o material de descarte deste laboratório do seguindo os protocolos de biossegurança utilizados no próprio estabelecimento.”
7. **Benefícios**: ao participar desta pesquisa o voluntário receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa e terá benefícios diretos e indiretos, sendo eles: Indireto: esperamos que este estudo traga informações importantes sobre *a comprovação do uso de centrífugas disponíveis no sistema público para a utilização da técnica que visa implementar a cicatrização, reparo e reconstrução de tecidos moles, cobertura de feridas, auxílio na regeneração óssea etc*, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa *ampliar o uso da técnica tanto no serviço privado quanto no serviço público, desde que haja profissionais capacitados e o mínimo de estrutura necessária*, onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior. Direto: *Além disto, a sra. (sr.) receberá os resultados do exame hematológico (hemograma), terá aferida sua pressão arterial no momento da coleta sanguínea e será disponibilizado uma pequena refeição (lanche) após o exame.*

8. **Pagamento**: a sra (sr.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. No entanto, em caso de despesas e/ou danos inesperados decorrentes da participação na pesquisa, os voluntários serão indenizados pelos pesquisadores responsáveis.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

a- Autorizo a execução do trabalho de pesquisa;
b- Divulgação dos dados obtidos neste estudo e
c- Confirmo que recebi **UMA VIA** deste termo de consentimento, assinada pelo participante de pesquisa (ou seu representante legal) e pelo pesquisador, e rubricada em todas as páginas por ambos.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa

_____

Nome do Participante da Pesquisa

_____

Assinatura do Participante da Pesquisa

_____

Assinatura do Pesquisador

_____

Assinatura do Orientador

Pesquisador: PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES – (81)999909334– lopes.pedrohenrique@hotmail.com
Orientador: MARCIA BENTO MOREIRA – (87) 21016757 – marciabentomoreira@gmail.com

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa: Professor Alvaro Rego Millen Neto
Vice-Coordenadora: Deuzilane Muniz Nunes
Telefone do Comitê: 87 2101-6896
E-mail cedep@univasf.edu.br

ANEXOS

10. ANEXO A

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: OBTENÇÃO DE FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA UTILIZANDO DUAS CENTRÍFUGAS DISTINTAS: estudo imunohistoquímico comparativo

Pesquisador: PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 64239917.0.0000.5196

Instituição Proponente: UNIVASF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.200.157

Apresentação do Projeto:

1. Os pesquisadores apresentaram carta resposta com as modificações adequadas no projeto de pesquisa;

Objetivo da Pesquisa:

2. Os objetivos estão bem delineados, são exequíveis, estão em acordo com a metodologia proposta e podem ser atingidos no prazo estipulado pelo cronograma.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

3. Foi realizada uma análise dos riscos pertinente, com previsão de estratégias para minimizá-los, assim como foram apresentados os potenciais benefícios que a pesquisa pode propiciar aos seus participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

4. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

5. Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados adequadamente.

Recomendações:

6. Recomenda-se a aprovação do protocolo de pesquisa.

Endereço: Avenida José de Sá Maniçoba, s/n
Bairro: Centro **CEP:** 56.304-205
UF: PE **Município:** PETROLINA
Telefone: (87)2101-6896 **Fax:** (87)2101-6896 **E-mail:** cedep@univasf.edu.br

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

Continuação do Parecer: 2.200.157

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

7. O projeto foi corrigido e atende aos aspectos éticos de proteção aos participantes da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

É com satisfação que informamos formalmente a Vª. Srª. que o projeto "OBTENÇÃO DE FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA AUTÓLOGA UTILIZANDO DUAS CENTRÍFUGAS DISTINTAS: estudo imunohistoquímico comparativo" foi aprovado pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas (CEDEP) da UNIVASF. A partir de agora, portanto, o vosso projeto pode dar início à fase prática ou experimental. Informamos ainda que no prazo máximo de 1 (um) ano a contar desta data deverá ser enviado a este comitê um relatório sucinto sobre o andamento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_859362.pdf	21/07/2017 15:22:47		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_170717.pdf	21/07/2017 15:22:22	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto170717.pdf	21/07/2017 15:22:10	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Outros	Carta_resposta_aoCEP170717.pdf	21/07/2017 15:19:31	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Outros	Cartaresposta.pdf	03/04/2017 16:54:51	Clean Sá	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMADEEXECUCAO.pdf	01/04/2017 14:13:52	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP.pdf	01/04/2017 14:13:23	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/04/2017 14:10:48	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_010417.pdf	01/04/2017 14:08:39	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Taermodecompromisso.pdf	31/01/2017 17:46:27	Clean Sá	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	31/01/2017 16:42:54	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito

Endereço: Avenida José de Sá Maniçoba, s/n
Bairro: Centro **CEP:** 56.304-205
UF: PE **Município:** PETROLINA
Telefone: (87)2101-6896 **Fax:** (87)2101-6896 **E-mail:** cedep@univasf.edu.br

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

Continuação do Parecer: 2.200.157

Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Sigilo.pdf	31/01/2017 16:42:11	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTADEANUENCIA.pdf	31/01/2017 16:41:31	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	31/01/2017 16:37:29	PEDRO HENRIQUE DE SOUZA LOPES	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PETROLINA, 03 de Agosto de 2017

Assinado por:
DEUZILANE MUNIZ NUNES
(Coordenador)

Endereço: Avenida José de Sá Maniçoba, s/n
Bairro: Centro **CEP:** 56.304-205
UF: PE **Município:** PETROLINA
Telefone: (87)2101-6896 **Fax:** (87)2101-6896 **E-mail:** cedep@univasf.edu.br

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação em Extensão Rural – PPGExR
Câmara Interdisciplinar Temática I – Políticas Públicas & Desenvolvimento

Juazeiro/BA, 20 de fevereiro de 2018.

CARTA DE ANUÊNCIA PARA DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA

Autorizo o desenvolvimento da pesquisa intitulada "**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA IN VITRO DA FIBRONECTINA EM AMOSTRAS DE L-PRF: ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO**" no campus sede do Programa de Pós-Graduação em Extensão Rural (Espaço Plural), localizado no município de Juazeiro, estado da Bahia.

A presente pesquisa poderá ser realizada na sala número 10 do prédio de salas de aula e laboratórios do Espaço Plural e deverá ser realizada pelo pesquisador responsável, **Pedro Henrique de Souza Lopes,** aluno do Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde Biológicas, nível de Mestrado Acadêmico, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (PPGCSB/UNIVASF); durante o período de fevereiro a julho do ano corrente.

A pesquisa tem como objetivo principal avaliar a influência do tempo de permanência dos tubos contendo *plugs* de PRF em repouso após a centrifugação quanto a molécula de fibronectina.

Fica autorizado o acesso ao campus sede deste mestrado os participantes da pesquisa bem como o pesquisador principal e sua equipe. Ao mesmo tempo, pedimos que o nome deste órgão possa constar no trabalho de conclusão da pesquisa, seja em vias de dissertação ou em artigo previsto para futuras publicações.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Márcia Bento Moreira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Extensão Rural
Universidade Federal do Vale do São Francisco
www.pgextensaorural.univasf.edu.br

BA 210 Km 04 – Rodovia Juazeiro/ Sobradinho, Bairro Malhada da Areia, CEP: 48909-210 – Juazeiro/BA
FONE: 74 3611-72 06 E-MAIL: cpgexr@univasf.edu.br SITE: http://www.pgextensaorural.univasf.edu.br