

Universidade Brasil – Campus Itaquera
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

***Plasma Rico em Plaquetas: Investigação da efetividade de
diferentes protocolos para aplicação em pé diabético***

CECÍLIA PENHA DALL'ORTO CRUZ

Orientadora: Prof^a Dr^a Carla Roberta Tim

Coorientadora: Prof^a Dr^a Livia Assis

São Paulo, SP

2020

Platelet Rich Plasma: Investigation of the effectiveness of different protocols for application on diabetic foot

CECÍLIA PENHA DALL'ORTO CRUZ

Dissertação de mestrado, apresentado ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof.^a Dr^a Carla Roberta Tim

Coorientador: Prof^a Dr^a Livia Assis

São Paulo, SP

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D15p Dall'Orto, Cecília P. Cruz.
Plasma Rico em Plaquetas: Investigação da Efetividade de diferentes protocolos para aplicação em pé diabetico / Cecília P. Cruz Dall'Orto. – 2019.
43 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Transportes, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Carla Tim.
Coorientação: Profa. Dra. Livia Assis.
1. PRP, Úlceras, Diabetes. I. Título.

CDD 388

**TERMO DE APROVAÇÃO****CECÍLIA PENHA DALL'ORTO CRUZ****"PLASMA RICO EM PLAQUETAS: INVESTIGAÇÃO DA EFETIVIDADE DE
DIFERENTES PROTOCOLOS PARA APLICAÇÃO EM PÉ DIABÉTICO"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a). Dr.(a) Carla Roberta Tim (presidente-orientador)

Prof.(a). Dr.(a) Laurita dos Santos (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof.(a). Dr.(a) Hueliton Wilian Kido (UNINOVE)

São Paulo, 12 de novembro de 2020
Presidente da Banca Prof.(a). Dr.(a) Carla Roberta Tim

Houve alteração do Título: sim () não (X):



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "PLASMA RICO EM PLAQUETAS: INVESTIGAÇÃO DA EFETIVIDADE DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA APLICAÇÃO EM PÉ DIABÉTICO"

Houve alteração do Título: sim () não (X)

Autor(es):

Discerte: **Cecília Penna Dall'Orto Cruz**

Assinatura: _____

Orientador(a): Prof. Dr. Carla Roberta Tim

Assinatura: _____

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 12/11/2020

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Florentino Campo Dall'Orto,

Ao meu esposo Edmilson Severiano da Cruz.

Pelo amor e incentivo ao longo do tempo que estiveram comigo e que tanta falta me fazem.

À Pâmela e Valentina

Luz da minha vida.

Á minha mãe, Marli F. Dall'Orto, por compreender minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

Para que esse trabalho pudesse ser realizado, recebi colaboração de inúmeras pessoas as quais desejo expressar meu agradecimento.

À Professora Dr^a Carla Tim, orientadora, pelo encorajamento nos momentos difíceis, e principalmente pela confiança em mim depositada e pelo incentivo, apoio e paciência.

À secretaria de Saúde do Município de Cáceres, na pessoa da Secretária de Saúde, Silvana Maria de Souza, pelo apoio e constante estímulo.

Ao Ambulatório de Dermatologia Municipal e Laboratório análises Clínica de Cáceres, agradecimento especial à Rogério Dias da Cunha Ramsdorf biomédico, pela responsabilidade e seriedade na análise laboratorial dos hemocomponentes.

Ao professor Dr. Diretor do Curso de Medicina da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT Gleber Nelson Marques, pelo respeito à vida acadêmica e pelas sugestões.

Aos alunos do Internato do curso de medicina da Universidade do Estado de Mato grosso, Edilaine Rubint, Matheus Gattass e se estende aos alunos Anna Carolina da Silva Santos, Gabrielly Paola da silva Souza, Maria Paula Banhara Rodriguese Karolyni lesley Diniz San'anna, sempre com questionamentos oportunos.

Ao Colega Médico Maximiliano Leite, por me ouvir incansavelmente e pelos conselhos sempre úteis.

Aos meus familiares pelo incentivo e motivação.

RESUMO

A Diabetes mellitus (DM) caracteriza-se como um distúrbio metabólico de hiperglicemia persistente. O pé diabético é uma das primeiras complicações identificadas nos pacientes diabéticos e causa grandes manifestações negativas na qualidade de vida destes. O pé diabético apresenta propensão a infecção, e quando, moderada ou grave sofrem algum nível de amputação do membro. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto biológico produzido a partir de um processo de centrifugação de sangue autólogo, permitindo a extração de plasma com uma concentração de três a cinco vezes maiores de plaquetas em relação a sua quantidade no sangue basal. Nesta perspectiva, este estudo teve como objetivo elaborar revisão sistemática para avaliar a efetividade de diferentes protocolos de recuperação de PRP para tratamento de feridas e verificar a viabilidade de reproduzir protocolos de recuperação do PRP variando força/velocidade e tempo de centrifugação. Para isso, foi realizada a busca dos artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) com os descritores em português e inglês “feridas crônicas, úlceras crônicas, plasma rico em plaquetas, reparação profunda de tecidos moles, cicatrização de feridas, medicina regenerativa”. Utilizou-se a combinação dos descritores como estratégia de busca. O período de publicação foi delimitado entre os anos de 2010 a 2019. Foram excluídas demais produções que não se enquadrassem na categoria artigo científico, como tese, dissertações, monografias; bem como trabalho inconclusivo, relatos de casos, revisão de literatura narrativa e estudo realizado em animais. Foram selecionados 66 artigos, após os critérios de exclusão, apenas 13 artigos compôs o corpus do estudo. Em 61,5 % dos trabalhos utilizou a aplicação de gel autólogo de PRP; e, 38,4 % optaram pela administração injetável do PRP, via subcutânea ou intradérmica. Do total de 13 estudos analisados, todos evidenciaram que o PRP auxilia no processo de reparo tecidual. Em 23 % dos estudos analisados houve investigação da variável de dor, com melhora da mesma e da qualidade de vida do paciente. Os ensaios clínicos continuam com grande importância para o caso em questão, bem como revisões de literatura sistemáticas para o recrutamento de informações e aumento de evidências acerca do assunto. O PRP apresenta grande potencial de terapêutica opcional no cuidado e no processo de reparo de feridas crônicas. Diante disso, o segundo estudo teve como objetivo avaliar a factibilidade de reprodução de dois protocolos de recuperação do PRP variando força/velocidade e tempo de centrifugação. Foram recrutados 20 voluntários previamente hígidos com contagem de plaquetas dentro do intervalo de referência $150 - 450.10^3$ uL. Para a realizar a preparação do PRP foram utilizadas duas diferentes centrifugas: 1) centrífuga Centri lab digital modelo CE1161, velocidade ajustável – 0 a 5000 rpm com raio de 14 cm e rotor ângulo fixo; com 10 pacientes; 2) centrífuga Kasvi digital mod. Ce800, velocidade ajustável de 100 a 4000 rpm com raio de 14 cm e ângulo variável, com 10 pacientes. O presente estudo constatou que a preparação de PRP produzidos utilizando maior força/velocidade e tempo de centrifugação promoveram a concentração de plaquetas estatisticamente maior quando comparado ao protocolo de menor força/velocidade. Não foi possível realizar a reprodutibilidade dos protocolos em diferentes centrifugas. Os resultados apontam que além da força de gravidade e tempo para centrifugação, o ângulo do rotor também pode influenciar na preparação de PRP.

PALAVRAS-CHAVE: Plasma Rico em Plaquetas, Velocidade de Centrifugação, Feridas Crônicas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is characterized as a metabolic disorder of persistent hyperglycemia. Diabetic foot is one of the first complications identified in diabetic patients and causes major negative manifestations in their quality of life. These wounds are prone to infection, and when, moderate or severe, they suffer some level of limb amputation. Platelet-rich Plasma (PRP) is a biological product produced from an autologous blood centrifugation process, allowing plasma extraction with a concentration of three to five times higher than that of platelets without basal blood. In this perspective, this study aimed at a systematic review to assess the effectiveness of different PRP recovery protocols for wound treatment and to verify the feasibility of PRP recovery protocols by varying the strength / speed and the centrifugation time. For this purpose, a search was performed in the articles of the Virtual Health Library (VHL) with the descriptors in English and Portuguese "chronic ulcers, Platelet-rich plasma, Deep Soft Tissue Repair, Chronic Wounds, Wound Healing, Regenerative Medicine, Therapeutics and wound healing. Use a combination of descriptors as a search strategy. The publication period was delimited between the years 2010 to 2019. Other productions that were not included in the scientific article category were excluded, such as thesis, dissertations as well as inconclusive work, case reports, review of narrative literature and study on animals. 66 articles were selected, after exclusion, only 13 composite articles or corpus of the study. In 61.5 % of the studies, a PRP autologous gel application was used; and 38.4 % opted for injecting PRP, either subcutaneously or intradermally. Total of 13 studies analyzed, all proven that the PRP assist in the healing and tissue regeneration process. In 23 % of the studies analyzed there was an investigation of the pain variable, with improvements in it and in the patient's quality of life. Clinical trials continue to be of great importance for the case in question, as well as the analysis of systematic literature for recruiting information and increasing the occurrence of subjects. PRP has a great optional therapeutic potential in the treatment and healing process of chronic ulcers. Therefore, the second study aimed to evaluate the effectiveness of the reproduction of two PRP recovery protocols, varying strength / speed and centrifugation time. Twenty trained volunteers were recruited, with platelet count within the reference range $150 - 450 \cdot 10^3 \text{ uL}$. Two different centrifuges were used to prepare the PRP: 1) CE1161 digital laboratory model centrifuge, adjustable speed - 0 to 5000 rpm with a radius of 14 cm and fixed rotor; with 10 patients; 2) Kasvi digital mod. Ce800, adjustable speed from 100 to 4000 rpm with a radius of 14 cm and variable angle, with 10 patients. The present study found that the preparation of the PRP using the highest force / speed and the centrifugation time, promoting the concentration of coatings statistically higher when compared to the protocol of lower force / speed. It was not possible to reproduce the protocols in different centrifuges. The results pointed out beyond the force of gravity and the centrifugation time, or the rotor angle can also influence the preparation of the PRP.

KEYWORDS: Platelet Rich Plasma, Centrifugation speed, Chronic Wounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma do processo de busca e seleção dos artigos	24
Figura 2 - Relação dos artigos encontrados e seus resultados.....	28
Figura 3 - Recuperação de Plasma Rico em Plaquetas	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de crescimento e suas principais funções	22
Tabela 2 - Artigos selecionados por meio de critérios de inclusão	26
Tabela 3 - Parâmetros para centrifugação sanguínea	32
Tabela 4 - Resultados da contagem de plaquetas usando as diferentes técnicas de preparação de PRP	33

LISTA DE ABREVIATURAS

DM - Diabetes mellitus

DM1 - Diabetes mellitus tipo 1

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2

IDF - *International Diabetes Federation*

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

UBS - Unidades Básicas de Saúde

PDGF - Fatores de crescimento transformador do inglês *Platelet-derived growth factor*

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

FGF - Fator de crescimento Fibroblástico do inglês *Fibroblast Growth Factor*

IGF - Fator de crescimento semelhante a insulina do inglês *Insulin-like growth factor*

EGF - Fator de crescimento epitelial ou epidermal do inglês *Epidermal Growth Factor*

PDGF-AB - Fator de plaquetas crescimento derivado AB do inglês *Platelet-derived growth factor AB*

TGF- β 1 - Fator de crescimento transformador beta do inglês *Transforming growth factor beta*.

BVS - Biblioteca Virtual em Saúde

LILACS - Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde

MEDLINE - *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*

SciELO - *Scientific Electronic Library Online*

DeCS - Descritores em Ciências da Saúde

IC - Intervalo de confiança

OR - *Odds-Ratio*

h₀ - Hipótese nula

mL - mililitro

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

uL – microlitro

EDTA k₂ – Etileno-diamino-tetraacético dipotássico

rpm - Rotações por minuto

cm – centímetro

Força g - força gravitacional

RCF – do inglês relative centrifugal

Min - Minuto

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	15
1.1	Hiperglicemia Crônica – fator desencadeador de complicações	15
1.2	Feridas pé diabéticos X Plasma Rico em Plaquetas.....	16
2	OBJETIVO GERAL	19
3	ESTUDO I.....	20
3.1	EFEITOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS – REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA.....	20
3.1.1	Introdução	20
3.1.2	Material e Métodos.....	23
3.1.3	Resultados	25
3.1.4	Discussão	28
3.1.5	Conclusão	29
4	ESTUDO II.....	30
4.1	EFETIVIDADE DE DIFERENTES PROTOCOLOS NA RECUPERAÇÃO DE PLAQUETAS	30
4.1.1	Introdução	30
4.1.2	Material e Métodos.....	31
4.1.3	Resultados	33
4.1.4	Discussão	34
4.1.5	Conclusão	35
5	Considerações Finais	37
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A diabetes mellitus (DM) caracteriza-se como um distúrbio metabólico de hiperglicemia persistente ocasionada por um mecanismo de deficiência na produção de insulina ou na ação deste hormônio em longo prazo (GUYTON; HALL, 2017).

A DM é classificada em dois tipos: a tipo I (DM1), trata-se de uma doença autoimune com manifestação geralmente juvenil, onde ocorre destruição primária das células beta-pancreáticas ou origem idiopática gerando hipoinsulinemia absoluta. Enquanto, a tipo II (DM2), corresponde a grande maioria dos casos, com etiologia multifatorial incluindo fatores genéticos e ambientais, como obesidade e outros componentes da síndrome metabólica, no qual a hiperglicemia é decorrente da resistência à insulina e a diminuição de secreção das células betas pancreáticas (KASPER, 2015).

Diante da sua crescente incidência no mundo, a DM torna-se um problema irrevogável. Em 2017, a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF) estimou que 415 milhões de pessoas, cerca de 8,8 % da população mundial, com 20 a 79 anos de idade vivem com diabetes, com o Brasil ocupando a 4ª posição entre os dez primeiros países. Ainda, é estimado que no ano de 2045, haverá 630 milhões de pessoas no mundo diagnosticadas com a doença, devido a propensão dos indivíduos a enfermidade (LYRA et al., 2020; ZHENG; LEY; HU, 2018).

Diversos fatores estão associados a esse aumento da prevalência da DM, a grande maioria relacionada a hábitos de vida (ZHENG *et al* 2017). O sedentarismo, a dieta alimentar rica em carboidratos e os lipídios, além do envelhecimento populacional aumentam a incidência de diabetes mellitus. Em concordância a esses eventos, a falta de conhecimento da população acerca da doença, os primeiros sintomas insidiosos e a execução ineficaz da saúde primária, facilitam o desenvolvimento das suas complicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.1 Hiperglicemia Crônica – fator desencadeador de complicações

As complicações estão divididas tradicionalmente em distúrbios macrovasculares e microvasculares. Os distúrbios macro vasculares, envolvem a aterosclerose dos grandes vasos que é a principal causa de anginas, infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (GOLDMAN; SCHAFER, 2016).

As complicações microvasculares, estão relacionadas a três manifestações mais comuns e devastadoras do diabetes mellitus; a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia diabética. O risco dessas complicações, em pacientes com diabetes mellitus, é estimado em 2 a 4 e 10 – 20 vezes maior respectivamente que em pessoas sem diabetes mellitus (GREGG; SATTAR; ALI, 2016).

Efeitos diretos da hiperglicemia, a neuropatia diabética, complicação microvascular, resulta da isquemia dos nervos e manifesta-se com parestesias, disestesias e perda da sensibilidade tátil, vibratória, proprioceptiva e da temperatura (ZHENG; LEY; HU, 2018). Nos membros inferiores, esses sintomas também causam diminuição da percepção de traumas e ulcerações nos pés. Entre as complicações crônicas do DM, a ulceração e a amputação de extremidades são as mais graves e de maior impacto socioeconômico, sendo, ainda frequentes na população brasileira (IBGE, 2014).

1.2 Feridas pé diabéticos X Plasma Rico em Plaquetas

As feridas crônicas são feridas caracterizadas por um atraso no reparo tecidual, aquelas que falharam no processo normal e na sequência ordenada e temporal da reparação tecidual ou as feridas que apesar de passar pelo processo de reparo não tiveram restauração anatômica e resultados funcionais (LAZARUS *et al.*, 1994). De modo geral, os diabéticos têm mais dificuldade para reparar lesões de pele e leva maior tempo para reparar a ferida devido ao auto índice glicêmico e baixo fluxo sanguíneo nas extremidades distais de membro inferior, culminando na cronificação da ferida (BOWKER; PFEIFER, 2007). A baixa tensão de oxigênio, excesso de carga microbiana, tecido necrótico, insuficiência venosa fazem com que as células do leito não respondem a sinalização celular normal com diminuição da produção e resposta ao fator de crescimento (PARK; HWANG; YOON, 2017).

A ferida de pé diabético é definida como uma ferida espessura total localizada abaixo do tornozelo em um paciente diabético e está associada a neuropatia diabética e doenças arteriais periféricas. O pé diabético é uma das primeiras complicações identificadas nos pacientes e causa grandes manifestações negativas na qualidade de vida destes (MOREIRA *et al.*, 2009). A *International Diabetes Federation* (IDF) estima que ao longo da vida, 15 a 25 % das pessoas com DM desenvolverão feridas nos pés, levando a um gasto de US 9,1 bilhões por ano (ATLAS, 2019). As feridas de

pé diabéticos, são proporcionadas por estresse mecânico repetitivo em áreas com neuropatia periférica, adicionado a influência da doença arterial periférica. Essas feridas apresentam propensão a infecção, assim, aproximadamente metade das feridas de pés diabéticos são infectados (BABAEI *et al.*, 2017).

A amputação de membros ocorre em 0,7 % e 2,4 % dos usuários de serviços de saúde, um percentual bastante significativo, considerando a amputação uma complicação irreversível com implicações físicas, mentais e sociais extremas (IBGE, 2014).

Dados da Pesquisa Nacional de Saúde apontam que 47 % dos usuários diabéticos referem ter recebido assistência médica, nos últimos 12 meses, em Unidades Básicas de Saúde (UBS), e 29 % em consultórios particulares ou clínicas privadas. Entendemos que, o acesso de usuários diabéticos aos serviços de saúde, sejam eles públicos ou privados, não necessariamente garante uma atenção de qualidade quando já se trata de complicações da diabetes mellitus (BROWNLEE, 2005; FOSS-FREITAS; MARQUES JUNIOR; FOSS, 2008).

O tratamento convencional atual para as feridas de pés diabéticos está voltado para curativos diários com assepsia e antissepsia para evitar a infecção local que fica a cargo do próprio paciente e ou familiares, o desbridamento cirúrgico, quando já em estado avançado de infecção e tecido desvitalizado associado a orientações e mudanças no estilo de vida. Conseqüentemente, aumentou o interesse em desenvolver novas terapias avançadas para lidar com feridas comprometidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Evidências científicas apresentam significativos avanços no tratamento de feridas. O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) que é um plasma de sangue autólogo com alta concentração de plaquetas, muito acima do sangue integral, obtido por centrifugação e cujo emprego foi referido na prática clínica para estimular o reparo de tecidos. Utilizado no campo da hematologia para tratamentos de feridas talassemias na perna; apresentou redução do tamanho da ferida após tratamento em 4 semanas (AFRADI *et al.*, 2017). Se expandiu em vários campos da dermatologia com importantes resultados no tratamento de alopecia (JAMES *et al.*, 2015; TRINK *et al.*, 2013), rejuvenescimento facial (CAMELI *et al.*, 2017; HERSANT *et al.*, 2017), enxertos e cirurgias plásticas (CERVELLI *et al.*, 2009). O PRP mostrou ser eficaz no tratamento da córnea ulcerativa (ALIO *et al.*, 2013; ALIO; RODRIGUEZ; WRÓBELDUDZIŃSKA,

2015; LÓPEZ-PLANDOLIT *et al.*, 2010) e na urologia, a terapia com PRP tem potencial para tratar a disfunção sexual masculina e pode ser útil em andrologia (WU *et al.*, 2012). O uso do PRP permaneceu na ortopedia como tratamento para patologias osteomusculares agudas e crônicas (CHEN *et al.*, 2006; GULLUNG *et al.*, 2011; YIN, 2015).

O potencial reparativo do PRP é atribuído a concentrações suprafisiológicas de fatores de crescimento liberados de plaquetas ativadas incluindo fatores de crescimento transformador (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MARTINO *et al.*, 2011). Esses fatores de crescimento desempenham papéis essenciais e sinalizam como uma abordagem útil baseada na riqueza de fatores de crescimento, protease, proteínas antimicrobianas, citocinas entre outros, fundamentais na regeneração de tecidos e reparo de feridas (LOSI *et al.*, 2013).

2 OBJETIVO GERAL

O estudo teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade de protocolos para PRP no uso do PRP em feridas de pé diabéticos.

Objetivos Específicos

- Elaborar revisão sistemática para avaliar a efetividade de diferentes protocolos de recuperação de PRP para tratamento de feridas;

- Verificar a reprodutibilidade de dois protocolos de recuperação do PRP variando força/velocidade e tempo de centrifugação.

3 ESTUDO I

3.1 EFEITOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS – REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA

Resumo: Feridas crônicas são caracterizadas por um retardo no processo natural de reparo. O plasma rico em plaquetas (PRP) ou também conhecido plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas ou plasma autógeno de plaquetas é um produto biológico produzido a partir de um processo de centrifugação de sangue autólogo, permitindo a extração de plasma com uma concentração de três a cinco vezes maiores de plaquetas em relação a sua quantidade no sangue basal. Nesta perspectiva, este estudo teve como objetivo analisar as evidências científicas produzidas sobre os métodos terapêuticos disponíveis com o uso de PRP em feridas crônicas. Trata-se de uma revisão sistemática de literatura, cuja questão norteadora foi: Há evidência científica terapêutica de uso de PRP autólogo em feridas crônicas? Para a busca dos artigos utilizou-se a Biblioteca Virtual em Saúde e foram encontrados 66 artigos. Aplicando os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 13 artigos para compor o estudo. Em 61,5 % dos trabalhos utilizou a aplicação de gel autólogo de PRP; e, 38,4 % optaram pela administração injetável do PRP, via subcutânea ou intradérmica. Do total de 13 estudos analisados, todos evidenciaram que o PRP auxilia no processo de reparo tecidual. Deste, 86,6 % evidenciaram superioridade no processo de reparo de feridas, alguns com melhora em relação ao tempo ou evolução de redução do tamanho da ferida. Em 23 % dos estudos analisados houve investigação da variável de dor, com melhora da mesma e da qualidade de vida do paciente. Os ensaios clínicos continuam com grande importância para o caso em questão, bem como revisões de literatura sistemáticas para o recrutamento de informações e aumento de evidências acerca do assunto. O PRP apresenta grande potencial de terapêutica opcional no cuidado e no processo de reparo de feridas crônicas.

PALAVRAS-CHAVE: Plasma Rico em Plaquetas, reparação profunda de tecidos moles, feridas crônicas, cicatrização de feridas, medicina regenerativa.

3.1.1 Introdução

Feridas crônicas são feridas caracterizadas por um retardo no processo natural de reparo (DIONYSSIOU *et al.*, 2013). Dos quais envolvem mecanismos complexos regulados por diversos fatores de crescimentos. A manipulação do plasma sanguíneo é capaz de separar sua porção de plasma rico em plaquetas (PRP), onde os fatores

de crescimento podem ser isolados. Dessa maneira, sendo um hemocomponente capaz de atuar no processo de reparo (WELLER *et al.*, 2019).

O PRP ou também conhecido plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas ou plasma autógeno de plaquetas é um produto biológico produzido a partir de um processo de centrifugação de sangue autólogo, permitindo a extração de plasma com uma concentração de três a cinco vezes maior o número de plaquetas em relação a sua quantidade no sangue basal (FERES JUNIOR *et al.*, 2004; PAGLIOSA; ALVES, 2007; VENDRAMIN *et al.*, 2006).

Inicialmente o PRP foi desenvolvido com o objetivo de reduzir as hemorragias durante procedimentos cirúrgicos (NUNES FILHO *et al.*, 2007). Seu uso começou a se tornar popular na odontologia humana, mais especificamente em cirurgias orais e maxilo-faciais, a partir de 1998 com a publicação de artigos relatando que a associação do PRP a enxerto de osso autógeno potencializava o processo de reparo ósseo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008). A partir de então, o produto passou a ser usado com sucesso nos campos da ortopedia, cirurgia da coluna vertebral, cirurgia plástica reconstrutiva, cirurgia oral e maxilofacial, ginecológica, oftálmica e indicações dermatológicas (WHITLOW *et al.*, 2008).

A Justificativa para o uso e o potencial terapêutico de uma alta concentração de plaquetas é baseada em sua capacidade de fornecer e liberar quantidades supra-fisiológicas de fatores essenciais de crescimento e citocinas. Estudos apresentados demonstram a existência de pelo menos 60 substâncias biologicamente ativas em seu interior, que participam dos mecanismos de reparação tecidual (ROZMAN; BOLTA, 2007). Os mediadores biológicos secretados pelos grânulos plaquetários após a ativação das plaquetas são a trombina, tromboxano A₂, adenosina difosfato, tromboplastina, fatores de coagulação, cálcio, serotonina, histamina fator de *Von Willebrand*, fibrinogênio (WHITLOW *et al.*, 2008), catecolaminas (LÓPEZ *et al.*, 2007) e os fatores de crescimento, sendo estes últimos os mais importantes pelo fato deles serem capazes de estimular diferentes processos celulares (BARBOSA *et al.*, 2008; ROZMAN; BOLTA, 2007). A tabela abaixo cita fatores de crescimento e correlaciona as suas principais funções.

Tabela 1 - Fatores de crescimento e suas principais funções

Fatores de Crescimento	Principais Funções
Transformador Beta (TGF-β)	Quimiotaxia, diferenciação celular, angiogênese
Fator de Crescimento Derivado da Plaqueta (PDGF)	Angiogênese, quimiotaxia, mitogênese e formação de colágeno;
Fator de crescimento Fibroblástico (FGF)	Diferenciação de osteoblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese, mitogênese, quimiotaxia
Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF)	Mitogênese e diferenciação de células mesenquimais
Fator de crescimento epitelial ou epidermal (EGF)	Mitogênes, atividade migratória, diferenciação células epiteliais
Fator de crescimento Vascular Endotelial (VEGF)	Quimiotaxia e proliferação de células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular

Fonte: (DHURAT; SUKESH, 2014)

Para que essas substâncias sejam liberadas e possam agir, as plaquetas precisam ser ativadas por um fator agonista, ou seja, componentes celulares, colágeno, citocina inflamatórias e outros (JAIN, 1993).

As plaquetas mudam de formato e passam a apresentar projeções membranosas longas conhecidas como pseudópodos e os grânulos localizados no seu interior, que, através processo de centrifugação são rompidos levando a liberação do seu conteúdo (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2004; JAIN, 1993). Após centrifugação e seleção dos elementos sanguíneos, se obtém um concentrado de fatores de crescimento que, no contato com o tecido, agem sobre as células danificadas estimulando sua regeneração e crescimento (ETULAIN, 2018).

Achados recentes relatam que durante as fases iniciais do reparo da ferida, as plaquetas ativadas atraem e estimulam migração celular para a ferida, agregando e formando uma matriz de fibrina. Esta matriz em seguida, serve como um *scaffold* de tecido para liberação sustentada de fatores de crescimento de plaquetas e citocinas, que estimulam o recrutamento, a diferenciação e a comunicação das células (ETULAIN, 2018). Assim, este estudo teve como objetivo analisar as evidências científicas produzidas sobre os métodos terapêuticos disponíveis com o uso de PRP em feridas crônicas.

3.1.2 Material e Métodos

Trata-se de uma revisão sistemática de literatura que, a partir da síntese de múltiplos estudos publicados, permite chegar a conclusões sobre determinado tema mediante a aplicação de métodos sistemáticos e ordenados e contribui para o aprofundamento do conhecimento do tema investigado (MAYDANA *et al.*, 2010).

De forma a cumprir rigorosamente suas etapas, na presente revisão sistemática seguiram-se os seguintes passos: estabelecimento da hipótese ou questão de pesquisa; estabelecimento dos critérios de inclusão/exclusão, escolha da base de dados e a seleção do material a ser pesquisado; extração das informações, organização e elaboração do banco de dados; avaliação dos estudos, inclusão/exclusão dos estudos e análise crítica; discussão dos dados identificados, recomendações e sugestões para futuras pesquisas; resumo das evidências ou apresentação da revisão (MAYDANA *et al.*, 2010).

O tema deste estudo foi: “Avaliar o uso do gel autólogo de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em feridas crônicas de difícil reparo. Para a busca ativa dos artigos, utilizou-se a Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) que reúne bases de dados como LILACS (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde), MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*), SciELO (*Scientific Electronic Library Online*), dentre outras, sendo utilizados os seguintes descritores em português e inglês: “feridas crônicas, úlceras crônicas, plasma rico em plaquetas, reparação profunda de tecidos moles, cicatrização de feridas, medicina regenerativa, padronizados pelos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e pelo MeSH (*Medical Subject Heading Database*). Utilizou-se a combinação dos descritores como estratégia de busca.

Os critérios de inclusão foram: artigos que respondessem à questão norteadora de estudos clínicos randomizados e revisão de literatura sistemática, redigidos na língua inglesa ou portuguesa e estarem disponíveis na íntegra em acesso aberto (*open access*). O período de publicação foi delimitado entre os anos de 2010 a 2019. Foram excluídas demais produções que não se enquadrassem na categoria artigo científico, como tese, dissertações, monografias; bem como trabalho inconclusivo, relatos de casos, revisão de literatura narrativa e estudo realizado em animais.

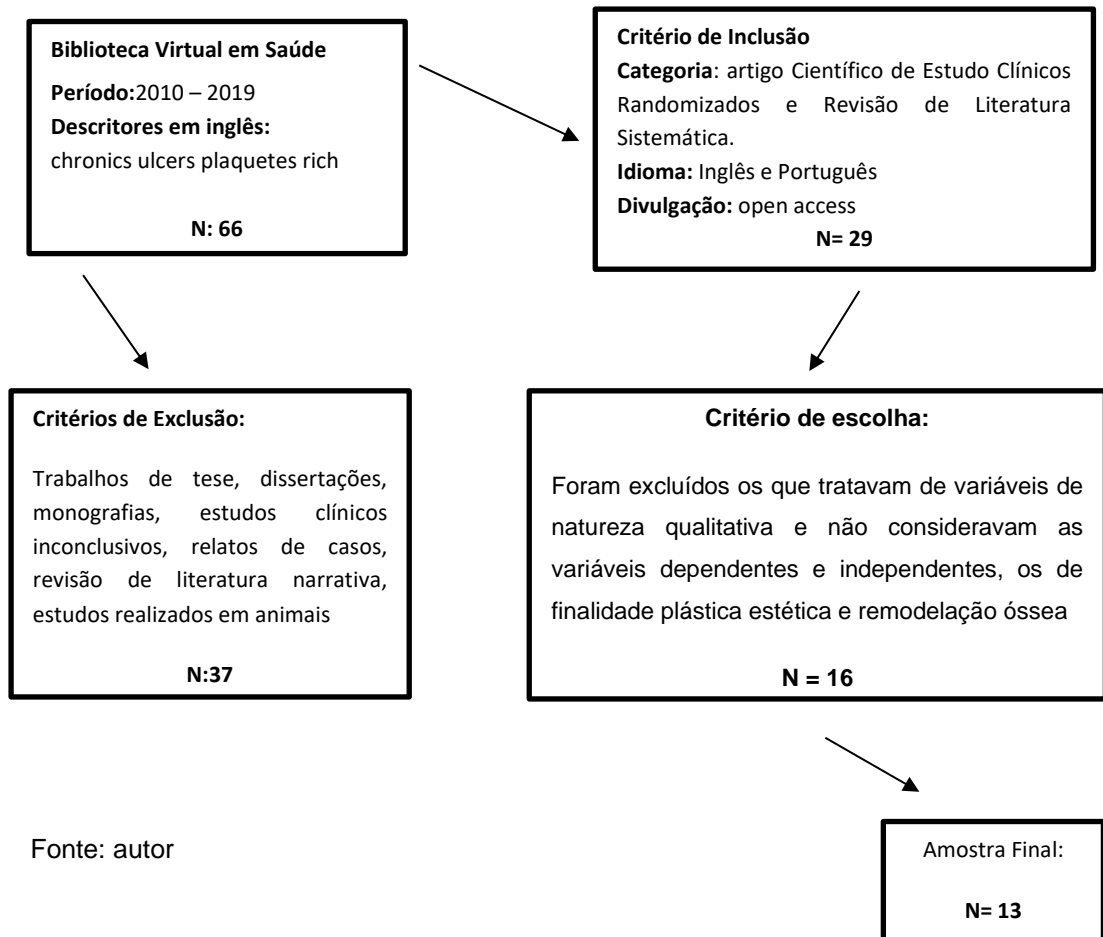
Para a organização das informações identificadas nos artigos selecionados, realizou-se uma análise crítica dos mesmos, sendo as informações consideradas

relevantes aos objetivos do estudo digitadas em uma planilha no programa *Microsoft Office Excel®*, contendo os seguintes dados: autoria/ano de publicação, título do artigo, periódico de publicação e delineamento da pesquisa.

Após a análise dos estudos, foram excluídos os artigos que não atenderam aos critérios de inclusão, aqueles que se repetiam. Para a discussão dos dados identificados, foi necessário proceder a uma leitura profícua dos artigos, sendo incluídos apenas aqueles que continham avaliação, análise e discussão referentes ao tratamento e cuidados de feridas crônicas com PRP autólogos tanto antes ou após o processo de gelificação. Os artigos selecionados e catalogados foram relidos na íntegra e seus conteúdos submetidos a uma análise comparativa, bem como uma avaliação dos dados estatísticos, considerando o intervalo de confiança (IC), as relações de *Odds-Ratio (OR)* e ou o nível descritivo ou valor de *p*, afim de excluir hipótese nula, resultados falsos ou sem relevância estatística.

A Figura 1 apresenta o fluxograma do processo de busca e seleção dos artigos.

Figura 1- Fluxograma do processo de busca e seleção dos artigos



Fonte: autor

3.1.3 Resultados

Durante a etapa de pesquisa encontrou-se artigos repetidos em bases de dados eletrônicas distintas. Entre os 66 artigos pré-selecionados, apenas 29 correspondiam ao interesse de estudo sobre a atuação do PRP no processo de reparo de feridas. Em uma segunda etapa, todos os artigos foram revistos e aplicou-se os critérios de escolha, dessa forma, sendo excluídos os que tratavam de variáveis de natureza qualitativa e não consideravam as variáveis dependentes e independentes. Trabalho com estudo clínicos testados em animais também foram excluídos, bem como os de finalidade plástica estética e de remodelação óssea. Assim, 16 artigos foram eliminados de exploração integrativa.

A amostra de estudos analisadas e adicionadas através dos critérios de inclusão formou um conjunto de 13 artigos. Compostos por apenas um estudo de revisão de literatura sistemática e os demais trabalhos utilizaram desenhos de estudos de ensaios clínicos prospectivos randomizados (Tabela 2).

Tabela 2 - Artigos selecionados por meio de critérios de inclusão

	Autor	Título do artigo
S1	VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, (2010)	Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas.
S2	VILLELA; SANTOS, (2010)	Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: A systematic review
S3	SAAD SETTA <i>et al.</i> , (2011)	Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study
S4	SALAZAR- ÁLVAREZ <i>et al.</i> , (2014)	Uso de plasma rico en plaquetas para cicatrización de úlceras crónicas de miembros inferiores
S5	(EL-KOMY <i>et al.</i> , 2015)	Platelet-rich plasma for resistant oral erosions of pemphigus vulgaris: A pilot study
S6	RAMOS- TORRECILLAS <i>et al.</i> , (2015)	Effectiveness of platelet-rich plasma and hyaluronic acid for the treatment and care of pressure ulcers.
S7	(BABAEI <i>et al.</i> , 2017)	Management of chronic diabetic foot ulcers using platelet-rich plasma
S8	AHMED <i>et al.</i> , (2017)	Platelet-rich plasma for the treatment of clean diabetic foot ulcers
S9	MONEIB <i>et al.</i> , (2018)	Autologous platelet-rich plasma versus conventional therapy for the treatment of chronic venous leg ulcers: A comparative study
S10	ETUGOV; MATEEVA; MATEEV, (2018)	Autologous platelet-rich plasma for treatment of venous leg ulcers: a prospective controlled study.
S11	(LI <i>et al.</i> , 2019)	Platelet-rich plasma plays an antibacterial, anti-inflammatory and cell proliferation-promoting role in an in vitro model for diabetic infected wounds
S12	(FENG <i>et al.</i> , 2019)	Clinic effects of autologous platelet-rich plasma gel in the repair of chronic wounds
S13	ISSA, J.P.M <i>et al</i> 2007	A Possibility in Regenerative Therapy. Int. J. Morphol.

Fonte: autor

Em análise dos estudos, houve três maiores amostras; a primeira envolveu um número de 150 pacientes (S7), a segunda 100 pacientes (S6) e a última 76 (S12). No entanto, o segundo recebeu um tempo de seguimento curto, com período de 36 dias de acompanhamento após intervenção (S6); já o último foi observado por 3 a 4 meses (S12).

Todos os estudos apresentaram grupo controle e referiram as seguintes variáveis: tempo de evolução, tamanho e etiologia da ferida. Exclusivamente, 3 (23 %)

estudos apontaram como variável dependente a dor (S4, S5, S9); e 2 (15,38 %) a hipótese da ação antibacteriana presente no PRP (S8, S11). Um estudo comparou através de randomização o uso de PRP isolado com administração de uma única dose ou duas doses, e uso de PRP associado a ácido hialurônico (S6).

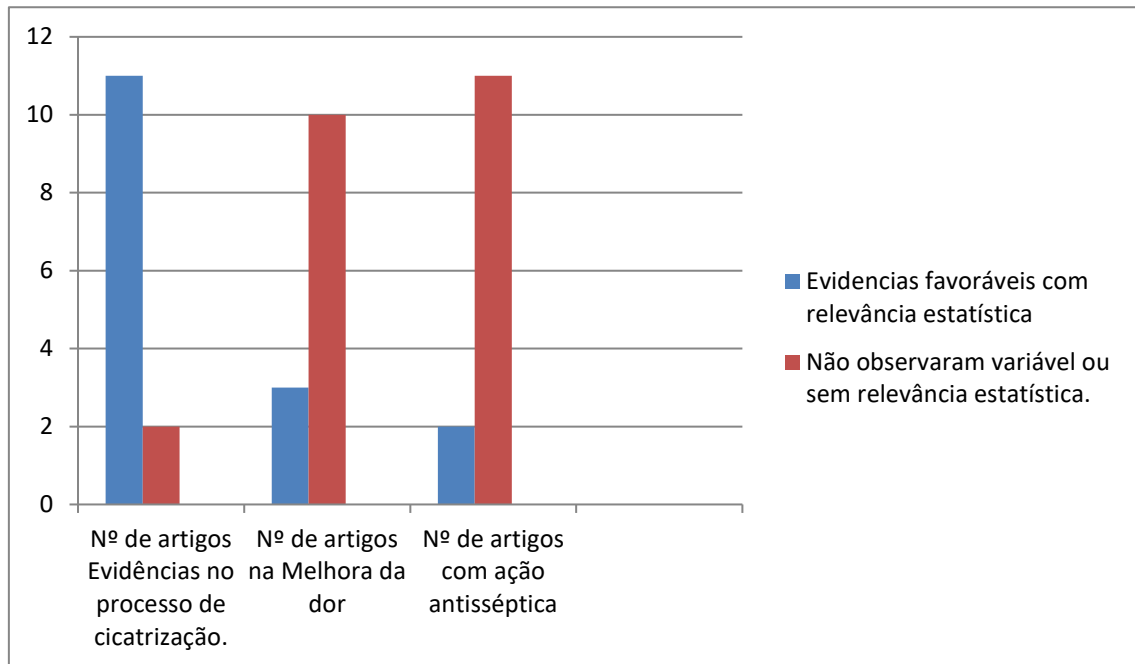
O manejo da intervenção adotada em cada estudo clínico não foi a mesma. Em 61,5 % dos trabalhos utilizou a aplicação de gel autólogo de PRP; e, 38,4 % optaram pela administração injetável do PRP, via subcutânea ou intradérmica. Mas em todas as maneiras de via de terapia proposta apresentavam o mesmo objetivo de avaliação do uso de PRP autólogo no processo de reparo de feridas.

Os trabalhos foram avaliados, principalmente, mediante as relações estatísticas de IC e sua probabilidade de significância (valor de p). O estudo S8, utilizou uma amostra de 56 pacientes com ferida diabética nos pés com idade entre 18 e 80 anos, com um grupo em uso de duas aplicações de PRP e outro controle com uso de pomada antisséptica. O grupo em uso de PRP indicou taxa de reparo completo de 85,7 % em relação ao grupo controle com taxa de 68 %. ($p = 0,041$) A taxa de reparo apresentou-se maior nas primeiras 8 semanas ($p < 0,05$) e sem significância estatística após 12 semanas ($p > 0,05$). O trabalho ainda evidenciou uma redução no número de infecções adquiridas durante o processo de regeneração da ferida com taxa de 3,5% no grupo de uso de PRP contra incidência de 21,4 % do grupo controle ($p = 0,011$).

A variável de qualificação da dor foi explorada e obtiveram-se resultados nos estudos S4, S5 e S9, com nível de evidência favorável e exclusão de hipótese nula (h_0). Em S4, as análises dos dados confirmaram o resultado de diminuição da dor e melhora física e mental da qualidade de vida dos pacientes em uso da terapêutica intervencionista com PRP ($p < 0,05$). Este estudo também concluiu que houve redução média da ferida de 59,8 % das feridas. Em S5 e S9, concluíram os resultados com afirmação de melhora subjetiva da dor.

Do total de 13 estudos analisados, todos evidenciaram que o PRP auxilia no processo de reparo. Deste, 86,6 % evidenciaram superioridade no processo de reparo de feridas, alguns com melhora em relação ao tempo ou evolução de redução do tamanho da ferida. Outros dois trabalhos (S10, S13) afirmaram que existe uma relação verdadeira entre o auxílio do PRP no processo de reparo, mas sem relevância estatística por análise de medidas de associação com IC. Necessitando, dessa forma, de ensaios com valor amostral maior que os estudados.

Figura 2 - Relação dos artigos encontrados e seus resultados



Fonte: autor

3.1.4 Discussão

Segundo a classificação de *Oxford Centre for Evidenci-Based medicine*, a revisão sistemática de literatura com homogeneidade realizada sobre a análise fidedigna de ensaios clínicos controlados e randomizados são considerados o melhor grau de evidência científica (A1) para a aplicação na medicina baseada em evidências (VILLELA; SANTOS, 2010).

Os estudos experimentais como os ensaios clínicos randomizados são desenhos de estudos importantes e adequados para fornecer evidências científicas para a prática clínica. No entanto, esses estudos exigem uma avaliação criteriosa quanto as condições de aplicação do estudo, a análise dos riscos da população estudada, os critérios de randomização; além de, do número da amostra e o período de acompanhamento, sujeitos a perdas durante o experimento e à vieses.

Dessa forma, a análise criteriosa e a busca de literatura científica para a produção de revisões de literatura mostram-se indispensável na formulação e investigação de hipóteses clínicas. O estudo clínico randomizado (S7), foi composto por amostra de 150 participantes com resultados apresentando IC estreito de 9,8; indicando estimativas mais precisavas. Visto que o nível de confiança de 95 % (IC),

informando assim que a probabilidade dos resultados for verdadeira é de 95 vezes (BABAEI *et al.*, 2017).

As feridas de difícil reparo interferem na qualidade de vida do paciente, além de serem causas de complicações mais severas com amputação do membro ou sepse. A sua resolução não segue um padrão ordenado de estágios e não apresenta tempo mensurável previsível. Sendo que as maiores incidências das feridas são de origem venosa, diabética e por pressão. Caracterizando, assim, uma comorbidade com necessidade de investigação para tratamentos mais eficazes e com mais custo de manejo e elaboração (SAAD SETTA *et al.*, 2011).

O PRP autólogo possui diversas atribuições favoráveis para o processo de reparo de tecidos. As aplicações clínicas em estudos controlados podem observar ainda outros marcadores específicos que atuam no reparo de feridas (WELLER *et al.*, 2019). Os mediadores ativados por ação plaquetária recrutam fatores de crescimento e estimulam diferentes processos celulares, fornecendo assim sua ação na reparação.

3.1.5 Conclusão

Esta revisão sistemática mostra que, existe evidência científica verdadeira com relação ao uso do PRP e o processo de reparo de feridas. Os resultados foram positivos em concordância com as taxas de reparo das feridas. O uso do gel autologo de PRP ganhou destaque no número de trabalho descritos, apresentando também resultados de diminuição da área de tamanho das feridas com evidências científicas significativas. Sendo assim, sua aplicação tópica com eficácia semelhante e/ou igualitária em relação a administração via parenteral.

Os ensaios clínicos continuam com grande importância para o caso em questão, bem como revisões de literatura sistemáticas para o recrutamento de informações e aumento de evidências a cerca do assunto. O PRP apresenta grande potencial de terapeutica opcional no cuidado e no processo de reparo de feridas crônicas.

4 ESTUDO II

4.1 EFETIVIDADE DE DIFERENTES PROTOCOLOS NA RECUPERAÇÃO DE PLAQUETAS

Resumo: Plasma Rico em Plaquetas (PRP) significa um concentrado de plaquetas em um pequeno volume de plasma. Esse concentrado de plaquetas é resultado de um processo de centrifugação, para sedimentar constituinte celulares, com base em diferentes gravidades específicas. As recomendações atualizadas no preparo do concentrado de plaquetas são as de considerar força gravitacional (g) e tempo. Assim, o estudo teve como objetivo verificar a viabilidade de reproduzir dois protocolos variando força/velocidade e tempo na taxa de recuperação do PRP após centrifugação. Para isso, foi verificado a reprodutibilidade de protocolos em duas centrifugas diferentes, uma com ângulo de rotor fixo e a outra com ângulo variável. Os resultados demonstraram que o protocolo que utilizou força de centrifugação de 400 e 800 g, ambos por 10 minutos, em uma centrifuga com rotor de 14 cm e ângulo fixo conseguiu recuperar maior número de plaquetas. Assim, pode-se sugerir que para os protocolos de preparação de PRP terem sua reprodutibilidade confiável é necessário publicação de protocolos detalhados com informação de força gravitacional, tempo de centrifugação e ângulo do rotor.

Palavras-Chave: Plasma rico em plaquetas, contagem de plaquetas, centrifugação.

4.1.1 Introdução

O plasma rico em plaquetas (PRP) ou também conhecido plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas ou plasma autógeno de plaquetas é um produto biológico produzido a partir de um processo de centrifugação de sangue autólogo, permitindo a extração de plasma com uma concentração de três a cinco vezes maior de plaquetas em relação a sua quantidade no sangue basal (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009)..

Ainda não há definição absoluta do número de plaquetas necessário para um estímulo regenerativo. Idealmente, a concentração de plaquetas deve estar perto de 1.000.000 de plaquetas/mL (DHURAT; SUKESH, 2014; EVERTS *et al.*, 2006; MARX, 2000; MAZZOCCA *et al.*, 2012). Da mesma forma, não há padronização na preparação do PRP. Vários estudos relataram diferentes protocolos de obtenção de PRP usando diferentes velocidades, força g e tempo de centrifugação (CARMONA; LÓPEZ, 2011; RAMÍREZ, 2006). Essa divergência de protocolos associada a

informações insuficientes para permitir reprodutibilidade tem dificultado a padronização de preparação do PRP, e assim, retardando a implementação eficaz dessa terapêutica na clínica.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo verificar a viabilidade de reproduzir dois protocolos variando forças/velocidade e tempo na taxa de recuperação do PRP após centrifugação.

4.1.2 Material e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (CEP 3.782.391) e seguiu as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS nº. 196/96 e suas complementares).

Foram recrutados 20 voluntários previamente hígidos com contagem de plaquetas dentro do intervalo de referência $150 - 450 \cdot 10^3$ uL para participar do estudo. Foram excluídos voluntários que referiram uso de anticoagulantes orais e/ou com tendências hemorrágicas ou que se apresentaram doenças sistêmicas: diabetes mellitus, hipertensão arterial, neoplasias malignas, lupus eritematoso sistêmico. Foram excluídas ainda, voluntárias que se apresentavam em estado gestacional ou em lactância.

Após explanado os objetivos da pesquisa aos voluntários e obtendo termo de consentimento livre e informado assinado, o sangue foi coletado por venopunção cubital em tubo para coleta a vácuo apropriado para cada amostra. Foi realizado a coleta de 10 mL de sangue divididos em 3 frascos: o primeiro frasco, 1 mL. Neste tubo há presença de EDTA k2 jateado na parede e são utilizados para rotinas de hematologias– hemograma mais contagem de plaquetas. Este tubo foi utilizado para quantificação basal do PRP.

Em seguida, foi coletados dois tubos, contendo citrato de sódio 3,2% (1:9) tamponado. Foi coletado 4,5 mL de sangue em cada tubo, empregado na preparação do PRP.

Para a realizar a preparação do PRP foram utilizadas duas diferentes centrifugas: 1) foi utilizado centrífuga Centri lab digital modelo CE1161, velocidade ajustável – 0 a 5000 rpm com raio de 14 cm e rotor ângulo fixo; com 10 pacientes; 2) foi utilizado centrífuga Kasvi digital mod. Ce800, velocidade ajustável de 100 a

4000 rpm com raio de 14 cm e ângulo variável, com 10 pacientes. Ainda, foi realizado a variação de força/velocidade e tempo de centrifugação baseado nos protocolos publicados (MAIA, 2008) e (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010).

Acondicionou-se em tubos de 4,5 ml com anticoagulante EDTA. Esse sangue foi submetido a uma primeira centrifugação com força 300g durante 5 minutos numa centrífuga raio de 14 cm de ângulo fixo; a segunda centrifugação foi submetido a uma força 640g durante 5 minutos na centrífuga com raio de 14 cm de ângulo fixo/ ângulo variável (protocolo I e III); O protocolo II e IV, variou força de 400g no tempo de 10 minutos na centrífuga raio de 14 cm de ângulo fixo/variável, força de 800g, tempo de 10 minutos, raio de 14 cm de ângulo fixo/variável em primeira e segunda centrifugação respectivamente.

Assim, as amostras de sangue foram distribuídas em quatro grupos, utilizado os protocolos descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros para centrifugação sanguínea

	Primeira		Segunda		Centrifuga	
	centrifugação		centrifugação			
	Força (g)	Tempo (Min)	Força (g)	Tempo (Min)	Raio (cm)	Ângulo
Protocolo I	300 g	5	640 g	5	14	Fixo
Protocolo II	400 g	10	800 g	10	14	Fixo
Protocolo III	300 g	5	640 g	5	14	Variável
Protocolo IV	400 g	10	800 g	10	14	Variável

Fonte: autor

Após a primeira centrifugação forma-se três fases: uma inferior vermelha, com as hemácias, imediatamente acima dessa fase há uma estreita faixa esbranquiçada, chamada zona de névoa (*buffy coat*). Por último, forma a fase superior, amarela, com o plasma. Então, é removido o sobrenadante da fase superior juntamente com a zona de névoa, sem hemácias com auxílio de micropipeta monocanal. Em seguida, será realizado novo procedimento de centrifugação, conforme cada protocolo testado. Após essa segunda centrifugação, o plasma sobrenadante foi descartado mantendo

apenas 10 % do volume total sangue inicial – 0,45 mL depositados em microtubos para a contagem plaquetária.

A normalidade de distribuição de todas as variáveis foi verificada Teste W de *Shapiro-Wilk*. Comparações entre grupos com distribuição não paramétrica foram realizadas usando o teste *Mann-Whitney*. *Graph Prism* software foi usado para realizar a análise estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.1.3 Resultados

Para o estudo 20 voluntários de ambos os sexos com idade que variam entre 25 a 50 anos foram selecionados. A contagem inicial dos componentes sanguíneos estava dentro da faixa normal de valores. Os resultados da concentração de PRP estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da contagem de plaquetas usando as diferentes técnicas de preparação de PRP

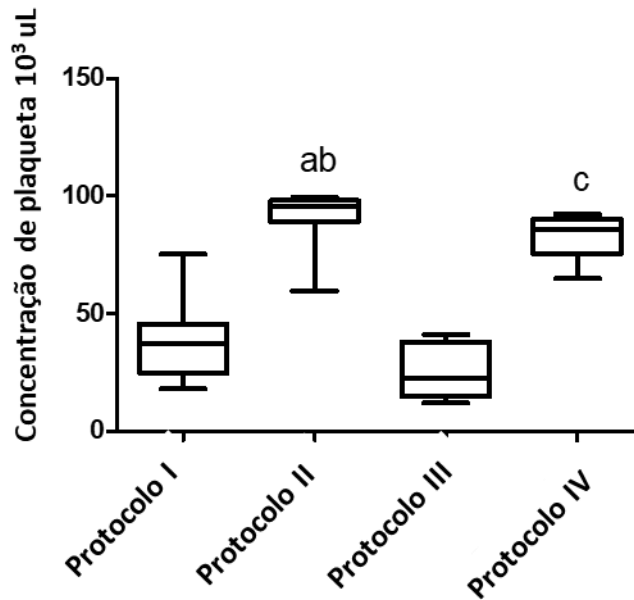
	Basal	Protocolo I	Protocolo II	Protocolo III	Protocolo IV
Média concentração plaquetas ± DP (valor de referência)	242,22±60,61 (150 – 450)	94,55±41,28	221,88±37,10	61,28±26,10	197,12±68,12

Fonte: autor

Pode ser observado, na figura 3, que os protocolos que utilizaram maior força/velocidade e tempo de centrifugação (protocolo II e IV) promoveram a concentração de plaquetas estatisticamente maior quando comparado ao protocolo I e III, respectivamente. Assim, os protocolos I e III recuperaram uma média de 38 e 22 % das plaquetas, nesta ordem. Entretanto os protocolos II e IV conseguiram recuperar uma média de 90 e 83 % das plaquetas.

Quando comparou a reprodutibilidade dos protocolos, ou seja, a realização dos mesmos protocolos em centrifugas diferentes, observou-se que o protocolo II apresentou diferença na concentração de PRP quando comparado ao protocolo IV.

Figura 3 - Recuperação de Plasma Rico em Plaquetas



^adiferença estatística comparado ao protocolo I ($p < 0,0001$); ^bdiferença estatística comparado ao protocolo IV ($p = 0,0002$); ^cdiferença estatística comparado ao protocolo III ($p = 0,0274$).

4.1.4 Discussão

Apesar das crescentes aplicações do PRP para o reparo tecidual tanto em animais como em humanos, a diversidade de protocolos causa dificuldades na comparação e/ou reprodução de resultados. Assim, o presente estudo reproduziu dois protocolos verificando a influência de forças/velocidade, tempo e variação de centrifuga na taxa de recuperação do PRP. Desta forma, o presente estudo demonstrou que os protocolos que utilizaram força/velocidade e tempo de centrifugação maior, tiveram uma recuperação melhor de PRP.

É relatado que a taxa de recuperação do PRP é afetada pela velocidade e tempo de centrifugação (CHAHLA *et al.*, 2017; DENFORS *et al.*, 1991). Assim, na literatura encontramos diversos protocolos de obtenção do PRP e muitas publicações descrevem que obtêm a recuperação de PRP em altas concentrações (ANDRADE *et al.*, 2008).

A busca de técnicas para a obtenção de PRP com custos menores fez surgir alguns métodos mais simples, com tubos de ensaio e uma centrífuga comum, que permitem a preparação do PRP. A centrífuga é o equipamento base para o processo

de sedimentação das plaquetas, e cada equipamento pode variar conforme o tipo de rotor, assim, a velocidade é fornecida em RCF (*relative centrifugal*) ou força gravitacional (força g) ou em rotações por minuto (rpm) (LAURITZEN, 1992; ROSA; GAUTO; GONÇALVES, 2013).

Dentre os diversos tipos de rotores, os mais comuns em centrífugas de laboratório de análises clínicas são os de ângulo fixo ou variável. Nas centrífugas de ângulo fixo, a amostra é colocada a um determinado ângulo ao plano de rotação; trabalham mais rápido, pois a força é aumentada. Na centrífuga de ângulo variável o movimento é mais suave, o que possibilita a formação de gradientes e camadas mais definidas, porém o processo de sedimentação é mais demorado (COMPRI-NARDY *et al.*, 2009). Assim, é sugerido que a diversidade de centrífuga utilizada na recuperação de PRP possa influenciar nos resultados disponíveis na literatura e apresentar resultados contraditórios.

Outro fator que pode influenciar na dificuldade de padronização dos protocolos de PRP é a força de centrifugação que tem como unidade de medida a força da gravidade (g) (COMPRI-NARDY *et al.*, 2009). Até então este era o fator mais importante para a separação dos componentes sanguíneos citados em vários outros estudos com fortes indicadores de padronização (GUILDELINES, 2011). O processo de extração de um maior número de plaquetas depende da velocidade de centrifugação e rotor (raio e ângulo) da centrífuga (ZUBRICK, 2016). No entanto, trabalhos que relatam apenas a velocidade de centrifugação, sem caracterizar a centrífuga utilizada, como, o tipo de rotor fornece, informações incompletas para reprodução da metodologia.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de padronização e publicação detalhada dos protocolos utilizados, uma vez que a ausência de minuciosidade destes estudos faz com que o preparo do PRP permaneça, ainda, um procedimento experimental, apesar de sua promissora aplicação na regeneração tecidual.

4.1.5 Conclusão

Pode-se sugerir que para realizar a reprodutibilidade dos protocolos de preparação de PRP ainda são necessários mais estudos que publiquem os protocolos detalhados da preparação da PRP. Uma vez que, que apenas dos protocolos utilizados foi capaz de recuperar plaquetas com maior concentração. Ainda, os

resultados apontam que além da força de gravidade e tempo para centrifugação, o ângulo do rotor também pode influenciar na preparação de PRP.

5 Considerações Finais

As evidências atuais apontam para a terapia com o concentrado de PRP como um tratamento eficaz para pacientes com feridas de pé diabéticos. Sugerem que os fatores de crescimento aumentam a probabilidade de reparação completa de feridas nos pés de pessoas diabéticas e como resultado diminuição da dor, diminuição da infecção amputação do membro afetado; uma melhora na qualidade de vida. Contudo, os estudos pré-clínicos e clínicos não oferecem consenso em relação aos métodos de extração do PRP e não apresentam um protocolo ideal de centrifugação. Existe uma gama de protocolos publicados com avaliação de tempo, velocidade e força de centrifugação. Essa variação de protocolos tem dificultado a utilização do PRP na prática clínica, uma vez que o presente estudo demonstrou que a característica da centrífuga como angulação-tubo rotor e raio influenciam na recuperação do PRP. O comportamento dinâmico dos rotores deverá ser motivo de atenção na extração do PRP. Os modelos são fabricados cada vez mais leves e com velocidades maiores. A determinação da frequência e modo de vibração de rotores, variáveis ou fixos alteram o resultado de sedimentação, portanto, exige conhecimento do seu desempenho. As diferenças nos desenhos de estudos sugerem a necessidade de um consenso de modelo factível e seguro para otimização futura do PRP.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRADI, H. et al. Treatment of 100 chronic thalassemic leg wounds by plasma-rich platelets. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 2, p. 171–175, 2017.
- AHMED, M. et al. Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Clean Diabetic Foot Ulcers. **Annals of Vascular Surgery**, v. 38, p. 206–211, 2017.
- ALBUQUERQUE, D. et al. Aplicação clínico-cirúrgica do plasma rico em plaquetas – estudo revisional. **Odontologia Clinico Cientifica**, v. 2, n. 7, p. 119–122, 2008.
- ALIO, J. L. et al. Autologous Fibrin Membrane Combined With Solid Platelet-Rich Plasma in the Management of Perforated Corneal Ulcers. **JAMA Ophthalmology**, v. 131, n. 6, p. 745, 2013.
- ALIO, J. L.; RODRIGUEZ, A. E.; WRÓBELDUDZIŃSKA, D. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 26, n. 4, p. 325–332, 2015.
- AMABLE, P. R. et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2013.
- ANDRADE, M. G. S. et al. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 105, n. 1, 2008.
- ATLAS, I. D. F. D. **463 PEOPLE LIVING WITH DIABETES million**, 2019.
- AFRADI, H. *et al.* Treatment of 100 chronic thalassemic leg wounds by plasma-rich platelets. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 2, p. 171–175, 2017. .
- BABAEI, V. et al. Management of chronic diabetic foot ulcers using platelet-rich plasma. **Journal of Wound Care**, v. 26, n. 12, p. 784–787, 2017.
- BARBOSA, A. et al. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v. 5, n. 38, p. 1335–1340, 2008.
- BOWKER, J.; PFEIFER, M. **Levin and O’Neal’s The Diabetic Foot**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 2005.
- BOWKER, J.; PFEIFER, M. **Levin and O’Neal’s The Diabetic Foot**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- CAMELI, N. et al. Autologous Pure Platelet-Rich Plasma Dermal Injections for Facial Skin Rejuvenation. **Dermatologic Surgery**, v. 43, n. 6, p. 826–835, 2017.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment for Shoulder Injury in a Horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 9, p. 506–

510, 2011.

CERVELLI, V. et al. Application of Platelet-Rich Plasma in Plastic Surgery: Clinical and In Vitro Evaluation. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 4, p. 625–634, 2009.

CHAHLA, J. et al. A Call for Standardization in Platelet-Rich Plasma Preparation Protocols and Composition Reporting. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 99, n. 20, p. 1769–1779, 2017.

CHEN, W.-H. et al. Tissue-engineered intervertebral disc and chondrogenesis using human nucleus pulposus regulated through TGF- β 1 in platelet-rich plasma. **Journal of Cellular Physiology**, v. 209, n. 3, p. 744–754, 2006.

COMPRI-NARDY et al. **Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica: Uma Visão Integrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DENFORS, I. et al. THE EFFECT OF CENTRIFUGATION TIME AND GRAVITATIONAL FORCE ON PLATELET YIELD AND PLATELET VOLUME DISTRIBUTION IN PLATELET-RICH PLASMA (PRP) OBTAINED BY DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION. **Thrombosis research**, v. 61, p. 463–468, 1991.

DEROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, p. 276–281, 2009.

DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 7, n. 4, p. 189, 2014.

DIONYSSIOU, D. et al. The effectiveness of intralesional injection of platelet-rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers: an experimental and clinical study. **International Wound Journal**, v. 10, n. 4, p. 397–406, 2013.

EL-KOMY, M. H. M. et al. Platelet-rich plasma for resistant oral erosions of pemphigus vulgaris: A pilot study. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 6, p. 953–955, 12 nov. 2015.

ETUGOV, D.; MATEEVA, V.; MATEEV, G. Autologous platelet-rich plasma for treatment of venous leg ulcers: a prospective controlled study. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 3, n. 32, p. 593–597, 2018.

ETULAIN, J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. **Platelets**, v. 29, n. 6, p. 556–568, 2018.

EVERTS, P. A. M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. **Journal of Extra-Corporeal Technology**, v. 38, n. 2, p. 174–187, 2006.

FENG, G. et al. Clinical effects of autologous platelet-rich plasma gel in the repair of chronic wounds. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi**, v. 6, n. 35, p. 451–455, 2019.

FERES JUNIOR, F. et al. Análise Comparativa do Índice de Sucesso dos Implantes Osteointegrados com e sem a Utilização de PRP, no Protocolo de Fixação. **Semina:**

Ciências Biológicas e da Saúde, v. 25, n. 1, p. 9, 2004.

FOSS-FREITAS, M. C.; MARQUES JUNIOR, W.; FOSS, M. C. Neuropatia autonômica: uma complicação de alto risco no diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 398–406, 2008.

GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. **Goldman's Cecil Medicine**. 25. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.

GREGG, E. W.; SATTAR, N.; ALI, M. K. The changing face of diabetes complications. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 6, p. 537–547, 2016.

GUILDELINES. Guidelines for the Use of Platelet Rich Plasma.

GULLUNG, G. et al. Platelet-rich plasma effects on degenerative disc disease: analysis of histology and imaging in an animal model. **Evidence-Based Spine-Care Journal**, v. 2, n. 04, p. 13–18, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HERSANT, B. et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma combined with hyaluronic acid on skin facial rejuvenation: A prospective study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 3, p. 584–586, 2017.

HOFFBRAND, A. V. .; PETTIT, J. E. .; MOSS, P. A. H. **Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2014. Disponível em: <<ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>

ISSA, J. P. M. et al. PRP: A Possibility in Regenerative Therapy. **Int. J. Morphol.**, v. 25, p. 587–590, 2007.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 1–18.

JAMES, R. et al. Efficacy of Activated 3X Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Androgenic Alopecia. **Journal of Stem Cells**, v. 4, n. 11, p. 191–199, 2015.

KASPER, D. L. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 19. ed. New York: McGraw-Hill Professional Publishing, 2015.

LAURITZEN, M. Quantities centrifugation laboratory. **Journal of automatic chemistry**, v. 14, n. 3, p. 93–96, 1992.

LAZARUS, G. S. et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Arch Dermatol**, v. 4, n. 130, p. 489–93, 1994.

LI, T. et al. Platelet-rich plasma plays an antibacterial, anti-inflammatory and cell proliferation-promoting role in an in vitro model for diabetic infected wounds. **Infection**

and Drug Resistance, v. Volume 12, p. 297–309, 2019.

LÓPEZ-PLANDOLIT, S. et al. Plasma Rich in Growth Factors as a Therapeutic Agent for Persistent Corneal Epithelial Defects. **Cornea**, v. 29, n. 8, p. 843–848, 2010.

LÓPEZ, J. et al. Plasma rico en factores de crecimiento y regeneración ósea. **Dentum**, v. 7, n. 3, p. 108–112, 2007.

LOSI, P. et al. Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7814–7821, 2013.

LYRA, R. et al. **Sociedade Brasileira de Diabetes Diabetes Mellitus Tipo 1 e Tipo2**, 2020.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em eqüinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2008..

MARX, R. E. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 3, p. 300–301, 2000.

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

MARTINO, M. M. *et al.* Engineering the Growth Factor Microenvironment with Fibronectin Domains to Promote Wound and Bone Tissue Healing. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 100, p. 100ra89-100ra89, 2011.

MAYDANA, A. V. et al. Possíveis fatores etiológicos para desordens temporomandibulares de origem articular com implicações para diagnóstico e tratamento. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 15, n. 3, p. 78–86, 2010.

MAZZOCCA, A. D. et al. Platelet-Rich Plasma Differs According to. **The Journal of bone and joint surgery**, v. 94-A, n. 4, p. 308–316, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual do pé diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica.** Ministério da Saúde, 2016. Disponível em:

<http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/manual_do_pe_diabetico.pdf>

MONEIB, H. A. et al. Autologous platelet-rich plasma versus conventional therapy for the treatment of chronic venous leg ulcers: A comparative study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 495–501, 2018.

MOREIRA, R. O. et al. Sintomas depressivos e qualidade de vida em pacientes diabéticos tipo 2 com polineuropatia distal diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 9, p. 1103–1111, 2009.

NUNES FILHO, D. P. et al. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Implant News**, v. 3, n. 4, p. 263–269, 2007.

PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1202–1205, 2007.

PARK, J.; HWANG, S.; YOON, I.-S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1259, 2017.

RAMÍREZ, J. U. C. **Use of autologous plateled concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse**. [s.l.] Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.

RAMOS-TORRECILLAS, J. et al. Effectiveness of Platelet-Rich Plasma and Hyaluronic Acid for the Treatment and Care of Pressure Ulcers. **Biological Research For Nursing**, v. 17, n. 2, p. 152–158, 2015.

ROSA, G.; GAUTO, M.; GONÇALVES, F. **Química Analítica**. Bookman ed. Rio de Janeiro: Tekne, 2013.

ROZMAN, P.; BOLTA, Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica**, v. 16, n. 4, p. 156–165, 2007.

SAAD SETTA, H. et al. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. **International Wound Journal**, v. 8, n. 3, p. 307–312, 2011.

SALAZAR-ÁLVAREZ, A. E. et al. Uso de plasma rico en plaquetas para cicatrización de úlceras crónicas de miembros inferiores. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 105, n. 6, p. 597–604, 2014.

TRINK, A. et al. A randomized, double-blind, placebo- and active-controlled, half-head study to evaluate the effects of platelet-rich plasma on alopecia areata. **British Journal of Dermatology**, v. 169, n. 3, p. 690–694, 2013.

VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, T. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Rev. Bras. Cir. Plást**, v. 2, p. 212–8, 2009.

VENDRAMIN, F. S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24–28, 2006.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (Impresso)**, v. 25, n. 4, p. 589–594, 2010.

VILLELA, D. L.; SANTOS, V. L. C. G. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: A systematic review. **Growth Factors**, v. 28, n. 2, p. 111–116, 2010.

WELLER, C. D. et al. Autologous platelet-rich plasma for healing chronic venous leg ulcers: Clinical efficacy and potential mechanisms. **International Wound Journal**, v. 16, n. 3, p. 788–792, 2019.

WHITLOW, J. et al. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v. 23, n. 5, p. 283–289, 2008.

WU, C. et al. The Neuroprotective Effect of Platelet-rich Plasma on Erectile Function in Bilateral Cavernous Nerve Injury Rat Model. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n. 11, p. 2838–2848, 2012.

YIN, W. Inhibitory Effects of Platelet-Rich Plasma on Intervertebral Disc Degeneration: A Preclinical Study in a Rabbit Model. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 1368–1375, 2015.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88–98, 2018.

ZUBRICK, J. W. **Manual de Sobrevivência no Laboratório de Química Orgânica-Guia de Técnicas para o Aluno**LTC Exatas Didático, , 2016.