



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Estudo da atividade antimicrobiana da fibrina rica em plaquetas (PRF) de  
origem canina**

**Bárbara Paulino Varela Leal  
Coimbra, julho de 2022**



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Estudo da atividade antimicrobiana da fibrina rica em plaquetas (PRF) de  
origem canina**

Coimbra, julho 2022

Bárbara Paulino Varela Leal

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

**Presidente do Júri:**

Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da  
Silveira

**Arguente:**

Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva

**Orientador:**

Professor Doutor Hugo Corte-Real Vilhena

**Orientador Interno**

Professor Doutor Hugo Vilhena

**Coorientadores Internos**

Professora Doutora Sofia Anastácio

Dr.<sup>a</sup> Carla Soares

**Orientador Externo**

Dr. Luís Barros

(Clínica Veterinária Vetlameações)

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao  
Grau de Mestre em Medicina Veterinária na EUVG

Dedico esta dissertação de mestrado à minha família, pai, mãe, Bruno, por todos os esforços que fizeram por mim e pelo apoio prestado em todas as etapas do meu percurso.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradecer à Instituição EUVG que me deu oportunidade de fazer o curso dos meus sonhos e que me deu a conhecer colegas e professores fantásticos.

Ao professor Hugo Vilhena que esteve sempre prestável em todo o processo da minha dissertação, foi um dos grandes pilares neste projeto, assim com a Doutora Carla, por ter estado sempre disponível para mim e para as minhas dúvidas, a qualquer hora do dia e pelo interesse que demonstrou por este trabalho. Também a ajuda da Professora Sofia Anastácio e as horas que tirou para me ajudar na parte laboratorial foram essenciais para este estudo.

A toda a Equipa VetLamações, um grande obrigado, por toda a partilha de conhecimento, paciência e amizade, em especial ao Professor Luís Barros pelo apoio que me deu e pelos valores que me ensinou tanto nas aulas como no estágio final.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos, bons e maus e por acreditarem sempre que eu era capaz. Ao meu irmão pelo orgulho oculto que tem por mim e pela força que me dá. Aos meus cãesinhos, Sapic e Bia pelas corridas e beijinhos de felicidade que me davam quando eu chegava a casa depois de uma semana em Coimbra.

Ao Diogo por todo o carinho, apoio, por ter sempre acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditava e por ter sido o meu ombro seguro todos os dias sem exceção, obrigada por tudo.

À minha família por me apoiar ao longo destes 6 anos. Ao meu afilhado Duarte, por me conseguir animar em qualquer altura com aquele sorriso e alegria de criança.

Ao Jaime, Almeida Jorge e Raquel pelas conversas no desigual e brindes sobre a amizade que me levantavam em dias menos bons. Ao meu grupo de amigos de Paços de Ferreira pelas conversas e saídas à noite que me faziam esquecer todos os meus problemas. À Carol pelo apoio, amizade incondicional e momentos inesquecíveis que temos juntas desde quase sempre. À Carina por todos os momentos e memórias que criamos juntas.

Ao meu grupo de amigas da faculdade pelos desabafos nos momentos mais complicados do nosso percurso e pelos empurrões de motivação que me ajudou a chegar até ao final.

E por último, ao meu Mufasa, por ser o meu companheiro eterno, pelo amor incondicional que me dá e pela companhia nos dias mais difíceis.

## **Índice**

<b>Introdução.....</b>	<b>6</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>7</b>
<i>Colheita de sangue.....</i>	<i>7</i>
<i>Preparação dos PRF e Soro Autólogo .....</i>	<i>8</i>
<i>Pesquisa de atividade antibacteriana.....</i>	<i>8</i>
<i>Análise Estatística.....</i>	<i>9</i>
<b>Resultados.....</b>	<b>10</b>
<i>Caracterização da população dadora.....</i>	<i>10</i>
<i>Obtenção dos PRF .....</i>	<i>11</i>
<i>Halos de inibição do crescimento bacteriano .....</i>	<i>11</i>
<b>Discussão .....</b>	<b>14</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>20</b>
<i>Anexo I.....</i>	<i>26</i>
<i>Anexo II.....</i>	<i>28</i>
<i>Anexo III.....</i>	<i>30</i>
<i>Anexo IV .....</i>	<i>33</i>

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Caracterização e dados hematológicos da população dadora.....	10
Tabela 2. Correlação entre idade, peso, sexo, estado reprodutivo, raça, plaquetas e leucócitos dos doadores e a inibição do crescimento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> .....	13
Tabela 3. Correlação entre idade, peso, sexo, estado reprodutivo, raça, plaquetas e leucócitos dos doadores e a inibição do crescimento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	13
Tabela 4. Correlação entre idade, peso, sexo, estado reprodutivo, raça, plaquetas e leucócitos dos doadores e a inibição do crescimento bacteriano de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	14
Tabela 5. Diferenças entre plasma rico em plaquetas e fibrina rica em plaquetas. ....	15
Tabela 6. Leituras dos halos de inibição em placas Mueller-Hinton inoculadas com <i>Escherichia coli</i> às 24 horas, 48 horas e 72 horas após incubação.....	30
Tabela 7. Leituras dos halos de inibição em placas Mueller-Hinton inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> às 24 horas, 48 horas e 72 horas após incubação. ....	31
Tabela 8. Leituras dos halos de inibição em placas Mueller-Hinton inoculadas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> às 24 horas, 48 horas e 72 horas após incubação. ....	32
Tabela 9. Medições dos halos de inibição de fibrina rica em plaquetas e soros autólogos.....	33
Tabela 10. Medição dos halos de inibição dos controlos positivo e negativo. ....	33

## Índice de Figuras

Figura 1. a) Coágulo de fibrina rica em plaquetas polimerizado, após o período de repouso; b) Coágulo de fibrina rica em plaquetas antes a remoção da fração vermelha; c) Coágulo de fibrina rica em plaquetas após a remoção da fração vermelha.....	7
Figura 2. Etapas do procedimento desde a colheita de sangue até à inoculação de fibrina rica em plaquetas e soros autólogos correspondentes em placas com Agar Mueller-Hinton previamente inoculadas com suspensão bacteriana.....	9
Figura 3. a) Fibrina rica em plaquetas não polimerizado, hemolisado, após 60 minutos de repouso; b) fobrina rica em plaquetas polimerizado, após 60 minutos de repouso; c) Fibrina rica em plaquetas polimerizado, antes do corte em 4 amostras; d) Fibrina rica em plaquetas cortado em 4 porções iguais. ....	11

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. <i>Boxplots</i> com representação da mediana e intervalo interquartil dos halos de inibição do crescimento bacteriano da fibrina rica em plaquetas sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
--	----

## Lista de Abreviaturas

**μL** – Microlitros

**A – PRF** – Fibrina Rica em Plaquetas Avançada (do inglês *Advanced-Platelet Rich Fibrin*)

**b.** – Estirpe b

**CGF** – Concentrado de Fatores de Crescimento (do inglês *Concentrated Growth Factor*)

**EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*)

**EUCAST** – Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

**FG** – Cola de Fibrina (do inglês *Fibrin Glue*)

**FRC** – Força Relativa de Centrifugação

**g** – Aceleração relativa à Gravidade da Terra

**GM-CSF**–Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

**IL** – Interleucina

**IQR** – Variação Interquartil (do inglês *Interquartil Range*)

**Kg** – Quilograma

**LSCC** – Velocidade baixa de centrifugação (do inglês *Low Speed Concentration Concept*)

**MH** – Mueller-Hinton

**mL** – mililitros

**mm** - milímetros

**MRSA** - *Staphylococcus Aureus* Resistente à Meticilina (do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

**NaCl** – Cloreto de sódio

**°C** – graus Celsius

**p – value** – Valor de significância estatística

**PC** – Concentrado de Plaquetas (do inglês *Platelet Concentrated*)

**PDP** – Produtos Derivados de Plaquetas

**PLT** – Plaquetas

**PPP** – Plasma Pobre em Plaquetas

**RBC** – Eritrócitos ou Glóbulos vermelhos (do inglês *Red Blood Cells*)

**PRF**–Fibrina Rica em Plaquetas (do inglês *Platelet-Rich Fibrin*)

**PRGF** – Plasma Rico em Fatores de Crescimento (do inglês *Plasma Rich in Growth Factors*)

**PRP** – Plasma Rico em Plaquetas

**rpm** – Rotações Por Minuto

**rs** - Coeficiente de Spearman

**spp.** – Espécies

**SRD** – Sem Raça Definida

**TGF- $\beta$**  - Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$  (do inglês *Transforming growth factor  $\beta$* )

**TNF**– Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor necrosis factor*)

**TSA** – Teste de Sensibilidade a Antibióticos

**VEGF** – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (do inglês *Vascular endothelial growth factor*)

**WBC** – Leucócitos ou Glóbulos Brancos (do inglês *White Blood Cells*)

## **Estudo da atividade antimicrobiana da fibrina rica em plaquetas (PRF) de origem canina**

Bárbara Leal<sup>1</sup>, Carla Soares<sup>2,3</sup>, Susana Faria<sup>4</sup>, Sofia Anastácio<sup>5,7</sup>, Luís Barros<sup>2</sup>, Hugo Vilhena<sup>3,6,7</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama e Centro de Investigação Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário-Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([bpvleal08@gmail.com](mailto:bpvleal08@gmail.com)) ([hugo.vilhena@euvg.pt](mailto:hugo.vilhena@euvg.pt))*

<sup>2</sup> *VetLamações, Clínica veterinária, Avenida D. João II 139, 4715-303, Braga, Portugal ([carlasoares.medvet@gmail.com](mailto:carlasoares.medvet@gmail.com)) ([luiscmbarros23@gmail.com](mailto:luiscmbarros23@gmail.com))*

<sup>3</sup> *Animal and Veterinary Research Centre (CECAV), AL4AnimaLS, Department of Veterinary Sciences, School of Agricultural and Veterinary Sciences, University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal*

<sup>4</sup> *Departamento de Matemáticas, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Guimarães, Campus de Azurém – 4800-058 Guimarães*

<sup>5</sup> *Centro de Inovação em Biomedicina e Biotecnologia (CIBB), Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal ([sofia.anastacio@euvg.pt](mailto:sofia.anastacio@euvg.pt))*

<sup>6</sup> *Onevetgroup Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC), Av. José R. Sousa Fernandes 197, 3020-210 Coimbra, Portugal*

<sup>7</sup> *Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama e Centro de Investigação Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([hugo.vilhena@euvg.p](mailto:hugo.vilhena@euvg.p))*

## Resumo

O biomaterial Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) é um hemoderivado utilizado em medicina regenerativa, que apresenta capacidade de regeneração de tecidos já comprovada em vários estudos em medicina humana e veterinária. Este potencial regenerativo dos tecidos deve-se à sua elevada concentração em fatores de crescimento e citocinas, derivados de plaquetas e leucócitos. Para além das suas propriedades regenerativas, alguns estudos em medicina humana demonstraram que os PRF apresentam, também, atividade antimicrobiana *in vitro*. O conhecimento relativo à utilização deste biomaterial em medicina veterinária é mais limitado, e maioritariamente relacionado com a sua atividade como agente promotor da cicatrização de feridas cutâneas, oculares e defeitos maxilo-faciais. A informação relativa às suas propriedades antimicrobianas em medicina veterinária é muito reduzida.

Este trabalho de investigação teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, dos PRF de origem canina sobre três agentes bacterianos frequentemente encontrados em feridas cutâneas caninas infetadas - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os coágulos de PRF foram obtidos através da metodologia de uma única centrifugação de sangue total de doadores caninos, e a avaliação das propriedades antibacterianas dos PRF foi avaliada através do método da difusão em placas de agar de Mueller-Hinton previamente inoculadas com suspensão bacteriana de cada agente bacteriano testado, durante um período de três dias. O procedimento foi realizado em 17 amostras de cães. Em 16 animais foi possível avaliar a atividade bacteriana dos PRF em duplicado sobre os três agentes bacterianos em estudo, para validação dos resultados obtidos. Foi ainda avaliada a atividade antimicrobiana do soro autólogo, recolhido após a centrifugação do sangue do animal dador, sobre os três agentes microbianos em estudo.

Os resultados demonstraram atividade antibacteriana dos PRF nas três espécies bacterianas testadas, tendo diferentes comportamentos ao longo dos três dias de incubação. A atividade antibacteriana manteve-se constante ao longo dos três dias sobre *E. coli b.*, diminuiu sobre *P. aeruginosa b.* e aumentou sobre *S. aureus b.* A atividade antibacteriana dos PRF de animais não castrados sobre *P. aeruginosa b.* às 24 horas de incubação foi significativamente superior à dos animais não castrados ( $P < 0.05$ ). Não foi observada atividade antimicrobiana do soro autólogo sobre nenhum dos três agentes microbianos em estudo.

Em conclusão, o PRF é um biomaterial de fácil obtenção, que necessita de um baixo volume de amostra e possui atividade antimicrobiana que complementa as suas propriedades regenerativas e analgésicas. A sua ação duradoura remete para a libertação gradual e temporal de fatores de crescimento e citocinas que são essenciais para a sua atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos sugerem que a terapia com PRF poderá ser uma opção terapêutica alternativa e/ou complementar à antibioterapia em cães. São, no entanto, necessários mais estudos para avaliar a sua atividade antimicrobiana *in vivo*, assim como avaliar a sua atividade noutras espécies animais e sobre diferentes agentes

infeciosos. Para além disso, numa perspetiva *Onehealth*, a informação obtida poderá ser complementar com a obtida em diferentes estudos em medicina humana.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, cães, *Escherichia coli*, fibrina rica em plaquetas, medicina regenerativa, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

## Abstract

The biomaterial platelet-rich fibrin (PRF) is a blood derivative used in regenerative medicine, which has a tissue regeneration capacity previously proven in several studies in human and veterinary medicine. This tissue regenerative potential is due to its high concentration of growth factors and cytokines, derived from platelets and leukocytes. In addition to their regenerative properties, some studies in human medicine have shown that PRF also have antimicrobial activity *in vitro*. The knowledge regarding the use of this biomaterial in veterinary medicine is more limited, and mostly related to its activity as a promoting agent for the healing of cutaneous and ocular wounds and maxillofacial defects. Information regarding its antimicrobial properties in veterinary medicine is scarce.

This study aimed to study the *in vitro* antimicrobial activity of canine PRF on three bacterial agents frequently found in infected canine skin wounds - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The PRF clots were obtained using the methodology of a single centrifugation of whole blood collected from canine donors, and the evaluation of the antibacterial properties of the PRF was evaluated through the diffusion method on Mueller-Hinton agar plates previously inoculated with bacterial suspension of each bacterial agent tested, over a period of three days. The procedure was performed on 17 samples of dogs. In 16 animals, it was possible to evaluate the bacterial activity of PRF in duplicate on the three bacterial agents under study, to validate the results obtained. The antimicrobial activity of the autologous serum collected after centrifuging the blood of the donor animal on the three microbial agents under study was also evaluated.

The results showed antibacterial activity of PRF in the three bacterial species tested, with different behaviors over the three days of incubation. The antibacterial activity remained constant over the three days on *E. coli* b., decreased on *P. aeruginosa* b. and increased on *S. aureus* b.. The antibacterial activity of PRF from intact animals on *P. aeruginosa* b. at 24 hours of incubation was significantly higher than that of spayed animals ( $P < 0.05$ ). No antimicrobial activity of autologous serum was observed on any of the three microbial agents under study.

In conclusion, PRF is an easily obtainable biomaterial, which requires a low sample volume and has antimicrobial activity that complements its regenerative and analgesic properties. Its lasting action is probably due to the gradual and temporal release of growth factors and cytokines that are essential for its antimicrobial activity. The results obtained suggest that PRF therapy may be an alternative and/or complementary therapeutic option to antibiotic therapy in dogs. However, further studies are needed to assess its antimicrobial activity, *in vivo*, as well as to assess its activity in other animal species and on different infectious agents. Moreover, from a Onehealth perspective, the information obtained may be complementary to that obtained in different studies in human medicine.

**Key-words:** Antimicrobial activity, dogs, *Escherichia coli*, platelet – rich fibrin, regenerative medicine, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

## **Introdução**

A Medicina Regenerativa é uma área clínica recente na medicina veterinária, que tem como objetivo principal reparar tecidos que foram danificados/destruídos, utilizando componentes biológicos que estimulam os tecidos e órgãos a sintetizar um tecido novo, morfológicamente e funcionalmente idêntico (Barrett, 2016). Temos o exemplo da utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) em lesões oculares (L. Alio *et al.*, 2012), ou a utilização de células estaminais em doenças como leucemia ou osteoartrite (Fortier & Travis, 2011).

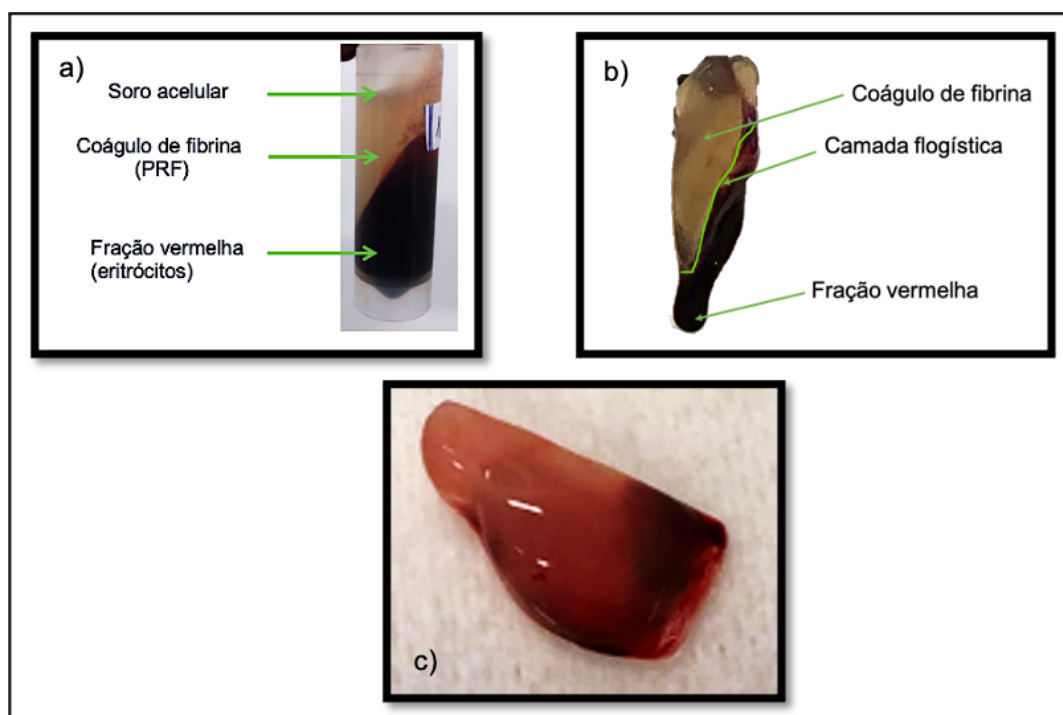
A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um hemoderivado que é atualmente frequentemente utilizado em medicina humana, especialmente em áreas como a medicina dentária, a cirurgia maxilofacial e a cirurgia plástica (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2010). Mais recentemente tem sido proposto em medicina humana e veterinária na cicatrização de feridas cutâneas (Naik *et al.*, 2013; Ozer & Colak, 2019; Pitzurra *et al.*, 2020; Soares, Babo, Reis, *et al.*, 2021). O PRF caracteriza-se como sendo um concentrado de plaquetas de 2ª geração, constituído por uma matriz de fibrina com uma elevada concentração de plaquetas e leucócitos (Mallmann *et al.*, 2014). É obtido após centrifugação de amostras de sangue total colhidas para tubos sem anticoagulante. Após a centrifugação, obtêm-se três frações diferentes no tubo de colheita: a) fração composta pelos eritrócitos; b) coágulo de PRF; c) soro acelular, também referido como soro autólogo, (Fig. 1. a) (Dohan *et al.*, 2006; Soares, Babo, Reis, *et al.*, 2021). Por sua vez, o PRF possui duas regiões distintas: a *platelet-rich area*, constituída por leucócitos e por plaquetas, compreendendo a camada flogística; e a *platelet-poor area*, que é constituída pela matriz de fibrina que dá forma ao coágulo, sendo esta acelular (Fig. 1. b. c) (Aizawa *et al.*, 2020).

A atividade regenerativa deste biomaterial já foi demonstrada por vários autores tanto em medicina humana como em medicina veterinária (Ozer & Colak, 2019; Soares *et al.*, 2018; Soares, Babo, Faria, *et al.*, 2021; Soares, Dias, *et al.*, 2021). Nos trabalhos já existentes, o potencial regenerativo dos PRF está relacionado com a sua capacidade de atuar como um agente *tissue-filler*, para além de induzir a síntese de tecido de granulação de forma rápida e efetiva, contribuindo para uma aceleração no processo de encerramento da ferida (Joseph Choukroun *et al.*, 2006).

Um parâmetro importante e considerado como um dos pontos mais críticos na regeneração dos tecidos são as infeções bacterianas associadas, sendo uma das maiores causas de morbidade associadas a feridas agudas e crónicas, e mesmo de mortalidade quando se trata de agentes bacterianos multirresistentes (Kennewell *et al.*, 2019). As infeções bacterianas são as mais prevalentes e podem ser de difícil resolução (Bowler *et al.*, 2001), uma vez que as bactérias têm capacidade de criar um biofilme que lhes confere resistência a vários antibióticos (Negut *et al.*, 2018; Padhy *et al.*, 2014). Grande percentagem das feridas cutâneas diagnosticadas em contexto clínico são devidas a deiscência de feridas antigas, a mordeduras e atropelamentos (Kožár *et al.*, 2018).

Para além da sua ação promotora da regeneração tecidual (atribuída maioritariamente às plaquetas), estudos recentes em medicina humana e veterinária mostraram que os PRF apresentam também capacidade antimicrobiana e analgésica (Soares, Babo, Faria, *et al.*, 2021; Soares, Dias, *et al.*, 2021), provavelmente devido à presença dos leucócitos e plaquetas (Aquino-

domínguez *et al.*, 2021; Castro *et al.*, 2019; Cieślik-Bielecka *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2020). Assim, o importante papel dos PRF na regeneração tecidual de feridas/lesões cutâneas é complementado pela sua inerente atividade antimicrobiana (Ellis *et al.*, 2018; Reinke & Sorg, 2012).



**Figura 1.** a) Coágulo de PRF polimerizado, após o período de repouso; b) Coágulo de PRF antes da remoção da fração vermelha; c) Coágulo de PRF após a remoção da fração vermelha.

No entanto, o conhecimento relacionado com as propriedades antimicrobianas dos PRF em medicina veterinária é ainda escasso. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a existência de atividade antibacteriana associada aos PRF de origem canina, de forma a sustentar a utilização da terapia-PRF na clínica de animais de companhia. Adicionalmente, foi igualmente estudada a capacidade antimicrobiana do soro autólogo. Para cumprir com o objetivo proposto, foi testada a atividade antimicrobiana de PRF e soro autólogo canino sobre três estirpes de agentes microbianos frequentemente encontrados em feridas cutâneas, em cães e gatos: *Escherichia coli b.*, *Staphylococcus aureus b.* e *Pseudomonas aeruginosa b.* (Abrahamian & Goldstein, 2011; Kožár *et al.*, 2018).

## **Materiais e Métodos**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama (Parecer 08/2022) e foi realizado com o consentimento informado de cada tutor (Anexo I).

### **Colheita de sangue**

As amostras de sangue foram colhidas em animais considerados clinicamente saudáveis, que foram apresentados para avaliação do estado geral de saúde do animal. Realizou-se tricotomia e assepsia cirúrgica do local de colheita. Procedeu-se à recolha de 11 mL de sangue da veia jugular, utilizando

uma agulha de 21 gauge e uma seringa com capacidade de 12 mL. Após colheita, o sangue total foi colocado em tubos com EDTA e tubos com heparina (0.5 mL em cada tubo) para realização de hemograma e bioquímica sanguínea. Dividiram-se os restantes 10 mL de sangue colhido em dois tubos de polipropileno estéreis com a capacidade de 5mL. A metodologia utilizada no presente estudo permite uma amostragem em duplicado de cada animal, obtendo-se dois PRF por animal dador.

### **Preparação dos PRF e Soro Autólogo**

Para a preparação dos PRF foi utilizado um protocolo adaptado previamente descrito para animais de companhia (Soares, Babo, Faria, *et al.*, 2021). Imediatamente após a colheita para tubos de polipropileno, o sangue total foi centrifugado a uma velocidade de 3500 rpm (aproximadamente, 960g) durante 10 minutos, com um rotor de ângulo fixo, com um raio de 75 mm (considerado na zona do tubo de interesse, correspondente à zona rica em plaquetas e leucócitos do PRF, dentro do tubo). Após a centrifugação do sangue, os PRF foram deixados a repousar dentro dos respetivos tubos durante 60 minutos à temperatura ambiente para a polimerização.

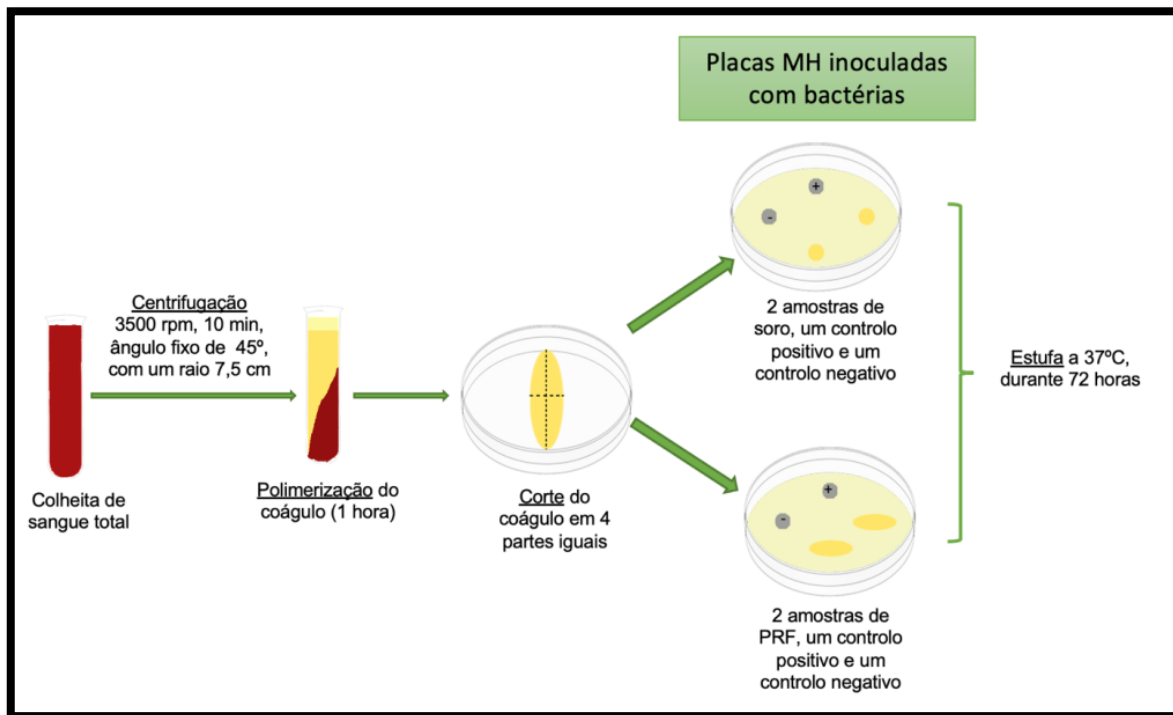
Concluído o tempo de polimerização de cada PRF, procedeu-se à sua preparação, utilizando uma técnica asséptica em todo o procedimento. Neste processo, a fração vermelha do coágulo obtido foi removida, sendo apenas aproveitada a fibrina polimerizada, que contém a designada camada flogística (leucócitos e plaquetas). Cada PRF foi cortado em 4 porções similares, com o auxílio de uma pinça e tesoura esterilizadas (Fig. 2). Cada fração de PRF obtida foi imediatamente colocada num microtubo tipo *ependorf* esterilizado, e armazenado a temperatura de refrigeração ( $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) até ao momento da inoculação nas placas de Mueller-Hinton, num período não superior a 15 minutos em todos os casos. Colheu-se também soro autólogo a partir das preparações dos PRF, e foi impregnado nos discos de papel esterilizados. Em cada placa colocaram-se duas amostras de PRF ou soro autólogo, um controlo positivo e um controlo negativo. As placas foram colocadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas (Fig. 2).

### **Pesquisa de atividade antibacteriana**

A pesquisa de atividade antibacteriana foi realizada por método de difusão, com adaptação da técnica de Kirby-Bauer, utilizada no teste de sensibilidade a antibióticos e de acordo com a padronização descrita pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Matuschek *et al.*, 2014) (Anexo II).

A atividade antibacteriana dos PRF e do soro autólogo foi avaliada em cultura pura de *S. aureus b.*, *P. aeruginosa b.* e *E. coli b.*. As amostras de PRF e de soro (10 $\mu\text{L}$ ) foram testadas em duplicado em placa com 9 mL de Agar Mueller-Hinton (MH), juntando-se, em cada placa, um controlo negativo (disco de papel estéril) e um controlo positivo (disco de papel impregnado com antibiótico inibidor decrescimento bacteriano) para cada agente testado. Assim, foram utilizados discos de tobramicina (10 $\mu\text{g}$ ), piperacilina (100 $\mu\text{g}$ ) e ampicacina (30 $\mu\text{g}$ ) como controlo positivo para *S. aureus b.*, *P. aeruginosa b.* e *E. coli b.*, respetivamente.

Após a aplicação dos PRF e dos soros nas placas previamente inoculadas com a suspensão bacteriana de cada uma das três espécies testadas, foi pesquisada a inibição de crescimento na zona periférica à amostra, com medição do raio de inibição em milímetros (mm), após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação em atmosfera de aerobiose e a 37° C.



**Figura 2.** Etapas do procedimento desde a colheita de sangue até à inoculação dos PRF e soros autólogos correspondentes em placas com Agar Mueller-Hinton previamente inoculadas com suspensão bacteriana.

### Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa *Statistical software R* (V. 3.3.6), (*R Development Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*).

Os resultados estão apresentados na forma de medianas e intervalo interquartil. Adicionalmente, investigou-se a relação entre a concentração sérica de plaquetas (PLT), leucócitos (WBC), idade, peso e os halos de inibição, usando o coeficiente de *Spearman* (rs). Para avaliar a significância estatística das diferenças observadas entre sexo, estado reprodutivo, raça e os halos de inibição foi usado o teste *Mann-Whitney* não paramétrico. Um valor de  $P < 0.05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## Resultados

### Caracterização da população dadora

Neste estudo foram colhidas amostras sanguíneas de 18 cães saudáveis, com idades entre os dois e os 12 anos. Destes animais, 11 eram fêmeas, sendo 10 castradas; dos sete machos incluídos no estudo, cinco encontravam-se castrados. Os animais apresentaram peso entre 10 Kg e 52 Kg. A maioria dos animais (n=13) era de raça pura, que incluía Cane Corso (n=2), *West Highland White Terrier* (n=2), *Bull Terrier* (n=2), *Siberian Husky* (n=1), *Epagueul Breton* (n=1), Bulldogue Francês (n=1), *Cocker Spaniel* (n=1), Leão da Rodésia (n=1), Podengo (n=1), *Weimaraner* (n=1); 5 cães não tinham raça definida (SRD) A caracterização da população incluída no estudo e os seus dados hematológicos são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização e dados hematológicos da população dadora.

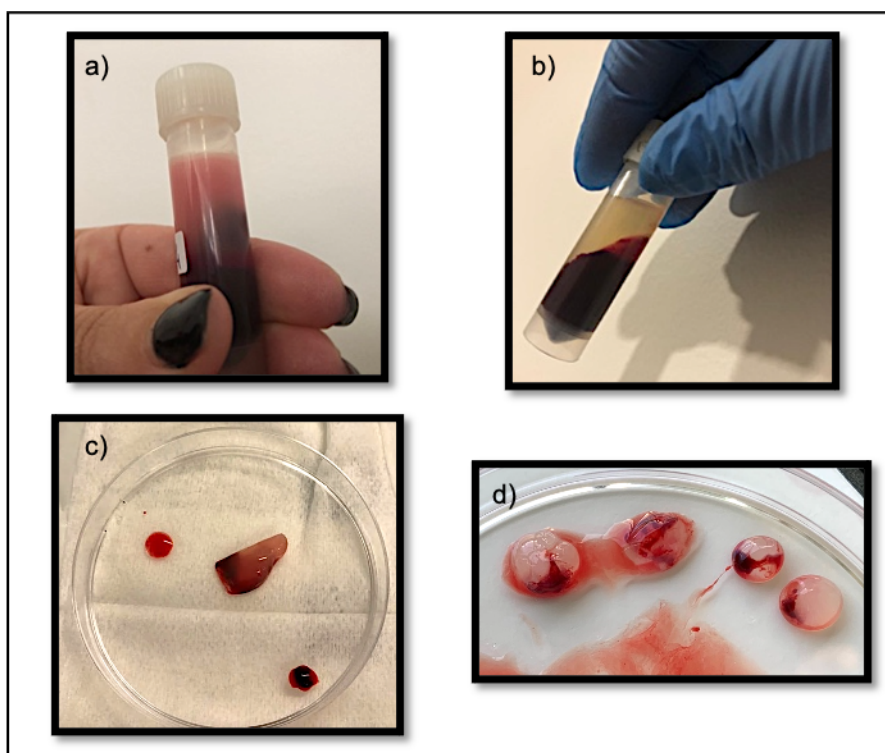
Animal nº.	Caracterização da população dadora					Hemograma-Concentrações celulares		
	Idade (anos)	Sexo	Est. Reprod.	Raça	Peso (Kg)	PLT (x10 <sup>3</sup> /uL)	WBC (x10 <sup>3</sup> uL)	RBC (x10 <sup>6</sup> uL)
1	2	F	Castrado	Pura Epagueul Breton	17,00	186,00	9,15	6,60
2	9	F	Castrado	Indefinida	21,00	240,00	8,05	7,41
3	3	M	Castrado	Pura Bull Terrier	30,00	85,00	9,17	7,25
4	6	M	Castrado	Indefinida	37,00	288,00	17,27	7,03
5	12	F	Castrado	Pura West Highland White Terrier	10,00	326,00	12,76	6,86
6	6	M	Inteiro	Pura Siberian Husky	35,00	180,00	10,97	6,27
7	6	F	Castrado	Pura Cane Corso	52,00	156,00	7,76	5,68
8	3	F	Inteiro	Pura Cane Corso	50,00	189,00	11,90	7,25
9	8	M	Castrado	Pura Coker Spaniel	22,00	208,00	9,08	7,29
10	8	M	Castrado	Indefinida	19,00	150,00	7,54	7,39
11	8	F	Castrado	Pura Buldogue Francês	11,00	255,00	6,89	7,92
12	10	M	Castrado	Pura West Highland White Terrier	10,10	480,00	12,01	7,21
13	5	F	Castrado	Pura Podengo	10,30	264,00	7,06	7,93
14	9	F	Castrado	Pura Leão da Rodésia	41,20	165,00	9,12	8,04
15	9	F	Castrado	Indefinida	10,20	258,00	10,03	6,93
16	7	M	Inteiro	Pura Weimaraner	38,70	213,00	8,05	6,67
17	11	F	Castrado	Indefinida	20,20	207,00	6,92	6,32
18	3	F	Castrado	Pura Bull Terrier	20,40	216,00	13,48	6,1

**Legenda:** Plaquetas (PLT); Leucócitos (WBC); Eritrócitos (RBC)

## Obtenção dos PRF

Um dos 18 dadores aos quais foram colhidas amostras sanguíneas foi excluído do presente estudo porque não ocorreu polimerização do PRF após os 60 minutos de repouso (Fig. 3. a). Os PRF dos restantes dadores (n=17) polimerizaram no período de tempo estabelecido (Fig. 3. b), no entanto, num destes dadores só foi possível obter uma amostra de PRF devido ao menor volume sanguíneo colhido, não tendo sido possível realizar a avaliação da atividade antimicrobiana em duplicado para esse dador (Fig. 3. b).

Após a separação da fração vermelha observou-se, macroscopicamente, um coágulo de fibrina, com consistência gelatinosa e aparência transparente (Fig. 3. c). Cada PRF foi fragmentado em quatro amostras (Fig. 3. d), ou seja, de cada dador foi possível obter oito amostras de PRF e o soro autólogo, exceto o animal em que só foi possível obter um PRF, do qual apenas foi possível obter quatro amostras de PRF.

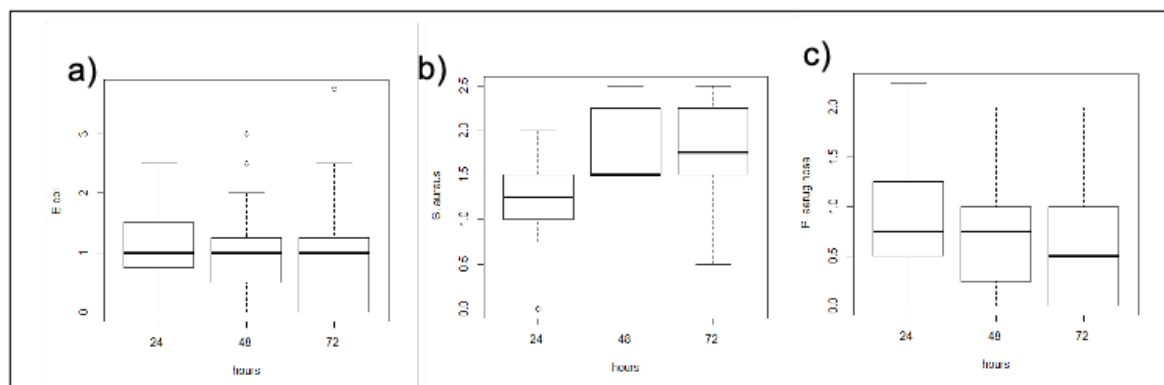


**Figura 3.** a) PRF não polimerizado, hemolisado, após 60 minutos de repouso; b) PRF polimerizado, após 60 minutos de repouso; c) PRF polimerizado, antes do corte em 4 porções iguais; d) PRF cortado em quatro porções iguais.

## Halos de inibição do crescimento bacteriano

O anexo II mostra as placas nas diferentes horas de leitura (tabelas 6, 7 e 8), assim como, as leituras dos halos de PRF, soro autólogo, controlo positivo e controlo negativo (tabelas 9 e 10).

Foram feitas leituras dos raios dos halos de inibição, pois estes apresentaram formas irregulares. A mediana dos halos de inibição do crescimento bacteriano produzidos pelos PRF para *E. coli* b. às 24h, 48h e 72h foram de 1.0 mm para os três *timepoints* (IQR 0.75-1.5 mm; 0.5-1.25 mm e 0.0-1.25 mm, respectivamente). A mediana dos halos de inibição produzidos pelos PRF na cultura *in vitro* de *S. aureus* b. às 24h foi de 1.25mm (IQR 1.0-1.5mm), às 48h de 1.5 mm (IQR 1.5-2.25 mm) e às 72h de 1.75 mm (IQR 1.25-2.25 mm). Os PRF na cultura de *P. aeruginosa* b. apresentaram halos de inibição com uma mediana de 0.75mm às 24h (IQR 0.5-1.25 mm), 0.75mm às 48h (IQR 0.25-1.0 mm) e de 0.5 mm às 72h (IQR 0.0-1.0 mm) (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Boxplots com representação da mediana e intervalo interquartil de a) halos de inibição (mm) do PRF na *E. coli* b. às 24, 48 e 72 horas; b) halos de inibição (mm) do PRF no *S. aureus* b. às 24, 48 e 72 horas; c) halos de inibição (mm) do PRF na *P. aeruginosa* b. às 24, 48 e 72 horas.

Não se observou a formação de halos de inibição antibacteriana produzidos pelo soro autólogo para *E. coli* b. às 24h, 48h ou às 72h (mediana 0.0 mm; IQR 0.0-0.0 mm). De forma similar, na cultura *in vitro* de *S. aureus* b. não se observou halo de inibição de atividade antimicrobiana do soro autólogo às 24h (mediana 0.0 mm, IQR 0.0-0.25mm), às 48h (mediana 0.0 mm; IQR 0.0-0.0 mm) e às 72h (mediana 0.0 mm; IQR 0.0-0.0 mm). Também na cultura *in vitro* de *P. aeruginosa* b. não se observaram halos de inibição para o soro autólogo em qualquer *timepoint* (mediana 0.0 mm, IQR 0.0-0.5mm às 24h; 0.0 mm; IQR 0.0-2.5 mm às 48 h; 0.0 mm, IQR 0.0-0.0 mm às 72 h).

Foi avaliada a influência dos diferentes dados demográficos e dos parâmetros hematológicos dos animais incluídos no estudo sobre os efeitos inibitórios antimicrobianos dos PRF. Não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre a concentração de PLT, WBC, idade, peso, sexo e raça dos animais incluídos no estudo e o efeito antibacteriano inibitório dos PRF sobre *E. coli* b., *P. aeruginosa* b. ou *S. aureus* b. para qualquer um dos três *timepoints* estudados (24, 48 e 72 horas) (Tabelas 2, 3 e 4). No entanto foi observada uma correlação significativa entre o estado reprodutivo dos animais do estudo e os halos de inibição de crescimento de *P. aeruginosa* b., em que os PRF dos animais não castrados apresentaram halos de inibição do crescimento bacteriano significativamente maiores às 24 horas do que os PRF dos animais castrados ( $P = 0.0151$ ). Não foram observadas outras correlações significativas entre o estado reprodutivo dos animais incluídos no estudo e o efeito antibacteriano

inibitório dos PRF sobre *E. coli* ou *S. aureus* para qualquer um dos três *timepoints* estudados, nem sobre *P. aeruginosa* às 48 ou 72 horas após a inoculação (Tabelas 2, 3 e 4).

**Tabela 2.** Influência dos dados demográficos e hematológicos dos animais incluídos no estudo na atividade antimicrobiana dos PRF sobre *Escherichia coli b.* às 24 horas, 48 horas e 72 horas pós inoculação bacteriana.

***Escherichia coli b.***

Horas de leitura	24horas		48horas		72horas	
	Coefficiente correlação	P	Coefficiente correlação	P	Coefficiente correlação	P
Idade	-0.2761	0.2833	0.0152	0.9538	0.0715	0.7849
Peso	-0.3405	0.181	-0.1911	0.4624	-0.3450	0.175
Sexo	-	0.1803	-	0.6061	-	0.2612
Estado Reprodutivo	-	0.6511	-	0.6051	-	0.4423
Raça	-	0.3237	-	0.6011	-	0.8180
WBC	0.1930	0.4574	0.2390	0.3554	0.069	0.7920
PLT	0.387	0.1248	0.03	0.9123	0.102	0.6965

**Tabela 3.** Influência dos dados demográficos e hematológicos dos animais incluídos no estudo na atividade antimicrobiana dos PRF sobre *Staphylococcus aureus b.* às 24 horas, 48 horas e 72 horas pós inoculação bacteriana.

***Staphylococcus aureus b.***

Horas de leitura	24horas		48horas		72horas	
	Coefficiente correlação	P	Coefficiente correlação	P	Coefficiente correlação	P
Idade	-0.1860	0.4747	-0.0579	0.8253	-0.021	0.4353
Peso	-0.2039	0.4324	-0.2048	0.4304	-0.1865	0.4733
Sexo	-	0.3558	-	0.4127	-	0.9187
Estado Reprodutivo	-	0.3347	-	0.7002	-	0.7492
Raça	-	0.5623	-	0.6037	-	0.7303
WBC	-0.431	0.0834	-0.081	0.7567	-0.1929	0.4582
PLT	-0.138	0.5984	-0.162	0.5336	-0.021	0.9358

**Tabela 4.** Influência dos dados demográficos e hematológicos dos animais incluídos no estudo na atividade antimicrobiana dos PRF sobre *Pseudomonas aeruginosa b.* às 24 horas, 48 horas e 72 horas pós inoculação bacteriana.

***Pseudomonas aeruginosa b.***

Horas de leitura	24 horas		48 horas		72 horas	
	Coefficiente correlação	P	Coefficiente correlação	P	Coefficiente correlação	P
Idade	-0.170	0.508	0.203	0.4331	0.001	0.9981
Peso	-0.013	0.9584	-0.3048	0.2341	-0.1814	0.4859
Sexo	-	0.8383	-	0.1548	-	0.2557
Estado Reprodutivo	-	<b>0.0151</b>	-	0.2027	-	0.2185
Raça	-	0.301	-	0.529	-	0.999
WBC	0.278	0.279	0.325	0.2033	0.056	0.8307
PLT	0.31	0.2224	0.327	0.199	-0.1033	0.6931

## Discussão

Os produtos derivados de plaquetas (PDP) são produtos biológicos obtidos a partir do sangue total, que possuem elevadas concentrações de fatores de crescimento e citocinas, e têm sido estudados como uma nova estratégia terapêutica na área da medicina regenerativa (Wessely-szponder *et al.*, 2022). Existem vários PDP que têm sido melhorados ao longo dos anos, tais como o concentrado de plaquetas (PC), o PRP, o plasma pobre em plaquetas (PPP), a cola de fibrina (FG) e o PRF (Attili *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2015; Masoudi *et al.*, 2016).

A terapia platelet-based refere-se ao uso dos PDP em contexto clínico, e começou a ser utilizada em 1960 com a criação da FG, seguida do PRP e mais tarde do PRF, que tem vindo a suscitar muito interesse devido às suas propriedades regenerativas, antimicrobianas e analgésicas (Soares, Babo, Faria, *et al.*, 2021; Soares, Babo, Reis, *et al.*, 2021). Os PRP são usados em úlceras da córnea (L. Alio *et al.*, 2012), cirurgia oral/maxilofacial (Catarino *et al.*, 2020), em feridas de pele, otoplastomas (Perego *et al.*, 2021), doenças articulares (Catarino *et al.*, 2020) e musculoesqueléticas (Soares, Babo, Reis, *et al.*, 2021). A sua aplicação clínica ocorreu inicialmente em humanos, acabando por se estender para a medicina veterinária, principalmente em animais de companhia (cães e gatos), mas também em cavalos (Crisci, 2019) e ruminantes (Lange-Consiglio *et al.*, 2014).

O PRF caracteriza-se como tendo uma elevada concentração de plaquetas e leucócitos. A elevada concentração de plaquetas e de leucócitos origina uma grande libertação de fatores de crescimento e citocinas que são essenciais para a regeneração tecidual, atividade antimicrobiana e propriedades analgésicas do PRF (Martínez *et al.*, 2015). As plaquetas possuem três tipos de grânulos: alfa, densos e lisossomais. Os grânulos alfa são os mais abundantes e contêm fatores de crescimento e citocinas.

Quando as plaquetas são ativadas devido a uma lesão, ocorre a libertação dessas moléculas que iniciam a sua função biológica de forma imediata (Wessely-szponder *et al.*, 2022). Os fatores de crescimento e as citocinas são proteínas que se ligam a recetores específicos nas células alvo (linfócitos, macrófagos, entre outras), e que transmitem um sinal de ativação de genes específicos, o que resulta num efeito biológico como ativação, proliferação ou diferenciação de outras células. Existem várias citocinas, mais as mais importantes são a interleucina (IL)-8, IL-1, IL-6, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos e Macrófagos (CM-CSF), funcionando como mediadores de doenças inflamatórias (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992; Yamakawa & Hayashida, 2019).

Este trabalho de investigação teve como principal objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de um derivado plaquetário de 2ª geração – o PRF. Em 1998, Marx e colaboradores estudaram pela primeira vez a aplicação de produtos derivados de plaquetas, os PRP, em cirurgia oral em medicina humana (Marx *et al.*, 1998). Os PRP tiveram uma grande aceitação no mundo da medicina, pois são um material biológico inovador que consegue concentrar grandes quantidades de fatores de crescimento e plaquetas, muito úteis na reconstrução óssea dentária. Atualmente, os PRF conseguem melhorar alguns aspetos dos PRP (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2010) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Diferenças entre PRP e PRF (Chou *et al.*, 2020; Soares, Babo, Reis, *et al.*, 2021; Yamakawa & Hayashida, 2019).

<b>Características</b>	<b>PRP</b>	<b>PRF</b>
<b>Estado físico</b>	Líquido	Sólido/gelatinoso
<b>Uso de aditivos (anticoagulante e trombina)</b>	Sim	Não
<b>Protocolo</b>	Mais etapas e mais complexo	Simples e rápido
<b>Concentração de plaquetas e leucócitos e fatores de crescimento</b>	Menor	Maior
<b>Libertação de fatores de crescimento/ duração da ação</b>	Libertação rápida e limitada, até 4 horas	Libertação lenta e prolongada, durante 7 dias.
<b>Custo</b>	Mais dispendioso em equipamento e consumíveis	Equipamento e consumíveis mais económicos
<b>Concentração de leucócitos</b>	Baixa	Elevada

Para além destes dois derivados, vários autores já modificaram/melhoraram alguns protocolos para aumentar a eficiência dos PRF. Anitua (2001) desenvolveu, a partir do PRP, o plasma rico em fatores de crescimento (PRGF), substituindo apenas a trombina derivada de animais por cálcio (Anitua, 2001). Choukron (2014), após várias utilizações de PRF, executou algumas modificações e criou a fibrina rica em plaquetas – avançada (A-PRF); através da diminuição da velocidade de centrifugação, tornou o coágulo mais maleável e com maior concentração de fatores de crescimento (Joseph Choukron, 2014). Outra forma modificada do PRF é o concentrado de fatores de crescimento (CGF), que se apresenta por ser um coágulo mais rígido, devido às repetidas alterações na velocidade de centrifugação (Masuki *et al.*, 2016).

Alguns estudos demonstraram que o tipo de material usado nos tubos de centrifugação também tem consequências na forma do coágulo, tempo de gelificação, libertação de ativação de plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento. Neste estudo utilizaram-se tubos de polipropileno que possuem várias vantagens como poderem ser esterilizados, serem baratos, não apresentarem efeitos nocivos para as amostras, serem resistentes ao choque e serem recicláveis (Hisham A. Maddah, 2016). Contudo, vários autores aconselham tubos de vidro, por estes terem um melhor efeito na polimerização dos PRF, sendo assim mais eficientes (Soares, Babo, Faria, *et al.*, 2021). Os tubos de sílica são desaconselhados na produção de PRF ou similares para uso clínico, tendo sido provado que estes libertam facilmente micro e nanopartículas de sílica que induzem efeitos citotóxicos e inflamatórios (Kusaka *et al.*, 2014) em diferentes células, principalmente no epitélio pulmonar (Kaewamatawong *et al.*, 2005), hipocampo e células endoteliais (Tsuji *et al.*, 2019).

Em relação à força relativa de centrifugação (FRC), um estudo realizado por Choukron em 2016, mostrou que o conceito de velocidade baixa de centrifugação (LSCC) tem um impacto favorável na concentração de plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento (VEGF e TGF- $\beta$ 1), obtendo-se uma maior concentração destes componentes em velocidades mais baixas, como por exemplo a 600 rpm (44g) durante 8 minutos (J. Choukron & Ghanaati, 2018).

Um estudo recente avaliou a posição de centrifugação e a sua influência nas propriedades do coágulo, e mostrou que a centrifugação horizontal apresenta uma melhor separação de células por camadas, assim como uma distribuição mais homogénea das plaquetas e leucócitos no coágulo, quando comparada com centrifugações de ângulo fixo. Para além disso, permite uma maior concentração de plaquetas e leucócitos, o que torna o PRF e o soro com maiores capacidades cicatrizantes/regenerativas e antibacterianas (Feng *et al.*, 2020).

No nosso estudo foi observada atividade antibacteriana dos PRF de origem canina sobre os três agentes bacterianos testados, e nos diferentes *timepoints* avaliados (24h, 48h e 72h) (Gráfico 1). Diversos estudos avaliaram as propriedades antibacterianas dos PDP. Em 2021, Ana-Rita Atilli, (Atilli *et al.*, 2021), publicou um estudo onde era avaliada a atividade antimicrobiana, *in vitro*, de PRP de origem canina sobre *P. aeruginosa* e *E. coli*. Os volumes de amostra foram semelhantes aos usados no nosso estudo, e os halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos foram também semelhantes aos obtidos no nosso estudo.

Outros dois estudos avaliaram as propriedades antimicrobianas, *in vitro*, de PRF humanos. Um estudo em 2021 (Bhamjee, 2017), avaliou a atividade antimicrobiana dos PRF sobre *S. aureus*; e o estudo de Feng, (Feng et al., 2020) sobre *S. aureus* e *E. coli*. Em ambos os estudos foram utilizados maiores volumes de sangue para a obtenção dos PRF (10 mL), e por esse motivo é expectável que possuam uma maior concentração de péptidos antibacterianos. No primeiro estudo foram observados halos de inibição do crescimento antibacteriano maiores do que os obtidos no nosso estudo; enquanto que no segundo estudo, foram obtidos halos de inibição menores para *S. aureus* e semelhantes para *E. coli* em relação ao nosso estudo.

Um estudo, *in vitro*, realizado em 2017 (Bhamjee, 2017), em medicina humana, apresentou halos maiores do que este estudo, a pesar do PRF ter sido produzido com maior volume de amostra (10mL). No nosso estudo, a evolução da atividade antimicrobiana dos PRF ao longo dos três dias de incubação foi variável consoante os agentes testados. Os halos de inibição sobre *E. coli b.* mantiveram-se sensivelmente constantes ao longo das 72 horas; enquanto que sobre o *S. aureus b.* os halos de inibição aumentaram, ligeiramente, tendo o maior halo às 72 horas; por outro lado, sobre *P. aeruginosa b.* os halos de inibição diminuíram ao longo dos 3 dias. Os resultado observados na *E. coli b.* e no *S. aureus b.* podem estar relacionados com a libertação lenta, gradual e temporal dos fatores de crescimento, citocinas e péptidos antibacterianos em grande concentração, proporcionada pela sua matriz de fibrina (Aquino-domínguez et al., 2021). Em relação à atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa b.*, apesar de ir diminuindo ao longo dos três dias de inoculação, manteve-se presente ao longo do período do estudo, mostrando uma atividade antibacteriana prolongada.

Num estudo realizado em 2020 (Feng et al., 2020), concluiu – se que o soro autólogo também poderia apresentar propriedades antimicrobianas, uma vez que contém proteínas do complemento e citocinas que ajudam na lise de células bacterianas, principalmente de *S. aureus* e *E. coli*. Contudo, neste estudo, observou-se que os soros obtidos a partir da preparação dos PRF não apresentaram propriedades antibacterianas, *in vitro*, sobre nenhuma das bactérias estudadas, e por esse motivo, os nossos resultados sugerem que os soros autólogo que são usados na área da oftalmologia (Farghali et al., 2021; L. Alio et al., 2012) não possuem propriedades antimicrobianas.

Os halos de inibição obtidos apresentavam uma forma irregular, isto pode ter acontecido porque, na preparação dos PRF, todas as porções apresentavam a zona flogística e, por ser o local com maior concentração de plaquetas e leucócitos, criou o maior halo de inibição bacteriana.

Não houve qualquer correlação significativa entre a concentração sérica de PLT e dos WBC e a capacidade antimicrobiana dos PRF. Contudo, a análise das plaquetas foi uma limitação, visto que ocorreu a formação de agregados plaquetários no momento da colheita ou armazenamento da amostra num número elevado de dadores, fenómeno confirmado através de esfregaço sanguíneo no laboratório de referência.

Houve apenas uma correlação com valores significativos entre o estado reprodutivo dos animais com a capacidade antimicrobiana dos PRF sobre *P. aeruginosa b.* às 24 horas após inoculação, sendo que os PRF dos animais não castrados apresentaram uma atividade antibacteriana significativamente superior do que os PRF dos animais castrados. Esta diferença poderá ser devida à maior concentração

de hormonas que os animais não castrados possuem, e estas estarem relacionadas com o aumento das propriedades antibacterianas dos PRF, assim como o metabolismo dos animais inteiros ser mais rápido do que os castrados (Vendramini et al., 2020). No entanto, estes resultados devem ser interpretados com precaução, devido ao reduzido número de animais incluídos no estudo.

A resistência aos antibióticos é um tema atual e cada vez mais importante tanto em medicina humana como em medicina veterinária (Barrett, 2016). Em medicina veterinária não é frequente a recolha de amostras de feridas para cultura bacteriológica com teste de sensibilidade antimicrobiana. Isto contribui para o uso inadequado de antibióticos que podem não ser específicos para o conjunto de microrganismos que estão presentes em feridas (Bowler et al., 2001). Adicionalmente, o uso de antibióticos no tratamento de feridas aumenta o risco de formação de bactérias multirresistentes, como por exemplo o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (Kennewell et al., 2019), que atrasam a regeneração de tecidos, para além de provocarem complicações no animal, podendo ser transmitidas a outros animais e ao Homem (Rahman et al., 2018). Também o meio ambiente irá beneficiar com a implementação da terapia PRF para o tratamento de feridas em contexto veterinário, uma vez que não são usados agentes químicos que inevitavelmente acabem por contribuir para a acumulação de resíduos no ambiente (Aquino-domínguez et al., 2021). Assim, os PRF - um biomaterial por excelência-, sendo de origem biológica e possuir atividade antimicrobiana, pode constituir uma alternativa ao uso de antibióticos e antissépticos tópicos geralmente usados no tratamento de feridas, evitando de forma direta as resistências bacterianas (Soares, Dias, et al., 2021).

## Conclusões

Neste estudo, concluímos que os PRF, caracterizados como sendo um biomaterial autólogo sustentável, com uma ação regenerativa eficaz e propriedades analgésicas, possui também propriedades antimicrobianas interessantes contra as estirpes *E. coli b.*, *S. aureus b.*, *P. aeruginosa b.*. Estas propriedades antimicrobianas são provavelmente devidas à sua elevada concentração de plaquetas e leucócitos, e dos fatores de crescimento e citocinas sintetizadas por estes. O PRF é obtido através de uma pequena amostra de sangue e a sua técnica de preparação é rápida, pouco invasiva e de fácil execução. No nosso estudo verificou-se que este atua de forma diferente dependendo do micro-organismo, mantendo a sua atividade antibacteriana constante ao longo de 72 horas sobre *E. coli b.*, aumentando a sua atividade sobre *S. aureus b.* ao longo das 72 horas de incubação, e diminuindo a sua atividade antimicrobiana ao longo de 72 horas sobre *P. aeruginosa b.*. Contudo, as suas propriedades antimicrobianas nunca desaparecem ao fim deste período de tempo, podendo dever-se à sua matriz tridimensional, capaz de armazenar células inflamatórias, plaquetas, fatores de crescimento e citocinas, e fazendo com que estes sejam libertados de uma forma lenta e gradual ao longo do tempo. Observou-se também que os PRF de animais castrados apresentaram uma atividade antibacteriana significativamente inferior aos PRF de animais não castrados sobre *P. aeruginosa b.* nas primeiras 24 horas pós inoculação. No presente estudo, não foi observada atividade antibacteriana do soro autólogo sobre os três agentes bacterianos em estudo.

Os resultados obtidos sugerem que os PRF de origem canina apresentam atividade antibacteriana *in vitro*, e que a terapia com PRF poderá ser uma opção terapêutica alternativa e/ou complementar à antibioterapia em cães. São, no entanto, necessários mais estudos para avaliar a sua atividade antimicrobiana *in vivo*, assim como avaliar a sua atividade noutras espécies animais e sobre diferentes agentes infecciosos. Para além disso, numa perspetiva *Onehealth*, a informação obtida poderá ser complementar com a obtida em diferentes estudos em medicina humana.

## Referências Bibliográficas

- Abrahamian, F. M., & Goldstein, E. J. C. (2011). Microbiology of animal bite wound infections. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 24, Issue 2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00041-10>
- Aizawa, H., Tsujino, T., Watanabe, T., Isobe, K., Kitamura, Y., Sato, A., Yamaguchi, S., Okudera, H., Okuda, K., & Kawase, T. (2020). Quantitative near-infrared imaging of platelets in platelet-rich fibrin (Prf) matrices: Comparative analysis of bio-prf, leukocyte-rich prf, advanced-prf and concentrated growth factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124426>
- Anitua, E. (2001). The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Practical Procedures & Aesthetic Dentistry: PPAD*, 13(6).
- Aquino-domínguez, A. S., Romero-Tlalolini, M. de los A., Torres-Aguilar, H., & Aguilar-Ruiz, S. R. (2021). Recent advances in the discovery and function of antimicrobial molecules in platelets. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910230>
- Attili, A. R., Iacoucci, C., Serri, E., Cuteri, V., Cantalamessa, A., Linardi, M., Rifici, C., Mazzullo, G., Rossi, G., Galosi, L., & Tambella, A. M. (2021). Antibacterial Properties of Canine Platelet-Rich Plasma and Other Non-Transfusional Hemo-Components: An in vitro Study. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.746809>
- Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. In *FEBS Letters* (Vol. 307, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-Z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-Z)
- Barrett, J. G. (2016). A set of grand challenges for veterinary regenerative medicine. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(MAR). <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00020>
- Bhamjee, F. (2017). *The in vitro antimicrobial activity of advanced platelet rich fibrin (A-PRF) against microorganisms of the oral cavity*. 15. <https://etd.uwc.ac.za/handle/11394/6232>
- Bowler, P. G., Duerden, B. I., & Armstrong, D. G. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>
- Castro, A. B., Herrero, E. R., Slomka, V., Pinto, N., Teughels, W., & Quirynen, M. (2019). Antimicrobial capacity of Leucocyte-and Platelet Rich Fibrin against periodontal pathogens. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44755-6>
- Catarino, J., Carvalho, P., Santos, S., Martins, Â., & Requicha, J. (2020). Treatment of canine osteoarthritis with allogeneic platelet-rich plasma: Review of five cases. *Open Veterinary Journal*, 10(2). <https://doi.org/10.4314/ovj.v10i2.12>
- Chou, T. M., Chang, H. P., & Wang, J. C. (2020). Autologous platelet concentrates in maxillofacial regenerative therapy. In *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* (Vol. 36, Issue 5).

<https://doi.org/10.1002/kjm2.12192>

- Choukroun, J., & Ghanaati, S. (2018). 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. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 44(1). <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0767-9>
- Choukroun, Joseph. (2014). Advanced PRF & i-PRF: Platelet Concentrates or Blood Concentrates. *Journal of Periodontal Medicine and Clinical Practice*, 1(1).
- Choukroun, Joseph, Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M. O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Dohan, D. M. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011>
- Cieślak-Bielecka, A., Reichert, P., Skowroński, R., Królikowska, A., & Bielecki, T. (2019). A new aspect of in vitro antimicrobial leukocyte- and platelet-rich plasma activity based on flow cytometry assessment. *Platelets*, 30(6). <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1513472>
- Crisci, A. (2019). The L-PRF Membrane (Fibrin Rich in Platelets and Leukocytes) and Its Derivatives (A-PRF, I-PRF) Are Useful as a Source of Stem Cells in Regenerative Wound Therapy: Experimental Work on the Horse. *Regenerative Medicine and Therapeutics*, 3(1). <https://doi.org/10.36959/654/392>
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006). 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*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Del Corso, M., Inchingolo, F., Sammartino, G., & Charrier, J. B. (2010). Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Growth factor release and contradictory results. In *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* (Vol. 110, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.05.059>
- Ellis, S., Lin, E. J., & Tartar, D. (2018). Immunology of Wound Healing. In *Current Dermatology Reports* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s13671-018-0234-9>
- Farghali, H. A., AbdElKader, N. A., AbuBakr, H. O., Ramadan, E. S., Khattab, M. S., Salem, N. Y., & Emam, I. A. (2021). Corneal Ulcer in Dogs and Cats: Novel Clinical Application of Regenerative Therapy Using Subconjunctival Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.641265>
- Feng, M., Wang, Y., Zhang, P., Zhao, Q., Yu, S., Shen, K., Miron, R. J., & Zhang, Y. (2020). Antibacterial effects of platelet-rich fibrin produced by horizontal centrifugation. *International Journal of Oral Science*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41368-020-00099-w>

- Fortier, L. A., & Travis, A. J. (2011). Stem cells in veterinary medicine. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/scrt50>
- Hisham A. Maddah. (2016). Polypropylene as a Promising Plastic: A Review. *American Journal of Polymer Science*. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20160601.01>
- Kaewamatawong, T., Kawamura, N., Okajima, M., Sawada, M., Morita, T., & Shimada, A. (2005). Acute Pulmonary Toxicity Caused by Exposure to Colloidal Silica: Particle Size Dependent Pathological Changes in Mice. *Toxicologic Pathology*, 33(7), 745–751. <https://doi.org/10.1080/01926230500416302>
- Kennewell, T., Mashtoub, S., Howarth, G., Cowin, A., & Kopecki, Z. (2019). Antimicrobial and healing-promoting properties of animal and plant oils for the treatment of infected wounds. *Wound Practice and Research*, 27(4). <https://doi.org/10.33235/wpr.27.4.175-183>
- Kožár, M., Hamilton, H., & Koščová, J. (2018). Types of Wounds and the Prevalence of Bacterial Contamination of Wounds in the Clinical Practice of Small Animals. *Folia Veterinaria*, 62(4). <https://doi.org/10.2478/fv-2018-0036>
- Kusaka, T., Nakayama, M., Nakamura, K., Ishimiya, M., Furusawa, E., & Ogasawara, K. (2014). Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092634>
- L. Alio, J., Arnalich-Montiel, F., & E. Rodriguez, A. (2012). The Role of “Eye Platelet Rich Plasma” (E-Prp) for Wound Healing in Ophthalmology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(7). <https://doi.org/10.2174/138920112800624355>
- Lange-Consiglio, A., Spelta, C., Garlappi, R., Luini, M., & Cremonesi, F. (2014). Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: First clinical application. *Journal of Dairy Science*, 97(10). <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7999>
- Mallmann, F., Lago, P. E. W., & Della Bona, Á. (2014). Uso de fibrina rica em plaquetas (PRF) no tratamento de perfurações da membrana sinusal. *Full Dent. Sci*, 5(17).
- Martínez, C. E., Smith, P. C., & Palma Alvarado, V. A. (2015). The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: A concise update. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 6, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00290>
- Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., & Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 85(6). [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4)
- Masoudi, E. A., Ribas, J., Kaushik, G., Leijten, J., & Khademhosseini, A. (2016). Platelet-Rich Blood Derivatives for Stem Cell-Based Tissue Engineering and Regeneration. In *Current Stem Cell Reports* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0034-8>

- Masaki, H., Okudera, T., Watanebe, T., Suzuki, M., Nishiyama, K., Okudera, H., Nakata, K., Uematsu, K., Su, C.-Y., & Kawase, T. (2016). Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International Journal of Implant Dentistry*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s40729-016-0052-4>
- Naik, B., Karunakar, P., Jayadev, M., & Rahul Marshal, V. (2013). Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. In *Journal of Conservative Dentistry* (Vol. 16, Issue 4, pp. 284–293). <https://doi.org/10.4103/0972-0707.114344>
- Negut, I., Grumezescu, V., & Grumezescu, A. M. (2018). Treatment strategies for infected wounds. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092392>
- Ozer, K., & Colak, O. (2019). Leucocyte- And platelet-rich fibrin as a rescue therapy for small-to-medium-sized complex wounds of the lower extremities. *Burns and Trauma*, 7. <https://doi.org/10.1186/s41038-019-0149-0>
- Padhy, A., Mishra, R., Behera, S. S., Sahu, A. R., & Sahoo, S. (2014). Microbial profile of canine persistent wound infections. *Veterinary World*, 7(4). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.244-247>
- Perego, R., Spada, E., Moneta, E., Baggiani, L., & Proverbio, D. (2021). Use of autologous leucocyte- and platelet-rich plasma (L-prp) in the treatment of aural hematoma in dogs. *Veterinary Sciences*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/vetsci8090172>
- Pitzurra, L., Jansen, I. D. C., de Vries, T. J., Hoogenkamp, M. A., & Loos, B. G. (2020). Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. *Journal of Periodontal Research*, 55(2). <https://doi.org/10.1111/jre.12714>
- Rahman, M. M., Amin, K. B., Rahman, S. M. M., Khair, A., Rahman, M., Hossain, A., Rahman, A. K. M. A., Parvez, M. S., Miura, N., & Alam, M. M. (2018). Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates from humans and animals by culture methods and multiplex PCR 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiolog. *BMC Veterinary Research*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1611-0>
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. In *European Surgical Research* (Vol. 49, Issue 1). <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Soares, C. S., Babo, P. S., Faria, S., Pires, M. A., & Carvalho, P. P. (2021). Standardized Platelet-Rich Fibrin (PRF) from canine and feline origin: An analysis on its secretome pattern and architectural structure. *Cytokine*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155695>
- Soares, C. S., Babo, P. S., Reis, R. L., Carvalho, P. P., & Gomes, M. E. (2021). Platelet-Derived Products in Veterinary Medicine: A New Trend or an Effective Therapy? In *Trends in Biotechnology* (Vol. 39, Issue 3, pp. 225–243). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.07.011>

Soares, C. S., Barros, L. C., Saraiva, V., Gomez-Florit, M., Babo, P. S., Dias, I. R., Reis, R. L., Carvalho, P. P., & Gomes, M. E. (2018). Bioengineered surgical repair of a chronic oronasal fistula in a cat using autologous platelet-rich fibrin and bone marrow with a tailored 3D printed implant. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20(9).

<https://doi.org/10.1177/1098612X18789549>

Soares, C. S., Dias, I. R., Pires, M. A., & Carvalho, P. P. (2021). Canine-origin platelet-rich fibrin as an effective biomaterial for wound healing in domestic cats: A preliminary study. *Veterinary Sciences*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/vetsci8100213>

Tsujino, T., Masuki, H., Nakamura, M., Isobe, K., Kawabata, H., Aizawa, H., Watanabe, T., Kitamura, Y., Okudera, H., Okuda, K., Nakata, K., & Kawase, T. (2019). Striking differences in platelet distribution between advanced-platelet-rich fibrin and concentrated growth factors: Effects of silica-containing plastic tubes. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(3).

<https://doi.org/10.3390/jfb10030043>

Vendramini, T. H. A., Amaral, A. R., Pedrinelli, V., Zafalon, R. V. A., Rodrigues, R. B. A., & Brunetto, M. A. (2020). Neutering in dogs and cats: Current scientific evidence and importance of adequate nutritional management. In *Nutrition Research Reviews* (Vol. 33, Issue 1).

<https://doi.org/10.1017/S0954422419000271>

Wessely-szponder, J., Zdziennicka, J., Junkuszew, A., Latalski, M., Świeca, M., & Szponder, T. (2022). Prospects and applications of natural blood-derived products in regenerative medicine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 1).

<https://doi.org/10.3390/ijms23010472>

Yamakawa, S., & Hayashida, K. (2019). Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. In *Burns and Trauma* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1186/s41038-019-0148-1>

# **Anexos**

## Anexo I



Associação Cognitória Vasco da Gama

### COMISSÃO DE ÉTICA



Escola Universitária Vasco da Gama

#### PARECER

---

**Título do Projeto:** Estudo in vitro da atividade antimicrobiana da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) de cães, gatos e cavalos

**Investigador Responsável:** Professor Doutor Hugo Corte-Real Vilhena

**Referência interna:** 08/2022

---

#### Parecer Nº 08/2022

A Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama procedeu à análise do Projeto de carácter científico, mencionado em epígrafe, incluindo o resumo não técnico, a descrição resumida do plano de investigação e o termo de responsabilidade e, no cumprimento das suas funções, opção B - decide aprovar a sua realização sem esclarecimentos adicionais.

Aprovado no dia 26 de Abril de 2022, por unanimidade.

Pe' A CE-EUVG  
Assinado por: **Ferdinando Bernardino de Freitas**  
Num. de Identificação: 12149864  
Data: 2022.04.26 23:31:25+01'00'



Ferdinando Bernardino de Freitas

(Presidente)



## COMISSÃO DE ÉTICA



Associação Cognitória Vasco da Gama

Escola Universitária Vasco da Gama

### Observações:

- Observação 1
- Observação 2
- Observação 3

## Anexo II

Protocolo adaptado a partir da Técnica de Kirby-Bauer para Teste de Suscetibilidade Antimicrobiano por método de difusão (EUCAST):

1. Preparação do meio de cultura
  - a. O meio de Mueller Hinton (MH) foi preparado, esterilizado e arrefecido até atingir temperatura de cerca de 45°C.
  - b. Foi efetuada a distribuição em placa de Petri estéril até perfazer uma altura de 4 mm +/- 0,5mm (cerca de 9 mL de meio).
  - c. As placas foram armazenadas a temperatura de refrigeração (5±3°C).
2. Preparação do inóculo
  - a. Cada agente testado foi inoculado Agar MH 24 horas antes do ensaio.
  - b. Para inoculação das placas do ensaio, para cada agente testado, foi preparada uma suspensão bacteriana em 5 mL de solução salina fisiológica estéril com uma densidade 0,5 na escala de MacFarland.
  - c. A inoculação das placas foi realizada utilizando uma zaragatoa estéril garantindo o espalhamento do inóculo em toda a superfície do agar MH. Para cada amostra, foram preparadas placas com inóculo de agentes em duplicado (soro e PRF).
3. Preparação das placas para teste PRF
  - a. Cada amostra de PRF previamente preparado e mantidos em refrigeração (5±3°C) foi colocado em cada placa em duplicado, tendo sido colocado um disco de papel estéril (4mm) em cima.
  - b. Foi ainda colocado um disco de papel estéril (4mm) em cada placa, como controlo negativo.
  - c. Foi colocado um disco impregnado com antibiótico (6mm) específico para cada cultura (controlos positivos): amicacina (30 µg) para as placas inoculadas com *E. coli* b., tobramicina (10 µg) para o *S. aureus* b. e piperacilina (100 µg) para *P. aeruginosa* b..
  - d. Todos com igual distância uns dos outros (PRFs, controlo negativo e positivo).
4. Junção dos soros ao meio inoculado com microrganismos
  - a. O soro de cada PRF, mantidos em refrigeração (5±3°C), foi em cada placa em duplicado, com o auxílio de uma micropipeta com pontas estéreis, com um disco de papel estéril (4 mm).
  - b. Foi ainda colocado um disco de papel estéril (4mm) em cada placa, como controlo negativo.
  - c. Foi colocado um disco impregnado com antibiótico (6mm) específico para cada cultura (controlos positivos): amicacina (30 µg) para as placas inoculadas com *E. coli* b., tobramicina (10 µg) para o *S. aureus* b. e piperacilina (100 µg) para *P. aeruginosa* b..
  - d. Todos com igual distância uns dos outros (soro, controlo negativo e positivo).

5. Leituras dos halos de inibição

- a. As placas foram incubadas em atmosfera de aerobiose a 37°C, durante um total de 72 horas.
- b. As leituras foram realizadas em três momentos: 24, 48 e 72 horas.

### Anexo III

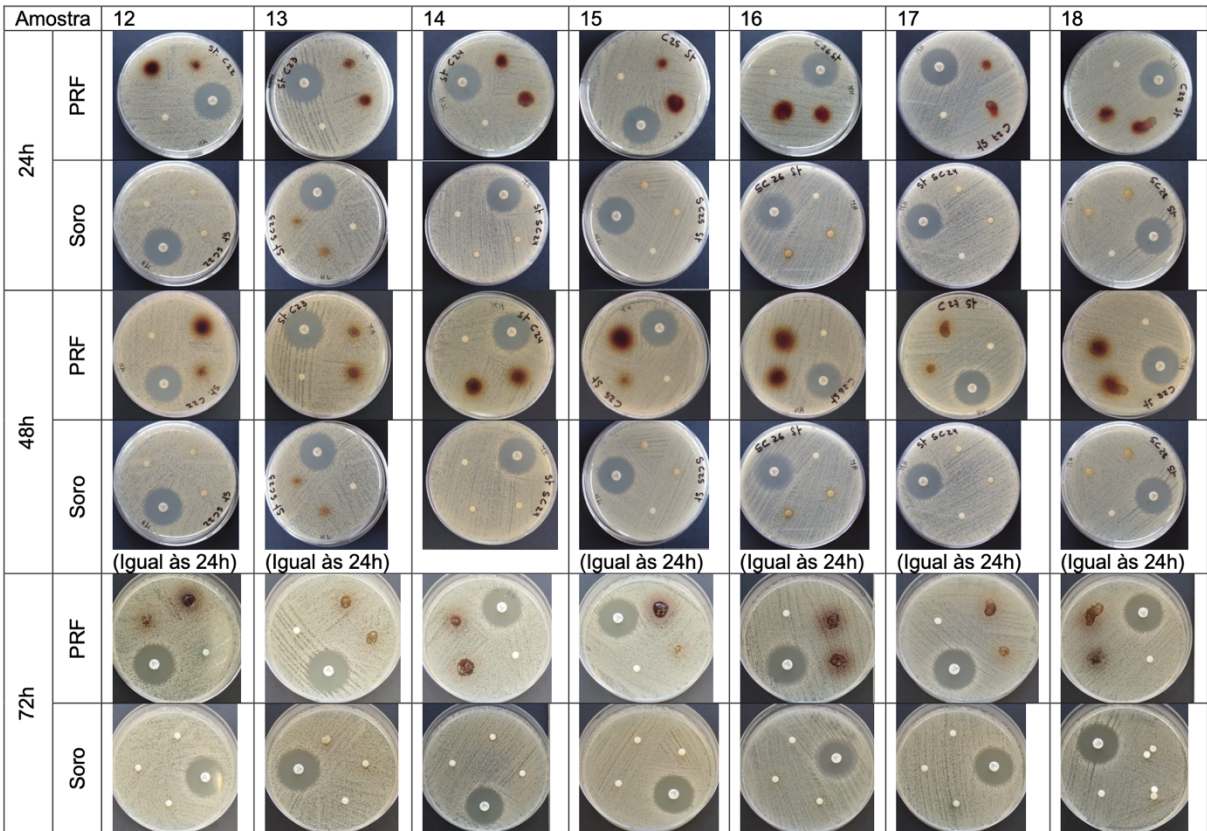
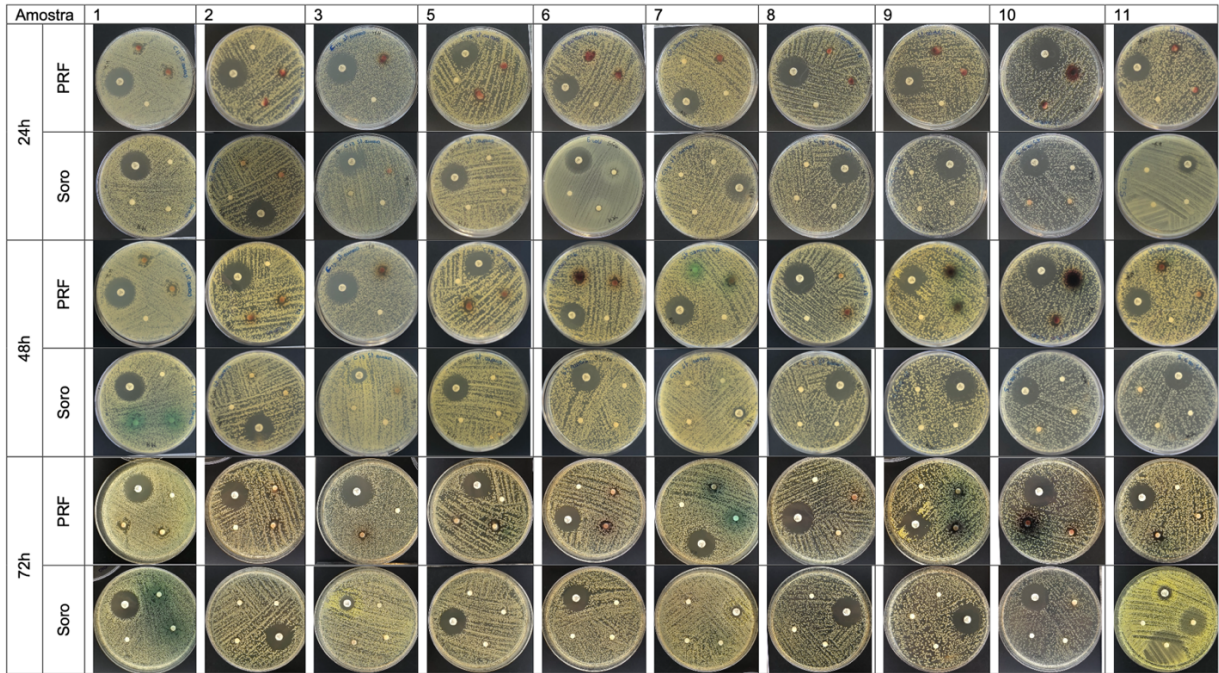
**Tabela 6.** Leituras dos halos de inibição em placas MH inoculadas com *Escherichia coli* b. às 24, 48 e 72 horas após incubação.

Amostra	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	
24h	PRF										
	Soro										
48h	PRF										
	Soro										
72h	PRF										
	Soro										

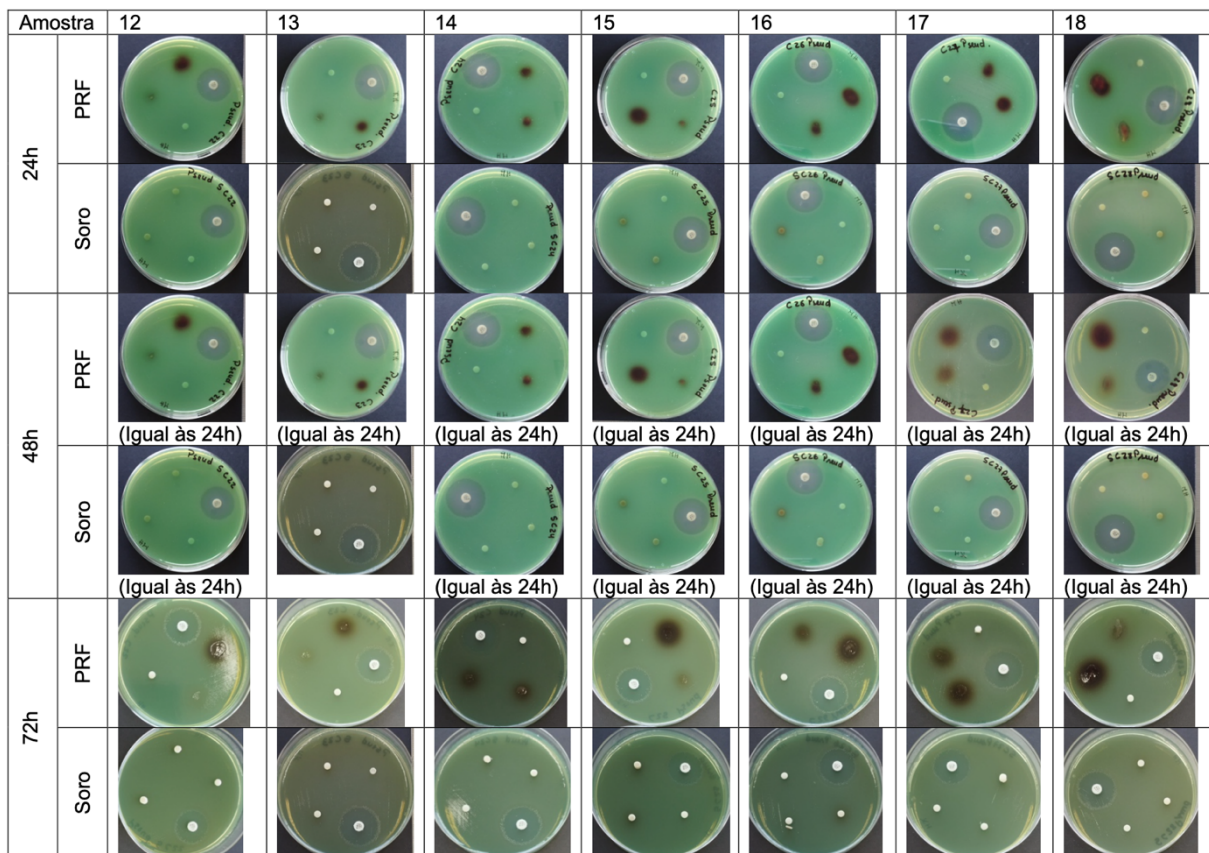
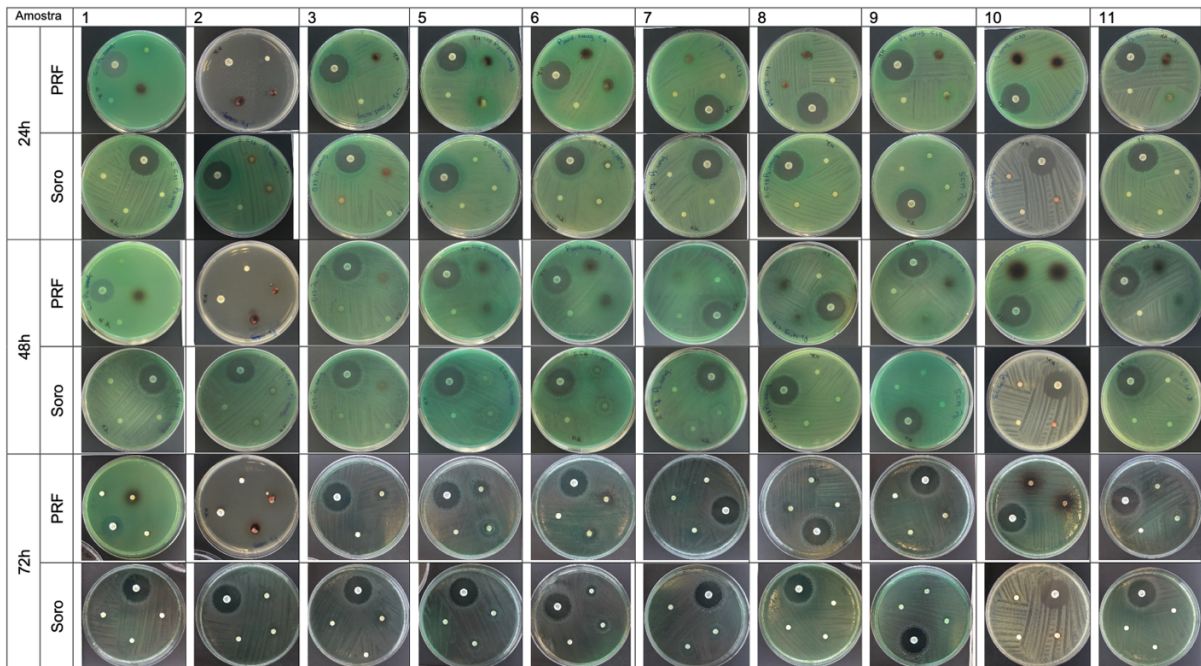
  

Amostra	12	13	14	15	16	17	18	
24h	PRF							
	Soro							
48h	PRF							
	Soro							
72h	PRF							
	Soro							

**Tabela 7.** Leituras dos halos de inibição em placas MH inoculadas com *Staphylococcus aureus* b. às 24, 48 e 72 horas após incubação.



**Tabela 8.** Leituras dos halos de inibição em placas MH inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa* b. às 24, 48 e 72 horas após incubação.



## Anexo IV

Tabela 9. Medições dos halos de inibição dos PRF e soros autólogos.

Animal nº.	Halos de inibição (mm)											
	<i>E. coli</i> b.			<i>S. aureus</i> b.						<i>P. aeruginosa</i> b.		
	24h		48h		72h		24h		48h		72h	
	PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro
1	3,00	0,00	1,50	0,00	2,00	0,00	1,50	0,00	1,00	0,00	0,50	0,00
2	2,00	0,00	2,50	0,00	3,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	0,50	0,00
3	1,50	6,00	1,00	0,00	1,50	0,00	1,50	6,00	1,00	0,00	X	6,00
4	1,00	0,00	1,50	0,00	1,00	0,00	0,50	0,00	2,00	0,00	X	0,00
5	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,50	0,00	2,00	0,00	0,50	0,00
6	X	0,00	X	0,00	X	0,00	X	0,00	X	0,00	X	6,00
7	3,50	0,00	3,50	0,00	4,00	0,00	2,00	6,00	3,50	0,00	3,50	0,00
8	1,00	0,00	2,50	0,00	3,50	0,00	1,00	8,00	1,00	0,00	0,50	0,00
9	0,00	6,00	0,00	5,00	0,00	5,00	1,00	6,00	3,50	0,00	3,50	0,00
10	0,00	6,00	0,00	6,00	0,00	6,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	6,00
11	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	2,00	0,00	3,00	0,00	2,50	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	4,00	5,00
14	1,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	1,50	0,00	2,00	0,00	0,50	5,00
15	0,50	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	2,50	0,00	1,00	0,00
16	0,50	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	2,00	0,00	0,50	0,00
17	1,00	0,00	1,50	0,00	2,00	0,00	1,00	0,00	3,00	6,00	2,50	0,00
18	0,50	0,00	1,00	0,00	0,50	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
19	1,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	1,50	6,00	2,50	6,00	0,50	0,00
20	1,00	0,00	0,50	0,00	2,50	0,00	2,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
21	2,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00
22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00
23	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	3,00	0,00	1,00	0,00
24	2,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	1,00	0,00
25	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	3,00	0,50	3,00	0,00	1,00	1,00
26	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,50	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
29	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
30	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	3,00	0,00
31	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	1,00	0,00
32	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
33	3,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00
34	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00

Tabela 10. Medição dos halos de inibição dos controlos positivo e negativo.

Animal nº.	Halos de inibição (mm)											
	Controlo Positivo (6mm)						Controlo Negativo (4mm)					
	<i>E. coli</i> b.		<i>S. aureus</i> b.		<i>P. aeruginosa</i> b.		<i>E. coli</i> b.		<i>S. aureus</i> b.		<i>P. aeruginosa</i> b.	
PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro	PRFs	Soro	
1	9,50	7/9,5	9,00	9,50	9,00	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	7/9,5	0,70	9,50	9,50	X	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	X	0,00
3	7/9,5	13,50	10,00	4,50	9,50	9,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	Excluído		Excluído		Excluído		Excluído		Excluído		Excluído	
5	5,5/7	6,5/8,5	8,50	9,00	9,50	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	6,5/8	8,50	9,00	8,00	9,50	9,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	7/5,5	8,50	7,00	4,5/7,5	9,50	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	6,5/8,5	6,0/9	10,00	9,00	9,50	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	6/9,5	6,0/10	9,00	10,00	9,50	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	6,0/9	6,5/9	10,50	10,00	10,50	9,50	0,00	0,00	X	0,00	X	0,00
11	4,5/9	4,50	8,50	8,00	10,50	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	10,00	9,50	10,50	10,50	9,50	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	10,00	10,00	10,50	10,50	10,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	10,00	10,00	9,50	9,50	10,00	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	10,00	10,00	9,50	9,50	9,50	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	10,00	10,00	9,50	8,50	10,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	10,00	10,00	10,50	10,50	9,50	9,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	10,50	10,00	9,50	9,50	10,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Legenda: Números a vermelho: halo de diminuição da atividade antibacteriana.

X: sem PRF