



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

BIANCA AYUMI LIMA TANIGUCHI

**ANÁLISE FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA**

Presidente Prudente - SP
2018



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

BIANCA AYUMI LIMA TANIGUCHI

**ANÁLISE FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Prof^a Dr^a Cecília Braga Laposy

Presidente Prudente - SP
2018

636.932
2T64a

Taniguchi, Bianca Ayumi Lima.

Análise fractal de feridas dérmicas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas e rosuvastatina / Bianca Ayumi Lima Taniguchi. – Presidente Prudente, 2018.

33 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Braga Laposy

1. Coelhos 2. Dimensão fractal 3. PRP 4. Rosuvastatina tópica 5. Feridas. I. Título.

BIANCA AYUMI LIMA TANIGUCHI

**ANÁLISE FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 27 de setembro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cecília Braga Laposy
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho –Unesp
Presidente Prudente

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista- Unoeste
Presidente Prudente-São Paulo

DEDICATÓRIA

Sou grata a Deus, que me ajudou em cada etapa desse trabalho e não me deixou fraquejar.

Aos meus pais, meus avós, minha irmã que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constante.

Ao meu namorado Kaike, por seu apoio e paciência durante minha caminhada.

À professora e orientadora Dr^a Cecília, por seus ensinamentos, paciência e confiança ao longo das supervisões das minhas atividades no mestrado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a Cecília Braga Laposy, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, ensino e compreensão durante o decorrer do curso.

As colaboradoras prof^a Dr^a Gisele Alborghetti Nai e prof^a Dr^a Rosa Maria Barilli Nogueira.

Agradecimento especial aos alunos de iniciação científica do curso de medicina veterinária da UNOESTE Alana Acorsi, Elena Moreira, Mayara Gimenez, Yuri Vicentini pelo auxílio durante o experimento deste trabalho.

A colega de mestrado Maria Rosa S Breda que colaborou muito para realização deste trabalho.

Pesquisador Me. Guilherme Akio Tamura Ozaki, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP de Presidente Prudente, por seu tempo em auxiliar com a técnica de dimensão fractal.

A todos os professores da UNOESTE por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo fornecimento da taxa para realização do meu mestrado.

À instituição UNOESTE, seu corpo docente, direção e administração pelo suporte fornecido.

RESUMO

Análise fractal de feridas dérmicas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas e rosuvastatina

O processo cicatricial compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para restaurar o tecido lesado. Os biomateriais como o plasma rico em plaquetas (PRP) têm sido muito utilizados para a promoção de cicatrização, pela melhor distribuição do colágeno. Além disso, estudos mostram que as estatinas associadas a biomateriais podem melhorar a função endotelial e aumentar a reepitelização. A análise da arquitetura do colágeno é fundamental quando se trata de cicatrização. Uma forma de avaliação utilizada para identificar alterações estruturais na pele é a dimensão fractal, que permite caracterizar estruturas irregulares em lâminas histológicas e quantificar as alterações existentes, de maneira mais precisa, pois se trata de uma técnica que independe do avaliador. Este estudo teve por objetivo verificar a viabilidade do uso da rosuvastatina (RSV) associada ou não ao PRP autólogo de forma seriada, para analisar as fibras colágenas por meio da dimensão fractal. Foram utilizadas 100 biopsias de feridas de pele induzidas experimentalmente de coelhos adultos, machos, tratadas ou não com PRP, RSV e associação, que foram acompanhadas aos 7, 14 e 17 dias. Em todos os tratamentos houve uma diminuição da DF, verificada até o 17^o dia. A DF das feridas que receberam diferentes tratamentos foi menor nos primeiros sete dias ($P < 0,05$), mostrando que a adição da RSV ao PRP de forma seriada pode favorecer a reorganização das fibras no processo de cicatrização inicial. A utilização da DF para avaliação de colágeno mostrou-se confiável.

Palavras-chave: coelhos, dimensão fractal, PRP, rosuvastatina tópica, feridas.

ABSTRACT

Fractal analysis of dermal wounds from rabbits treated with platelet rich plasma and rosuvastatin

The cicatricial process comprises a sequence of events and cellular interacting to restore damaged tissue. Biomaterials such as platelet rich plasma (PRP) were widely used for a healing promotion, due to the better distribution of collagen. In addition, studies show that biomaterial-associated statistics can improve endothelial function and increase re-epithelialization. Analysis of collagen architecture is critical when it comes to healing. A form of evaluation used to individualize the changes in the history and quantify as the existing changes, more precisely, because it is a technique that is independent of the evaluator. This is a research program to evaluate the use of rosuvastatin (RSV) associated with autologous PRP in serial form, to analyze how the ability of expression through the fractal dimension. 100 skin biopsies induced experimentally by male adults, treated or not with PRP, RSV and association, were followed at 7,14 and 17 days. In all procedures there was a decrease in the DF, verified up to 170 days. The WF of the Wounds That Know the Departure of the Different Doses Seven Days ($P < 0.05$), It was verified that, unlike PRP in a serious way, the reorganization of the fibers in the initial healing process can be favored. The use of DF for collagen evaluation proved to be reliable.

Keywords: rabbits, fractal dimension, PRP, topical rosuvastatin, wounds.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
	ANEXO 1.....	30
	ANEXO 2.....	31

1 ARTIGO CIENTÍFICO¹

Análise fractal de feridas dérmicas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas e rosuvastatina tópica

Bianca AL Taniguchi¹, Maria Rosa S Breda¹, Alana PZ Acorsi², Rosa Maria B Nogueira¹, Gisele A Nai¹, Cecília B Laposy¹

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil¹; Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil².

Autor para correspondência: Cecília Braga Laposy, Dr. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. Tel: +55 (018) 99623-0772; Fax: +55 (18) 3229-2080
E-mail:claposy@unoeste.br

Título abreviado: análise fractal de feridas com PRP e rosuvastatina

Agradecimentos: à Universidade do Oeste Paulista pelo suporte financeiro.

Declaro não haver conflitos de interesse.

Resumo: 233 palavras

Tabelas: 2

Figuras coloridas: 5

¹ Artigo redigido segundo as normas da revista International Journal of Clinical and Experimental Pathology.

Resumo

O processo cicatricial compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para restaurar o tecido lesado. Os biomateriais como o plasma rico em plaquetas (PRP) têm sido muito utilizados para a promoção de cicatrização, pela melhor distribuição do colágeno. As estatinas associadas a biomateriais podem melhorar a função endotelial e aumentar a reepitelização. A análise da arquitetura do colágeno é fundamental quando se trata de cicatrização. Uma forma de avaliação utilizada para identificar alterações estruturais na pele é a dimensão fractal, que permite caracterizar estruturas irregulares em lâminas histológicas e quantificar as alterações existentes, de maneira mais precisa, pois se trata de uma técnica que independe do avaliador. Este estudo teve por objetivo verificar a viabilidade do uso da rosuvastatina (RSV) associada ou não ao PRP autólogo de forma seriada, para analisar as fibras colágenas por meio da dimensão fractal. Foram utilizadas 100 biopsias de feridas de pele induzidas experimentalmente de coelhos adultos, machos, tratadas ou não com PRP, RSV e associação, que foram acompanhadas aos 7, 14 e 17 dias. Em todos os tratamentos houve uma diminuição da DF, verificada até o 17^o dia. A DF das feridas que receberam diferentes tratamentos foi menor nos primeiros sete dias ($P < 0,05$), mostrando que a adição da RSV ao PRP de forma seriada pode favorecer a reorganização das fibras no processo de cicatrização inicial. A utilização da DF para avaliação de colágeno mostrou-se confiável.

Palavras-chaves: Coelhos, dimensão fractal, PRP, rosuvastatina tópica, feridas.

Introdução

A pele é a primeira barreira protetora do corpo e tem uma função muito importante na defesa contra corpos estranhos e agentes patogênicos. O colágeno é o principal elemento presente na derme, sendo que são encontrados dois tipos de colágenos, o tipo I e tipo III. Particularmente, na matriz dérmica o colágeno tipo I é o que mais predomina e o colágeno tipo III é encontrado em menor proporção. Nas feridas é o inverso, predominando o colágeno tipo III [1,2].

A cura da ferida é uma resposta natural de reparação tecidual que contém três fases distintas: inflamação, proliferação e maturação. Se por acaso ocorrer falha ou prolongamento em alguma das três fases, pode haver atraso da oclusão desta ferida [3].

A fase inflamatória é marcada pela presença de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, além de vários mediadores químicos. Na fase seguinte, proliferação, ocorre uma reconstituição epidérmica, com proliferação de fibroblastos na região mais superficial da ferida modulada aparentemente pelos macrófagos. Na maturação ou remodelação ocorre diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, dura meses e é responsável pela maturação do tecido cicatricial [4,5].

A cicatrização de feridas é um processo mediado principalmente por plaquetas, que desempenham um papel fundamental na hemostasia, consistindo em um processo de inflamação, reparação e remodelação do tecido lesionado [6].

Os biomateriais têm sido muito utilizados para a promoção de cicatrização mais homogênea, pela melhor distribuição do colágeno [7]. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um biomaterial obtido a partir de centrifugações do sangue, rico em fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e outros, que levam à regeneração endotelial e epitelial, síntese de colágeno, ação angiogênica, analgésica e anti-inflamatória [8-10].

Além do uso do PRP em processos cicatriciais, estudos mostram que as estatinas podem desempenhar múltiplos efeitos, incluindo ações antioxidantes, antitrombóticas, anti-inflamatórias e melhora da função endotelial [11]. Considerada uma nova classe de estatina, a rosuvastatina (RSV) possui efeitos hipolipemiantes,

porém na sua ação anti-inflamatória, induz a secreção de citocinas que modulam a resposta inflamatória e reduz a alta sensibilidade da proteína C reativa, desempenhando um efeito benéfico em reações imunológicas excessivas, promovendo uma resolução normal da resposta inflamatória [12].

A dimensão fractal (DF) é uma ferramenta digital que permite identificar alterações e regularidade de um objeto em diferentes escalas dimensionais [13]. Na área da medicina humana, a DF vem sendo utilizada em estudos com neurônios, nos carcinomas hepáticos e ainda caracterizar estruturas irregulares em lâminas histológicas de pele [14-18]. Apesar dos resultados serem mais precisos, pois é uma técnica que independe do avaliador, ela ainda é pouco utilizada, especialmente para análise do colágeno em processos cicatriciais.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo verificar a viabilidade do uso da RSV associada ou não ao PRP autólogo de forma seriada para avaliar as fibras colágenas por meio da dimensão fractal.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados em 8 coelhos adultos, machos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia, peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg, mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo (12 horas claro/escuro) controlados, com água e ração *ad libitum*. O trabalho foi aprovado pela comissão de Ética e Uso de Animais (protocolo número 3478) da Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil (Anexo 1).

Procedimento anestésico

Os coelhos foram contidos manualmente para realização da tricotomia da região dorsal direita e esquerda. Em seguida, os animais foram anestesiados (intramuscular-IM) com uma associação de cloridrato de Xilazina a 2% (Xilazin[®] 2%) e Cloridrato de Zolazepam (Zoletil[®] 50) na dose de 15mg/Kg intramuscular. Feito isso, aplicou-se previamente 0,1 mL de anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor) no local de cada lesão.

Feridas cirúrgicas

Com os animais anestesiados, a pele foi demarcada em quatro locais com auxílio de caneta utilizado um punch de 8mm para realização das feridas cirúrgicas. Os fragmentos foram retirados com auxílio de uma pinça anatômica, preservando a musculatura. A ferida considerada controle (lado esquerdo superior-A) foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9%[®]. A lesão do lado esquerdo inferior recebeu o gel de RSV a 1,2% (C). A ferida do lado direito superior foi tratada com PRP autólogo na forma gel (B) e a ferida do lado direito inferior recebeu gel de RSV e PRP autólogo gel (D) (Figura 1). Em seguida foi colocado um curativo sobre as quatro feridas (lado direito e esquerdo/ superior e inferior) com ryon estéril e curativo adesivo (Band Aid[®]).

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam analgésico cloridrato de Tramadol, na dose de 0,5mg/Kg, IM, 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos, a fim de minimizar o desconforto inicial. A primeira troca dos curativos foi feita 3 dias após a indução das feridas e este segundo curativo permaneceu por mais quatro dias. A partir disso, os tratamentos ocorreram a cada 4 dias, segundo protocolo estabelecido por Vendramin et al. [19], até completarem 16 dias de experimento. As biópsias foram feitas nos momentos 0,7,14 e 17 dias para posterior análise histológica.

As amostras de pele foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se a seguir 4 cortes histológicos de 4 micrômetros de cada animal que foram corados com solução de Hematoxilina-Eosina (H/E) para aferição do colágeno.

Preparo da Rosuvastatina

Formulou-se a RSV a 1,2% na forma líquida a fim de ser incorporada ao PRP e posteriormente todo o material foi transformado em gel com a adição do gluconato de cálcio. Para o tratamento da ferida somente com gel de RSV, formulou-se a RSV a 1,2% na forma gel.

Preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)

Após procedimento anestésico, colheu-se 8mL de sangue proveniente da veia auricular utilizando scalp 25G. O material foi transferido para dois frascos contendo o

anticoagulante citrato de sódio. Deste material foi retirada uma alíquota para a contagem automática de plaquetas (contador automático Sysmex Poch Diff 100iV-Roche) e depois centrifugado, inicialmente a 200G (centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos para formação de dois níveis: toda a fração correspondente ao plasma mais 200µL da fração vermelha foi transferida para outro tubo para nova centrifugação (400G por 10 minutos).

Nesta segunda etapa formaram-se dois níveis distintos: um superior com coloração levemente amarelado denominado plasma pobre em plaquetas (PPP) e um inferior, avermelhado. Retirou-se o PPP e do restante foi realizada nova contagem de plaquetas, com o objetivo de verificar se houve concentração superior a seis vezes do inicial [19]. Após constatação da concentração plaquetária adequada, foram preparados dois tubos: um contendo 200µL de PRP líquido, 200µL de rosuvastatina líquida e 100 µL de gluconato de cálcio a 10%. O segundo tubo contendo 400 µL de PRP líquido e 100 µL de gluconato de cálcio a 10%, sendo que para ambos os frascos o volume final de PRP em gel foi de 0,5mL.

Captação das imagens

Para a captação das imagens, foi utilizado microscópio de luz de polarizada (Leica DM 750, Wetzlar, Germany) acoplado a uma câmera (Leica ICC 50 HD, Wetzlar, Germany). As imagens foram capturadas com padronização de objetiva de aumento de 20 vezes, intensidade máxima de luz do microscópio e polarização em plano de 90°.

Dimensão fractal

Para análise da dimensão fractal da pele (figura 2 a 5), as lâminas tanto coradas com HE quanto por picrosirius e fotografadas foram binarizadas para leitura e a dimensão fractal estimada pelo método *Box-counting*, por meio do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O software considera o *Box-counting* em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuem a mesma dimensão fractal.

Desta forma a análise das lâminas histológicas fractais baseou-se na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado pode ser quantitativamente expresso como a dimensão fractal do objeto que é $DF = (\log N_r / \log r - 1)$. Sendo N_r a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal calculada com o software ImageJ fica sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes.

Análise estatística

Previamente às análises, todos os grupos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para validação do pressuposto de normalidade dos dados, pelo qual se verificou que as variáveis apresentaram distribuição não-paramétrica. As feridas controle e as dos diferentes tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e dentro de cada grupo, com contrastes pelo método de Student-Newman-Keuls. Os dados foram demonstrados por média e desvio padrão. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

Contagem de Plaquetas

A quantidade de plaquetas média no grupo de PRP levando em consideração os 17 dias de tratamento foi de $128,6 \pm 28,9/\text{mm}^3$ e o plasma rico em plaquetas chegou a $834,0 \pm 110,9/\text{mm}^3$ superando em seis vezes a concentração inicial conforme preconizou Vendramin et al. [19].

Análise Fractal

Os resultados da dimensão fractal do colágeno das lâminas coradas por Picrosirius e H/E referentes aos diferentes tratamentos estão expressos nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Nas lâminas coradas com Picrosirius, houve uma diferença significativa após uma semana da lesão e tratamento de todas as feridas, principalmente quando observamos as lesões que receberam a RSV associada ao PRP (ferida D). A partir do 14^o dia até o final do experimento, não houve alterações na avaliação da DF do colágeno nos diferentes tratamentos.

Observou-se também que a associação da RSV com o PRP apresentou menor DF no momento 7 na avaliação de fibras colágenas. Na ferida controle (A) não houve

diferença significativa entre os momentos 0 e 7, diferentemente do que foi verificado nas lesões C e D.

Quando se analisou as lâminas coradas com H/E, houve uma diminuição significativa do colágeno na ferida que recebeu somente PRP aos 14 dias ($p < 0,05$).

Discussão

Nas lâminas coradas com picosirius houve diferença significativa no processo inicial de cicatrização e foi observado também uma diferença significativa entre os momentos 0 e 7 comparando a ferida controle com a associação de RSV e PRP e somente PRP. Com a coloração de HE, somente houve diferença significativa no momento 14 com PRP.

As plaquetas desempenham um papel central na cicatrização de feridas, pois liberam fatores de crescimento que, diretamente influenciam na reparação tecidual, além de citocinas e quimiocinas envolvidas na modulação da resposta inflamatória [20]. O PRP ainda está relacionado com a secreção da colagenase e estímulo à síntese de colágenos tipo I e III, que são sintetizados por fibroblastos, importantes componentes estruturais do tecido cicatricial maduro [21].

A RSV acelerou o processo de cicatrização inicial das lesões, ou seja, a atuação da RSV acontece principalmente na fase inflamatória do processo de cicatrização.

Um estudo realizado por Karadeniz et al. [22] demonstrou benefícios em lesões realizadas em ratos saudáveis, com a melhora de reepitelização nos grupos tratados com estatina.

Türer et al. [23] analisaram o efeito da administração local da rosuvastatina em defeitos ósseos calvários preenchidos com enxertos autógenos em ratos, onde concluíram que a administração local de 1 mg de RSV aumentava a regeneração óssea.

Não foi encontrado estudos sobre a avaliação da RSV com PRP no processo cicatricial. Em geral, há poucos estudos em relação às estatinas, sobre efeitos fora da sua atuação como hipolipemiante [24].

A diminuição inicial da DF nos primeiros 7 dias pós lesão leva a uma hipótese que neste período as fibras estão no início de sua reorganização, deixando ainda algumas lacunas, edemas, que ao serem analisadas por esta ferramenta digital acabam diminuindo o valor. Esta observação foi mais evidente nas feridas que

receberam a rosuvastatina, o que leva a supor que o uso do referido medicamento é útil na primeira semana da lesão para reorganizar as fibras colágenas e melhorar a qualidade da cicatriz.

Conclui-se que o uso da RSV associada ou não ao PRP foi eficaz nos primeiros sete dias de lesão. Porém, mais estudos são necessários para avaliar o aumento ou não do colágeno com associação da RSV e PRP em feridas experimentais.

Referências

- [1] Valenti DMZ, Silva JA, Teodoro WR, Velosa PA, Mello SBV. Avaliação da histoarquitetura do colágeno no tecido cutâneo após a utilização tópica da argila em ratos. *Rev Bras Cie Saude* 2010; 8: 22-31.
- [2] Nicolau JAZ, Faria PF, Marques LO, Hoepers DF, Rocha AD, Sobral ACL. Análise do efeito do estradiol e progesterona tópicos na cicatrização de feridas em ratos. *Surg Cos Derm* 2014; 6: 126-129.
- [3] Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 509-528.
- [4] Oliveira IVPM, Dias RVC. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Vet Bras* 2012; 6: 267-271.
- [5] Macedo JL, Pereira IC, Oliveira ASSS, Magalhães MJS. Phytotherapy effectiveness in the process of healing of patients with diabetes mellitus tissue diagnosis. *ReonFacema* 2017; 3: 396-400.
- [6] Fathi WK. The Effect of Hyaluronic Acid and Platelet – Rich Plasma on Soft Tissue Wound Healing: An Experimental Study on Rabbits. *Al-Rafidain Dent J* 2012; 12: 115-125.
- [7] Yu C, Hu ZQ, Peng RY. Effects and mechanisms of a microcurrent dressing on skin wound healing: a review. *Mil Med Res* 2014; 1-24 doi: 10.1186/2054-9369-1-24.
- [8] Shin KH, Lee H, Kang S, Ko YJ, Lee SY, Park JH, Bae JH. Effect of Leukocyte-Rich and Platelet-Rich Plasma on Healing of a Horizontal Medial Meniscus Tear in a Rabbit Model. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 179756. doi: 10.1155/2015/179756.
- [9] Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, Falisi G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 924-930.
- [10] Ostvar O, Shadvar S, Yahaghi E, Azma K, Fayyaz AF, Ahmadi K, Nowrouzian I. Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinico-histopathologic study in rabbits. *Diagn Pathol* 2015; 10: 85 doi: 10.1186/s13000-015-0327-8.
- [11] Xie W, Li P, Wang Z, Chen J, Lin Z, Liang X, Mo Y. Rosuvastatin may reduce the incidence of cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes

receiving percutaneous coronary intervention by suppressing miR-155/SHIP-1 signaling pathway. *Cardiovasc Ther* 2014; 32: 276-282.

[12] Craig TR, Duffy MJ, Shyamsundar M, McDowell C, O'Kane CM, Elborn JS, McAuley DF. A randomized clinical trial of hydroxymethylglutarylcoenzyme a reductase inhibition for acute lung injury (the HARP study). *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 620-626.

[13] Borowska M, Szarmach J, Oczeretko E. Fractal texture analysis of the healing process after bone loss. *Comput Med Imag Grap* 2015; 46: 191-196.

[14] Ristanović D, Stefanović BD, Puškaš N. Fractal Analysis of Dendrite Morphology Using Modified Box-Counting Method. *Neurosci Res* 2014; 84: 64-67.

[15] Lee LH, Tambasco M, Otsuka S, Wright A, Klimowicz A, Petrillo S, Morris D, Magliocco A, Bebb DG. Digital Differentiation of Non-Small Cell Carcinomas of the Lung by the Fractal Dimension of Their Epithelial Architecture. *Micron* 2014; 67: 125-131.

[16] Huynh HN, Pradana A, Chew LY. The Complexity of Sequences Generated by the Arc-Fractal System. *PLoS One* 2015 (10.1371/journal.pone.0117365).

[17] Pacagnelli FL, Sabela AK, Mariano TB, Ozaki GA, Castoldi RC, Carmo EM, Carvalho RF, Tomasi LC, Okoshi K, Vanderlei LC. Fractal Dimension in Quantifying Experimental-Pulmonary-Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107: 33-39.

[18] Ozaki G, Camargo RCT, Koike TE, Garcia TA, Castoldi RC, Camargo Filho JCS. Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats Subjected to Stretch Injury Analysis. *Int J Morphol* 2015; 33: 908-913.

[19] Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cirur Plast* 2009; 24 (2): 212-218.

[20] Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo AM, Inchingolo AD, Dipalma G, Flace P, Girolamo F, Tarullo A, Laino L, Sabatini R, Abbinante A, Cagiano R. Regenerative surgery performed with platelet-rich plasma used in sinus lift elevation before dental implant surgery: an useful aid in healing and regeneration of bone tissue. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16: 1222-1226.

[21] Yang L, Witten TM, Pidaparti RM. A biomechanical model of wound contraction and scar formation. *J Theor Biol* 2013; 332: 228-248.

[22] Karadeniz Cakmak G, Irkorucu O, Ucan BH, Emre AU, Bahadir B, Demirtas C, Tascilar O, Karakaya K, Acikgoz S, Kertis G, Ankarali H, Pasaoglu H, Comert M.

Simvastatin improves wound strength after intestinal anastomosis in the rat. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13: 1707-16.

[23] Türer A, Türer CC, Ballı U, Durmuşlar MC, Önger ME, Çelik HH. Effect of Local Rosuvastatin Administration on Calvarial Bone Defects. *J Craniofac Surg* 2016; 27: 2036-2040.

[24] Machado WM, Munhoz ACM, Fernandes D. Estatinas: Efeitos pleiotrópicos. *Ci Biol Saúde* 2011; 17: 141-150.

Tabela 1. Média e desvio-padrão da dimensão fractal do colágeno de feridas experimentalmente induzidas em coelhos analisadas entre os momentos e os tratamentos de cada ferida. Coloração Picosirius.

Momentos/Feridas	Controle	PRP	RSV	RSV+PRP
M0	1,73±0,01 ^{Aa}	1,73±0,01 ^{Aa}	1,73±0,01 ^{Aa}	1,73±0,01 ^{Aa}
M7	1,73±0,03 ^{Aa}	1,70±0,03 ^{Aa}	1,66±0,05 ^{Ab}	1,59±0,07 ^{Bb}
M14	1,50±0,07 ^{Ab}	1,45±0,04 ^{Ab}	1,47±0,05 ^{Ac}	1,45±0,04 ^{Ac}
M17	1,41±0,10 ^{Ab}	1,44±0,07 ^{Ab}	1,44±0,07 ^{Ac}	1,44±0,03 ^{Ac}

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os momentos de tratamento de cada ferida. Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos no mesmo momento.

Tabela 2. Média e desvio-padrão da dimensão fractal de feridas experimentalmente induzidas em coelhos analisadas entre os momentos e os tratamentos de cada ferida. Coloração de Hematoxilina/Eosina.

Momentos/Feridas	Controle	PRP	RSV	RSV+PRP
M0	1,84±0,03 ^{Aa}	1,84±0,03 ^{Aa}	1,84±0,03 ^{Aa}	1,84±0,03 ^{Aa}
M7	1,81±0,09 ^{Aa}	1,85±0,03 ^{Aa}	1,66±0,05 ^{Aa}	1,59±0,07 ^{Aa}
M14	1,81±0,06 ^{Aa}	1,77±0,10 ^{Ab}	1,47±0,05 ^{Aa}	1,45±0,04 ^{Aa}
M17	1,82±0,05 ^{Aa}	1,88±0,02 ^{Aa}	1,44±0,07 ^{Aa}	1,44±0,03 ^{Aa}

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os momentos de tratamento de cada ferida. Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos no mesmo momento.

Legenda das Figuras

Figura 1. Esquema de tratamento das Feridas: A-controle; B- PRP; C-RSV; D-RSV + PRP.

Figura 2. Microscopia e dimensão fractal da ferida controle experimentalmente induzida em coelhos nos momentos 0,7,14 e 17 dias.

Figura 3. Microscopia e dimensão fractal da ferida experimentalmente induzida em coelhos tratada com PRP nos momentos 0,7,14 e 17 dias.

Figura 4. Microscopia e dimensão fractal da ferida experimentalmente induzida em coelhos tratada com RSV nos momentos 0,7,14 e 17 dias.

Figura 5. Microscopia e dimensão fractal da ferida experimentalmente induzida em coelhos tratada com associação de PRP e RSV nos momentos 0,7,14 e 17 dias.

Figura 1

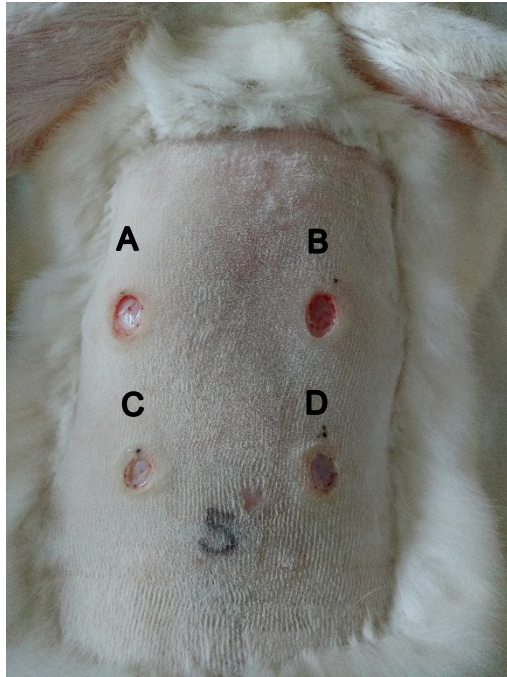
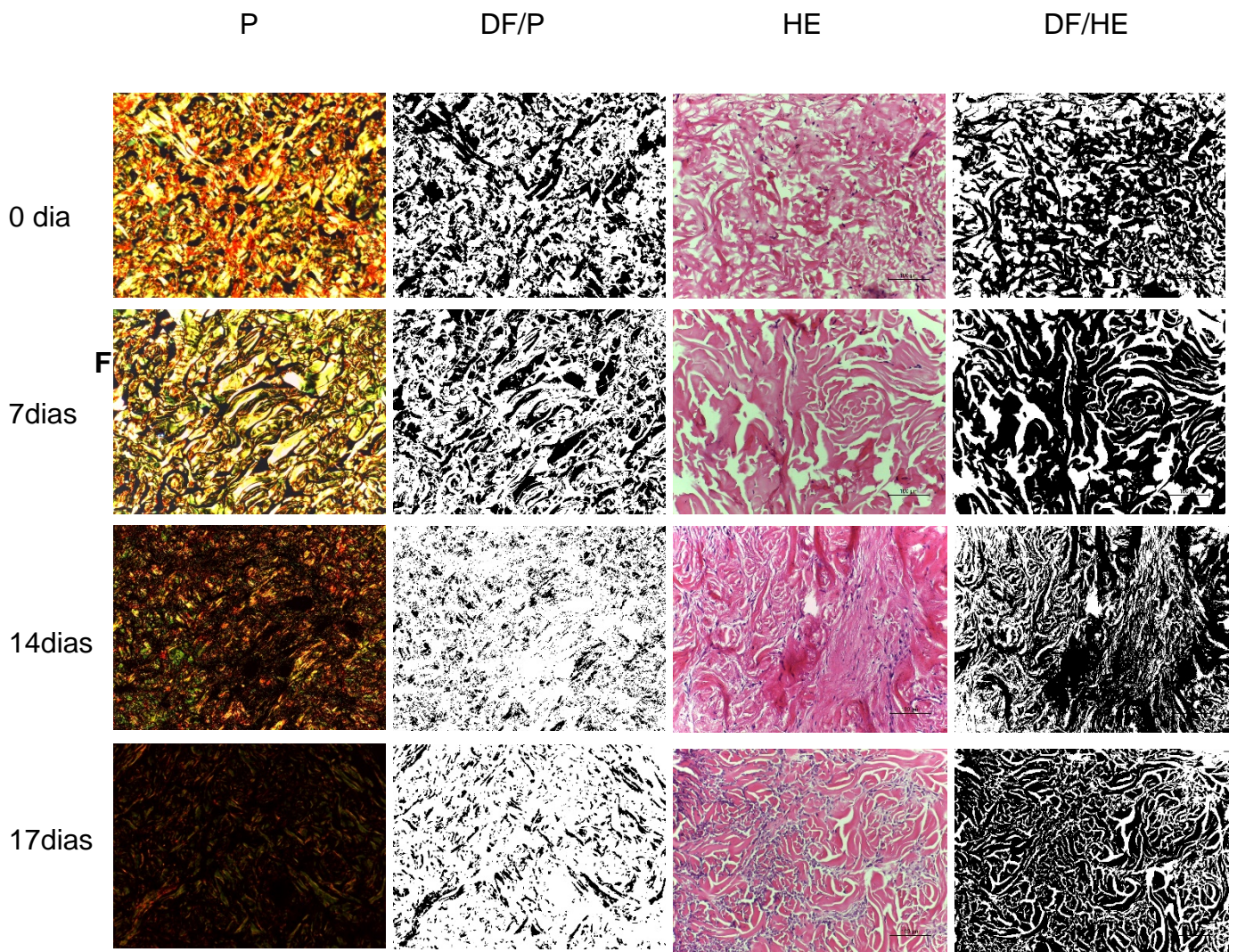
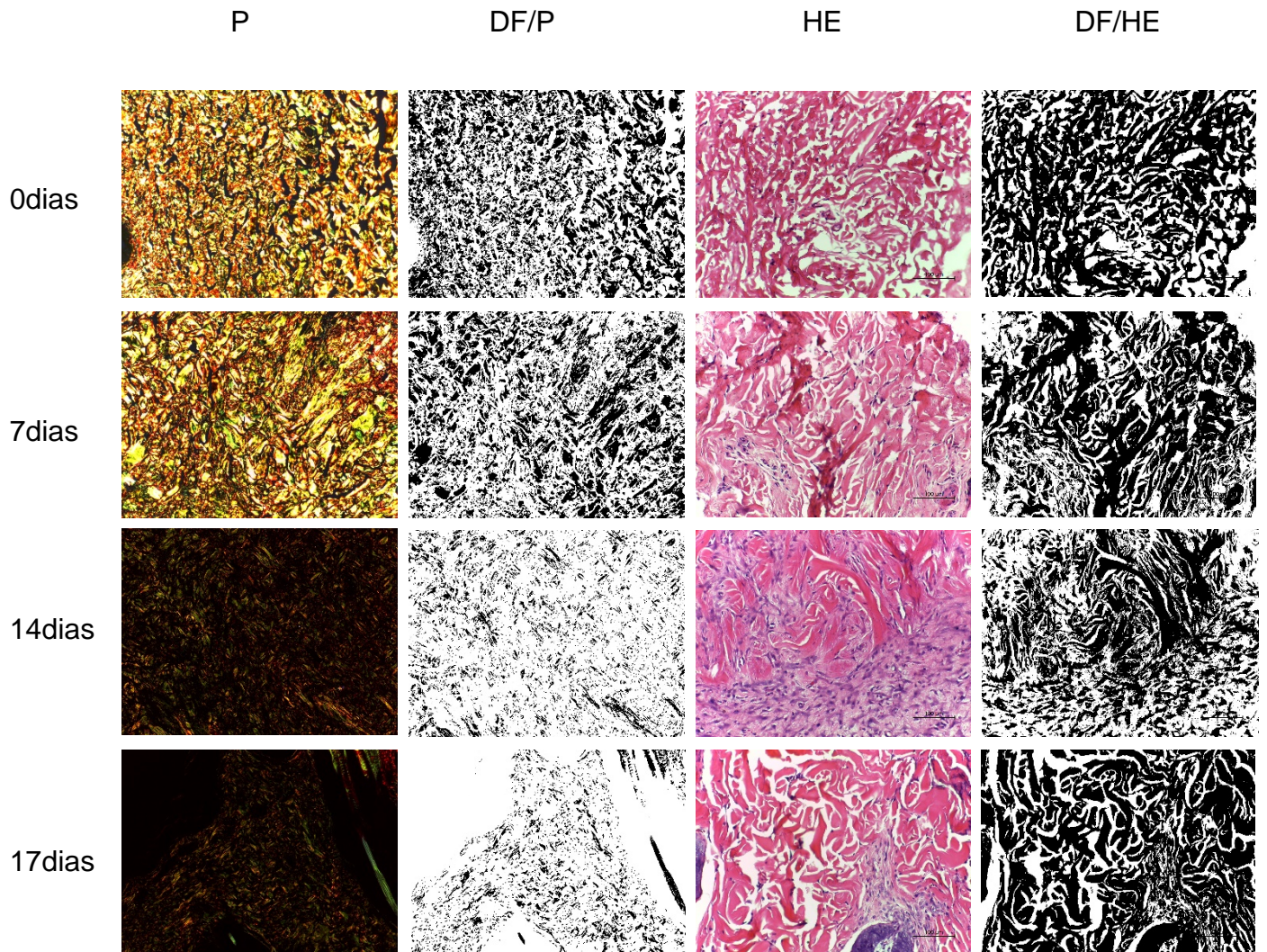


Figura 2.



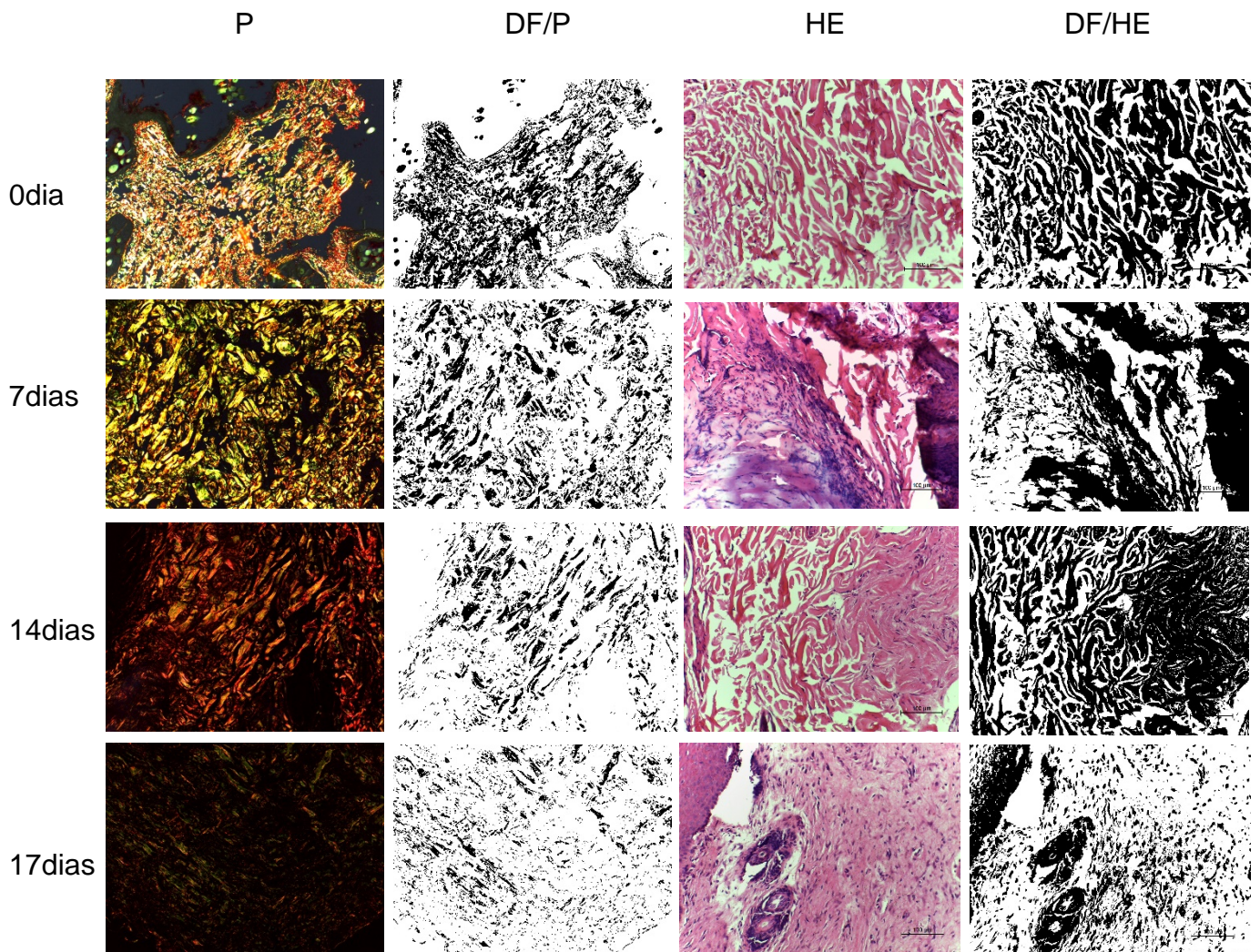
Legenda: P; Picrosirius; DF/P: dimensão fractal de lâminas coradas com picrosirius; H/E: Hematoxilina e eosina; DF/H/E; dimensão fractal de lâminas coradas com hematoxilina/eosina.

Figura 3



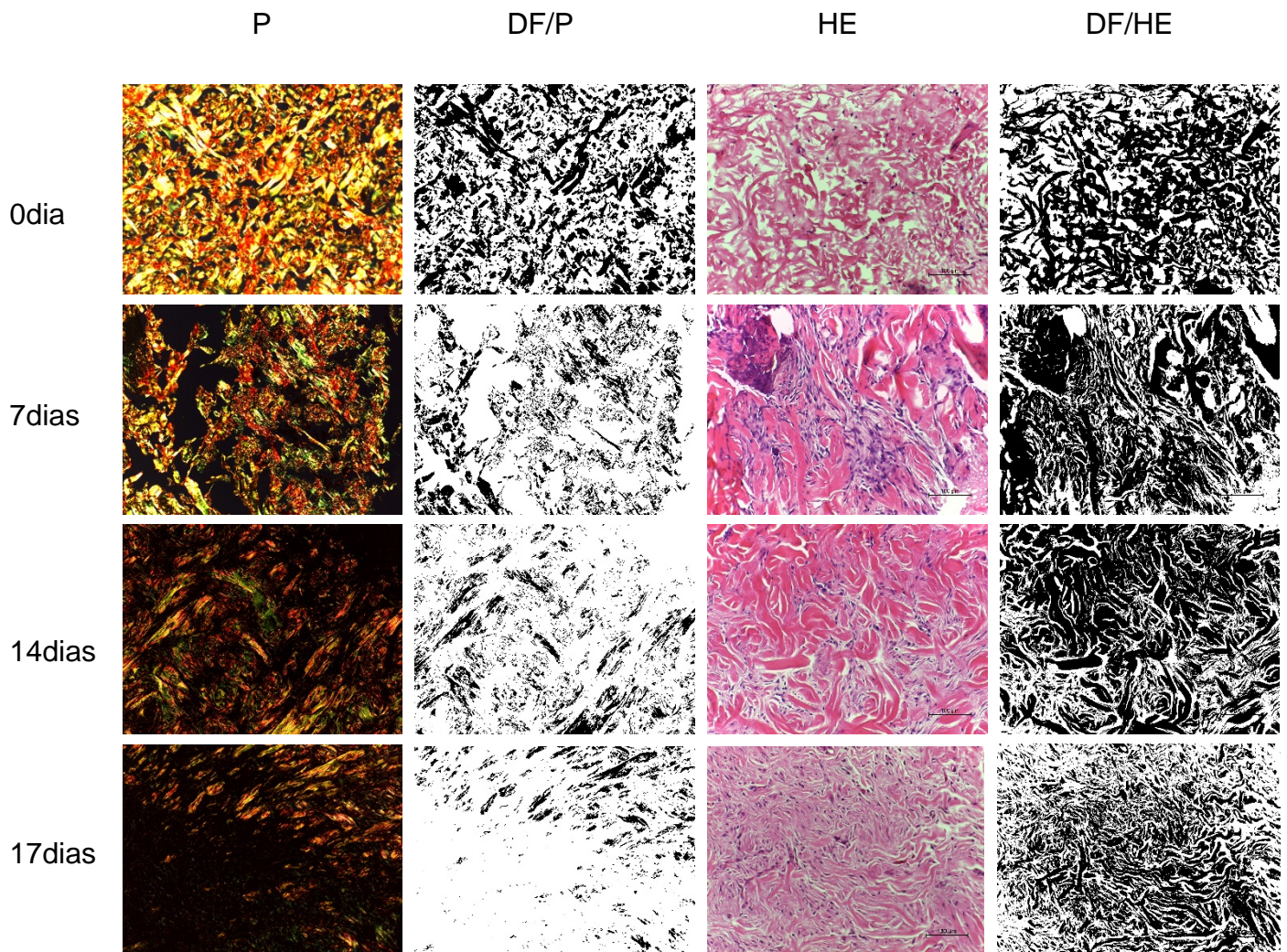
Legenda: P; Picrosirius; DF/P: dimensão fractal de lâminas coradas com picrosirius; H/E: Hematoxilina e eosina; DF/H/E; dimensão fractal de lâminas coradas com hematoxilina/eosina

Figura 4



Legenda: P; Picrosirius; DF/P: dimensão fractal de lâminas coradas com picrosirius; H/E: Hematoxilina e eosina; DF/H/E; dimensão fractal de lâminas coradas com hematoxilina/eosina

Figura 5



Legenda: P; Picrosirius; DF/P: dimensão fractal de lâminas coradas com picrosirius; H/E: Hematoxilina e eosina; DF/H/E; dimensão fractal de lâminas coradas com hematoxilina/eosina

ANEXO 1

04/09/2018

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
 FEC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE FRACTAL DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM DIFERENTES BIOMATERIAIS E ROSUVASTATINA", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 2485 e tendo como participante(s) CECILIA BRAGA LAPOMY (responsável), GISELE ALBORGHETTI MAI (discente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (discente), ALANA PRISCILA ZANELI ACORSI (discente), BLANCA AYUMI LIMA TANIGUCHI (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com as prescrições da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 03/12/2016.

Vigência do projeto: 10/2016 a 02/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Coelho Nova Zelândia	16	3 quilos	2 anos	M	Biotério Central

Presidente Prudente, 7 de Dezembro de 2016.

Prof. Dr. João Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Msc. Adilson Falcão de Faria
Coordenador da CEUA - UNOESTE

valide este documento em www.unoeste.br/SQP/certificados/ver.asp?h=02258a4f3806c6a2805c8643b6834ac8b

<http://www.unoeste.br/SQP/certificados/ver.asp?h=02258a4f3806c6a2805c8643b6834ac8b>

1/1

ANEXO 2

Normas da Revista

Information for Authors

The International Journal of Clinical and Experimental Pathology (IJCEP, ISSN 1936-2625) is an open access online journal dedicated to publication of original work in all areas of clinical, anatomic and experimental pathology. IJCEP also welcomes papers from other fields related to the study of human disease, such as immunology, biochemistry and molecular biology. IJCEP is primarily devoted to original clinical, translational and experimental research papers, but will also publish editorials, view articles, case reports, letters to the editors and meeting reports. The goal of IJCEP is to provide a free forum for rapid dissemination of clinical and basic observations that will enhance our understanding, diagnosis and management of human disease.

PREPARATION OF MANUSCRIPT (Download Sample Manuscript for IJCEP)

All manuscripts should be written in standard grammatical English using computer software, arranged in the following order and saved as **single DOC (Word) file** including all components of the manuscript:

1. cover letter
2. title page
3. abstract and keywords
4. main text in Arial Font
5. acknowledgements, if any
6. references
7. tables, if any
8. figure legends, if any
9. figures, if any

Cover Letter

The cover letter should include name, degree, address, telephone, fax and email of the corresponding author. A statement that all authors have contributed to, read and approved the final manuscript for submission should be included if there are multiple authors. Any editorial or financial conflict of interest (e.g., consultancy, stock ownership, equity interests, patent or licensing agreements) should be clearly disclosed in the cover letter. The disclosure statement must be submitted upon the acceptance.

Title Page

The title page should include:

1. A concise title;
2. First name, middle initial, and last name of each author. No academic degree should be provided in this section;
3. Name of the department and institutional affiliation of each author;
4. A short Running Title for the paper;

5. Corresponding author and contact information including e-mail address;
6. Acknowledgement including sources of financial support for the work, if any;
7. Declaration of Conflict of Interest.

Abstract and Keywords

The abstract should not exceed 250 words that concisely summarize the study's purpose, significant findings and conclusions. Include up to 6 keywords or phrases at the end of the abstract. Each keyword should be separated by a comma.

Main Text

The main text should include Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. The Introduction should be succinct, clearly stating the purpose and rationale of the study. In Materials and Methods, the procedures should be described in sufficient detail to allow duplication by an independent observer. Results and Discussion may be combined or divided. They should be written concisely and logically with emphasis on novel findings.

Acknowledgements

All acknowledgements (if any) should be included at the end of the main text before references and may include grant and administrative support.

References (Please download EndNote X Style or Reference Manager Output Style for IJCEP)

Reference published in IJCEP should begin on a new page, be double-spaced and numbered in order of citation in the text, including citations in tables and figure legends. Complete author citation is required (use of "et al" is not acceptable). References should conform to the style of the Journal. Examples follow:

Journals: [1] Krishnan B and Truong LD. Renal epithelial neoplasms: the diagnostic implications of electron microscopic study in 55 cases. *Hum Pathol* 2002; 33: 68-79.

Books: Fishman AP: Pulmonary Hypertension and Cor Pulmonale. *Pulmonary Diseases and Disorders*. Edited by Fishman AP. New York, McGraw-Hill, 1988, pp. 999-1048

Web sites: Cite in text only with an active weblink and keep such links minimum.

In press: To be used only for papers accepted for publication. Cite as for journal with (in press) in place of volume and page numbers.

Submitted papers/unpublished data: Cite in text only.

Tables

All tables should be cited consecutively in the main text by Arabic numbers (Table 1, Table 2, etc). Type each table with a descriptive title on a separate page after the references. Provide explanations for any nonstandard abbreviations in footnotes to the table.

Figure Legends

Figure legends including figure number, a short title and detailed description should be embedded at the end of text file.

Figures

All figures should be cited consecutively in the main text by Arabic numbers (Figure 1, Figure 2, etc). All figures must be prepared at 600dpi resolution and embedded at the end of the manuscript in the Word File. The text in all Figures must be in Arial Font and clearly readable at the 100% zoom. Photographs of a person should render them unidentifiable or include their written permission.

Supplemental data:

Authors are encouraged to avoid using supplemental data; and keep any such data and provide to readers if requested.

If supplemental data have to be used, all of them should be in the single file with all supplemental figures, tables and text materials included and arranged properly for publication.

Publication Fee

International Journal of Clinical and Experimental Pathology is an open access journal which provides instant, worldwide and barrier-free access to the full-text of all published articles. Publishing Fee allows the publisher to make the published material available for free to all interested online readers.

Publication fee is \$1680 for each paper which will be billed to the corresponding author. There is no extra charge for color figures or any other hidden charges.