



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

CRISTOFFER DA SILVA SANTANA

**IMUNOEXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPOS I E III EM BIÓPSIAS DE FERIDAS
DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM GEL DE ROSUVASTATINA E
PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO**

Presidente Prudente - SP
2020

CRISTOFFER DA SILVA SANTANA

**IMUNOEXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPOS I E III EM BIÓPSIAS DE FERIDAS
DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM GEL DE ROSUVASTATINA E
PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO**

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

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Cecília Laposy Santarém

636.089 65 Santana, Cristoffer da Silva.
S232i Imunoexpressão de colágeno tipos I e III em biópsias de feridas dérmicas de coelhos tratadas com gel de rosuvastatina e plasma rico em plaquetas autólogo / Cristoffer da Silva Santana. – Presidente Prudente, 2020. 37f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientadora: Cecília Laposy Santarém

1. Biomateriais. 2. Cicatrização. 3. Estatinas. 4. Pele
I. Título.

CRISTOFFER DA SILVA SANTANA

**IMUNOEXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPOS I E III EM BIÓPSIAS DE FERIDAS
DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM GEL DE ROSUVASTATINA E
PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO**

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

Presidente Prudente, 27 de abril de 2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Karina Maria Basso
Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL)
Londrina-PR

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida, me permitindo o aprendizado constante.

À minha avó paterna, Dulce Alves Meira (em memória), que com muito amor e dedicação incondicional à família, foi minha grande incentivadora na realização do mestrado e também em todo meu processo de formação profissional. Sua presença em minha vida foi fundamental. Sentirei saudades eternas e serei eternamente grato por tudo.

Aos meus pais Iracema e Valdeci, meu irmão Ayslan, minhas tias Sueli e Lucimar, que estiveram sempre comigo, sendo entusiastas da minha carreira, desde o início da graduação em farmácia.

À minha avó materna, Maria Lica da Silva (em memória), que sempre demonstrou grande satisfação pelo meu processo de formação pessoal e profissional.

Aos meus amigos, pela motivação de sempre, fazendo com que eu me mantivesse firme na caminhada.

À minha orientadora, professora Dra. Cecília Laposy Santarém, pela oportunidade de realização deste trabalho de mestrado, especialmente por poder estudar sobre um tema de extrema relevância médica e social.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas vezes que me sustentou e me manteve firme na caminhada.

À minha orientadora, professora Dra. Cecília Laposy Santarém, pelo apoio nos momentos difíceis e pela paciência com as minhas falhas durante o processo. Pelos ensinamentos a mim transmitidos, pelos gestos de incentivo e por sua sensibilidade e receptividade no processo de orientação do mestrado.

A toda minha família, pelo incondicional apoio de sempre.

Às professoras Dra. Francis Lopes Pacagnelli e Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, pelas valiosas contribuições e receptividade em minha banca de qualificação.

Aos professores do Mestrado em Ciência Animal da Unoeste, pelos conhecimentos proporcionados e pela importante participação em nosso processo de formação.

A todos os graduandos, mestrandos, professores e funcionários que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Luis do Nascimento Ortega e Dra. Larissa Sapucaia Ferreira Esteves, pelo grande incentivo de sempre.

Aos meus colegas de turma, Michel e Thaynara, pela parceria, e pelos estudos e informações compartilhadas.

Aos membros da banca de defesa da dissertação, pela disposição em participar de um momento tão importante.

À CAPES pelo incentivo financeiro concedido: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

“Apenas quando somos instruídos pela realidade é que podemos mudá-la.”
Bertolt Brecht

RESUMO

Imunoexpressão de colágeno tipos I e III em biópsias de feridas dérmicas de coelhos tratadas com gel de rosuvastatina e plasma rico em plaquetas autólogo

A pele é considerada a primeira barreira de defesa do organismo, sendo uma estrutura de grande importância. A epiderme e a derme são as camadas mais externas da pele, sendo a derme, a camada mais espessa e que apresenta grande quantidade de colágeno. A cicatrização de feridas pós-cirurgia envolve múltiplos eventos como, inflamação, proliferação de fibroblastos, síntese de matriz extracelular, vascularização e epitelização; e o tratamento ideal deve incluir produtos anti-fibróticos, anti-inflamatórios, e promotores de vascularização. O Plasma Rico em Plaquetas Autólogo (PRPa) e a Rosuvastatina (RSV) possuem, dentre estas, inúmeras atividades biológicas que contribuem no processo de reparação tecidual, reforçando sua importância na engenharia de tecidos. Com o objetivo de avaliar a imunoexpressão de fibras colágenas dos tipos I e III produzidas quando da utilização do PRPa e/ou RSV em feridas dérmicas induzidas, foram utilizadas 32 biópsias de 8 coelhos adultos, machos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia. As feridas que originaram as biópsias foram tratadas com PRPa e RSV isoladamente ou em associação, nos dias 0, 3, 7, 10 e 14. As amostras de pele foram coletadas no dia 17 e fixadas em formol 10% durante 24 a 48 horas, depois lavadas e transferidas para solução de álcool 70%. Em seguida foram processadas conforme técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusas em parafina. Os cortes foram montados em lâminas silanizadas para a realização da imuno-histoquímica, utilizando a técnica da imunoperoxidase indireta. A imunoexpressão de colágeno tipo I foi maior nas feridas que receberam PRPa, e o tratamento com PRPa+RSV proporcionou maior imunoexpressão de fibras colágenas tipo III e menor expressão de colágeno tipo I, quando comparado ao controle e aos demais tratamentos, mas sem diferença estatística ($P > 0,05$). Uma ferida com predominância de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I condiz com a fase de inflamação do processo cicatricial sendo que, nas fases seguintes (proliferação e maturação), o colágeno tipo I passa a predominar. Neste estudo, ocorreu a predominância de colágeno tipo III na fase de proliferação. Conclui-se que a associação de PRPa + RSV no tratamento de feridas demonstrou um possível efeito aditivo na imunoexpressão de colágeno tipo III, podendo ser uma alternativa viável para ação de reparação tecidual e formação de colágeno, otimizando o processo cicatricial.

Palavras-chave: Biomateriais. Cicatrização. Estatinas. Pele.

ABSTRACT

Collagen types I and III immunoexpression in rabbit skin biopsies treated with rosuvastatin gel and autologous platelet-rich plasma

The skin is considered the first defense barrier of the organism, being a structure of great importance. The epidermis and the dermis are the outermost layers of the skin, with the dermis being the thickest layer that has a large amount of collagen. Post-surgery wound healing involves multiple events such as inflammation, fibroblast proliferation, extracellular matrix synthesis, vascularization and epithelialization; and the ideal treatment should include anti-fibrotic, anti-inflammatory, and vascularity-promoting products. Autologous Platelet Rich Plasma (PRPa) and Rosuvastatin (RSV) have, among these, numerous biological activities that contribute to the tissue repair process, reinforcing their importance in tissue engineering. In order to evaluate the immunoexpression of types I and III collagen fibers produced when using PRPa and / or RSV in induced dermal wounds, 32 biopsies from 8 clinically healthy adult male Zealand rabbits were used. The wounds that originated the biopsies were treated with PRPa and RSV alone or in combination, on days 0, 3, 7, 10 and 14. Skin samples were collected on day 17 and fixed in 10% formaldehyde for 24 to 48 hours, then washed and transferred to 70% alcohol solution. Then they were processed according to a routine histological technique for optical microscopy and included in paraffin. The sections were mounted on silanized slides for immunohistochemistry, using the indirect immunoperoxidase technique. Type I collagen immunoexpression was higher in wounds that received PRPa, and treatment with PRPa + RSV provided greater immunoexpression of type III collagen fibers and less expression of type I collagen when compared to control and other treatments, but without statistical difference ($P > 0.05$). A wound with a predominance of type III collagen over type I collagen is consistent with the inflammation phase of the healing process and, in the following phases (proliferation and maturation), type I collagen becomes predominant. In this study, there was a predominance of type III collagen in the proliferation phase. It is concluded that the association of PRPa + RSV in the treatment of wounds demonstrated a possible additive effect in the immunoexpression of type III collagen, which can be a viable alternative for tissue repair and collagen formation, optimizing the healing process.

Keywords: Biomaterials. Healing. Statins. Skin.

LISTA DE SIGLAS

FRP	– Fibrina Rica em Plaquetas
FRPa	– Fibrina Rica em Plaquetas autóloga
HMG CoA	– 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-Coenzima A
PRP	– Plasma Rico em Plaquetas
PRPa	– Plasma Rico em Plaquetas autólogo
PRPa + RSV	– Associação de Plasma Rico em Plaquetas autólogo com Rosuvastatina em gel
RSV	– Rosuvastatina

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
	ANEXO A- CEUA (APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS).....	25
	ANEXO B- LAUDO DA ROSUVASTATINA.....	26
	ANEXO C- NORMAS DA REVISTA.....	27

1 Artigo

2 **Imunoexpressão de colágeno tipos I e III em biópsias de feridas dérmicas de coelhos**
3 **tratadas com gel de rosuvastatina e plasma rico em plaquetas autólogo**

4 Cristoffer da Silva Santana¹, Maria Rosa Santos Breda¹, Yuri Ferreira Vicentini², Anthony
5 Cesar de Souza Castilho³, Gisele Alborghetti Nai³, Cecília Laposy Santarém^{3*}

6 ¹Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste
7 Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil.

8 ²Discente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste,
9 Presidente Prudente, SP, Brasil

10 ³Professores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do
11 Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil.* E-mail: claposy@unoeste.br

12

13 **Título abreviado:** Reparação tecidual pós-tratamento com Plasma Rico em Plaquetas
14 autólogo e Rosuvastatina

15

16 **Palavras-chave:** 1. Biomateriais 2. Cicatrização 3. Estatinas 4. Pele

17

18 **Apoio financeiro:** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
19 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento
20 001. Processo Fapesp2016/25938-0.

21

22

23 **Endereço para correspondência:**

24 Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia
25 Raposo Tavares, Km 572, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

26 Tel: +55 (18) 99623-0772;

27 Fax: +55 (18) 3229-2080;

28 E-mail: claposy@unoeste.br

29

30 Conflito de interesses: Os autores declaram que não há conflito de interesses.

31

32

33

34 **Artigo Original**

35

36 **Resumo**

37 A pele é considerada a primeira barreira de defesa do organismo, sendo uma estrutura de
38 grande importância. A epiderme e a derme são as camadas mais externas da pele, sendo a
39 derme, a camada mais espessa e que apresenta grande quantidade de colágeno. A cicatrização
40 de feridas pós-cirurgia envolve múltiplos eventos como, inflamação, proliferação de
41 fibroblastos, síntese de matriz extracelular, vascularização e epitelização; e o tratamento ideal
42 deve incluir produtos anti-fibróticos, anti-inflamatórios, e promotores de vascularização. O
43 Plasma Rico em Plaquetas Autólogo (PRPa) e a Rosuvastatina (RSV) possuem, dentre estas,
44 inúmeras atividades biológicas que contribuem no processo de reparação tecidual, reforçando
45 sua importância na engenharia de tecidos. Com o objetivo de avaliar a imunoposição de
46 fibras colágenas dos tipos I e III produzidas quando da utilização do PRPa e/ou RSV em
47 feridas dérmicas induzidas, foram utilizadas 32 biópsias de 8 coelhos adultos, machos,
48 clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia. As feridas que originaram as biópsias foram
49 tratadas com PRPa e RSV isoladamente ou em associação, nos dias 0, 3, 7, 10 e 14. As
50 amostras de pele foram coletadas no dia 17 e fixadas em formol 10% durante 24 a 48 horas,
51 depois lavadas e transferidas para solução de álcool 70%. Em seguida foram processadas
52 conforme técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusas em parafina. Os
53 cortes foram montados em lâminas silanizadas para a realização da imuno-histoquímica,
54 utilizando a técnica da imunoperoxidase indireta. A imunoposição de colágeno tipo I foi
55 maior nas feridas que receberam PRPa, e o tratamento com PRPa+RSV proporcionou maior
56 imunoposição de fibras colágenas tipo III e menor expressão de colágeno tipo I, quando
57 comparado ao controle e aos demais tratamentos, mas sem diferença estatística ($P>0,05$).
58 Uma ferida com predominância de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I condiz com
59 a fase de inflamação do processo cicatricial sendo que, nas fases seguintes (proliferação e
60 maturação), o colágeno tipo I passa a predominar. Neste estudo, ocorreu a predominância de
61 colágeno tipo III na fase de proliferação. Conclui-se que a associação de PRPa + RSV no
62 tratamento de feridas demonstrou um possível efeito aditivo na imunoposição de colágeno
63 tipo III, podendo ser uma alternativa viável para ação de reparação tecidual e formação de
64 colágeno, otimizando o processo cicatricial.

65

66 **Palavras-chave:** Biomateriais. Cicatrização. Estatinas. Pele.

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78 **Introdução**

79 Considerada a primeira barreira de defesa do organismo, a pele exerce é uma estrutura
80 de grande importância. Caso ocorram lesões na pele, a cicatrização é fundamental no sentido
81 de manter a pele intacta. A pele é dividida em derme e epiderme, sendo a epiderme a camada
82 mais externa e menos espessa, e a derme, a camada mais interna, mais espessa, rica em
83 colágeno, elastina e elementos da matriz extracelular [Miller et al., 2013]. O processo
84 habitual de reparação de feridas consiste em uma sequência de fases, recuperando a derme e a
85 epiderme, tais como a inflamação, que ocorre até o terceiro dia de lesão; a proliferação, que
86 ocorre do quarto até o vigésimo dia; e remodelação, que vai do vigésimo primeiro dia em
87 diante [Reinke; Sorg, 2012].

88 O colágeno é um componente muito importante na derme, e desempenha um papel-
89 chave na elasticidade e resistência da pele [Bedoya et al., 2016]. A matriz extracelular
90 dérmica e as fibras dérmicas possuem de 80% a 90% de fibras colágenas. Predominam na
91 derme os colágenos tipos I e III, que são responsáveis por aproximadamente 87% e 10%,
92 respectivamente, de todo o colágeno dérmico produzido [Miller et al., 2013], sendo que o tipo
93 III predomina na cicatrização inicial e o tipo I na cicatriz mais resistente e tardia, após ocorrer
94 a remodelagem [Medeiros; Dantas-Filho, 2016]. Isso demonstra claramente a importância da
95 expressão de colágeno no processo de regeneração tecidual e na cicatrização, tanto em lesões
96 cutâneas simples, e especialmente em lesões crônicas de difícil cicatrização, como lesões por
97 pressão, úlceras venosas e diabéticas.

98 A cicatrização de feridas é um processo complexo, que depende de diversos tipos de
99 células, fatores de crescimento, matriz extracelular e citocinas. Faz-se necessário uma
100 compreensão abrangente sobre a remodelação de tecidos e do processo de cicatrização,
101 juntamente com a compreensão da interação célula-célula/biomaterial [Nour et al., 2019].

102 Produtos como o Plasma Rico em Plaquetas autólogo (PRPa) vêm sendo utilizados
103 há mais de duas décadas [Khademhosseini; Langer, 2016]. O PRPa é um concentrado de
104 plaquetas em um pequeno volume de plasma que possui fatores de crescimento (FC) e
105 proteínas osteocondutoras, que também serve de matriz para migração epitelial, formação
106 óssea, assim como de tecido conjuntivo. Essas propriedades o tornam um produto com grande
107 potencial de melhorar a integração de enxertos ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de gordura,
108 assim como estimular a cicatrização de feridas [Vendramin et al., 2006].

109 A rosuvastatina (RSV) é um medicamento da classe das estatinas, considerado um
110 inibidor competitivo altamente eficaz da HMG-Coa redutase, enzima responsável pela via

111 metabólica que produz o colesterol [Pradeep et al., 2016]. Atualmente é utilizada no
112 tratamento da hiperlipidemia e na prevenção de doenças cardiovasculares [Wu et al., 2016], e
113 além dessa aplicação, foi relatado que a RSV possui múltiplas atividades biológicas, incluindo
114 efeito anti-fibrótico, anti-inflamatório, promotor da vascularização [Kata et al., 2015], além de
115 prevenir o dano tecidual [kirzioglu et al., 2018]. Juntamente a esses fatores protetores e pró-
116 cicatrizantes, faz-se necessário a expressão de fibras que contribuem com a integridade de
117 tecidos, como é o caso do colágeno [Silva; Penna, 2012].

118 As lesões de pele interferem diretamente na qualidade de vida da população,
119 causando impactos físicos, psíquicos, sociais, profissionais e econômicos, constituindo um
120 sério problema de saúde pública [Waidman et al., 2011].

121 Muitas alternativas foram propostas para restaurar o tecido lesado do hospedeiro,
122 porém, ainda não existem opções economicamente viáveis. Enquanto isso, os pacientes
123 afetados permanecem propensos a vários fatores complicantes, como doenças funcionais,
124 preocupações sociais e encargos econômicos e financeiros [Miron; Zhang, 2018]. Baseado
125 nisso, a existência de uma alternativa terapêutica de baixo custo e de fácil aplicabilidade para
126 tratamento de pacientes com lesões por pressão, úlceras diabéticas ou venosas, por exemplo,
127 seria de grande importância clínica e de relevante impacto social, devido à obtenção de uma
128 cicatriz funcional e esteticamente satisfatória.

129 A hipótese do presente estudo é a de que haveria um efeito aditivo pelo uso de PRPa
130 e RSV na imunoexpressão dos colágenos I e III, com otimização do processo cicatricial,
131 aumentando a produção de colágeno na fase proliferativa da cicatrização, com a finalidade de
132 melhorar a qualidade do reparo tecidual.

133 Considerando a importância do plasma rico em plaquetas autólogo como um
134 biomaterial promissor e os poucos estudos envolvendo uma estatina no processo cicatricial, o
135 objetivo deste estudo foi avaliar a imunoexpressão de fibras colágenas tipos I e III, quando da
136 utilização do PRPa e/ou RSV em biópsias deferidas dérmicas induzidas em coelhos.

137

138 **Material e Métodos**

139 O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do uso de animais (CEUA) da
140 Universidade do Oeste Paulista - Unoeste de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil
141 (protocolo nº 5170).

142

143

144

145 Animais

146 Foram utilizados 8 coelhos machos adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova
147 Zelândia, peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg, com idade média de 2 anos, que receberam tratamento com
148 PRPa, RSV e associações. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com
149 temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo (12 horas claro/escuro) controlados. Os
150 coelhos passaram por um período de adaptação de sete dias antes do estudo. Durante todo o
151 experimento foram mantidos em condições padronizadas de dieta e água à vontade.

152

153 Plasma rico em plaquetas autólogo (PRPa)

154 Após procedimento anestésico, foram colhidos 4mL de sangue venoso proveniente da
155 orelha do coelho, utilizando scalp 25G. O material foi transferido para um frasco contendo o
156 anticoagulante citrato de sódio, deste material foi retirada uma alíquota para a contagem
157 automática de plaquetas (contador automático SysmexPochDiff100iV-Roche) e depois
158 centrifugado, inicialmente a 200G (centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos para
159 formação de dois níveis: toda a fração correspondente ao plasma mais 200 μ L da fração
160 vermelha que foi transferida para outro tubo para nova centrifugação (400G por 10 minutos)
161 [Tetila et al., 2019].

162

163 Gel de rosuvastatina (RSV)

164 Para a formulação do gel de rosuvastatina a 1,2% foi utilizado um solvente para
165 diluição da droga, e posteriormente preparado um gel aristoflex com 20% de glicerina
166 aquecida em banho-maria ($50 - 60^{\circ}\text{C}$) a fim de homogeneizar o polímero com o solvente e
167 a droga, evitando a cristalização do ativo [Grover et al., 2016 com modificações]. O gel foi
168 colocado manualmente nas feridas tratadas com RSV isolada ou associada ao PRPa, e a
169 quantidade foi suficiente para cobrir a lesão [Tetila et al., 2019].

170

171 Indução e tratamento das feridas

172 Com os animais anestesiados, foi realizado a antissepsia e demarcação da pele do
173 dorso dos coelhos em quatro locais com auxílio de caneta Pilot[®] e um punch de 8 mm foi
174 utilizado para realização das feridas cirúrgicas. Os fragmentos foram retirados com auxílio
175 de uma pinça anatômica, preservando a musculatura. Cada ferida realizada recebeu
176 diferentes tratamentos: solução fisiológica (considerada ferida controle), PRPa, RSV e
177 associação (PRPa+RSV). Em seguida todas as feridas foram cobertas com ryon estéril e
178 curativo adesivo (Band Aid[®]). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam

179 cloridrato de Tramadol (0,5mg/Kg, IM, 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos), a fim
180 de minimizar o desconforto inicial.

181 O tratamento e a troca dos curativos foram realizados nos dias 0, 3, 7, 10 e 14,
182 segundo protocolo estabelecido por Vendramin et al., [2010] até completarem 16 dias de
183 experimento. No 17º dia, prosseguiu-se com a realização de biópsia da ferida para
184 avaliação.

185 Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ após anestesia com a associação
186 de Cloridrato de Tiletamina e Zolazepam 30 mg/Kg IM e Xilazina a 2% 0,2 mg/Kg IM e a
187 comprovação da morte foi realizada a partir da avaliação dos batimentos cardíacos. Após a
188 eutanásia os animais foram identificados, congelados e armazenados para uso em aulas
189 práticas.

190

191 Análise Imuno-histoquímica

192 A verificação histológica do processo cicatricial do dia 17, dos colágenos I e III,
193 foi realizada por meio da imuno-histoquímica, usando a técnica de imunoperoxidase
194 indireta. Tal procedimento foi realizado no Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC)
195 do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da
196 Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu, São Paulo, Brasil.

197 Foram utilizadas 32 amostras de pele, sendo 8 de cada grupo (controle, PRPa, RSV
198 e PRPa + RSV), que foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0
199 por 24 a 48 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos
200 foram transferidos para uma solução de álcool 70%. Após os procedimentos padronizados
201 para realização de inclusão dos tecidos em parafina, prosseguiu-se com os cortes na
202 espessura de 4µm e montagem em lâminas silanizadas.

203 Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato (pH
204 6,0) na panela de pressão (aproximadamente 100° C) em banho-maria, durante 30 minutos.
205 Em seguida, foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) e submetidas ao processo de
206 bloqueio da peroxidase endógena com a utilização de uma mistura de PBS e peróxido de
207 hidrogênio, durante 10 minutos, no escuro. Em seguida foi feito novo bloqueio com leite
208 desnatado 5% em PBS.

209 Os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído em BSA 1% para
210 colágeno tipo I ou colágeno tipo III overnight a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram
211 lavadas com PBS. Os cortes de pele foram incubados com o anticorpo secundário, também

212 diluído com BSA 1%, durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. A reação
213 imuno-histoquímica foi então revelada com o DAB (diaminobenzidina) (Tabela 1).

214 Devido à presença de bastante colágeno na pele, não foi utilizado controle positivo
215 e, para o controle negativo, um dos cortes não recebeu anticorpo primário (recebeu apenas
216 anticorpo secundário). Em seguida, foram contra-corados com hematoxilina. Todas as
217 diluições utilizadas foram previamente testadas [Souza et al., 2015].

218

219 Tabela 1. Anticorpos utilizados para avaliação dos colágenos em feridas de coelhos tratadas
220 com PRPa, RSV e associações.

Tipo de anticorpo	Hospedeiro	Fabricante	Código	Diluição
Anticorpo primário colágeno tipo I(monoclonal)	Camundongo	GeneTex	GTX26308	1:50
Anticorpo primário colágeno tipo III(monoclonal)	Camundongo	NovusBiolo gicals	NBP1-05119	1:100
Anticorpo secundário– goatanti- mouseIgGH&L (HRP)	Caprino	Abcam	ab6789	1:200

221

222 **Captação das Imagens**

223 Para a captação das imagens, foi utilizado microscópio óptico (Leica DMLB, São
224 Paulo, SP, Brasil) acoplado a uma câmera (Leica DFC300 FX, São Paulo, SP, Brasil). As
225 imagens observadas no microscópio foram projetadas em um monitor através de um
226 software analisador de imagem (LeicaQWin Plus, São Paulo, SP, Brasil). O sistema
227 apresenta, na tela do computador, a imagem original digitalizada a partir da lâmina
228 histológica. As imagens foram obtidas no aumento de 400x, na região abaixo da epiderme.

229 A área imunomarcada, apresentando a coloração acastanhada, foi avaliada a partir
230 da técnica de deconvolução de cores, usando o Plugin “ColourDeconvolution” no software
231 Fiji. Para tanto, a imagem foi separada em 3 cores: verde (fundo da lâmina), azul
232 (hematoxilina) e acastanhada (área imunomarcada), sendo apenas esta última utilizada para
233 a quantificação. Na seção “Imagens”, foi selecionado “Threshold” para a seleção das áreas
234 marcadas e posterior quantificação. Para que não fosse detectada pouca marcação em áreas

235 bastante marcadas ou excesso de marcação em áreas pouco marcadas, foi estabelecido um
 236 intervalo de 0-180 para os tons de castanho do histograma. Após a aplicação da máscara na
 237 área imunomarcada, foi mensurada a porcentagem desta marcação em relação à área, sendo
 238 que uma média foi calculada a partir de 3 imagens obtidas de cada ferida [Andrade et al.,
 239 2011].

240

241 Análise Estatística

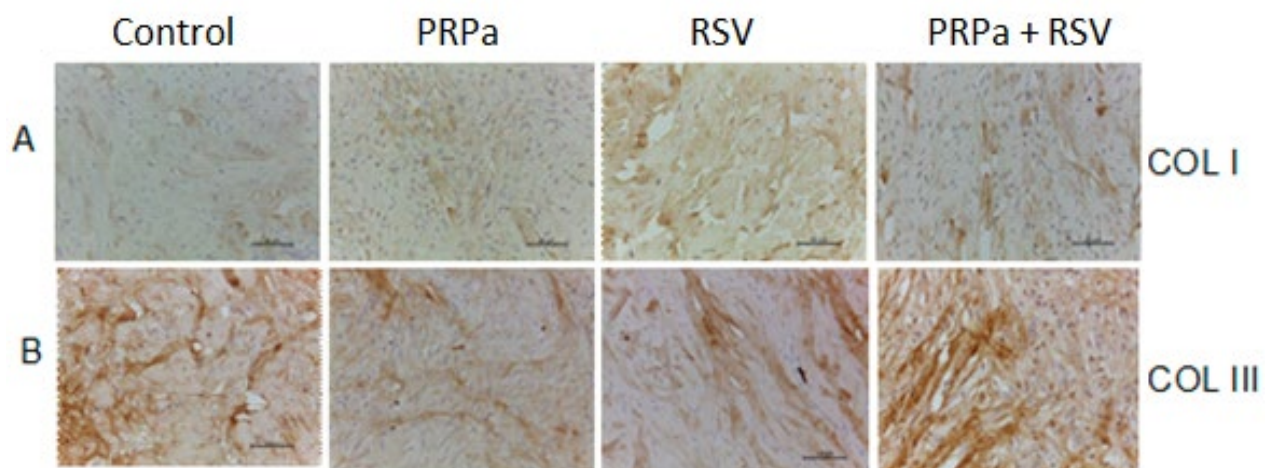
242 A avaliação do efeito dos tratamentos foi realizada com o programa estatístico
 243 GraphPadPrism, versão 5.01. Para validação dos pressupostos de normalidade dos dados e
 244 homogeneidade de variâncias foi realizado teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk) e
 245 de homogeneidade de variância entre os grupos (Bartlett). Para comparação entre os
 246 tratamentos foram realizados os testes Kruskal Wallis e Tukey. Diferenças foram
 247 consideradas significativas quando $P < 0,05$.

248

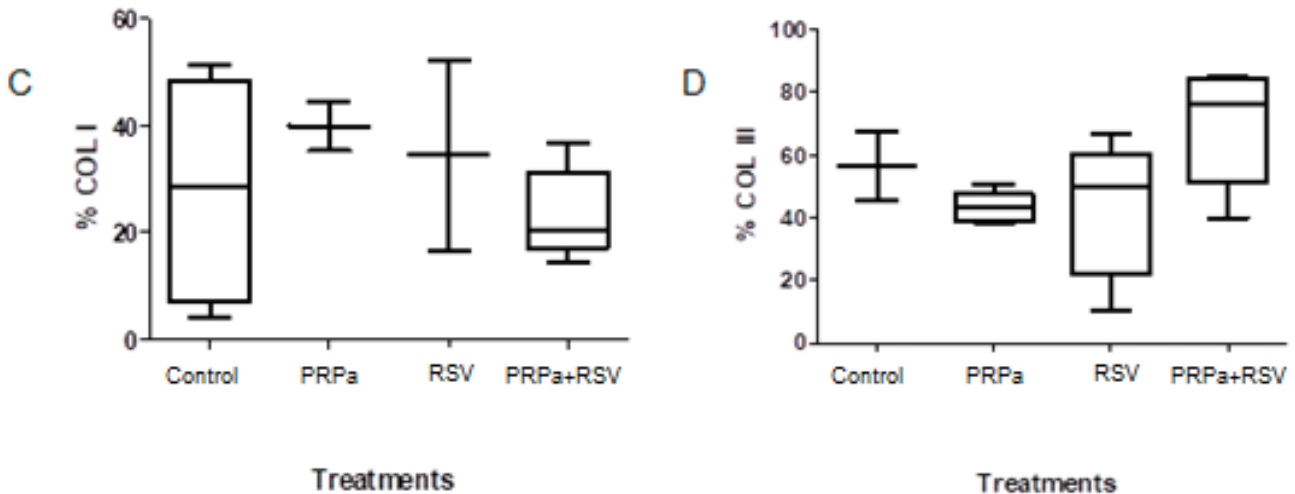
249 Resultados

250 A imunoexpressão de colágeno tipo I foi maior nas feridas que receberam PRPa
 251 quando comparada ao controle e aos demais tratamentos. Já o tratamento com PRPa+RSV
 252 proporcionou maior imunoexpressão de fibras colágenas tipo III e menor expressão de
 253 colágeno tipo I, quando comparado ao controle e aos demais tratamentos, mas sem diferença
 254 estatística ($P > 0,05$) (Figuras 1 e 2).

255 **Figura 1.** A: Marcação imuno-histoquímica para o colágeno tipo I (COL I) no dia 17 com
 256 controle negativo (NC) e diferentes grupos experimentais. Ampliação: 400x. Barra de
 257 escala: 50 μ m. B: Marcação imuno-histoquímica para colágeno tipo III (COL III) no dia 17
 258 com controle negativo (NC) e diferentes grupos experimentais.



259 **Figura 2:** C e D: Gráficos representando a porcentagem média de imunocoloração para
 260 colágeno tipos I e III nos diferentes grupos experimentais (Control = controle, PRPa =
 261 plasma rico em plaquetas autólogo; RSV = rosuvastatina; PRPa + RSV = plasma rico em
 262 plaquetas autólogo e rosuvastatina).



263 **Discussão**

264 Demonstramos neste estudo que o tratamento associado de PRPa+RSV levou a uma
 265 predominância de colágeno tipo III, pois foi o que proporcionou maior imunoexpressão
 266 deste tipo de colágeno e uma menor imunoexpressão de colágeno do tipo I. Já o tratamento
 267 com PRPa foi o que proporcionou maior imunoexpressão de colágeno tipo I, em
 268 comparação aos outros grupos.

269 De acordo com Witte e Barbul [1997], na fase de inflamação do processo cicatricial
 270 ocorre predominância de colágeno tipo III em relação ao tipo I, e que nas fases seguintes
 271 (proliferação e maturação) passa a predominar o colágeno tipo I. Em nosso estudo, a
 272 imunoexpressão de colágeno tipo III predominou em relação ao tipo I no tratamento com
 273 PRPa e RSV em associação, na fase de proliferação. Este achado antagônico poderia ser
 274 explicado pelo fato das feridas estarem ainda em fase de cicatrização [Broughton et al.,
 275 2006].

276 Pietrovski et al. [2012] realizaram uma revisão com o objetivo de melhor
 277 compreender o uso das estatinas no tratamento de úlceras em pés diabéticos, e concluíram
 278 que existem algumas evidências provenientes de estudos experimentais em favor do uso das
 279 estatinas nesse tipo de lesão, e que, apesar de serem estudos experimentais, os resultados
 280 sugerem um efeito promissor no processo cicatricial. Essas evidências representam um
 281 indício de que as estatinas aceleram a cicatrização em lesões de pele, no entanto, mais
 282 estudos clínicos são necessários para avaliar o uso terapêutico para essa indicação.

283 As bactérias presentes em feridas prejudicam a cicatrização, ativando a via
284 alternativa do complemento, amplificando e prolongando a fase inflamatória da cicatrização
285 [Deodhar; Ranna; 1997]. Ko et al. [2018] avaliaram os efeitos antibacterianos *in vitro* das
286 estatinas contra patógenos bacterianos que causam infecções na pele, e verificaram que as
287 estatinas podem reduzir a formação de biofilme e diminuir a adesão bacteriana às
288 superfícies ambientais. Sobre o mesmo tema, Olivetti et al. [2019] utilizaram hidrogéis
289 modificados de colágeno impregnados com sinvastatina como curativos para feridas na
290 pele, e observaram que a atividade antibacteriana foi prolongada, confirmando as
291 propriedades antimicrobianas das estatinas.

292 Além disso, foram demonstradas atividades bacteriostáticas contra *Staphylococcus*
293 *aureus* e *Escherichia coli*, no uso do PRP rico em leucócitos [Bielecki et al., 2007]. Esses
294 dados são importantes no sentido de reforçar a importância do controle de infecções no
295 processo cicatricial. Em nosso estudo, as feridas induzidas eram limpas e permaneceram
296 livres de sinais de infecção durante todo o período de estudo e realização dos tratamentos.

297 Em estudo realizado por Maged et al. [2019], os autores utilizaram células tronco
298 mesenquimais associadas a curativos de quitosana impregnados com rosuvastatina em ratos
299 albinos, com a finalidade de melhorar a cicatrização de feridas induzidas. Concluíram que,
300 os curativos impregnados com rosuvastatina aumentaram a proliferação de fibroblastos
301 dérmicos em comparação com o placebo. Além disso, após 30 dias da implantação deste
302 curativo, foi possível observar regeneração dérmica aprimorada e ausência de formação de
303 cicatriz hipertrófica. Em nosso estudo, a avaliação ocorreu no décimo sétimo dia após a
304 lesão, não sendo possível observar o processo cicatricial mais tardio. Portanto, pretende-se
305 realizar novos estudos com a finalidade de avaliar a reparação tecidual nas fases seguintes.

306 Adicionalmente, Ferreira et al. [2019] estudaram o efeito da associação de
307 biomateriais e rosuvastatina tópica na reparação tecidual de feridas cirúrgicas em coelhos.
308 Os biomateriais utilizados entre os grupos foram o PRPa, e FRPa (Fibrina Rica em
309 Plaquetas autóloga), isoladamente e em associação à rosuvastatina. Nos resultados é
310 possível observar que a rosuvastatina isolada e FRPa associada à RSV, foram superiores na
311 quantidade de fibroblastos produzidos, em comparação aos grupos controle e FRPa
312 ($P < 0,05$). Os autores concluíram então, que tanto a RSV quanto a FRP possuem bons
313 efeitos cicatrizantes, e que a associação de ambas foi benéfica e demonstrou um possível
314 efeito aditivo na proliferação de fibroblastos, indo de encontro aos achados de nosso estudo
315 na associação de um biomaterial com a rosuvastatina, no sentido de melhorar os aspectos
316 gerais do processo cicatricial.

317 Poucos estudos avaliaram especificamente o uso de PRPa e RSV na cicatrização de
318 feridas, principalmente no que tange à avaliação da imunexpressão de diferentes tipos de
319 colágeno. Tetila et al. [2019], realizaram um estudo longitudinal sobre o uso do plasma rico
320 em plaquetas autólogo e rosuvastatina na cicatrização de feridas em coelhos, onde
321 avaliaram aspectos microscópicos e macroscópicos. Os autores observaram que o
322 PRPa+RSV e PRPa isolado, apresentaram maior quantidade de fibras colágenas, 90,76% e
323 90,07%, respectivamente, quando comparados a RSV isolada (85,98%) e ao grupo controle
324 (78%), corroborando os achados de nosso estudo sobre o aumento de fibras colágenas pelo
325 uso de PRPa isolado ou em associação com RSV. Além disso, as feridas tratadas com PRPa
326 resultaram em bordas com fechamento mais homogêneo, reafirmando a importância dos
327 biomateriais na cicatrização de feridas.

328 Na prática clínica, as atividades biológicas de biomateriais associados a estatinas,
329 poderiam contribuir de maneira importante no tratamento de lesões de pele, tais como
330 úlceras diabéticas, ou outras de difícil cicatrização e/ou com sinais de infecção.

331 Conclui-se que a associação de PRPa ao gel de rosuvastatina no tratamento de feridas
332 demonstrou um possível efeito aditivo na imunexpressão de colágeno tipo III, podendo ser
333 uma alternativa viável para ação de reparação tecidual e formação de colágeno, otimizando
334 o processo cicatricial.

335 **Referências**

- 336 Andrade TAM, Iyer A, Das PK, Foss NT, Garcia SB, Coutinho-Netto J, Jordão-JrAA, Frade
337 MAC. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice
338 The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice.
339 Brazilian J. Med. Biol. Res. 2011; 44:1036–1047.
340
- 341 Bedoya SAO, Conceição LG, Vitória MIV, Loures FH, Valente FL, Amorim RL, Silva FF.
342 Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas
343 cutâneo em cães. Arq Bras Med Vet Zootec. 2016; 68(1):147-154. DOI:
344 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8484>.
345
- 346 Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, & Wielkoszynski T.
347 Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active
348 substances: an in vitro study. The Journal of bone and joint surgery. 2007; 89(3):417-420.
349
- 350 Broughton G, Janis JE, Attinger CE, 2006. The Basic Science of Wound Healing, in: Plastic
351 and Reconstructive Surgery. p. 12S–34S.
352 <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>
353
- 354 Deodhar AK, Ranna RE. Surgical physiology of wound healing: a review. J Post grad
355 Med. 1997; 43(2): 52-6. PubMed; PMID 10740722.
356
- 357 Ferreira NGO. Efeito da associação de biomateriais e rosuvastatina tópica na reparação
358 tecidual de feridas cirúrgicas em coelhos [dissertação] [internet]. Presidente Prudente:
359 Universidade do Oeste Paulista; 2019. [acesso em 2019 nov 10]. Disponível em:
360 <http://bdtd.unoeste.br:8080/jspui/bitstream/jspui/1170/2/Nathalia%20Gonzaga%20de%20Oliveira%20Ferreira.pdf>
361
362
- 363 Grover HS, Kapoor S, Singh A. Effect of topical simvastatin (1.2 mg) on gingival crevicular
364 fluid interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 levels in chronic periodontitis – A clinic
365 biochemical study. J Oral Biol Craniof Res. 2016; 6(2):85-92. DOI:
366 10.1016/j.jobcr.2015.11.003
367
- 368 Kata D, Földesi I, Feher LZ, Hackler L Jr, Puskas LG, Gulya K. Rosuvastatin enhances anti-
369 inflammatory and inhibits pro-inflammatory functions in cultured microglial
370 cells. Neuroscience [Internet]. 2015 [acesso em 2019 out 20]314:47-63. Disponível em:
371 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633263>
372
- 373 Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. Nat Protoc
374 [Internet] 2016 [acesso em 2019 set 15]11(10):1775. Disponível em:
375 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27583639>
376
- 377 Kırzioğlu FY, Özmen Ö, Doğan B, Bulut MT, Fentoğlu Ö, Özdem M. Effects of rosuvastatin
378 on inducible nitric oxide synthase in rats with hyperlipidaemia and periodontitis. J Periodontal
379 Res. 2018; 53:258-266. DOI: 10.1111/jre.12513
380
- 381 Ko HHT, Lareu RR, Dix BR, Hughes JD. In vitro antibacterial effects of statins against
382 bacterial pathogens causing skin infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Jun;
383 37(6):1125-1135. DOI: 10.1007/s10096-018-3227-5

- 384
385 Maged A, Abdelkhalek AA, Mahmoud AA, Salah S, Ammar MM, Ghorab MM.
386 Mesenchymal stem cells associated with chitosan scaffolds loaded with rosuvastatin to
387 improve wound healing. *Eur J Pharm Sci.* 2019; 15:185-198. DOI:
388 10.1016/j.ejps.2018.11.002.
- 389
390 Medeiros AC, Dantas-filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *J Surg Cl Res.*
391 2016;7(2):87-102.
- 392
393 Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Muller and Kirk's small animal dermatology. 7.ed. St.
394 Louis: Elsevier, 2013. p.774-843.
- 395
396 Miron RJ, Zhang Y. Autologous liquid platelet-rich fibrin: A novel drug delivery system.
397 *Acta Biomater.* 2018; 75:35–51. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.05.021
- 398
399 Nour S, Baheiraei N, Imani R, Khodaei M, Alizadeh A, Rabiee N, Moazzeni SM. A review of
400 accelerated wound healing approaches: biomaterial-assisted tissue remodeling. *J Mater Sci.,*
401 *Mater Med.* 2019; 30(10):120.
- 402
403 Olivetti CE, Alvarez Echazú MI, Perna O, Perez CJ, Mitarotonda R, De Marzi M, Desimone
404 MF, Alvarez GS. Dodecenylsuccinic anhydride modified collagen hydrogels loaded with
405 simvastatin as skin wound dressings. *J Biomed Mater Res A.* 2019 Sep; 107(9):1999-2012.
406 DOI: 10.1002/jbm.a.36713
- 407
408 Pietrovski EF, Mascarenhas L, Scheeren E, Neves EB. Úlceras do pé diabético podem ser
409 tratadas com estatinas?. *Rev Bras Farm [Internet].* 2012 [acesso em 2019 nov 10]; 93(3): 279-
410 282. Disponível em: <http://rbfarma.org.br/files/rbf-2012-93-3-2.pdf>
- 411
412 Pradeep AR, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K, Raju A, Singh P. Rosuvastatin 1.2 mg In Situ
413 Gel Combined With 1:1 Mixture of Autologous Platelet-Rich-Fibrin and Porous
414 Hydroxyapatite Bone Graft in Surgical Treatment of Mandibular Class II Furcation Defects:
415 A Randomized Clinical Control Trial. *J Periodontol.* 2016; 87(1):5–13. DOI:
416 10.1902/jop.2015.150131
- 417
418 Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur. Surg. Res.* 2012; 49:35–43. DOI:
419 <https://doi.org/10.1159/000339613>
- 420
421 Silva TF, Penna ALB. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Rev Inst*
422 *Adolfo Lutz.* 2012; 71(3):530-539.
- 423
424 Souza MV, Silva MB, Pinto JDO, Lima MBDS, Crepaldi J, Lopes GFM, Santos HB, Ribeiro
425 RIMA, Thomé RG. Immunohistochemical Expression of Collagens in the Skin of Horses
426 Treated with Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma. *Biomed Res. Int.* 2015;20151–12.
427 <https://doi.org/10.1155/2015/893485>
- 428
429 Tetila AF, Breda MRS, Nogueira RMB, Nai GA, Laposy CB. The Use of Platelet-Rich
430 Plasma and Rosuvastatin in Wound Healing in Rabbits: A Longitudinal Study. *Adv Skin*
431 *Wound Care.* 2019; 32(9):1-5. DOI: 10.1097/01.ASW.0000577136.88748.68
- 432

- 433 Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Plasma rico em plaquetas e
434 fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. Ver Col Bra
435 Cir [Internet]. 2006 Fev [acesso 2019 Nov 10] ; 33(1): 24-28. Disponível em:
436 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912006000100007&lng=en)
437 [69912006000100007&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912006000100007&lng=en).
438
- 439 Vendramin FS, Franco D, Schamall RF, Franco TR. Utilização do plasma rico em plaquetas
440 (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. Rev. Bras. Cir. Plástica. 2010;25:4-10.
441 <https://doi.org/10.1590/S1983-51752010000400004>
442
- 443 Waidman MAP, Rocha SC, Correa JL, Brischiliari A, & Marcon SS. O cotidiano do
444 indivíduo com ferida crônica e sua saúde mental. Texto & Contexto-Enfermagem.
445 2011; 20(4):691-699.
446
- 447 Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. Surg Clin North Am. 1997;
448 77(3):509-528. DOI: 10.1016/s0039-6109(05)70566-1
449
- 450 Wu H, Germanov AV, Goryaeva GL, Yachmenev AN, Gordienko DI, Kuzin
451 VV, Skoroglyadov AV. The Topical Application of Rosuvastatin in Preventing Knee Intra-
452 Articular Adhesion in Rats. MedSciMonit. 2016; 22:1403-1409. DOI: 10.12659/msm.898237

ANEXO A- CEUA (APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS)

07/11/2019

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO I E III EM BIÓPSIAS DE FERIDAS DÉRMICAS TRATADAS COM GEL DE ROSUVASTATINA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM COELHOS.", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5170 e tendo como participante(s) CRISTOFFER DA SILVA SANTANA (discente), YURI FERREIRA VICENTINI (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO (docente), CECILIA LAPOSY SANTAREM (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR 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 os preceitos 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 20/02/2019.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
3478	21/02/2017	UNOESTE	NÃO	Material armazenado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Unoeste

Presidente Prudente, 28 de Maio de 2019.

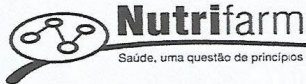
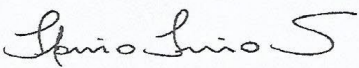


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 16 3229-2079 – cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – 16 3229-2079 – cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – 163229-2079 – ceua@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 9a7110ec8aacdeec1b5697a68d429912

ANEXO B- LAUDO DA ROSUVASTATINA

 Nutrifarm Saúde, uma questão de princípios		NUTRIFARM DO BRASIL IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE INGREDIENTES LTDA		11/10/2016 16:51:2	
Este documento representa a garantia de que este produto foi devidamente analisado e aprovado em nosso laboratório e portanto encontra-se em conformidade com as especificações dos órgãos federais, estaduais e municipais responsáveis.			Nota Fiscal : 89299 Nº Pedido : 88854		
ROSUVASTATINA CALCICA*					
Lote Interno	: RSA0091215/F1(1)	Validade	: 01/11/2020	D.C.B.	: 07818
Lote Fabricante	: RSA0091215	Fabricação	: 01/12/2015	C.A.S.	: 147098-20-2
Origem	: INDIA	Análise	: 30/06/2016	N.C.M.	: 2932.20.00
Procedência	: BRASIL	Form. Molec	: Ca[2(C22H27FN3O6S)]	Nº O. Frac	: 4004
Fabricante	: UNIQUE LABORATORIES PRIVATE L	Peso Molec	: 1.001,149		
Análises Realizadas pelo Distribuidor :					
Teste :	Especificação :	Resultado :			
Aspecto	Pó cristalino branco a quase branco creme	De acordo			
Solubilidade	Solúvel em acetona e levemente solúvel em acetona.	De acordo			
Identificação	IR / Reação de precipitação	De acordo			
Água (K.F.)	Máximo 6,0%	2,302			
Substâncias Relacionadas	Qualquer impureza individual - Máximo 0,5%	<0,5			
	Total de impurezas - Máximo 1,0%	<1,0			
Teor	98,0% a 102,0% - Base anidra	99,02			
Conteúdo de cálcio	3,5% a 4,5%	4,20			
Rotação Óptica Específica	+14,0° a +18,0°	+14,90°			
Metais pesados	Máximo 20 ppm	<20			
Armazenamento :	Ficha de Segurança :	Referência :			
ARMAZENAR EM RECIPIENTE HERMETICAMENTE FECHADO. MANTER AO ABRIGO DA LUZ. GUARDAR EM LOCAL SECO E FRESCO.		Método do Fabricante.			
Resultado : Aprovado (X)		Conclusão : Todos os resultados atendem as especificações			
 Flavio Francisco de Souza Farmacêutico Resp CRF : 63.833-SP		 Paulo Cesar Silva Ramalho Supervisor do CQ CRQ IV : 04471803		Conferência automatizada  Data de emissão : 11/10/2016 Página :	

ANEXO C- NORMAS DA REVISTA

Cells Tissues Organs



Author Guidelines

About the Journal

Aims and Scope

Cells Tissues Organs aims at bridging the gap between cell biology and developmental biology and the emerging fields of regenerative medicine (stem cell biology, tissue engineering, artificial organs, in vitro systems and transplantation biology). *CTO* offers a rapid and fair peer-review and exquisite reproduction quality. Special topic issues, entire issues of the journal devoted to a single research topic within the range of interests of the journal, are published at irregular intervals.

Journal Sections

Developmental Biology
Stem Cells
Tissue Engineering – Regenerative Medicine

Article Types

Research Articles

Research Articles report on primary research. They must describe significant and original observations. Consideration for publication is based on the article's originality, novelty, and scientific soundness, and the appropriateness of its analysis.

Research Articles are reports of original work. Authors are asked to follow the [▶ EQUATOR Network](#) for Research Articles.

Prior approval from an Institutional Review Board (IRB) or an Ethics Review Committee is required for all investigations involving human subjects.

More information is available in the downloadable Research Article [We are online](#)

Documents

[!\[\]\(2e897e890e69d81eae4503a8342c36b0_img.jpg\) Research Article \(DOC, 46.5 KB\)](#)

Review Articles

Review Articles are considered reviews of research or summary articles. They are state-of-the-art papers covering a current topic by experts in the field. They should give evidence on and provide answers to a well-defined aspect or question in a particular area. Review Articles must include a critical discussion of the reported data and give a clear conclusion with potential impacts on the standard of care.

More information is available in the downloadable Review Article sample below.

Documents

[!\[\]\(830769b31eeeaca920791081939ff8ba_img.jpg\) Review Article \(DOC, 40.5 KB\)](#)

Systematic Review

Systematic Reviews are literature reviews focused on a research question that synthesizes all high-quality research evidence relevant to that question. Systematic Reviews should be presented in the Introduction, Methods, Results, Discussion format. The subject must be clearly defined. The objective of a Systematic Review should be to arrive at an evidence-based conclusion. The Methods section should give a clear indication of the literature search strategy, data extraction procedure, grading of evidence, and kind of analysis used. We strongly encourage authors to comply with the [► Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses \(PRISMA\) guidelines](#).

More information is available in the downloadable Systematic Review sample below.

Documents

[!\[\]\(bd3b31712ad9bab5a241210fa6925cdd_img.jpg\) SystematicReview \(DOC, 42.5 KB\)](#)

Commentaries

More information is available in the downloadable Commentaries sample below.

Documents

[!\[\]\(7bc43b319a082987e20f7bf78f4bab80_img.jpg\) Commentary \(DOC, 40 KB\)](#)

Editorials

Editorials are discussions related to a specific article or issue written by an editor or other member of the publication staff.

More information is available in the downloadable Editorial sample below.

Documents

[!\[\]\(666e09182d4cd268646ea700ea60dcdf_img.jpg\) Editorial \(DOC, 40 KB\)](#)

Letters

Letters are encouraged if they directly concern articles recently published in the journal. If accepted, the editors reserve the right to submit such letters to the authors of the articles concerned prior to publication, in order to permit them to respond in the same issue of the journal.

In exceptional cases, Letters may also address data published in another journal or general subjects related to matters discussed in the journal.

More information is available in the downloadable Letter sample below.

Documents

[!\[\]\(faf942dc3e59ce8eb64b4ac481eca7e0_img.jpg\) Letter \(DOC, 38 KB\)](#)

Letters should refer to articles published in Cells Tissues Organs in the last 12 months and should contain no abstract, up to 750 words main text, approx. 5 references, and 1-2 illustrations and/or tables.

Meeting Reports/Abstracts

More information is available in the downloadable Meeting Report sample below.

Documents

[!\[\]\(b4eeff342f60cc7bcd67d869b4fedca2_img.jpg\) Meeting Report \(DOC, 38 KB\)](#)

Methods Article

Methods Articles primarily describe methods or procedures used to perform an experiment or research rather than report the results of the research.

More information is available in the downloadable Methods Article sample below.

Documents

[!\[\]\(19d44b37fb4fa155bf9d60c77a3d3cb2_img.jpg\) Method Article \(DOC, 41 KB\)](#)

Contact Information

Should you have any problems with your submission, please contact the editorial office:

Angela Lorenz
Editorial Office 'Cells Tissues Organs'
S. Karger AG
P.O. Box
CH-4009 Basel (Switzerland)
Tel. +41 61 306 1358
Fax +41 61 306 1434
Email: cto@karger.com



Conditions

General Conditions

Only papers written in English are considered. The articles should be comprehensible to a reader who is fluent in English and should be edited prior to submission to ensure that standard English grammar and usage are observed. Use of a professional [▶ language editing service](#) prior to submission can help avoid delays with the review process.

All manuscripts are subject to editorial review.

The presentation of manuscripts should follow the [▶ Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals from the International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\)](#).

Karger journals aim to adhere to the [▶ COPE Code of Conduct and Best Practice Guidelines](#).

By submitting an article for publication, the authors agree to the transfer of the copyright to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of the Journal and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

The Submission Statement with original (hand-written) signatures is to be provided upon submitting the paper. If it is not possible to collect all signatures on a single document, individual copies should be provided for each author. Manuscripts may be accompanied by a cover letter in addition to the Submission Statement if additional information is to be communicated to the Editor(s)-in-Chief.

Karger recommends the use of original images and materials whenever possible. If a submitted manuscript contains third-party copyright material(s), it is the authors' sole responsibility to obtain permission from the relevant copyright holder for reusing the material(s), including any associated licensing fee. The copyright and usage information needs to be checked carefully to

avoid copyright infringement.

Most publishers offer a quick and easy way to clear permissions for their content via the built-in website application RightsLink or via > <https://www.copyright.com/get-permissions/>. Another widely used licensing tool is > [PLSClear](#). Please check the publishers' websites for the available options and user instructions.

Statements

All submitted manuscripts must contain a Statement of Ethics and a Disclosure Statement after the main body of the text, but before the reference list. More information on statements can be found in the article samples downloadable in the Article Types section.

Plagiarism

Whether intentional or not, plagiarism is a serious offense. If evidence of plagiarism is found before or after acceptance, or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are found to be unsatisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

Further Conditions

Research on Human Pluripotent Stem Cells

Research involving human embryonic stem cells, embryonic germ cells or induced pluripotent stem cells must comply with the ISSCR 'Guidelines for the Conduct of Human Embryonic Stem Cell Research' (website, PDF) or an equivalent set of guidelines or applicable regulations.

Website: <http://www.isscr.org/guidelines2016>

PDF: <http://www.isscr.org/guidelines/ISSCRhESCguidelines2006.pdf>

Peer Review

Cells Tissues Organs is a peer-reviewed journal that uses a single-blind peer review system. Our aim is to provide authors with timely and constructive feedback regarding their submitted manuscript. The Editor(s)-in-Chief and the international editorial board ensure a thorough and fair peer review process and the highest scientific publishing standards. Editors guide the peer review process for papers in their areas of expertise.

During online submission, you may be asked to provide the contact details, including e-mail addresses, of potential reviewers of your paper. Reviewers must have a recent publication record in the area of the submitted paper, must not have published with the authors in the previous three years, and must not be from the same institution as the authors.

The Editor(s)-in-Chief is/are responsible for maintaining a high-quality peer review of papers submitted to the journal. Their decision concerning the acceptance or rejection of submitted manuscripts is final.



Article Preparation

Formatting

The preferred word processing program for manuscripts is Microsoft Word. Page and line numbering should be activated, and the level of subheadings should be indicated clearly.

Footnotes should be avoided. When essential, they should be numbered consecutively and appear at the foot of the appropriate page.

Abbreviations (with the exception of those clearly well established in the field) should be explained when they are first used both in the abstract and in the main text.

Units of measurement should be expressed in SI units wherever possible.

Generic names of drugs (first letter: lowercase) should be used whenever possible. Registered trade names (first letter: uppercase) should be marked with the superscript registration symbol ® or ™ when they are first mentioned.

The manuscript, tables, figures, and Submission Statement must be submitted in separate files.

For further technical specifications, including those regarding tables, figures, and illustrations, please refer to the > [Karger website](#).

Manuscript Arrangement

Title Page

The first page should contain a short and concise title plus a running head of no more than 80 characters. Abbreviations should be avoided.

Below the title, list all the authors' names as outlined in the article sample, which can be downloaded under Article Types. Each listed author must have an affiliation, which comprises

the department, university, or organization and its location, city, state/province (if applicable), and country.

Place the full postal address of the corresponding author at the bottom of the first page, including at least one telephone number and e-mail address.

Keywords relevant to the article should be listed below the corresponding author information.

Body

Please refer to the Article Types section of the Guidelines for Authors for information on the relevant article structure, including maximum word counts and downloadable samples.

Online Supplementary Material

Online Supplementary Material may be used to enhance a publication and increase its visibility on the Web. Supplementary files (directly relevant but not essential to the conclusions of the paper) will undergo editorial review and should be submitted in a separate file with the original manuscript and with all subsequent submissions. The Editor(s) reserve(s) the right to limit the scope and length of supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for publication without the need for any modification or editing and should not exceed 10 Mb in size. Figures and tables must have titles and legends, and all files must be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are Word or PDF files, Excel spreadsheets (if the data cannot be converted properly into a PDF file), and multimedia files (MPEG, AVI, or QuickTime formats). All supplementary material should be referred to in the main text. A DOI number will be assigned to supplementary material, and it will be hosted online at > <https://karger.figshare.com> under a > [CC BY license](#). Supplementary material may incur a charge. See Cost of Publication for more information.

References

In-Text Citation

References in the text should be made up of the author(s)'s name(s) (up to 2 authors) followed by the year of publication. When there are more than 2 authors, the first author's name and 'et al.' should be used. When references are made to more than 1 paper by the same author, published in the same year, they should be designated as a, b, c, etc. In-text citations should always be ordered chronologically, e.g., [Rendulic et al., 2004; Jurkevitch, 2006].

The reference list should be arranged alphabetically, then chronologically. Material submitted for publication but not yet accepted should be labelled as 'unpublished' and may not be included in the reference list. Other pre-published or related materials with a DOI, e.g. preprint

manuscripts, datasets, and code, may be included.

Further information and examples can be found in the downloadable article samples in Article Types. If you are using reference management software, we recommend using the Vancouver Referencing Style.

Reference Management Software

The use of EndNote is recommended to facilitate formatting of citations and reference lists. The journal output style can be downloaded from > <http://endnote.com/downloads/styles>.

Author Services

Karger Publishers offer a range of services to assist authors with the preparation of their manuscript, including discounts for language editing services offered by third parties.

More information is available on the > [Author Resources](#) section of the Karger homepage.

When submitting a manuscript, authors can add their > [ORCID number](#) to their Karger account to ensure that their paper is accredited to them correctly.



Cost of Publication

Page Charges/Article Processing Charges

Charges are waived in this journal, meaning **publication is free of charge**.

Karger submits accepted papers from Cells Tissues Organs to PMC in compliance with all funder mandates. The selection of Author's Choice is not required.

Online Supplementary Material

Authors will be charged a processing fee of CHF 250.00 for hosting supplementary material.

Illustration Charges

Color illustrations are reproduced free of charge.

Author's Choice

Karger Publisher's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading, and printing at www.karger.com. The option is available for a one-time fee, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at > www.karger.com/authors_choice. For a fee of CHF 3,000.00 / USD 3,530.00 / EUR 3,000.00, the final, published version of the article may be posted at any time and in any repository or on other websites, in accordance with the relevant Creative Commons license as well as the current Karger self-archiving policy for Open Access articles. Karger supplies all articles to PubMed Central for indexing.



Journal Policies

Copyediting and Proofs

Manuscripts accepted for publication by Karger Publishers are subject to copyediting. Karger Publishers' house style is based on internationally recognized standard manuals, including > [The Chicago Manual of Style](#).

An e-mail containing a link to download the RTF proofs will be sent to the corresponding author. The authors should check the RTF document and respond to any questions that have been raised during proofreading within 48 hours. Only text corrections are required, since layout and typesetting take place at a later stage.

Alterations made to proofs, other than the correction of errors introduced by the Publisher, are charged to the authors and may require editorial approval.

Please note that the revised proofs are not sent to the authors prior to typesetting and online publication unless there are exceptional circumstances. The article layout will be created according to the Karger standard.

DOI Number

A DOI number will be available as a unique identifier on the title page of each article. DOIs are useful for identifying and citing articles published online without volume or issue information (for more information, see > www.doi.org).

Online First Publication

All articles are published electronically ahead of print with a DOI number and are supplemented later with the definite reference to the printed version. The articles become available immediately after the authors' approval to print.

Licenses and Copyright

The Submission Statement outlines the licensing and copyright terms. A copy of the Submission Statement originally hand signed by all authors must be received by the editorial office. Please print and sign the form, and upload it during submission to make it legally binding. A brief cover letter may also be included if additional information is to be communicated to the Editor(s)-in-Chief.

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their postprints (i.e., accepted manuscripts after peer review but before production) on their personal home page or institution's repository, provided that these are not used for commercial purposes, are linked to the publisher's version, and acknowledge the publisher's copyright. Preprints may be shared without restriction.

In addition, authors may post their accepted manuscripts in public Open Access repositories and scientific networks no earlier than 12 months following publication of the final version of their article. The posted manuscripts must:

1. Be used for noncommercial purposes only
2. Be linked to the final version on www.karger.com and include the following statement:

"This is the peer-reviewed but unedited manuscript version of the following article: [insert full citation, e.g., *Cytogenet Genome Res* 2014;142:227–238 (DOI: 10.1159/000361001)]. The final, published version is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number])."

It is the authors' responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Manuscripts to be archived in PubMed Central due to funding requirements or that have been published under the Author's Choice™ scheme will be submitted by Karger on the authors' behalf, as outlined under Funding Organizations.

Funding Organizations

If the authors are affiliated with an organization that has an offsetting agreement with Karger Publishers which may allow them to publish their article free of charge, this should be communicated in a cover letter at the submission stage, so that eligibility can be assessed.

NIH-Funded Research

The US National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy mandates that final, peer-reviewed manuscripts are archived in its digital database PubMed Central (PMC) within 12

months of the official publication date. As a service to authors, Karger Publishers submits the accepted, unedited version of NIH-funded manuscripts to PMC upon publication. The final, peer-reviewed article is made available after a 12-month embargo period. Where the authors have chosen to make their paper freely available under Karger's Author's Choice™ service, this embargo does not apply.

Other Funding Sources

Karger Publishers also complies with other funders' requirements (including the Wellcome Trust and RCUK) for submission to PMC. In some cases, doing so requires that authors select Author's Choice™, which is generally reimbursed by the funder or is a permissible cost in the grant. Authors should include information on their grants in the Funding Sources section of their papers.

More information on funding sources can be found on the [Karger website](#).



Submission

Manuscript Submission

Manuscripts should be submitted online via the Cells Tissues Organs submission portal.

Before submission, please read the [Guidelines for Authors](#) for specific requirements for manuscript preparation.

Submission Statement

A Submission Statement, downloadable below, signed by all authors must be received by the editorial office. Please print and sign the form, and upload it during submission to make it legally binding. A brief cover letter outlining in how far the work is interdisciplinary and what is new in regard to the current literature on the topic may be included, but this is not essential.

Documents

[Download Submission Statement CTQ \(PDF, 198.51 KB\)](#)

