

**AVALIAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS DE FERIDAS DÉRMICAS DE
COELHOS TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS**

EVELINE FERRACIOLLI

**AVALIAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS DE FERIDAS DÉRMICAS DE
COELHOS TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS**

EVELINE FERRACIOLLI

Dissertação apresentada a 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: Profa. Dra. Cecília Braga Laposy

636.089 65 Ferracioli, Eveline.
F368a Avaliação das fibras colágenas de feridas
dérmicas de coelhos tratadas com diferentes fontes
de plasma rico em plaquetas / Eveline Ferracioli. –
Presidente Prudente, 2016.
25f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Braga Laposy.

1. Coelhos. 2. Feridas dérmicas. 3.
Cicatrização. 4. Fibras colágenas. 5. Plasma rico
em plaquetas. I. Título.

EVELINE FERRACIOLLI

**AVALIAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS
TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

Dissertação apresentada a 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, 21 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Fernando De Biasi
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Londrina- Paraná

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em memória à minha querida mãe, que em pouco tempo de vida, com sua sabedoria, me deixou o legado da vida e a importância de ter fé.

Ao meu marido Walter, que é um grande companheiro e meu eterno amor, sempre paciente e compreensivo, um presente de Deus na minha vida. Obrigada por ter me incentivado dia a dia e pelos sábios conselhos dados durante este período e principalmente por ter sido pai e mãe durante minha ausência.

A minha filha Lara, como seu próprio nome diz Luz da família. Agradeço a minha amada filha por toda paciência e compreensão com a mamãe durante esse período e dedicação aos estudos, mas é para você minha filha que quero deixar o exemplo do futuro e os estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me sustentado em todos os momentos, por ter me guiado e dado sabedoria necessária a realização desse trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cecília Braga Laposy, por toda atenção e dedicação. Obrigada pela paciência na orientação e por transmitir seus conhecimentos. É um orgulho ter sido orientanda de uma profissional tão sábia e competente.

À Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira parceira neste trabalho como co-orientadora, contribuindo generosamente com informações e sugestões importantes para o desenvolvimento do mesmo.

À Prof^a. Dr^a. Gisele Alborghetti Nai, pelo auxílio com as imagens histológicas e cedido o laboratório para a pesquisa.

À Prof. Dr. Anthony Cesar de Souza Castilho pelas ricas sugestões feitas no meu exame de qualificação.

À todos os professores do Mestrado em Ciência Animal, pelo conhecimento transmitido.

Ao professor José Carlos Camargo Filho e ao Doutorando Guilherme Osaki, pela imensa ajuda com a parte histológica deste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Luis Antonio Justulin Junior, pela excelente disposição e recepção em Botucatu e pelas valiosas informações dadas, que tiveram uma influência importante no delineamento deste estudo.

As minhas queridas professoras e agora companheiras de mestrado Valéria Cardoso Moreira e Maria Elisa Marques pela agradável companhia e ajuda para desenvolvimento do trabalho.

Às minhas amigas Francilene Agostinho, Letícia Ortega, Meiriélle Meneghine e Marina Platzeck que para mim são verdadeiras irmãs e me orgulho de conhecê-las e ter vocês na minha vida, obrigada por tudo Amo vocês.

À minha querida Valéria Montanari que para mim é como uma mãe, dedico todo esse trabalho à ela que sempre cuida de mim, e me conduz para o bom caminho da vida.

À minha querida amiga Josiane Lins que é uma benção, um verdadeiro anjo, que tenho orgulho de conviver com uma pessoa tão iluminada e maravilhosa.

À minha querida Cinthia Carocci que tenho orgulho de conhecer e que acompanhou todas as fases da minha vida.

À querida coordenadora do Curso de Tecnologia em Estética e Cosmética Bruna Corral e professor Marcos Zocoleer, pelo apoio, e também para obtenção deste título de Mestre.

Às minhas queridas clientes que chamo de flores, agradeço imensamente toda paciência e compreensão, e principalmente o incentivo que me deram, me orgulho de tê-las comigo durante todos esses anos.

À toda minha família, minha avó, minhas tias e tio, meus irmãos, minha sogra, meus amigos, por me apoiarem sempre e acreditarem em mim. Obrigada por todo carinho e incentivo, e por compreenderem a minha ausência nos últimos meses. Amo todos vocês!

“ Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância ”
(John F. Kennedy)

RESUMO

Avaliação das fibras colágenas de feridas dérmicas de coelhos tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um recurso promissor no tratamento de feridas, considerado um biomaterial atóxico, que quando injetado no tecido, aumenta a capacidade de regeneração tecidual por estimular fatores de crescimento e ativar a angiogênese, e assim induzir a síntese de colágeno. Estudos comprovam a eficácia do PRP de fonte autóloga gel, porém as fontes homóloga e heteróloga gel constituem alternativas quando não há condições de obtenção do PRP do próprio animal, porém desconhece-se o efeito do uso destas fontes na organização das fibras colágenas durante o processo cicatricial. Sendo assim, o trabalho teve como objetivo comparar os efeitos na cicatrização após a realização de ferida dérmica em coelhos tratados com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas (PRP) gel (autólogo, homólogo e heterólogo). Foram utilizadas 36 biópsias de feridas dérmicas, experimentalmente induzidas em 18 coelhos adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia (n= 9 machos, n= 9 fêmeas), tratados e não tratados (controle) com diferentes fontes de PRP. As feridas foram higienizadas e tratadas nos dias 0,3,7,10,14 e no 17^o dia foi realizada a biópsia da ferida, para avaliação histológica e observação da fase inicial de remodelação. Para a determinação do tipo de colágeno, as lâminas de biópsia passaram pela técnica de polarização com o corante Picrosirius-red F3BA. Os resultados comprovaram que a fonte de PRP homólogo gel mostrou-se tão eficiente quanto a fonte de PRP autólogo gel em comparação a cicatrização. Outro importante achado no presente estudo foi que o uso PRP heterólogo gel proporcionou um processo de cicatrização tão bom quanto àqueles proporcionados pelos grupos autólogo e homólogo gel. Como o PRP é rico em fatores de crescimento, mesmo estes sendo de outros animais da mesma espécie e também de espécies diferentes, vale ressaltar que, mesmo quando aplicadas de forma seriada, as diferentes fontes de PRP não ocasionaram efeito negativo como, por exemplo, complicações clínicas. Conclui-se que as fontes heteróloga e homóloga são alternativas seguras e que seu uso contribui positivamente para um processo cicatricial adequado.

Palavras-chave: coelhos, feridas dérmicas, cicatrização, fibras colágenas, plasma rico em plaquetas.

ABSTRACT

Evaluation of collagen and in dermal wounds of rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma

The platelet-rich plasma (PRP) is a promising resource in treatment of wounds, considered a non-toxic biomaterial, which when injected in the tissue, increases its regeneration capacity by stimulating growth factors and activating angiogenesis and thus to induce synthesis of collagen. Studies confirm the effectiveness of the autologous gel source of PRP, but the homologous and heterologous gel sources are alternatives when there are no conditions for obtaining the animal's own PRP, however, unknown whether the effect of using these sources in the organization of the collagen fibers during the process scar. Therefore, this study aimed to compare the effects on healing produced after performing dermal wound in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma (PRP) gel (autologous, homologous and heterologous). 36 biopsies of dermal wounds have been used, experimentally induced in 18 adult rabbits, clinically healthy, of New Zealand breed (n = 9 males, n = 9 females), treated and not treated with different sources of PRP. The wounds were sanitized and treated on 0,3,7,10,14 days, and, in 17^o day, a biopsy of the wound has been made, for histologic evaluation and observation of the initial phase of remodeling. In order to determine the type of collagen, the biopsy slides passed through polarization technique with dye-red Picrosirius F3BA. Results confirmed that the source of homologous PRP gel proved to be as efficient as the source of autologous PRP gel if compared healing. Other important finding in this study was that heterologous PRP gel use provided a healing process as good as those provided by autologous and homologous gel groups. As tough PRP is rich in growth factors, even these being from other animals of the same species and also of different species, it is noteworthy that even when applied serially, the different types of PRPs have not caused negative effects, as rejection, for example. It has been concluded that the heterologous and homologous sources are safe alternatives and their use contributes positively to an adequate healing process.

Keywords: rabbits, dermal wound scaring, collagen fibers, platelet-rich plasma.

LISTA DE SIGLAS

RP	– Plasma Rico em Plaquetas
PRPA	– Plasma Rico em Plaquetas Autólogo
PRPHE	– Plasma Rico em Plaquetas Heterólogo
PRPHO	– Plasma Rico em Plaquetas Homólogo
PPP	– Plasma Pobre em Plaquetas
FC	– Fatores de Crescimento
PDGF	– Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
CEUA	– Comissão de Ética em Uso de Animais
%	– Porcentagem
μm	– Micrômetros
mL	– Mililitros
IM	– Intramuscular
PC	– Porcentagem de Contração
Ai	– Área Inicial
Af	– Área Final
A	– Área da Ferida
R	– Raio Maior
r	– Raio Menor
mm	– Milímetros

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE USO DE ANIMAIS	
	(CEUA).....	23

1 ARTIGO CIENTÍFICO¹

2 Avaliação das fibras colágenas de feridas dérmicas de coelhos tratadas com diferentes
3 fontes de plasma rico em plaquetas
4 Evaluation of collagen and in dermal wounds of rabbits treated with different sources of
5 platelet-rich plasma

6
7 E.Ferracioli¹, C.B. Laposy^{1*}, R.M.B. Nogueira¹, L. Justulin Jr², J.C. Camargo Filho³,
8 V.C. Moreira¹, M.E. M.Marques¹, G.A. Nai¹, G.A.T. Osaki³

9 1-Universidade do Oeste Paulista- Presidente Prudente, São Paulo.

10 2- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Botucatu-São Paulo.

11 3 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Presidente Prudente-São
12 Paulo.

13 * Autor para correspondência: claposy@unoeste.br

14 **Resumo**

15 O trabalho teve como objetivo comparar os efeitos na cicatrização após a
16 realização de ferida dérmica em coelhos tratados, de forma seriada, com diferentes
17 fontes de plasma rico em plaquetas (PRP) gel (autólogo, homólogo e heterólogo).
18 Foram utilizadas 36 biópsias de feridas dérmicas, experimentalmente induzidas em 18
19 coelhos adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia (n= 9 machos, n= 9
20 fêmeas), tratados e não tratados (controle) com diferentes fontes de PRP. Para a
21 determinação do colágeno, bem como sua quantificação, as lâminas de biópsia passaram
22 pela técnica de polarização com o corante Picrosirius-red F3BA. Os resultados
23 comprovaram que as fibras colágenas neoformadas dos lados tratados com diferentes
24 fontes de PRP gel, permaneceram mais organizadas quando comparadas às feridas dos
25 lados controle (P>0,05). As médias das densidades das fibras dos grupos autólogo e
26 homólogo foram muito semelhantes (75,0±13,7 e 73,1±10,2, respectivamente). Já a
27 densidade das fibras colágenas do grupo heterólogo foram inferiores (59,4±11,3),
28 evidenciando diferenças significativas entre os grupos. Conclui-se que as fontes
29 homóloga e heteróloga são alternativas seguras e que seu uso contribui positivamente
30 para um processo cicatricial adequado.

31 **Palavras-chave:** coelhos, feridas dérmicas, cicatrização, fibras colágenas, plasma rico
32 em plaquetas.

¹ Artigo elaborado conforme normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Abstract

The study aimed to compare the effects of scaring after achieving dermal wound in treated rabbits, serially, with different sources of platelet-rich plasma (PRP) gel (autologous, homologous and heterologous). The study made use of 36 biopsies of dermal wounds, experimentally induced in 18 adult rabbits, clinically healthy, New Zealand breed (n=9 males, n=9 females) treated and untreated with different sources of PRP. To determine the type of collagen, as well as its quantification, the biopsy blades went through polarization technique with red Picrosirius F3BA dyeing. The results proved that the newly formed collagen fibers side treated with different sources of gel PRP, remained more organized compared to the control side wounds ($P>0.05$). The average fiber of autologous and homologous groups were very similar (75.0 ± 13.7 and 73.1 ± 10.2 respectively). However, the collagen fibers of the heterologous group were lower (59.4 ± 11.3), showing significant differences among the groups. It's concluded that the heterologous and homologous sources are viable alternatives safe and that their use contributes positively to a proper healing process.

Key words: rabbits, dermal wound scaring, collagen fibers, platelet-rich plasma.

Introdução

Estudos experimentais sugerem novas opções terapêuticas para solucionar possíveis problemas no processo cicatricial. Atualmente o uso do plasma rico em plaquetas (PRP), tornou-se uma opção de tratamento promissor e vem sendo utilizado em várias áreas da saúde como na ortopedia, odontologia e cirurgia plástica (Monteiro et al., 2013).

Recentemente pesquisadores descrevem os benefícios do PRP para rejuvenescimento cutâneo. Na Itália, Readelli (2010), utilizou o PRP para revitalização da face e pescoço e obteve melhora da textura da pele e redução de pequenas rugas. Uma hipótese para este achado foi a provável estimulação da produção de ácido hialurônico, o que facilitaria a absorção de água, promovendo maior firmeza, turgor e hidratação à pele, contribuindo para a formação das fibras de colágeno (Banihashemi et al., 2014; Conde Monteiro et al., 2015).

64 Na estética, o uso do PRP tem contribuído com a biotecnologia por atuar como
65 ferramenta e adiar o processo de envelhecimento cutâneo, sendo um processo seguro,
66 tolerável e pouco invasivo (EL-Domyati et al., 2013; Santos et al., 2013). O biomaterial
67 quando injetado no tecido aumenta a capacidade de regeneração tecidual por estimular
68 os fatores de crescimento e ativar a angiogênese, e por fim, induzir a síntese de
69 colágeno por meio da estimulação dos fibroblastos (Ganceviciene et al., 2012; EL-
70 Domyati et al., 2013; Conde Monteiro et al., 2015).

71 O PRP é o derivado do sangue que possui grande quantidade de plaquetas, que
72 por meio de ativação liberam fatores de crescimento (FC), dentre os quais, se destacam
73 os fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o qual estimula a síntese de
74 DNA, a quimiotaxia e a síntese de colágeno, para que ocorra a cicatrização das feridas e
75 o reparo tecidual (Kim et al., 2011).

76 No entanto, há situações que podem inviabilizar a utilização do PRP autólogo
77 gel como, por exemplo, queimaduras de grandes extensões em que o indivíduo não
78 possui quantidade ou qualidade suficiente de pele. Nestes casos consideram-se outras
79 fontes de PRP como o homólogo e o heterólogo, sendo um recurso alternativo
80 (Barrionuevo et al., 2015). A hipótese deste estudo baseia-se que o uso de outras fontes
81 de plasma rico em plaquetas possa contribuir positivamente na cicatrização tanto como
82 a fonte autóloga.

83 Diante de poucos relatos sobre o uso de diferentes fontes de PRP em feridas
84 dérmicas objetivou-se avaliar os efeitos dos diferentes biomateriais durante o processo
85 cicatricial e verificar se as fontes homóloga e heteróloga são capazes de produzir uma
86 quantidade de fibras colágenas adequadas à reparação tecidual.

87 **Material e Métodos**

88 O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA)
89 sob o protocolo número 2584 da Instituição de origem.

90 Para o estudo foram utilizados 24 coelhos (12 machos e 12 fêmeas) da raça
91 Nova Zelândia, 150 dias, peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg, mantidos em gaiolas individuais,
92 tratados com ração peletizada e água à vontade. Do total de 24 animais, seis coelhos (3
93 machos e 3 fêmeas) foram utilizados somente como doadores para obtenção do PRP
94 homólogo gel (PRP Ho). Um cão adulto, saudável, sem raça definida, peso médio de 25
95 kg foi utilizado como único doador para o preparo do PRP gel do grupo heterólogo

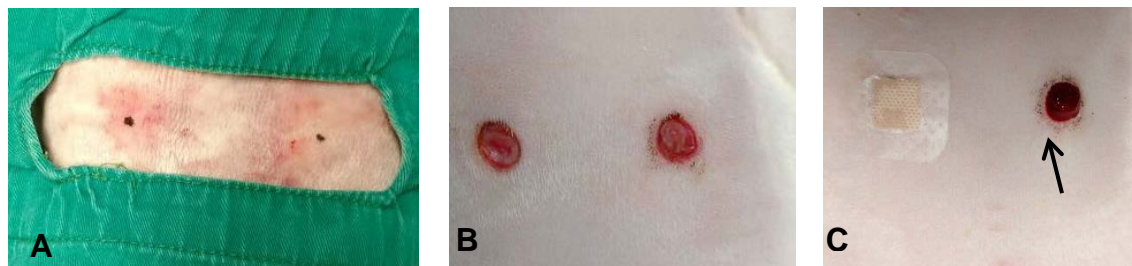
96 (PRP He). O animal passou por exames laboratoriais de rotina que atestaram sua
97 sanidade e permaneceu durante todo o período experimental em uma baia individual no
98 Hospital Veterinário da mesma instituição, recebendo ração e água a vontade. Foram
99 utilizados 6 coelhos (3 machos e 3 fêmeas) para confecção do grupo autólogo gel
100 (PRPA).

101 Para o preparo dos PRP autólogo e homólogo retirou-se 4,5mL de sangue da
102 veia auricular do próprio coelho e de um coelho doador, respectivamente utilizando
103 Scalp 25G. O material foi transferido para um frasco contendo anticoagulante citrato de
104 sódio a 3,2% (Santos, 2013). Para o preparo do PRP heterólogo, colheu-se 4,5mL de
105 sangue da veia jugular externa de um cão adulto, hígido, sem raça definida, utilizando
106 frascos a vácuo contendo citrato de sódio a 3,2% (BC Vacutainer, São Paulo, SP,
107 Brasil).

108 As amostras de sangue colhidas passaram pelo método de contagem automática
109 de plaquetas (contador Automático Sysmex Poch Diff 100i V- Roche Diagnóstica, São
110 Paulo, Brasil) e hemocitômetro (Oliveira-Filho, 2008). Feito isso, os materiais foram
111 centrifugados a 200G (centrífuga Excelsa baby 206 R, São Paulo, S.P., Brasil), por 10
112 minutos. Retirou-se o plasma pobre em plaquetas (PPP) e do restante foi realizada uma
113 nova contagem de plaquetas, com o objetivo de verificar se houve uma concentração
114 superior a seis vezes do inicial (Vendramin et al., 2010). Constatada a concentração
115 plaquetária adequada, o PRP líquido foi transformado em gel, com adição de gluconato
116 de cálcio a 10%, na proporção de 4:1 (Oliveira et al., 2000). O volume final de PRP em
117 gel de todas as fontes foi de 0,5mL.

118 Os animais foram submetidos a tricotomia na região dorsal direita e esquerda
119 com máquina de tosa (Andis AGC2-USA), utilizando lâmina n^o.40. Em seguida foram
120 anestesiados com cloridrato de Tiletamina e Zolazepan (Zoletil[®] 50, 15mg/kg-
121 IM, Virbac, Brasil), segundo protocolo de Kanashiro e Cassu (2008). A princípio foi
122 realizada antissepsia da pele com álcool 70%, depois demarcação do local (lesão) com
123 uma caneta hidrográfica, e aplicado 0,5 ml subcutâneo de anestésico local (em cada
124 ferida) (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor). Foi utilizado um punch estéril
125 de 8mm de diâmetro para realização das feridas, tanto na região do lado esquerdo (A-
126 ferida controle) como direito (B- ferida tratada), conforme Figura 1.

127



128 Figura 1. Sequência de procedimentos para o tratamento com diferentes tipos de PRP.
 129 A- marcação das lesões dérmicas. B- lesões feitas com punch 8mm. C- colocação do
 130 PRP (seta).

131 Em seguida ao procedimento, ambas feridas foram protegidas com ryon estéril
 132 e curativo adesivo (Band-Aid[®], Johnson & Johnson do Brasil-Indústria e Comércio de
 133 Produtos para Saúde LTDA). Após o procedimento cirúrgico os animais receberam
 134 Cloridrato de Tramadol (0,5mg/KgIM, Teuto Brasileiro S/A-Anápolis-Goiás,Brasil) em
 135 um período de 12/12 horas durante 3 dias consecutivos. As feridas foram higienizadas e
 136 tratadas nos dia 0,3,7,10,14 e o 17^o dia foi realizada a biópsia da ferida (seguindo o
 137 mesmo protocolo da fase de indução das feridas) para avaliação histológica e
 138 observação da fase inicial de remodelação (Vendramim et al., 2010).

139 Durante todos os momentos de observação, foi realizada a mensuração em
 140 milímetros das bordas das feridas com auxílio de um paquímetro digital (DC-60
 141 Western[®], São Paulo, S.P., Brasil). As medidas obtidas na mensuração foram usadas
 142 para calcular a área da ferida através da formula: $A = \pi \times R \times r$, onde A = área da ferida,
 143 R = raio maior, r = raio menor (Schirato et al., 2006).

144 O percentual de contração da lesão foi calculado utilizando modelo matemático
 145 onde a porcentagem de contração (Pc) é igual a área final (Af) menos a área inicial (Ai)
 146 vezes 100 (x100), dividido pela área inicial (Ai), ou seja: $Pc = (Af - Ai) \times 100 / Ai$
 147 (Oliveira et al., 2000; Schirato et al., 2006). As feridas foram fotografadas nos dias 7, 10
 148 e 17 empregando uma câmera digital (Nikon[®], Tokio, Japão).

149 Foi realizada a biópsia no 17^o dia de cicatrização, com auxílio de um punch de
 150 8mm de diâmetro, abrangendo área central e borda das feridas. O procedimento
 151 anestésico utilizado foi semelhante ao modelo adotado na indução das feridas. Após a
 152 retirada das amostras de pele, os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10%
 153 por 24 horas e, em seguida, inclusos em parafina. Cortes de 5 μ m de espessura foram

154 corados com Picosirius-red F3BA, para identificação das fibras colágenas por análise
155 morfológica (Lattouf et al., 2014). A análise histológica foi realizada pelo mesmo
156 patologista em sistema duplo cego.

157 Para quantificar e avaliar o colágeno foi utilizada a técnica de polarização com
158 o corante Picosirius-red F3BA (Lattouf et al., 2014). A coloração com Picosirius
159 permite uma análise quantitativa simples e sensível para medição de colágeno e
160 proteínas contidas em cortes de tecido. Com essa técnica é possível quantificar o
161 colágeno maduro e imaturo. No sistema RGB (Red, Green, Blue) as fibras de colágeno
162 maduro, tipo I, mais espessas e fortemente birrefringentes, aparecem em amarelo,
163 laranja e vermelho; enquanto as fibras do colágeno imaturo, tipo III, mais finas,
164 dispersas e fracamente birrefringentes, aparecem em verde. Através desse método, é
165 possível quantificar a área ocupada por cada tipo de colágeno em cada campo pré-
166 determinado do corte histológico (Greca et al., 2005).

167 Para a captação das imagens, utilizou-se microscópio da marca Leica DMLB
168 80 ligado à uma câmera DC 300 FX sob luz normal, as imagens obtidas com o
169 analisador de imagem Leica Q-Win e analisada por um software (versão 3 para
170 Windows) para análise histológicas). Foram, então, selecionados aleatoriamente 3
171 campos da área de cicatrização. As imagens foram capturadas com padronização de
172 objetiva de aumento de 20 vezes, intensidade máxima de luz do microscópio e
173 polarização em plano de 90°.

174 Para validação dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade
175 de variâncias foram utilizados respectivamente os testes de Kolmogorov-Smirnov e
176 Levene. Para verificar se as médias do percentual de contração da ferida do lado A em
177 relação ao lado B diferiram entre grupos dentro de cada momento, utilizou-se a análise
178 de variância em uma via (ANOVA *one-way*). Para verificar se o percentual final (M17-
179 M0) de contração da ferida diferiu entre lados, dentro de cada grupo, utilizou-se o teste
180 t-pareado.

181 Foi utilizada regressão linear simples para modelar os percentuais de contração
182 da ferida (variável dependente) em relação ao tempo em dias (variável independente)
183 para cada um dos grupos e para os lados A e B. Para determinar os coeficientes de
184 regressão e interceptos diferiram entre as retas ajustadas para cada grupo, empregou-se
185 o teste t não pareado. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para avaliar

186 as diferenças das porcentagens de fibras colágenas entre as feridas tratadas e não
 187 tratadas de cada fonte de PRP. Já os testes de Bartlett e Tukey foram utilizados ao
 188 comparar as fibras colágenas dos diferentes grupos de tratamento. Todas as análises
 189 foram conduzidas com auxílio do programa Biostat 5.0 e com nível de significância de
 190 5%.

191 **Resultados**

192 A partir do 14^o dia pós-lesão, ocorreu maior contração das feridas em todos os
 193 grupos, mas especialmente nos lados tratados com as diferentes fontes de PRP e no 17^o
 194 dia alcançou os 99% no grupo homólogo gel (Tab.1).

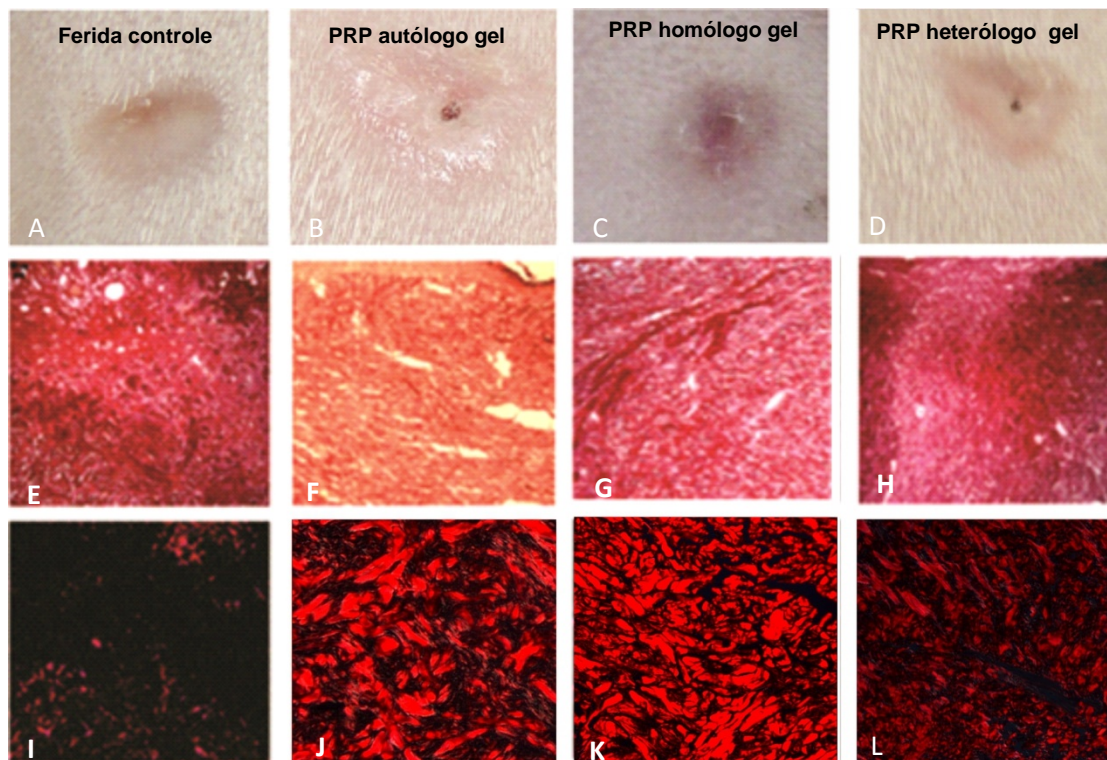
195

196 Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão da porcentagem de contração das feridas
 197 (A= lado controle), (B=lado tratado) de coelhos tratados com plasma rico em plaquetas
 198 (PRP) autólogo, homólogo e heterólogo em diferentes dias.

Dias	Fontes de PRP					
	Autólogo		Homólogo		Heterólogo	
	A	B	A	B	A	B
3	9,3± 17,4	13,5± 55,8	15,2± 25,8	26,9± 4,7	18,2± 14,0	23,9± 13,1
7	5,9± 26,9	25,3± 10,4	30,7± 26,7	39,7± 11,1	27,1± 19,2	38,6± 14,0
10	17,1± 33,4	47,6± 25,8	50,2± 9,1	60,0± 15,8	41,5± 29,0	51,1± 10,9
14	57,7± 43,6	71,5± 23,5	86,6± 11,1	91,7± 12,4	80,6 ±28,6	84,4± 12,2
17	90,3± 6,7	95,9± 3,0	97,8± 2,2	99,7 ±0,5	96,5± 7,8	96,8± 4,7

199

200 As fibras colágenas neoformadas das feridas tratadas com diferentes fontes de
 201 PRP apresentaram-se mais organizadas, o que permitiu uma melhor cicatrização. O lado
 202 tratado com os PRP sobressai em relação a organização das fibras colágenas quando
 203 comparado ao controle (Fig.2).



204

205 Figura 2. Fotografia ilustrando o aspecto macroscópico das lesões ao final do 17^o dia
 206 dos grupos controle, PRPA, PRPHo e PRPHe gel, respectivamente representados pelas
 207 letras A,B,C e D. Coloração com Picrosírius (aumento 200x): E- (controle); F- (PRPA);
 208 G- (PRPHo); H- (PRPHe). Observou-se menor vascularização, maior organização e
 209 maior homogeneidade das fibras colágenas em relação ao PRP heterólogo (H).
 210 Avaliação da coloração com Picrosirius à luz polarizada (aumento de 200x): I-(
 211 controle); J- (PRPA); K- (PRPHo); L – (PRPHe). Nota-se a birrefringência do colágeno
 212 evidenciando a formação e organização das fibras colágenas quando comparadas ao
 213 grupo controle.

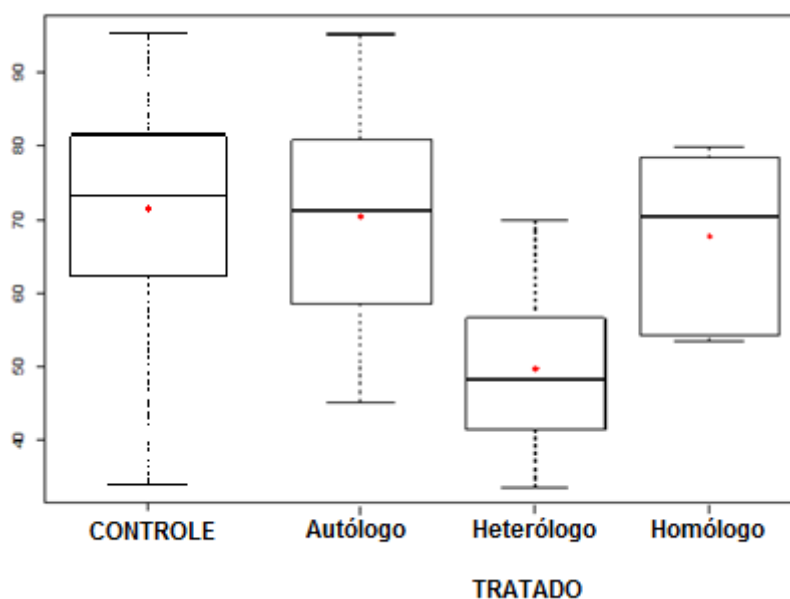
214

215 Em relação a porcentagem de formação das fibras de colágeno, houve uma
 216 quantidade maior ($P < 0,05$) nos coelhos não tratados (85,7%) comparados aos tratados
 217 com PRP autólogo gel (75,0%), ou seja, a cicatrização teve o mesmo padrão de
 218 estiramento, fazendo com que o processo de cicatrização seja próximo ao verificado em
 219 feridas não tratadas (Fig.3).

220

221 Na Fig. 3, foi possível observar que a mediana das fibras de colágeno das
 222 fontes autóloga e homóloga gel são semelhantes e da fonte heteróloga foi inferior às
 223 outras duas ($P > 0,05$).

223



224

225 Figura 3. Porcentagem de formação das fibras colágenas dos grupos controle e
 226 tratados com diferentes fontes de PRP gel. As linhas do interior dos boxes denotam 50%
 227 dos dados – mediana; as linhas superiores a 75% dos dados; e as inferiores, 25% dos
 228 dados. As linhas externas ao boxe indicam os limites máximos e mínimos ao 17º dia.

229

230 **Discussão**

231 O uso das diferentes fontes de PRP proporcionou um percentual de contração
 232 das feridas bem semelhante (Tab. 1). Observou-se que, apesar de não apresentarem
 233 diferenças estatísticas, as fontes heteróloga e homóloga mostraram-se tão eficientes
 234 quanto à fonte autóloga. Outro importante achado no presente estudo foi que o uso PRP
 235 heterólogo gel proporcionou um processo de cicatrização tão bom quanto àqueles
 236 proporcionados pelos grupos autólogo e homólogo gel. Como o PRP é rico em fatores
 237 de crescimento, mesmo estes sendo de outros animais da mesma espécie e também de
 238 espécies diferentes, vale ressaltar que, mesmo quando aplicadas de forma seriada, os
 239 diferentes tipos de PRP não ocasionaram efeitos adversos.

240

241 Kane et al. (2015) utilizaram a fonte autóloga de PRP pós implante de prótese
 242 de tornozelo e verificaram que não houve diferença estatística entre pacientes tratados
 243 ou não com PRP. Contrastando com esses resultados, Ostvar et al. (2015) observaram
 que feridas tratadas com PRP autólogo, tiveram uma redução significativa da lesão,

244 quando comparadas ao controle. Ganceviciene (2012) verificou que, quando injetado, o
245 PRP promoveu aumento da regeneração tecidual por secreção de fatores de crescimento
246 que estimulam uma melhora na vascularização tecidual, angiogênese e indução da
247 síntese de colágeno por meio da estimulação dos fibroblastos.

248 Segundo Barrionuevo et al. (2015), ao compararem o efeito do uso de
249 diferentes fontes de PRP (autólogo, homólogo e heterólogo) gel, sobre o processo de
250 cicatrização de feridas cutâneas, concluíram que, independente da fonte, seu uso
251 melhora e acelera o processo de cicatrização. Este estudo corrobora os achados deste
252 experimento, verificando-se ainda que as fontes autóloga e homóloga produzem uma
253 fibra mais densa e homogênea.

254 Quarteiro et al. (2015) em seu estudo com ratos tratados com PRP homólogo
255 gel no reparo de lesões musculares, descreveram que na primeira avaliação feita aos sete
256 dias, a quantidade média de colágeno foi significativamente menor nas lesões tratadas
257 com PRP, em relação às lesões controle, sugerindo um processo inflamatório mais
258 intenso com possível aumento da liberação de citocinas. Observação semelhante foi
259 verificada no presente estudo, onde os grupos tratados com diferentes fontes de PRP
260 apresentaram menor quantidade de fibras colágenas quando comparadas aos grupos
261 controle, porém mais organizadas.

262

263 **Conclusões**

264 Conclui-se que as fontes de plasma rico em plaquetas homóloga e heteróloga ,
265 quando aplicadas de forma seriada, são alternativas seguras, contribuindo positivamente
266 para um processo cicatricial adequado.

267

268 **Referências**

269 BANIHASHEMI, M.; NAKHAEIZADEH, S. An introduction to application of platelet
270 rich plasma (PRP) in skin rejuvenation. *Rev.Clin. Med.*, v. 1, n. 2, p. 38-43, 2014.

271 BARRIONUEVO, D.V.; LAPOSY, C.B.; ABEGÃO, K.G. et al. Comparison of
272 experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich
273 plasma. *Lab. Anim.*, v. 49, n. 3, p. 209-214, 2015.

- 274 CONDE MONTERO, E.; FERNÁNDEZ SANTOS, M.E.; SUÁREZ FERNÁNDEZ, R.
275 Platelet-rich Plasma: applications in dermatology. *ActasDermoSifiliogr.*, v. 106, n. 2, p.
276 104-111, 2015.
- 277 EL-DOMYATI, M.; MEDHAT, W. Minimally Invasive Facial Rejuvenation Current
278 Concepts and Future Expectations. *Expert Rev. Dermatol.*, v. 8, n. 5, p. 565-580, 2013.
- 279 GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A.I.; THEODORIDIS, A.; MAKRANTONAKI, E.
280 Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*, v. 4, n. 3, p. 308-319, 2012.
- 281 GRECA, F.H.; RAMOS, E.J.B.; DALLOLMO, V.C. et al. The clinical use of platelet-
282 rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury*, v.40, p.158–
283 162, 2009.
- 284 KANASHIRO, G.P.; CASSU, R.N. Anestesia em animais selvagens e de laboratório.
285 In: Andrade, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3 ed. São Paulo: Roca, p.728-745,
286 2008.
- 287 KANE, J.M.; COSTANZO, J.A.; RAIKIN, S.M. The efficacy of platelet-rich plasma for
288 incisional healing after total ankle replacement using the agility total ankle replacement system.
289 *Foot Ankle Int.*, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2015.
- 290 KIM, D.H.; JE, Y.J.; KIM, C.D. et al. Can Platelet-rich Plasma be used for skin
291 rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal
292 Fibroblast. *Ann.Dermatol*,v.23,p.424-431, 2011.
- 293 LATTOUF, R.; YOUNES, R.; LUTOMSKI, D. et al.Picrosirius red staining a useful
294 tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J. Histochem.*
295 *Cytochem.*, v. 62, n. 10, p. 751-758, 2014.
- 296 MONTEIRO, M.R. Platelet-rich plasma in dermatology. *Surg.Cosmet.Dermatol.*, v. 5,
297 n. 2, p. 155-159, 2013.
- 298 MOREIRA, V.C. *Análise do colágeno e angiogênese de feridas dérmicas de coelhos*
299 *tratados com PRP autólogo gel* 2016. 27f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
300 Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. Presidente Prudente-SP.
- 301 OLIVEIRA, S.T., LEME, M.C., PIPPI, N.L. et al. Formulations of comfrey
302 (*Symphytum officinale L.*) in the healing of skin wounds in rats. *Rev. FZVA*, v. 7/8, p.65-
303 74, 2000.
- 304 OLIVEIRA-FILHO, M.A.; ALMEIDA, L.E.; PEREIRA, J.A. et al. Plasma rico em
305 plaquetas de coelhos: introdução a um modelo experimental. *ABCD, arq.bras.cir.dig.*,
306 v.21, p.175-179, 2008.

307 OSTVAR, O.; SHADVAR, S.; YAHAGHI, E. et al. Effect of platelet-rich plasma on the
308 healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinic-histopathologic study
309 in rabbits. *Diagnostic Pathology*, v. 10, n. 85, p. 1-6, 2015.

310 QUARTEIRO, M.L., TOGNINI, J.R.F., OLIVEIRA, E.L.F.; SILVEIRA I. O efeito do
311 plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. *Rev. bras.ortop.*, v.
312 50,p. 586-595, 2015.

313 READELLI, A.; ROMANO, D.; MARCIANO, A. Face and neck revitalization with
314 Platelet-rich Plasma (PRP): clinical outcome in a series of 23 consecutively treated
315 patients. *J. Drugs Dermatol.*, v. 9, n. 5, p. 466-472, 2010.

316 SANTOS, E. Z. *Avaliação da reparação de feridas cirúrgicas em coelhos, tratadas ou*
317 *não com plasma rico em plaquetas autólogo em gel.*2013. 44f. Dissertação (Mestrado
318 em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. Presidente
319 Prudente-SP.

320 SCHIRATO, G.V.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O. et al. The polysaccharide from
321 *Anacardium occidentale L.* in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing.
322 *Cienc. Rural*, v. 36, p.149-154, 2006.

323 UEBEL, C.O.; MARTINS, P.D.E.; SILVEIRA, J.A.M.; GAZZALLE, A. Megassessões
324 de unidades foliculares e fatores de crescimento plaquetário. *Rev. bras. cir.plást.*, v. 28,
325 n.1, p.156-164, 2013.

326 VENDRAMIN, F.S.; FRANCO D.; FRANCO T. R. Use of autologous platelet-rich
327 plasma in skin grafts surgeries in chronic wounds. *Rev. bras. cir. plást.*, v. 25, n. 4, p.
328 589-594, 2010.

329

330

331

332

333

334

335

336

337

ANEXO

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE USO DE ANIMAIS (CEUA)

Certificado

Página 1 de 1

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 "ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENAS DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2584 e tendo como participante(s) CECILIA BRAGA LAPOSY (responsável), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (docente), EVELINE FERRACIOLLI (discente), MARIANA CHIARI BERTOLLI (discente), 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.

Presidente Prudente, 23 de Julho de 2015.



Prof. Doutor Rodrigo Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq



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

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança a0797bad159a33af45c8c41e911eca3b

<http://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=a0797bad159a33af45c8c41e911ec...> 16/05/2016