

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS EM
COELHOS, TRATADAS OU NÃO COM PLASMA RICO EM
PLAQUETAS AUTÓLOGO EM GEL**

ELIANE SZÜCS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS EM
COELHOS, TRATADAS OU NÃO COM PLASMA RICO EM
PLAQUETAS AUTÓLOGO EM GEL**

ELIANE SZÜCS DOS SANTOS

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: Prof^ª. Dr^ª. Cecília Braga Laposy

636.089 714 Santos, Eliane Szücs dos.
S237a Avaliação da reparação de feridas padronizadas em coelhos, tratadas ou não com plasma rico em plaquetas autólogo em gel / Eliane Szücs dos Santos. – Presidente Prudente, 2013.
44 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2013.

Bibliografia.

Orientadora: Cecília Braga Laposy.

1. Coelhos. 2. Plasma rico em plaquetas autólogo. 3. Cicatrização. 4. Feridas. I. Título.

ELIANE SZÜCS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS EM COELHOS,
TRATADAS OU NÃO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO EM
GEL**

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.

Presidente Prudente, 14 de novembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cecília Braga Laposy
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Audrey de Souza Marquez
Universidade Norte do Paraná – Unopar
Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por ter me dado a vida, as oportunidades e a sabedoria que me trouxeram até aqui.

Aos meus pais Jorge e Luiza, responsáveis pelo meu desenvolvimento humano e o que sou hoje, que sempre me orientaram sobre aprendizado buscando as melhores oportunidades de conhecimento, crescimento cultural e científico, me incentivando aos estudos, bem mais precioso de um indivíduo. Perdoem as minhas ausências.

Aos meus irmãos, que de forma direta ou indireta me ajudaram e ajudam sempre, simplesmente por existirem em minha vida.

À minha filha, minha jóia rara... Razão do meu viver... Obrigada por existir!

Aos amigos e colegas de trabalho que de uma forma ou de outra contribuíram para essa realização.

Ao Alberto, companheiro de todas as horas, obrigada pela paciência, compreensão, carinho e companheirismo, superando e compreendendo meu sacrifício e os momentos de ausência.

Aos meus mestres, exemplos de carinho, dedicação e conhecimento.

À Prof^a. Rosa minha co-orientadora, pessoa rara e especial, obrigada pela oportunidade de convívio e ajuda científica na realização deste trabalho.

Ao Prof. Rogério, pelas análises estatísticas e por me orientar sobre as mesmas.

À Karina, companheira em todos os momentos, fossem eles bons ou ruins, preocupantes ou gratificantes, temerosos ou agradáveis, obrigada pelo convívio, troca de informações, conhecimentos, paciência e carinho.

Ao Bruno e Inara, fiéis escudeiros nessa longa jornada.

Aos funcionários do Biotério e do Coelhário pela dedicação e ajuda com nossos queridos animais.

Aos coelhos, aprendemos juntos a convivência homem-animal, que bela oportunidade!

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste sonho!

“Pessoas especiais existem para nos fazer compreender que o amor é o que faz diferença na vida. Essas pessoas tornam minha vida mais bela”.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Prof^a Dra. Cecília Braga Laposy,

Obrigada pela oportunidade de convívio e troca de conhecimentos, agradeço também por entender minhas dificuldades e limitações com paciência, dedicação, segurança e competência científica.

Sua força, entusiasmo e exemplo me trouxeram até aqui, sem isso, jamais teria alcançado meu ideal, uma caminhada árdua onde em muitos momentos pensei em desistir.

Que Deus a abençoe e aprimore cada vez mais todas as suas virtudes!

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência
em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

RESUMO

Avaliação da reparação de feridas cirúrgicas em coelhos, tratadas ou não com plasma rico em plaquetas autólogo em gel

Com o objetivo de avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo na forma gel sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelos experimentais *in vivo*, foram induzidas feridas no dorso de coelhos com auxílio de um punch de 8mm, sendo o lado direito considerado controle (A) e tratado com NaCl 0,9% e o lado esquerdo (B) tratado com gel autólogo de PRP. As lesões foram avaliadas por um período de 17 dias. Foram utilizados seis coelhos brancos da raça Nova Zelândia (n=3 machos; n=3 fêmeas), adultos, pesando $3,0 \pm 1,0$ kg. Nos dias 0, 3, 7, 10, 14 e 17, os animais foram avaliados quanto ao peso e comportamento, e as feridas morfológica e morfometricamente. No 17º dia foi feita biópsia para avaliação histopatológica. A morfometria das feridas foi avaliada estatisticamente pelos métodos de Mauchly e contrastes pelo método Sidak e teste t-pareado. Macroscopicamente foi evidente a cicatrização precoce da ferida tratada com PRP gel autólogo em relação à controle, o que também foi comprovado nas análises histológicas. Concluiu-se que o PRP é eficaz e acelera o processo de cicatrização, quando aplicado em intervalos curtos e de forma seriada, comprovando seu potencial terapêutico sobre lesões cutâneas. Pode ainda ser uma alternativa de tratamento de feridas.

Palavras-Chave: Coelhos. Plasma rico em plaquetas autólogo. Cicatrização. Feridas.

ABSTRACT

Evaluation of healing of surgical wounds in rabbits treated or not with autologous platelet-rich plasma gel

In order to evaluate the effect of platelet-rich plasma (PRP) autologous gel on wound healing in experimental models in vivo, wounds were induced on the back of rabbits with the aid of a punch 8mm, using the right side as the control (A) treated with 0.9% NaCl and the left (B) treated with autologous PRP gel. Lesions were evaluated for a period of 17 days. It was used six white New Zealand rabbits (n=3 males and n=3 females), adult, weighing 3.0 ± 1.0 kg. On days 0, 3, 7, 10, 14 and 17, the animals were evaluated for weight and behavior, and the wounds were evaluated morphologically and morphometrically. On the 17th day the wounds was biopsied for histopathological evaluation. The morphology of the wounds evaluated statistically by the methods of Mauchly and contrasts by Sidak method and t-test. Macroscopically was evident early healing of the wound treated with autologous PRP gel in relation to the control, which was also confirmed in the histological analysis. It was concluded that PRP is effective and accelerates the healing process when applied in short intervals and in series, confirming the therapeutic potential for cutaneous lesions. It may also be an alternative treatment of wounds.

Keywords: Rabbit. Autologous platelet-rich plasma. Healing. Wounds.

LISTA DE SIGLAS

% – Porcentagem

ADP – Difosfato de Adenosina

ATP – Trifosfato de Adenosina

CMI_s – Células Mesenquimais Indiferenciadas

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

FC – Fator de Crescimento

FCP – Fator de Crescimento Plaquetário

FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico

FvW – Fator de von Willebrand

IGF – Fator de Crescimento semelhante à Insulina

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

MAF – Fator de Ativação de Macrófagos

PAF-4 – Porcentagem

PDEGF – Fator Ativador das Plaquetas-4

PDGF – Fator de Crescimento Celular Endotelial Derivado das Plaquetas

PPP– Plasma Pobre em Plaquetas

PRP– Plasma Rico em Plaquetas

TGF- α – Fator de Crescimento Transformante-Alfa

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador Beta

TXA₂ – Tromboxano A₂

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGF-A – Fator de Crescimento Endotelial Vascular-A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 Pele.....	13
2 FISIOPATOLOGIA DO PROCESSO CICATRICIAL	14
2.1 Fases da Cicatrização.....	14
2.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa.....	14
2.1.2 Fase proliferativa ou de regeneração.....	16
2.1.3 Fase reparadora ou remodelação tecidual.....	17
2.2 Tipos de Cicatrização.....	19
2.2.1 Cicatrização por primeira intenção.....	19
2.2.2 Cicatrização por segunda intenção ou secundária.....	19
2.2.3 Cicatrização por terceira intenção.....	19
3 PLAQUETAS.....	20
3.1 Fatores de Crescimento (FC).....	22
3.2 Fatores de Crescimento Plaquetário (FCP).....	23
3.2.1 Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF).....	23
3.2.2 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).....	24
3.2.3 Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF β).....	24
4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).....	25
4.1 Mecanismo de Ação do Plasma Rico em Plaquetas.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
ARTIGO CIENTÍFICO.....	31

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Pele

A pele é um órgão externo, que corresponde a 15% do peso corporal total, reveste e delimita o organismo protegendo-o e interagindo com o meio exterior (AZULAY; AZULAY; AZULAY, 2011). Desempenha funções específicas como suporte e proteção contra perda de água por dessecação; garante a homeostasia de líquidos e minerais produzindo o suor; protege contra agentes mecânicos, físicos e biológicos; age na secreção e excreção de moléculas endógenas; recebe e transmite estímulos externos (MALAQUIAS; BACHION; NAKATANI, 2008).

É constituída por três camadas interdependentes: epiderme (mais externa firmemente acoplada ao tecido conjuntivo subjacente, formada por camadas de células diferenciadas, sem vascularização, sendo nutrida por contiguidade com a derme); derme (intermediária, definida como uma rígida matriz de tecido conjuntivo de suporte, contendo estruturas especializadas dispostas imediatamente abaixo e intimamente conectadas à epiderme); e hipoderme (camada de tecido conjuntivo frouxo que contém gordura) (AZULAY; AZULAY; AZULAY, 2011).

A pele está exposta a traumatismos frequentes, que desencadeiam soluções de continuidade e perda de tecidos, resultando em cicatrização na tentativa de restabelecer sua integridade funcional. Quando a extensão da perda cutânea dificulta ou até mesmo impossibilita a aproximação das bordas, ocorre a cicatrização por segunda intenção, que é um processo mais lento, produzindo muitas vezes cicatrizes extensas e/ou retraídas. Embora os processos morfológicos e químicos, que atuam na ferida fechada, sejam basicamente os mesmos nas feridas abertas em cicatrização, a contração torna-se um aspecto importante nas feridas abertas, e a epitelização assume um papel relevante (BORGES, 2008).

2 FISIOPATOLOGIA DO PROCESSO CICATRICIAL

O termo cicatrização é definido como processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado (HATANAKA; CURY, 2007). Pode ser definida como a cura de uma ferida por reparação ou regeneração dos tecidos afetados que depende de alguns fatores como o tipo de pele, localização anatômica, idade, estado de saúde e nutricional do indivíduo, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, uso de alguns medicamentos e ressecamento do leito da lesão (MENEHIN; VATTIMO, 2005).

O processo cicatricial compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para que ocorra a restauração do tecido lesado. Desde o extravasamento do plasma, com a coagulação e agregação plaquetária até a reepitelização e remodelagem do tecido lesado, o organismo age para restaurar a funcionalidade tecidual (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Quando não há impedimento a cicatrização segue uma sequência específica podendo ser esquematizada em três fases distintas e interdependentes: inflamatória ou exsudativa, proliferativa ou de regeneração e reparadora ou de remodelação tecidual (BUCH; ARANTES; CAMPELO, 2008; PAGNANO et al., 2008).

2.1 Fases da Cicatrização

2.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa

As lesões a que os organismos estão sujeitos levam a alterações nas células endoteliais, ocorrendo ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes que preenchem a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. Esta lesão é caracterizada por sinais de inflamação como dor, rubor, calor, edema e perda da função local, iniciando no exato momento do dano e tem a duração de 48 a 72 horas (MENDONÇA; COUTINHO NETTO, 2009).

A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão rico em fibrina, que provisoriamente tampona a lesão endotelial, forma uma barreira contra invasão de microrganismos e organiza matriz necessária para a migração celular. Nesta fase são observados infiltrados celulares (neutrófilos, linfócitos e

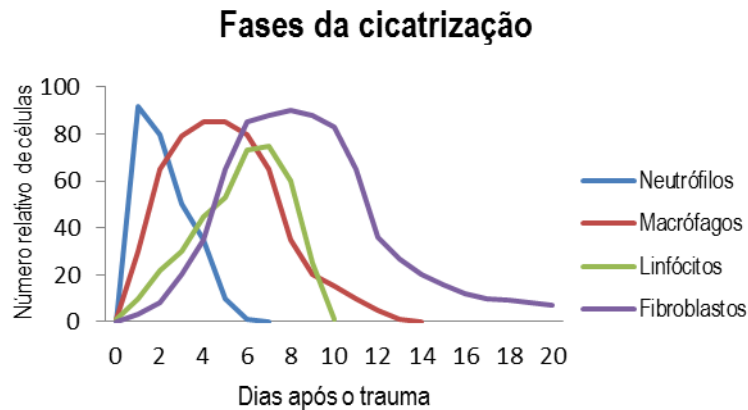
macrófagos) com a função de secretar citocinas e linfocinas, que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Os neutrófilos são as primeiras células a alcançarem a região inflamada, nas primeiras 24 horas após ocorrer a lesão, com a função de eliminar possíveis microrganismos por meio de fagocitose e debridamento de tecidos necrosados (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004). Caso a ferida não esteja severamente infectada, em poucos dias o número de neutrófilos diminui devido à fagocitose por macrófagos.

Os monócitos teciduais migram para o local da ferida em cerca de 48 a 96 horas e diferenciam-se em macrófagos finalizando a fase inflamatória (WERNER; GROSE, 2003; MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Quando chegam à área lesada secretam substâncias biologicamente ativas como as proteases que atuam na remodelagem da matriz extracelular, eles produzem também vários fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) que estimulam a formação do tecido de granulação (MENEHIN; VATTIMO, 2005).

Só depois ocorre a migração e proliferação dos fibroblastos que são células predominantes do tecido conjuntivo e tem como principal função a manutenção da integridade do tecido pela síntese dos elementos da matriz extracelular, compactação das fibras colágenas, produção de elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico da célula, como evidencia a Figura 1 (SCHIRATO et al., 2006; PAGNANO et al., 2008).

FIGURA 1 – Fases da cicatrização quanto ao tipo celular



Fonte: Adaptado de Broughton, Janis e Attinger (2006)

Aproximadamente 6 a 7 dias após o trauma, os linfócitos aparecem no local da ferida, em número menor que na circulação, secretam linfocinas importantes, incluindo: IL-2, MAF (Fator de Ativação de Macrófagos) e fatores quimiotáticos, além de aumentar o estágio inicial da cicatrização através da estimulação de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. Sugere-se também, que os linfócitos T podem regular a atividade fibroblástica exuberante a qual poderia, caso esta regulação não existisse, ocorrer tardiamente na reparação cicatricial. Contudo, seu papel na cicatrização ainda não está bem definido e permanece controverso (ARAÚJO, 2010).

2.1.2 Fase proliferativa ou de regeneração

A segunda etapa do processo de cicatrização dura três semanas e é responsável pelo fechamento da lesão, onde a mitose celular é a atividade predominante. A migração e ativação dos fibroblastos são intensificadas com a presença local de macrófagos, produção e liberação dos mediadores químicos por eles produzidos, destacando os fatores de crescimento TGF- α (Fator de crescimento transformante-alfa) e o VEGF-A (Fator de crescimento vascular-endotelial-A) (RENDIC; ALDEA, 2008).

Nesta fase, a reepitelização se inicia poucas horas após ocorrer a lesão, e após quatro dias, a fibroplasia, que é a formação do tecido de granulação, ocupa o tecido lesionado e substitui a matriz extracelular por tecido conjuntivo forte e elástico, porém edematoso e muito exsudativo. A eficiência deste processo depende da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos chamado de neovascularização (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

De acordo com alguns estudos, a angiogênese é a etapa fundamental do processo de cicatrização, onde a partir de vasos preexistentes são formados novos vasos sanguíneos, que irão suprir de oxigênio e nutrientes o tecido em crescimento, proporcionando um ambiente favorável para a formação do tecido de granulação que cresce em direção à camada de células basais. Com isso há ativação dos fibroblastos e elaboração do colágeno, que será depositado no espaço da ferida (HATANAKA; CURI, 2007; MENDONÇA; COUTINHO NETTO, 2009).

O colágeno é formado continuamente no interior da ferida, ligando-se à fibronectina para formar um novo tecido. Tazima, Vicente e Moriya (2008) relatam que o colágeno é uma proteína de alto peso molecular, composta de glicina, prolina, hidroxiprolina, hidroxilisina e lisinas responsáveis pela força tensil da cicatriz. A síntese do colágeno é realizada por meios de fatores críticos que incluem proteínas, carboidratos, vitaminas A e C, gorduras, zinco, ferro, tiroxina, oxigênio e que depende de reações bioquímicas como a hidroxilação dos aminoácidos e lisina.

No final desta etapa, a rede linfática passa por regeneração, a circulação é restabelecida por neovascularização e o leito da ferida está preenchido totalmente por tecido de granulação. Aos poucos o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas dando assim aparência de cicatriz à região lesada devido ao acúmulo de massa fibrosa (HATANAKA; CURI, 2007).

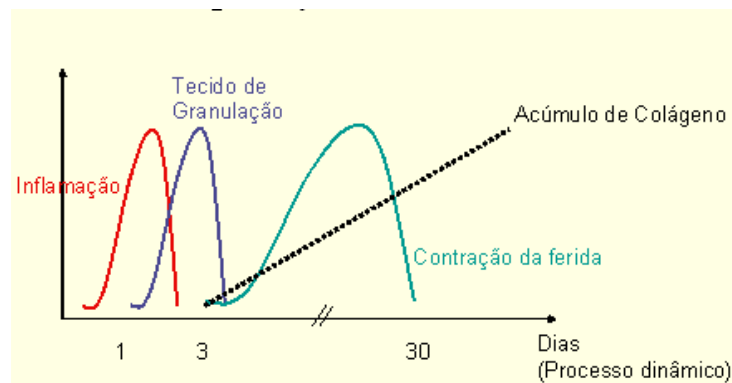
2.1.3 Fase reparadora ou remodelação tecidual

Neste momento ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, onde acontece a reorganização do colágeno e aumento da resistência da cicatriz. A coloração passa, aos poucos, de vermelho para branco pálido (SCHIRATO et al., 2006).

A lesão sofre um processo de contração reduzindo a quantidade e o tamanho da cicatriz desordenada, por meio de um movimento centrípeto da espessura da pele circundante e ocorre simultaneamente com a granulação e epitelização sendo um importante aliado na cicatrização das feridas. A contração progride em velocidade de 0,6 a 0,7 mm/dia e poderá ser limitada se a pele ao redor da lesão estiver fixa ou não elástica e quando as bordas da lesão se encontram, porém se ocorrer de forma exagerada pode causar defeitos cicatriciais importantes, devido à diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, estimulados por fatores de crescimento (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; WEND, 2005).

A resolução completa de uma lesão pode ser considerada somente depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular, porém, a força original do tecido antes de ser lesado jamais voltará ao normal. Uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal. Este processo que tem início por volta da terceira semana após ocorrer a lesão e pode levar muitos meses e até anos, dependendo do grau, extensão e local da lesão (HATANAKA; CURI, 2007) (Figura 2).

FIGURA 2 – Fenômenos sequenciais na recuperação tecidual em relação aos dias de trauma



Fonte: Adaptado de Witte e Barbul (1997)

2.2 Tipos de Cicatrização

Pesquisas citam que o processo de cicatrização de uma lesão pode ocorrer de três formas, por primeira, segunda ou terceira intenção, e devemos sempre levar em consideração o agente causador da lesão, a quantidade de tecido perdido e o conteúdo microbiano (BAJAY; ARAÚJO, 2006).

2.2.1 Cicatrização por primeira intenção

Ocorre quando não há perda de tecido e as extremidades da pele ficam justapostas uma à outra, está associado a feridas limpas, quando a pele foi cortada por meios assépticos e o processo de cicatrização ocorre dentro de um período estimado, deixando cicatriz mínima (NITZ et al., 2006).

2.2.2 Cicatrização por segunda intenção ou secundária

Ocorre em feridas onde houve perda de tecido e as extremidades da pele ficam distantes umas das outras, sendo necessária formação de tecido de granulação até que a contração e epitelização aconteçam. Está relacionada a ferimentos infectados e lesões com perda acentuada de tecido e geralmente requer um maior tempo para a cicatrização, deixando uma cicatriz significativa (MONTEIRO et al., 2007).

2.2.3 Cicatrização por terceira intenção

Acontece quando há fatores que interferem e retardam a cicatrização de um ferimento que inicialmente foi fechado por primeira intenção. A ferida é deixada aberta por um determinado período para a drenagem do exsudato e posteriormente suturada (BORGES, 2008).

3 PLAQUETAS

A reparação tecidual de uma área submetida a um trauma depende da presença de plaquetas. Estas têm papel importante na hemostasia e constituem uma das principais fontes de fatores de crescimento (SANTOS; SANTOS, 2004; PIETRZAK et al., 2007).

As plaquetas são fabricadas na medula óssea, como resultado da fragmentação dos megacariócitos, são pequenas, discóides, anucleadas, possuindo cerca de 5 a 7 μ m de diâmetro e, normalmente, largura inferior a 3 μ m. Em geral, são produzidas 1000 a 3000 plaquetas a partir de cada megacariócito. Esses fragmentos apresentam importante função no processo de coagulação são essenciais no processo inflamatório e na reparação tecidual. Sob circunstâncias normais, sobrevivem de 7 a 10 dias na circulação sanguínea (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000).

Do total das plaquetas presentes no organismo humano, 70% estão na circulação e 30% no baço, onde permanecem por cerca de 10 dias, quando são retiradas pelas células reticulo-endoteliais do baço e do fígado (ANDREWS, BERNDT, 2004; SCHULZE, SHIVDASANI, 2005).

Em sua complexidade citoplasmática, são encontradas organelas indispensáveis às suas funções e contêm vários tipos de granações secretoras como os grânulos alfa (mais abundantes, possuem fibrinogênio e fator de crescimento plaquetário, que estimulam as mitoses no músculo liso dos vasos sanguíneos e a cicatrização de feridas); delta (armazenam ADP e ATP) e lâmbda (lisossomos carregados com as enzimas usuais dessas organelas) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Essas organelas estão intimamente ligadas aos mecanismos de atividade trombotinâmica da coagulação, que seriam a emissão de pseudópodes, adesividade interplaquetária e consequente retração do coágulo que lhe dá estabilidade e ancora o citoesqueleto da rede de fibrina que, nos processos de cicatrização e recuperação tecidual servem para a migração de células formadoras de novos tecidos. Tais funções requerem muita energia e demandam a presença de íons cálcio, elas obtêm energia a partir do glicogênio abundante em seus citoplasmas e do cálcio presente no plasma (PONTUAL; MAGINI, 2003).

As plaquetas possuem estrutura complexa, sendo divididas em zona periférica onde temos a região das membranas interna e externa, rica em

glicoproteínas que servem como alvos de adesão ou como receptores que desencadeiam a agregação plaquetária. Nesta região encontra-se em conexão com a superfície o sistema canicular aberto; neste sistema ocorre a liberação de diversas moléculas após a ativação das plaquetas. Localizam-se, também, os fosfolípidios de membrana, que servem como substrato para produção de ácido araquidônico e conseqüentemente de tromboxano A₂ (TXA₂), potente agonista da agregação plaquetária e da vasoconstrição, importantes para a coagulação, visto que proporcionam a superfície sobre a qual agem, ativando alguns de seus fatores (CASTRO et al., 2006).

A zona sol-gel encontra-se abaixo da zona periférica e é composta de citoesqueleto, que sustenta a discoide da plaqueta; o sistema contrátil, sob ativação, permite a mudança da forma discoide; o prolongamento de pseudópodos; a contração interna e a liberação dos constituintes granulares. Os grânulos plaquetários contêm entre 30% e 50% do conteúdo de proteína total da plaqueta (PONTUAL, MAGINI, 2003).

A zona de organelas consiste, basicamente de grânulos alfa, que contêm proteínas adesivas; fator de von Willebrand (FvW), trombospondina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator IV plaquetário, fatores da coagulação e inibidor do ativador plasminogênio; grânulos densos, que contêm trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina, cálcio; componentes celulares, tais como lisossomos e mitocôndria, que além de conter ATP e ADP, também participam dos processos metabólicos da plaqueta e armazenam enzimas e outras moléculas críticas para a função plaquetária. O sistema membranar inclui o sistema tubular denso, onde se encontra concentrado o cálcio, importante para desencadear os eventos contráteis e os sistemas enzimáticos envolvidos na produção de síntese de prostaglandinas (SAMPSON; GERHARDT; MANDELBAUM, 2006).

No processo inflamatório as plaquetas chegam rapidamente no local da ferida e liberam múltiplos FC e citocinas, incluindo: fator de crescimento transformador β (TGF β 1 e β 2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento celular endotelial derivado das plaquetas (PDEGF), interleucina-1 (IL-1) e fator ativador de plaquetas-4 (PAF-4). O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena de fatores de crescimento que favorecem a reparação celular e

a vascularização local, característica vital para o sucesso do tratamento, pois além de plaquetas, contém também fibrina, cininas e prostaglandinas.

As plaquetas liberam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que é quimiotático para macrófagos e fibroblastos que, ao chegarem ao foco da lesão, liberam mais PDGF, além de fator de crescimento transformador beta ($TGF\beta$) e fator do crescimento fibroblástico (FGF). Adicionalmente, os macrófagos fagocitam fragmentos celulares. Os FCs estocados são liberados, iniciando-se a fase de reparo. Na fase de reparo, ocorrem angiogênese e liberação dos FCs pelas células endoteliais. Células mesenquimais indiferenciadas (CMI), fibroblastos e macrófagos iniciam a formação do tecido. A proliferação, diferenciação, modulação e coordenação de células ocorrem através da interação de vários fatores de crescimento, coordenando a mitose celular e a síntese protéica. A mitose celular ocorre por indução de células mesenquimais indiferenciadas, presentes na medula óssea e na circulação sanguínea (MONTEIRO et al., 2010).

3.1 Fatores de Crescimento (FC)

Os fatores de crescimento representam uma classe de mediadores biológicos que regulam a proliferação, quimiotaxia e diferenciação celular, exercendo grande influência no processo de reparação e cicatrização tecidual (MAIA, 2008; CARMONA; LOPEZ; GIRALDO, 2011).

São peptídeos sinalizadores que regulam o metabolismo celular por meio da interação com um complexo de receptores de superfície celular, das vias de sinalização intracelular e finalmente, do aumento da transcrição de fatores e produção de proteínas que resultam na proliferação e diferenciação celular, bem como no aumento da produção da matriz extracelular (DAHLGREN et al., 2001).

A degranulação plaquetária propicia a liberação do fator de crescimento de transformação beta ($TGF-\beta$), fibrinogênio, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de transformação alfa ($TGF-\alpha$), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), tromboplastina plaquetária, cálcio, serotonina e enzimas hidrolíticas (MONTEIRO et al., 2010). Adicionalmente outros fatores como o de crescimento fibroblástico (FGF) (EVERTS et al., 2006) o do crescimento de tecido conjuntivo

(CTGF) (KUBOTA et al., 2004) e o semelhante à insulina I (IGF-I) (WEIBRIC et al., 2002) também estão presentes.

Os FC podem ser classificados em dois grupos: morfométricos e mitogênicos. Os primeiros estão envolvidos no crescimento ósseo por meio da transformação de células-tronco mesenquimais multipotentes em células osteoprogenitoras na presença da proteína óssea morfogênica. Já os mitogênicos estão relacionados ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese. Os fatores TGF- β , EGF e IGF agem sinergicamente, melhorando o acesso de células inflamatórias para a área da lesão, assim como na angiogênese, fibroplasia e regeneração da pele (reepitelização), segundo Werner e Grose (2003).

3.2 Fatores de Crescimento Plaquetário (FCP)

São inúmeros os FCPs contidos no plasma sanguíneo, mas três são os que atuam basicamente na reparação celular: o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF β -1) (MONTEIRO et al., 2010).

Estas moléculas protéicas em contato com seus respectivos receptores nucleares estimulam a angiogênese e a replicação dos tecidos e, como anti-inflamatórios, induzem a cicatrização e o crescimento de novas estruturas orgânicas (PONTUAL; MAGINI, 2003).

3.2.1 Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF)

É um peptídeo plaquetário que tem ação mitogênica sobre as células do tecido conjuntivo e dos fibroblastos. É um importante regulador na proliferação e quimiotaxia de células mesenquimais. Proteína composta por dois genes distintos em duas correntes 28 e 31 KDA e liberado após a agregação plaquetária, estimula de imediato a migração de fibroblastos para a reparação de feridas e perdas de substância tecidual. Também é secretado por macrófagos e estimula a síntese de colágeno. É um dos fatores de crescimento mais ativos. Dentre outras ações, estimula a reepitelização da pele quando na presença de lesões e perdas de substância tecidual (PONTUAL; MAGINI, 2003).

Estes fatores são conhecidos por favorecerem a angiogênese por meio da ativação dos macrófagos que secretam fatores induzindo células endoteliais a formarem novos capilares e também aumentam a quantidade de proliferação das células-tronco presentes na medula óssea (VALE, 2002).

3.2.2 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

Tem ação na permeabilidade vascular aumentando a angiogênese e, com isto, incrementando o aporte sanguíneo necessário para o processo de reparação tecidual. Atrai os fibroblastos para o sistema de produção de tecido conjuntivo e participa também na cascata da produção de fibrinogênio em fibrina cuja malha suporta o crescimento de células endoteliais e fibroblastos (UEBEL, 2006).

3.2.3 Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF β)

Este fator é liberado por macrófagos e fibroblastos, mas é nas plaquetas plasmáticas que se encontra sua maior concentração. Exerce ação reparadora e antiinflamatória de lesões e tecidos. Pertence a uma grande família, existindo nas três formas de isômeros: β -1, β -2 e β -3. O primeiro é o mais importante, sendo responsável pela maturação celular, migração fibroblástica e síntese de matriz extracelular. Todos os três isômeros induzem a formação de tecido colágeno e estão presentes em grande quantidade em cicatrizes hipertróficas e queloidianas (SKARE et al., 2009).

4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O PRP é um biomaterial autólogo, atóxico, com ação quimiotática, mitogênica, angiogênica, analgésica e antiinflamatória (EL-SHARKAWY et al., 2007), sem risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas, podendo ser utilizado como uma estratégia para acelerar e otimizar o efeito dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas na inicialização da reparação tecidual (MAIA, 2008; CARMONA; LOPEZ; GIRALDO, 2011).

O gel de plasma rico em plaquetas é apontado como a mais recente linha de colas teciduais com a vantagem adicional, em relação à cola de fibrina, da presença dos fatores de crescimento e citocinas, que lhe confere um grande benefício na cicatrização (VENDRAMIN et al., 2010), apresentando propriedades adesivas, hemostáticas e cicatrizantes utilizados em diversos procedimentos cirúrgicos (ALMEIDA et al., 2008).

Na criação do gel de plaquetas, o sangue venoso autólogo é centrifugado para produzir uma alta concentração deste hemocomponente em um pequeno volume de plasma, alcançando até seis vezes sua concentração inicial (1.000.000 a 1.500.000 plaquetas/ μ L). A adição de trombina e cálcio resulta na ativação das plaquetas e início do processo de coagulação (VISHAL, 2010) formando um gel rico em fatores de crescimento como PDGF, TGF- β , EGF e VEGF (OLIVA, 2008).

4.1 Mecanismo de Ação do Plasma Rico em Plaquetas

A resposta de reparação de tecidos começa com a formação de um coágulo de sangue e degranulação de plaquetas, que libera fatores de crescimento e citocinas no local. Isto, por sua vez, resulta na quimiotaxia de células inflamatórias, bem como a ativação e proliferação de células progenitoras locais (ANITUA et al., 2004; ZHANG et al., 2005).

Acredita-se que o PRP pode aumentar ou estimular a cicatrização acelerando o processo de cura biológica que ocorre normalmente após uma lesão (DOLDER et al., 2006; CÁCERES et al., 2008). Estudos demonstraram que o plasma rico em plaquetas pode aumentar a proliferação de células-tronco e

fibroblastos quando comparados ao PPP (Plasma Pobre em Plaquetas) (KAKUDO et al., 2008).

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o padrão de reparação das feridas cirúrgicas em coelhos saudáveis, tratadas ou não com PRP autólogo na forma gel.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. R. H. et al. Utilização do plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n. 2, p. 82-88, 2008.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Fisiologia plaquetária e trombose. **Jornal Oficial da Organização Européia de Investigação de Tromboses**, v. 114, n. 5, p. 447-53, 2004.
- ANITUA, E. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.
- ARAÚJO, AKL. **Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouratea sp.*** 2010. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY, L. **Dermatologia**. 5.ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- BAJAY, H. M.; ARAÚJO, I. E. M. Validação e confiabilidade de um tratamento de avaliação de feridas. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 290-295, jul./set. 2006.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.
- BORGES, E. L. Fatores intervenientes no processo de cicatrização. In: BORGES, E.L. et al. **Feridas: como tratar**. 2.ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008. p. 45-53.
- BUCH, D. R.; ARANTES, A. B.; CAMPELO, P. M. S. Verificação da atividade cicatrizante do exudato de folhas de *Jatropha multifida L.* **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 89, n. 2, p. 142-145, 2008.
- BROUGHTON, G. ; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 117 (7 suppl.), p. 12S-34S, 2006.
- CÁCERES, M. et al. Effect of platelet-rich plasma on cell adhesion, cell migration, and myofibroblastic differentiation in human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 4, p. 714-720, 2008.
- CARMONA, J. U.; LOPEZ, C.; GIRALDO, C. E. O uso do concentrado de plaquetas autólogo na terapia regenerativa músculo-esquelética crônica equina. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 43, p. 1-10, 2011.
- CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-332, out. 2006.

- DAHLGREN, L. A. et al. Effects of beta-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 62, n. 10, p. 1557-1562, 2001.
- DOLDER, J. et al. Platelet-rich plasma: quantifying the levels of growth factor and differentiation of bone marrow cells of mice. **Journal of Tissue Engineering**, v. 12, n. 11, p. 3067-3073, 2006.
- EL-SHARKAWY, H. et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. **Journal of Periodontology**, v. 78, p. 661-669, 2007.
- EVERTS, P. A. M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of Extra Corporeal Technology**, Bloomsburg, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Células do sangue. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 221-236.
- KAKUDO, N. et al. Proliferation-promoting effect platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. **Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 122, n. 5, p. 1352-1360, 2008.
- KUBOTA, S. et al. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. **Journal of Biochemistry**, Bethesda, v. 136, n. 3, p. 279-282, 2004.
- MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica e histopatológica**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MALAQUIAS, S. G.; BACHION, M. M.; NAKATANIAY, K. Risco de integridade da pele prejudicada em idosos hospitalizados. **Cogitare Enfermagem**, v. 13, n. 3, p. 428-436, 2008.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, jul./ago. 2003.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 11, p. 599-607, 2005.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MENEGHIN, P.; VATTIMO, M. F. F. Fisiologia do processo cicatricial. In: JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 31-35.

MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **International Journal of Biochemical and Cell Biology**, v. 36, n. 6, p. 1031-1037, 2004.

MONTEIRO, B. S. et al. Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos. **Revista Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1590-1596, 2010.

MONTEIRO, V. L. C. et al. Cana de açúcar no tratamento de feridas por segunda ou terceira intenção. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n. 1, p.1-8, jan./jun., 2007.

NITZ, A. C. et al. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopa didymus* e *Calendula officinali*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 4, p. 74-79, 2006.

OLIVA, M. A. **Exposição a fatores de crescimento e proteínas típicos a plasma rico de plaquetas inibe a formação de nódulos de mineralização de culturas de células crescidas sobre titânio**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

PAGNANO, L. O. et al. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1662-1666, set. 2008.

PIETRZAK, W. S. et al. Platelet-rich and platelet-poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 3, p. 559-567, 2007.

PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento**. São Paulo: Ed. Santos, 2003. 308 p.

RENDIC, E. O, ALDEA V. Manejo Avanzado de Heridas. **Revista Chilena de Dermatologia**, v. 24, n. 4, p. 322-327, 2008.

SAMPSON, S.; GERHARDT, M.; MANDELBAUM, B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, n. 1, p. 165-174, 2006.

SANTOS, M. D.; SANTOS, M. D. D. O sangue e medula óssea. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. **Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica**. 1.ed. São Paulo: Ed. Santos, 2004. p. 3-44.

SCHIRATO, G. V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.1, p. 149-154, jan./fev. 2006.

SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R. A. Mechanisms of thrombopoiesis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1717-1724, 2005.

SKARE, T. L. et al. Contagem de plaquetas e caracterização clínica de úlceras de pernas anticardiolipinas positivas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 36, n. 5, p. 420-424, 2009.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

UEBEL, C. O. **Ação do plasma rico em plaquetas e seus fatores de crescimento na cirurgias dos microimplantes**. 2006. 88 f. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VALE, G. N. V. B. **Plasma rico em plaquetas**: aplicação na odontologia: revisão bibliográfica. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VENDRAMIN, F. S. et al. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 1, p. 4-10, 2010.

VISHAL, M. Platelet-rich plasma: a review of the science of possible clinical applications. **Fox Valley Orthopedic**. v. 33, n. 2, p.104-122, 2010.

WEIBRIC, G. et al. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. **Factor Growth**, London, v. 20, n. 2, p. 93-97, 2002.

WEND, S. B. T. **Comparação da eficácia da calêndula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais**. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835-870, 2003.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

ZHANG, Y. et al. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic activity of mesenchymal stem cells from bone marrow in vitro. **Zhongguo Xiu Fu Jian Chong Wai Ke Za Zhi.**, v. 19, n. 2, p. 109-113, 2005.

ARTIGO CIENTÍFICO¹

Avaliação da reparação de feridas padronizadas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e tratadas com plasma rico em plaquetas autólogo em gel

Eliane S Santos², Cecília B Laposy^{2, *}, Karina G B Abegão², Rosa M B Nogueira², Gisele A Nai², Bruno N Bracale³, Inara G Delfim³

Resumo

Com o objetivo de avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo na forma gel sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelos experimentais in vivo, foram induzidas feridas no dorso de coelhos com auxílio de um punch de 8mm, sendo o lado direito considerado controle (A) e tratado com NaCl 0,9% e o lado esquerdo (B) tratado com gel autólogo de PRP. As lesões foram avaliadas por um período de 17 dias. Foram utilizados seis coelhos brancos da raça Nova Zelândia com idade aproximada de 2 anos e peso médio de 3 kg, sendo três machos e três fêmeas. Nos dias 0, 3, 7, 10, 14 e 17, os animais foram avaliados quanto ao peso e comportamento, e as feridas morfológica e morfometricamente. No 17º dia foi feita biópsia para avaliação histopatológica. A morfometria das feridas foi avaliada estatisticamente pelos métodos de Mauchly e contrastes pelo método Sidak e o Teste t-pareado. Macroscopicamente foi evidente a cicatrização precoce da ferida tratada com PRP gel autólogo em relação à controle, o que também foi comprovado nas análises histológicas. Concluiu-se que o PRP autólogo gel é eficaz e acelera o processo de cicatrização, quando aplicado em intervalos curtos e de forma seriada, comprovando seu potencial terapêutico sobre lesões cutâneas, podendo ainda ser uma alternativa de tratamento de feridas.

Palavras-Chave: Coelho. Plasma rico em plaquetas autólogo. Cicatrização. Feridas.

Título corrido: Feridas em coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas autólogo gel

Abreviações: PRP, Plasma rico em plaquetas; FC, Fator de crescimento; mm, milímetros; mm², milímetro quadrado; cm, centímetro; cm², centímetro quadrado; kg, quilogramas; g, gramas; G, força gravitacional; mg, miligramas; dL, decilitros; IM, intramuscular; SC, subcutânea; NaCl, cloreto de sódio; *P*, variável estatística; CEUA, Comissão de Ética no Uso

¹ Artigo elaborado seguindo as normas da revista Comparative Medicine.

² Universidade do Oeste Paulista - Mestrado em Ciência Animal, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

³ Universidade do Oeste Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

* Autor para correspondência: claposy@unoeste.br

de Animais; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF- β , fator transformador beta; EGF, fator de crescimento epidermal; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; PPP, plasma pobre em plaquetas; MO, microscopia ótica.

Introdução

A pele é um órgão externo, formada por três camadas (epiderme, derme e hipoderme), que reveste o organismo e protege as estruturas internas, sendo considerado o maior e mais pesado órgão, correspondendo a 15% do peso corporal total. Dentre suas funções, destacam-se a defesa orgânica, termorregulação, renovação dos tecidos de revestimento, controle do fluxo sanguíneo, percepção e recepção sensoriais¹¹.

O processo cicatricial compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para que ocorra a restauração do tecido lesado, desde o extravasamento do plasma, com a coagulação e agregação plaquetária até a reepitelização e remodelagem do tecido lesado, com o objetivo de restaurar a funcionalidade tecidual¹⁸.

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleares e discoides presentes no sangue, produzidas a partir dos megacariócitos, que auxiliam os processos de hemostasia, cicatrização e epitelização²³. Ao sofrerem degranulação nos sítios de lesão, liberam diversos fatores de crescimento (FC) e citocinas que estimulam a ação de outras células⁸, promovendo aumento da angiogênese, crescimento e permeabilidade vascular, proliferação de fibroblastos, aumento na síntese de colágeno e produção de tecido de granulação, facilitando assim o processo de reparo tecidual⁵.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte de fatores de crescimento obtidos pelo sequestro e concentração de plaquetas por um gradiente de densidade por meio da centrifugação. Na criação do gel de plaquetas, o sangue venoso é centrifugado para produzir uma alta concentração deste hemocomponente em pequeno volume de plasma, alcançando até seis vezes sua concentração inicial. A adição de trombina e cálcio resulta na ativação das plaquetas e início do processo de coagulação, formando um gel rico em fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF), o transformador beta (TGF- β), o epidermal (EGF) e o endotelial vascular (VEGF)^{15,17}. Atualmente é utilizado no tratamento de tendinopatias crônicas¹³, queimaduras⁶, feridas de extremidade de pacientes diabéticos²⁴, dermatites provocadas por radioterapia¹⁰, cirurgias plásticas e implantes dentários⁹.

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o padrão de reparação das feridas cirúrgicas em coelhos saudáveis, tratadas ou não com PRP autólogo na forma gel.

Material e métodos

Animais

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo número 1183 da instituição de origem. Foram utilizados 6 coelhos adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia, (n=3 machos, n=3 fêmeas), peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^0 \pm 2^0$ C e fotoperíodo (12 horas claro/escuro) controlados. Durante todo o experimento foram tratados com ração peletizada comercial e água *ad libitum*.

Obtenção e processamento do PRP autólogo gel

Após procedimento anestésico, colheu-se 4mL de sangue venoso proveniente da orelha utilizando scalp 25G. O material foi transferido para um frasco contendo o anticoagulante citrato de sódio, de onde foi retirada uma alíquota para a contagem automática de plaquetas (contador automático Sysmex Poch Diff 100iV-Roche) e depois centrifugado, inicialmente a 200G (centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos para formação de dois níveis: toda a fração correspondente ao plasma mais 200 μ L da fração vermelha foi transferida para outro tubo para nova centrifugação (400G por 10 minutos).

Nesta etapa formaram-se dois níveis distintos: um superior com coloração levemente amarelada denominada plasma pobre em plaquetas (PPP) e um inferior, avermelhado. Retirou-se o PPP e do restante foi realizada uma nova contagem de plaquetas, com o objetivo de verificar se houve uma concentração superior a seis vezes do inicial²⁰. As plaquetas foram contadas em sistemas automatizado e manual (hemocitômetro)²⁵.

Constatada a concentração plaquetária adequada, o PRP líquido foi transformado em gel, com adição de gluconato de cálcio a 10%, na proporção de 4:1²⁰. O volume final de PRP em gel foi de aproximadamente 0,5mL.

Indução e tratamento das feridas

Os coelhos foram contidos manualmente para realização de tricotomia da região dorsal direita e esquerda com máquina de tosa (Andis, AGC2 - USA), utilizando lâmina nº. 40. Em seguida, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil[®] 50, 15mg/kg-IM)¹².

Inicialmente, foi realizada antissepsia da pele com álcool 70% para posterior demarcação do local da lesão com auxílio de caneta, e aplicado 1,0 mL (SC) de anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor). Um punch de 8 mm foi usado para

realização da ferida cirúrgica, tanto na região dorsal do lado esquerdo (controle) como direito (ferida tratada com PRP autólogo gel), a pele foi retirada com auxílio de uma pinça anatômica, preservando a musculatura. A lesão considerada controle (A-lado esquerdo) foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9% e a do lado direito (B) tratada com PRP autólogo gel. Em seguida foi colocado um curativo de rayon estéril (1 cm²) e curativo adesivo sobre ambas feridas. Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam cloridrato de Tramadol, na dose de 0,5mg/kg, IM, 12/12 horas durante 3 dias consecutivos, a fim de se evitar possíveis desconfortos.

O gel de PRP autólogo foi trocado a cada 3 dias no total de 5 momentos seguindo o protocolo pré-estabelecido, com modificações²⁰. No 17º dia, foi feita a biópsia da ferida (utilizando um punch de 8mm e pinça anatômica) para avaliação histopatológica das lesões.

Avaliação morfológica e morfométrica

Nos dias 0, 3, 7, 10, 14 e 17, os animais foram avaliados clinicamente quanto ao peso em gramas (g) utilizando balança digital marca ELC-10[®] e observação das características da ferida em relação à cor considerando-se os escores: (1) rósea; (2) amarelada; (3) pálida; (4) cianótica; bordas da ferida: (1) sem granulação; (2) pouca granulação; (3) muita granulação; exsudato: (1) sem exsudato; (2) pouco exsudato; (3) muito exsudato; característica do exsudato: (0) ausente; (1) seroso; (2) sanguinolento; (3) purulento; sensibilidade ao toque: (1) ausente; (2) presente.

A mensuração das bordas das feridas (largura e altura) em milímetros foi feita com o auxílio de um paquímetro digital (DC-60 Western[®]). As medidas obtidas na mensuração foram usadas para calcular a área da ferida através da fórmula: $A = \pi \times R \times r$, onde A é igual à área, R é igual ao raio maior e r é igual ao raio menor²².

O percentual de contração da lesão foi calculado utilizando modelo matemático onde a porcentagem de contração (Pc) é igual a área final (Af) menos a área inicial (Ai) vezes 100 (x100), dividido pela área inicial (Ai), ou seja: $Pc = (Af - Ai) \times 100 / Ai$ ^{19,22}. Em todos os momentos a ferida foi fotografada com câmera digital (Nikon[®]).

Avaliação histopatológica

Previamente à retirada do fragmento (17º dia), foi realizado o mesmo protocolo anestésico utilizado no momento da indução das feridas. Na epiderme foi avaliada degeneração, necrose e regeneração, e na derme: edema, hemorragia, grau de neovascularização, fibrose e tipo de infiltrado inflamatório. Para todos os parâmetros

analisados, foi aplicado o sistema de escore, onde: (0) representa ausência, (1) alteração leve, (2) alteração moderada e (3) alteração acentuada. As amostras de pele foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por 24 a 48 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70%. Em seguida foram processadas conforme a técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina. Os cortes foram corados pelos métodos da hematoxilina e eosina²⁶. Todas as avaliações foram feitas por um único observador e de forma cega.

Análise estatística

O teste t-pareado foi utilizado para comparar as mesmas variáveis entre as feridas tratadas e controle (A x B). Para as áreas das feridas, utilizou-se a análise de variância de amostras repetidas com validação da esfericidade de dados pelo teste de Mauchly e contrastes pelo método Sidak. Nas avaliações histopatológicas entre controle e tratado (A x B) foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para todas as análises utilizou-se o programa computacional SPSS, adotando-se o nível de significância de 5%.

Resultados

Os animais foram avaliados em todos os momentos em relação ao peso, sem variações significantes (peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg), e clinicamente apresentaram-se saudáveis e sem alterações de comportamento.

O aspecto das feridas (A e B) permaneceu com coloração rósea durante todo o experimento, sem características macroscópicas de contaminação, excesso de granulação, dor ou presença de exsudato.

As medidas das lesões foram decrescendo gradualmente inversamente proporcional ao seu percentual de contração ($P=0,0106$). Em relação à porcentagem de contração da ferida (Figura 1), verificou-se que a média de contração da ferida tratada com PRP, foi de 95,87% (Tabela 1). Já a ferida controle ficou com 88,48%, observando-se diferença significativa ($P<0,05$). Apenas um animal tratado com o gel autólogo teve 100% de cicatrização (Figuras 2 e 3).

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão das áreas das feridas (em mm²) A (controle) e B (tratadas com PRP autólogo de coelhos).

Momentos/Feridas	A	B	P
M0	82,89±13,21 ^{Aa}	84,97±12,94 ^{Aa}	0,348
M10	66,78±20,39 ^{Ab}	43,53±20,46 ^{Bb}	0,045
M17	8,03±5,16 ^{Ac}	3,63±2,63 ^{Bc}	0,020

^{AB}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha P<0,05

^{ab}Letras minúsculas na mesma coluna P<0,05

Com relação à avaliação histopatológica, verificou-se que, dos animais tratados com PRP autólogo, 50% (3 coelhos) apresentaram reepitelização parcial e os outros 50% total; nas feridas controle, verificou-se que 66,7% (4 animais) apresentaram reepitelização total, os outros 2 apresentaram reepitelização parcial.

Quanto à presença de crosta fibrino-leucocitária e a neovascularização, observou-se que, tanto nas feridas tratadas como nas feridas controle, estavam presentes em 66,7% e ausentes nos outros 33,3% (2 coelhos). Estatisticamente os resultados foram iguais (P= 0,3173) (Figuras 4 e 5).

Em relação ao infiltrado inflamatório, observou-se leve infiltrado inflamatório do tipo linfocítico e discreta presença de macrófagos, tanto nas feridas A como B maior ou igual a 50%.

Na observação tanto dos fibroblastos como das fibras colágenas, houve presença em quantidade moderada maior ou igual a 65% nas feridas A e B, e grande quantidade nas demais (Figuras 4 e 5).

Discussão

A ausência de alterações clínicas e comportamentais durante o decorrer do experimento sinaliza que os animais não apresentaram dor^{4,14,21}. O uso do cloridrato de Tramadol nos primeiros dias após a indução da ferida contribuiu para o bem estar dos coelhos, proporcionando alívio adequado a qualquer tipo de desconforto⁷.

Macroscopicamente, as feridas tratadas com PRP apresentaram melhor cicatrização, observando-se maior porcentagem de contração em relação às controles. O mesmo relato foi observado em trabalhos com enxertos cutâneos em feridas crônicas²⁷ e enxertos de pele em coelhos²⁸. Isso comprova a ação das citocinas e FC contidos nas plaquetas que envolvem o processo de aceleração cicatricial¹⁶.

Bauer et al.³, ao utilizarem PRP em feridas dérmicas padronizadas em ratos, não verificaram a aceleração da cicatrização, nem retração da área das feridas. Uma das possíveis justificativas foi a aplicação única do gel, já que estudos sugerem aplicações repetidas de PRP para a promoção de resultados satisfatórios.

O fato do PRP ser homólogo também poderia ser outra justificativa, uma vez que seu uso não interferiu no processo de cicatrização, no entanto, não foram observados efeitos tóxicos ou prejudiciais³. No presente estudo, o gel foi aplicado com intervalo de 3 a 4 dias. Pacientes com úlceras crônicas tratadas com aplicação semanal de PRP também mostraram maior área de reparação¹, reforçando a importância de aplicações seriadas do gel com intuito de acelerar o processo cicatricial.

Na avaliação histopatológica, houve presença de moderada a grande quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas na terceira semana do início do processo cicatricial. As feridas A e B comparadas microscopicamente mostraram que o PRP teve um papel importante na remodelação da ferida, promovendo uma maior proliferação de fibroblastos, fibras colágenas e neovascularização. Os dados deste estudo corroboram Vendramin et al.²⁸, que demonstraram que o PRP apresenta eficácia no processo de remodelação e cicatrização de enxertos de pele em coelhos quando comparados aos não tratados. Outros autores também verificaram o aumento da taxa de produção de fibras colágenas e proliferação de fibroblastos, acelerando a cicatrização de um modo geral em humanos².

Mais estudos devem ser estimulados sobre a eficácia do PRP autólogo na cicatrização, por ser um método barato e de fácil preparo, o que permite seu uso em várias linhas de tratamento. Conclui-se que a aplicação do PRP gel autólogo em intervalos curtos e de forma seriada em feridas cutâneas, acelera o processo cicatricial, sendo uma alternativa no tratamento de feridas.

Referências

1. **Anitua E, Aquirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AL, Orive G, Andia I.** 2007. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **84**:415-420.
2. **Banhot S, Alex JC.** 2002. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* **18**:27-33.
3. **Bauer JA, Correa L, Lima FLM, Lima LAPA, Pustiglioni FE.** 2009. Effect of platelet-rich plasma on the standardized dermal wound healing in rats [Artigo em português]. *R Periodontia* **19**: 98-108.

4. **Borato E, Oliveira JJJ, Ciena AP, Bertolini GRF.** 2008. Immediate pain and edema assessment in muscular injury induced by formalin and treated with low-level laser (808nm). *Rev Bras Med Esp* **14**:446-449. [Artigo em português].
5. **Bosch G, Moleman M, Barneveld A, Van Weeren PR, Van Schie HT.** 2011. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports* **21**:554-561.
6. **Chen W, Zheng JS.** 2012. Advance in the research of platelet-rich plasma in burn treatment. *Zhonghua Shao Shang ZaZhi* **28**:288-290.
7. **Crissiuma AL, Almeida ECP.** 2006. Experimentation and Animal Welfare –Review. *Saúde & Ambiente em Revista. Duque de Caxias.* **1**(2):1-10. [Artigo em português].
8. **Donatti C, Brandão CVS, Ranzani JJT, Perches CS, Padovani CR, Pellizzon CH, Sereno MG.** 2013. Use of platelet-rich plasma in the treatment of deep corneal ulcers induced in rabbits. Clinical and histomorphometric evaluation. *Arq Bras Med Vet Zootec* **65**(3):809-818. [Artigo em português].
9. **González M, Arteaga-Vizcaíno M, Benito M, Benito M.** 2012. Application of platelet rich plasma (PRP) and its derivatives in dental implantologie and plastic surgery. *Invest Clin* **53**: 408-418.
10. **Iervolino V, DiCostanzo G, Azzaro R, Diodato AM, DiMacchia CA, DiMeo T, PetruzzIELLO A, Loquercio G, Muto P, Apice G, Cacciapuotì C.** 2013. Platelet gel in cutaneous radiation dermatitis. *Support Care Câncer* **21**:287-293.
11. **Isaac C, Ladeira PRS, Rego FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC.** 2010. Wound healing process: physiological healing. *Rev Med. (São Paulo)* **89**: 125-131. [Artigo em português].
12. **Kanashiro GP, Cassu RN.** 2008. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade SF. *Manual de terapêutica veterinária.* 3 ed. São Paulo: Roca; p.728-745.
13. **Kaux J, Crielaard JM.** 2013. Platelet-rich plasma application in the management of chronic tendinopathies. *Acta Orthop Belg* **79**:10-15.
14. **Klaumann PR, Wouk AFPF, Silas T.** 2008. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science* **13**(1):1-12.
15. **Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M.** 2011. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **19**:516-527.

16. **Maia L, Souza MV.** 2009. Components rich in platelets used in wound healing tendon, ligaments and osteo-articular diseases of animals. *Ciência Rural* **39**: 1279-1286. [Artigo em português].
17. **Marx RE.** 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* **62**:489-496.
18. **Mendonça RJ, Coutinho-Netto J.** 2009. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol* **84**:257-262. [Artigo em português].
19. **Oliveira ST, Leme MC, Pippi NL, Raiser AG, Manfron MP.** 2000. Formulations of comfrey (*Symphytum officinale* L.) in the healing of skin wounds in rats. *Rev FZVA* **7/8**: 65-74. [Artigo em português].
20. **Oliveira-Filho MA, Almeida LE, Pereira JA, Nassif PAN, Czeczko NG, Kume MH, Silva MBG.** 2008. Platelet-rich plasma of rabbits: introduction of one experimental animal model. *Arq Bras Cir Dig* **21**:175-179. [Artigo em português].
21. **Pedroso RA, Celich KLS.** 2006. Pain: fifth vital sign, a challenge for the care in nursing. *Texto Contexto Enferm Florianópolis*. **15**(2):270-276. [Artigo em português].
22. **Schirato GV, Monteiro FMF, Silva FO, Lima Filho JL, Leão AMAC, Porto ALF.** 2006. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. *Ciência Rural* **36**(1):149-154. [Artigo em português].
23. **Schulze H, Shivdasani RA.** 2005. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost* **3**:1717-1724.
24. **Shan GQ, Zhang YN, Ma J, Li YH, Zuo DM, Qiu JL, Cheng B, Chen ZL.** 2013. Evaluation of the effects of homologous platelet gel on healing lower extremity wounds in patients with diabetes. *Int J Low Extrem Wounds* **42**:22-29.
25. **Stockham SL, Scott MA.** 2008. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology Iowa*: Blackwell.
26. **Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-Neto A.** 2003. *Manual de Técnicas para histologia normal e patológica*. 2 ed. São Paulo: Manole.
27. **Vendramin FS, Franco D, Franco TR.** 2010b. Use of autologous platelet-rich plasma in skin grafts surgeries in chronic wounds. *Rev Bras Cir Plást* **25**:589-594. [Artigo em português].
28. **Vendramin FS, Franco D, Schamall RF, Franco TR.** 2010a. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in skin grafts in rabbits. *Rev Bras Cir Plást* **25**:4-10. [Artigo em português].

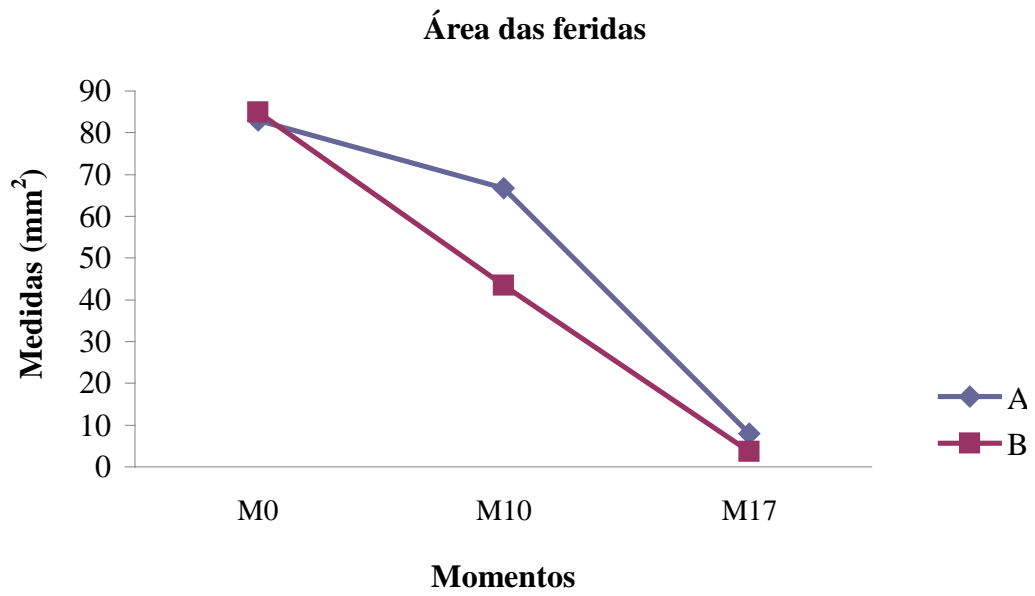


Figura 1. Avaliação morfométrica das feridas controle (A) e tratada (B) com PRP autólogo gel. Observar o decréscimo de forma linear das lesões tratadas com gel de PRP autólogo.

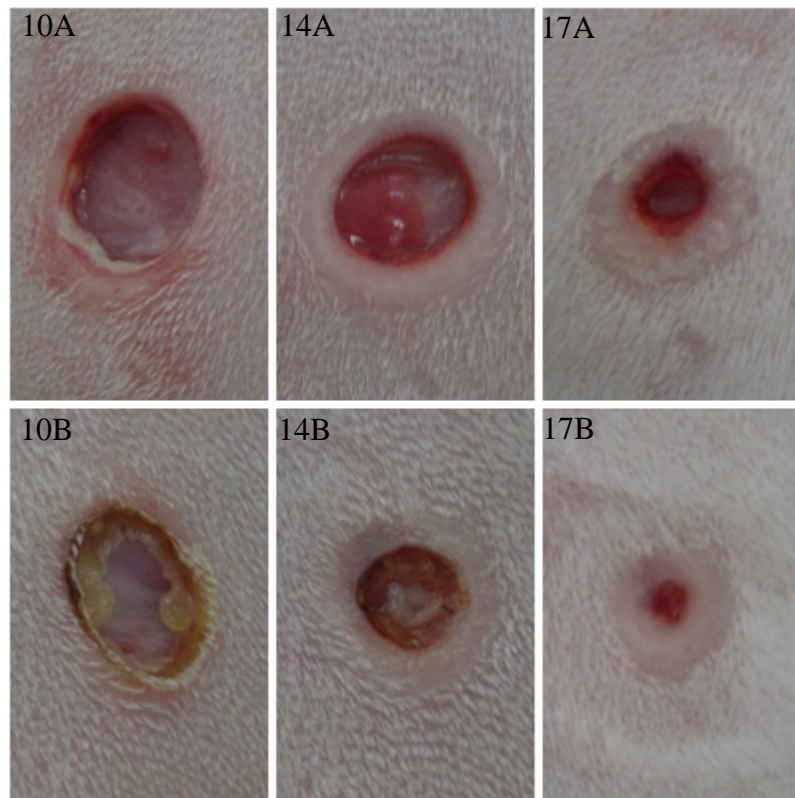


Figura 2. Coelho 3: Fotografia mostrando a evolução cicatricial nos momentos 10, 14 e 17 evidenciando o aspecto macroscópico das lesões. As letras A e B correspondem aos lados controle e tratado, respectivamente. Observar a presença de crosta e redução da ferida, mais intensas nas feridas tratadas com gel de PRP autólogo.

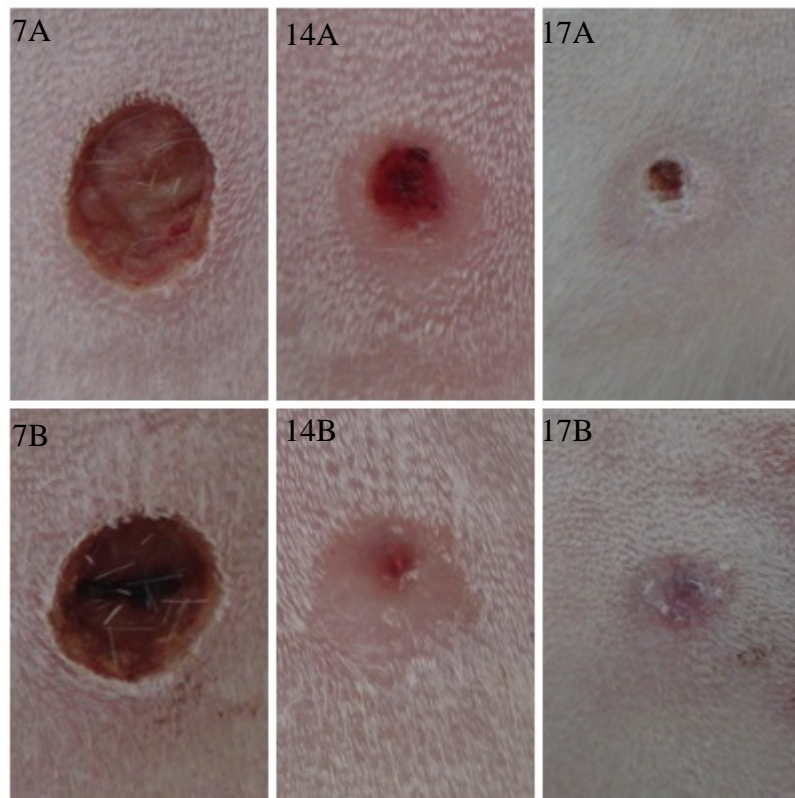


Figura 3. Coelho 6: Fotografia mostrando a evolução cicatricial nos momentos 7, 14 e 17 evidenciando o aspecto macroscópico das lesões. As letras A e B correspondem aos lados controle e tratado respectivamente. Observar o processo cicatricial mais evidente no lado tratado com gel de PRP autólogo nos diferentes momentos, sendo que no momento 17B, a ferida tratada, encontra-se totalmente cicatrizada.

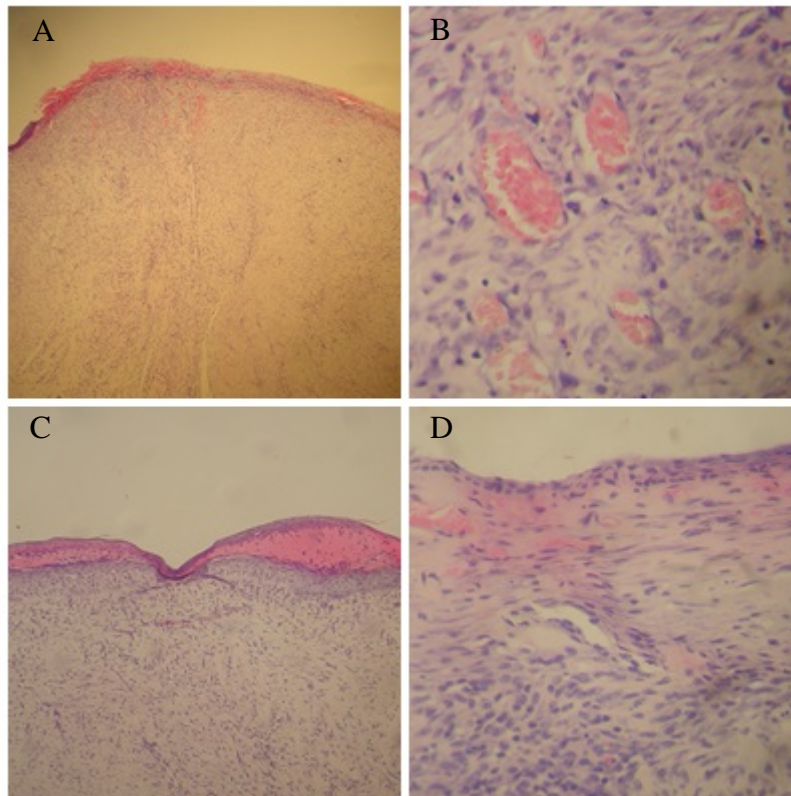


Figura 4. Fotomicroscopia das feridas controles (A e B) e tratadas (C e D): A - reepitelização parcial e crosta fibrino-leucocitária (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). B – neovascularização discreta e grande número de fibroblastos (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x). C – reepitelização total e crosta fibrino-leucocitária (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). D – neovascularização discreta, grande número de fibroblastos e discreto infiltrado inflamatório (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x).

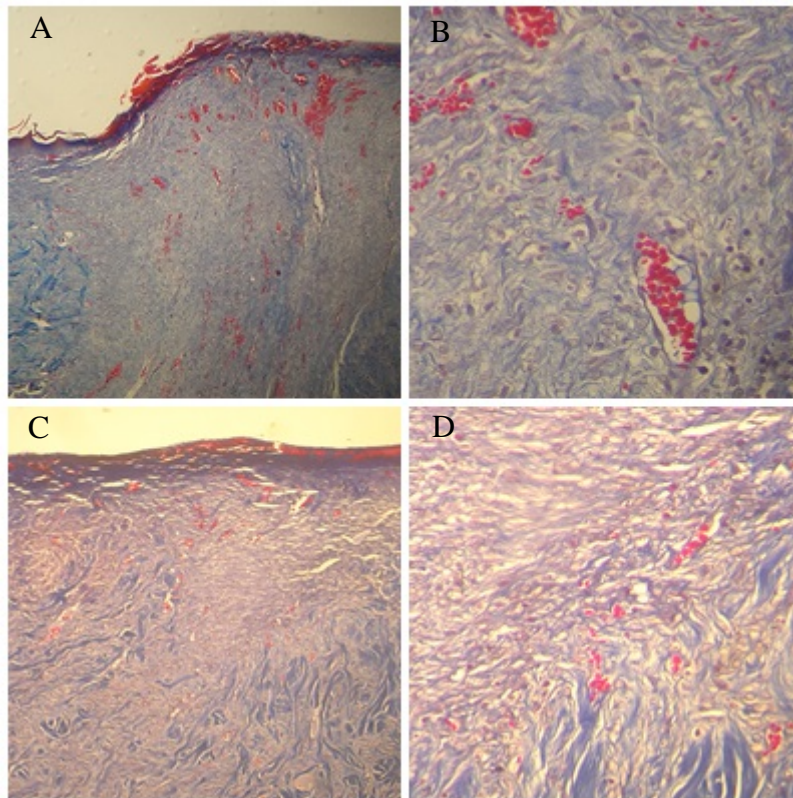


Figura 5. Fotomicroscopia das feridas controles (A e B) e tratadas (C e D): A – Pequena quantidade de fibras colágenas (Tricrômio de Masson, aumento de 100x). B – Detalhe das fibras colágenas (Tricrômio de Masson, aumento de 400x). C – Grande quantidade de fibras colágenas (Tricrômio de Masson, aumento de 100x). D – Detalhe das fibras colágenas (delgadas e espessas) (Tricrômio de Masson, aumento de 400x).