

Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas heterólogo na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos

KARINA GOMES BARROS ABEGÃO

Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas heterólogo na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos

KARINA GOMES BARROS ABEGÃO

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 Rosa Maria Barilli Nogueira

636.708965 Abegão, Karina Gomes Barros
A138e Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas heterólogo na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos / Karina Gomes Barros Abegão. -- Presidente Prudente, 2014.
95 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) --
Universidade do Oeste Paulista -- Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira.

1. Plasma rico em plaquetas. 2. Heterólogo. 3. Cicatrização. 4. Ferida cutânea. 5. Coelho I. Título.

KARINA GOMES BARROS ABEGÃO

Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas heterólogo na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos

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, 17 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^o. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho
Universidade Estadual Paulista-Unesp
Presidente Prudente - SP

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

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu esposo Alexis que sempre me apoiou e incentivou permitindo assim a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por dar-me uma vida plena e abundante; pelos dons que me deste e pelos relacionamentos que me possibilitaram chegar até aqui e que me fortalecem a cada dia.

Ao meu esposo Alexis, pela paciência e amor demonstrados durante os árduos períodos de estudo. Obrigada pelo companheirismo e compreensão. Desculpe-me pelas ausências!

Aos meus pais Quitéria e Osmar e, aos meus irmãos, Bruna e Thiago, pelo carinho, amor e compreensão ao longo de todos esses anos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado dando apoio, conselhos e me incentivando a jamais desistir. Apesar da distância vocês estão sempre presentes no meu pensamento e no meu coração. Amo muito vocês e muito obrigada por existirem na minha vida.

À minha sobrinha Maria Clara... que, com sua alegria e carisma, tornou-se um dos bens mais preciosos das nossas vidas.

Às minhas amigas Marília Campos, Isabella Pantarotto e Francijane Paixão, por me incentivarem a não desistir dos meus sonhos e objetivos. Obrigada por estarem presentes nos momentos difíceis e por compartilharem comigo momentos de grande alegria. Que a nossa amizade permaneça por toda vida!

À Prof^ª. Dra. Cecília Braga Laposy, que além de minha professora no mestrado, contribuiu enormemente sendo a co-orientadora dessa dissertação. Obrigada pela paciência, humildade e carinho demonstrados em todos os momentos. Com certeza um exemplo a ser seguido!

Ao Prof^º. Dr. Rogério Giufrida que, com sua seriedade e profissionalismo ajudou-me nas análises estatísticas. Muito obrigada por tudo!

À Prof^ª. Dra. Gisele Alborghetti Nai pela sua capacidade profissional na captura das imagens histológicas. Agradeço sua sincera amizade e seus valiosos conselhos.

À Prof^ª. Dra. Francis Lopes Pacagnelli pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

À Mestra Eliane Szucs dos Santos, pela parceria durante todo o período de experimento. Obrigada pela paciência e por estar sempre disposta a me ajudar.

Aos graduandos Bruno Bracale, Inara Guastini Delfim e Viviane Codognoto pela contribuição para a concretização deste experimento.

Aos funcionários do Biotério e do Coelhário pela dedicação e auxílio no cuidado com os animais.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu agradecimento e carinhosa homenagem à minha orientadora Prof^ª. Dra Rosa
Maria Barilli Nogueira.

Obrigada pela oportunidade de poder concretizar este sonho. A senhora me
acrescentou conhecimentos e experiências essenciais à forma de ver o mundo, particularmente em
relação à capacidade e missão que temos na vida.

Obrigada pela amizade, estímulo e incentivo no meu crescimento profissional.

Sem a sua confiança na minha capacidade eu jamais teria alcançado esta
importante meta. Esses dois anos de convívio fizeram-me mais forte, confiante e encorajada a
enfrentar novos desafios.

Que Deus lhe proteja e que continue sempre essa pessoa humilde, carinhosa e
excelente profissional.

Conte comigo sempre!

“O medo de sofrer é pior do que o próprio sofrimento. E nenhum coração jamais sofreu quando foi em busca de seus sonhos”

Paulo Coelho

RESUMO

Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas heterólogo na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos

O plasma rico em plaquetas é fonte de diversos fatores de crescimento e surge como uma nova biotecnologia na reparação tecidual, com grande potencial terapêutico. Pacientes com problemas de saúde geral e ausência de volume de sangue necessário para produção autóloga deste concentrado, podem ficar limitados para receber este tratamento inovador. Para ultrapassar a limitação, o presente estudo avaliou os efeitos do gel de plasma rico em plaquetas obtido a partir de um cão saudável, na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos mediante análises morfológicas, morfométricas e histológicas. Foram produzidas duas incisões no dorso de seis coelhos utilizando “punch” de 8 mm de diâmetro. Aleatoriamente, um dos lados foi denominado Controle (A), permanecendo o contralateral Tratado (B). Solução fisiológica a 0.9% e gel de plasma rico em plaquetas heterólogo foram aplicados topicamente nas lesões (A) e (B) respectivamente, nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 de pós-operatório. Observações macroscópicas registradas nos dias mencionados acima, incluindo o 17^o, no qual também foi realizada uma biópsia para análise histológica, demonstraram semelhança entre as lesões em relação às variáveis estudadas, sensibilidade dolorosa, cor da ferida, edema, hiperemia, exsudato, crosta e tecido de granulação. O processo de contração da área das lesões (A) e (B) evoluiu similarmente de forma linear, de modo que, histologicamente, reepitelização total foi alcançada em 90% das lesões (A) e 100% das lesões (B), sem diferenças estatisticamente significantes. Tais diferenças também não foram constatadas entre as feridas em relação aos demais parâmetros histológicos analisados: presença de crosta, neovascularização, colagenização, quantidade de fibroblastos e macrófagos, tipo celular e intensidade do processo inflamatório. Os resultados desta pesquisa sugerem que o gel de plasma rico em plaquetas heterólogo foi capaz de promover a cicatrização de feridas dérmicas em coelhos, sem efeitos prejudiciais.

Palavras-Chave: Plasma rico em plaquetas, Heterólogo, Cicatrização, Ferida cutânea, Coelho.

ABSTRACT

Effects of heterologous platelet-rich plasma gel in dermal wound healing standardized in rabbits

The platelet rich plasma is a source of several growth factors and appears as a new biotechnology in tissue repair, with great therapeutic power. Patients with general health problems and the lack of volume of blood required for autologous production of concentrate, may be restricted to receive this innovative treatment. To overcome the limitation, this study evaluated the effects of heterologous platelet-rich plasma gel obtained from a healthy dog, in the healing of dermal wounds in rabbits by standard morphological, morphometric and histological analyzes. Two surgical incisions were made on the back of six rabbits using a punch of 8 mm diameter. Randomly one side was denominated as a Control (A), leaving the contralateral Treaty as (B). 0.9% saline solution and heterologous platelet-rich plasma gel were applied topically to the lesions (A) and (B) respectively, on days 0, 3, 7, 10 and 14 after surgery. Macroscopic observations recorded on the days mentioned above, including the 17th, which is also a biopsy for histological analysis was performed, demonstrated similarity between the lesions in relation to the study variables, pain sensitivity, color of wound edema, hyperemia, exudate, crust and granulation tissue. The process of contraction of the lesion area (A) and (B) similarly developed linearly, so that histologically complete reepithelialization was achieved in 90% of lesions (A) and 100% of the lesions (B), no differences statistically significant. Such differences were also not found between wounds in relation to other histological parameters analyzed: presence of crust, neovascularization, collagen, fibroblasts and macrophages, cell type and intensity of the inflammatory process. The results of this study suggest that the heterologous platelet-rich plasma gel was able to promote the healing of dermal wounds in rabbits, no harmful effects.

Keywords: Platelet-rich plasma, Heterologous, Healing, Cutaneous wound, Rabbit.

LISTA DE SIGLAS

m ²	- Metro quadrado
%	- Porcentagem
ME	- Matriz Extracelular
NK	- Natural Killer
PMN	- Polimorfonucleares
PDGF	- Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
TGF-β	- Fator de Crescimento Transformador Beta
FGF	- Fator de Crescimento de Fibroblastos
VEGF	- Fator de Crescimento Endotelial Vascular
μm	- Micrômetro
μL	- Microlitro
EFG	- Fator de Crescimento Epitelial
IGF-I	- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I
CTGF	- Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
PRP	- Plasma rico em Plaquetas
PPP	- Plasma Pobre em Plaquetas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Anatomia e Fisiologia da Pele Normal.....	15
2.2 Epiderme	15
2.3 Matriz Extracelular e Lâmina Basal	18
2.4 Derme.....	20
2.4.1 Fibroblastos	22
2.4.2 Fibrócitos	22
2.4.3 Miofibroblastos	22
2.4.4 Macrófagos.....	23
2.4.5 Neutrófilos	24
2.4.6 Eosinófilos	24
2.4.7 Linfócitos	24
2.5 Fisiopatologia do Processo Cicatricial	25
2.6 Classificação das Feridas de Acordo com o Comprometimento Tecidual.....	25
2.6.1 Ferida de espessura parcial	25
2.6.2 Ferida de espessura total	26
2.7 Processos Biológicos da Cicatrização.....	26
2.7.1 Hemostasia.....	26
2.7.2 Inflamação.....	27
2.7.3 Proliferação	28
2.7.4 Contração.....	29
2.7.5 Remodelação	29
2.8 Tipos de Cicatrização.....	30
2.8.1 Cicatrização por primeira intenção	30
2.8.2 Cicatrização por segunda intenção	31
2.9 Fatores Interferentes na Cicatrização de Feridas.....	31
2.10 Plaquetas e Fatores de Crescimento	32
2.11 Plasma Rico em Plaquetas	34
2.11.1 Mecanismo de ação e obtenção do PRP na forma gel.....	34

REFERÊNCIAS.....	37
3 ARTIGO CIENTÍFICO	43
ANEXO.....	68

1 INTRODUÇÃO

A pele, maior órgão do corpo, é tida como a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes do meio externo e por isso está sujeita a constantes agressões, tornando sua capacidade de reparação muito importante para a sobrevivência (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Devido o seu interesse clínico, científico e econômico, a cicatrização de feridas dérmicas é objetivo de estudos e pesquisas. É um processo complexo que tem início a partir da perda da integridade da pele gerando uma solução de continuidade, podendo atingir camadas subjacentes em diversos graus (DEROSI et al., 2009) e depende de um conjunto de eventos moleculares e celulares, coordenado por citocinas e fatores de crescimento, que ocorrem de forma sobrepostas (MESTRE; RODRIGUES; CARDOSO, 2012).

Os fatores de crescimento são liberados a partir da degranulação de plaquetas ativadas e por células no local da lesão para promover a migração e proliferação celulares, resultando na formação de novos vasos sanguíneos e de tecido de granulação, essenciais para a reparação de feridas (SUZUKI; MARIMOTO; IKADA, 2013). Grânulos alfa contidos no interior das plaquetas contêm vários tipos de fatores de crescimento com efeitos benéficos na cicatrização dos tecidos (YIN et al., 2014), incluindo fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF) (VENDRUSCOLO et al., 2012b) e fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (MAIA; SOUZA, 2009).

O plasma rico em plaquetas (PRP) surge como uma nova biotecnologia para acelerar o processo normal de cura de lesões cutâneas e musculoesqueléticas em várias espécies, com resultados promissores (MOLINA-MINÃÑO et al., 2009). É uma fração de plasma que contém uma maior concentração de plaquetas do que os níveis da linha de base no sangue total (YUAN; ZHANG; WANG, 2013) geralmente obtido por dois processos de centrifugação do sangue (SUZUKI; MARIMOTO; IKADA, 2013). A adição de gluconato de cálcio neste concentrado resulta na ativação das plaquetas e início do processo de coagulação formando o gel de plaquetas rico em fatores de crescimento (VANAT et al., 2012).

A utilização clínica do PRP vem crescendo consideravelmente, como no tratamento de tendinites (MAIA; SOUZA, 2009) e tendinopatias crônicas (KAUX; CRIELAARD, 2013), na cirurgia regenerativa dental (FORNI et al., 2013), na promoção da cicatrização de feridas (LACCI; DARDIK, 2010), em enxertos ósseos (MARX et al., 1998) e cutâneos (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010), e como adjuvante em cirurgia de rejuvenescimento e lipoenxertia facial (ALMEIDA et al., 2008).

Apesar da eficácia comprovada do gel de PRP autólogo em vários estudos, outra modalidade de tratamento seguro seria necessária nos casos em que as condições gerais do paciente tornassem inviável e/ou contra-indicada a utilização de seu próprio sangue (SHAN et al., 2013). Resultados benéficos com o uso de sangue heterólogo foram demonstrados por Rezende et al. (2011) ao concluírem que a injeção intra-articular de PRP obtido por meio de doadores humanos, apresentou efeito protetor e reduziu as taxas de apoptose em lesões de cartilagem em coelhos, bem como a cura de úlcera corneana em coelhos por meio da associação de PRP com soro sanguíneo heterólogo (KAFASHI ELAHI; MOUSAVI; MOHAJERI, 2012). Outra indicação de fonte heteróloga foi relatada por Suzuki, Morimoto e Ikada (2013) ao utilizarem sangue canino para obtenção de PRP a ser implantado em ratos, justificado pela dificuldade encontrada na coleta de sangue de pequenos animais.

Dados estes resultados, buscou-se avaliar a cicatrização de feridas dérmicas produzidas experimentalmente no dorso de coelhos, tratadas ou não com PRP heterólogo na forma gel, sob os aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia e Fisiologia da Pele Normal

O sistema tegumentar é composto por pele, pêlos, unhas, receptores sensoriais, glândulas sebáceas e sudoríferas. A pele (ou membrana cutânea) cobre a superfície do corpo e determina seu limite com o meio externo, sendo considerada a primeira linha de defesa do organismo. Em humanos adultos, possui uma área de superfície de cerca de 2 m², contribuindo com aproximadamente 16% do peso corporal.

Estruturalmente, a pele apresenta duas partes distintas: uma parte fina e superficial, composta por tecido epitelial, denominada epiderme e uma camada mais espessa e profunda, composta por tecido conjuntivo, denominada derme. Abaixo da derme fica a hipoderme ou tela subcutânea (TORTORA; DERRICKSON, 2012). A hipoderme é formada principalmente pelos tecidos conjuntivos frouxo e adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A tela subcutânea adiposa aumenta o isolamento da pele e a protege de lesões causadas por pressão ou estiramento e é responsável pela união da derme com estruturas subjacentes, como músculos, tendões, ligamentos e ossos (IRION, 2005).

No embrião, a pele deriva de dois folhetos, ectoderma e mesoderma (MICHALANY; MICHALANY, 2002). A partir de seu folheto mais externo, a ectoderma, derivam a epiderme e seus anexos, o sistema nervoso e os órgãos dos sentidos (MICHALANY; MICHALANY, 2002; DE ALMEIDA, 2009). Do folheto embrionário mesoderma, mais particularmente do mesênquima, originam-se a derme, a tela subcutânea e os músculos lisos (MICHALANY; MICHALANY, 2002).

2.2 Epiderme

A epiderme recobre o corpo e é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Contém quatro tipos celulares: queratinócitos, células de Langerhans, células de Merkel e melanócitos (Figura 1). Serve como barreira de proteção do organismo contra elementos do meio externo, como: invasão por microorganismos, perda de água, injúrias mecânicas e térmicas. É especializada em

determinadas áreas do corpo, formando os diversos apêndices cutâneos, incluindo pelos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríferas (SIMANDL, 2010).

Os queratinócitos representam cerca de 90% do total das células da epiderme. Organizam-se em camadas e produzem uma proteína forte e impermeável denominada queratina, responsável pela proteção (barreira física) da pele e tecidos subjacentes (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

As células de Langerhans representam 3 a 5% de todas as células da epiderme. Funcionam como células sentinelas apresentadoras de antígenos, responsáveis pela imunovigilância da pele (SIMANDL, 2010). Têm a função de capturar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), que não são capazes de reconhecê-los por si próprios. Uma vez ativados, esses linfócitos proliferam-se e secretam uma variedade de mediadores locais, dentre eles as citocinas, glicoproteínas capazes de ativar células do sistema imunitário (ALBERTS et al., 1997). Além disso, as citocinas também podem agir sobre células de outros sistemas, participando da resposta inflamatória, da cicatrização de feridas e de outros processos biológicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As células de Merkel são as mais dispersas da epiderme, sendo encontradas em maior quantidade na pele espessa da palma das mãos e planta dos pés, lábios e cavidade oral. Essas células ficam em contato com a base chata de um neurônio sensorial, uma estrutura chamada de disco tátil de Merkel que, juntos, detectam sensações de toque.

Cerca de 8% das células epidérmicas são os melanócitos. São responsáveis pela síntese de uma substância pigmentar, a melanina. As projeções longas e finas dos melanócitos se estendem entre os queratinócitos e transferem grânulos de melanina entre eles (TORTORA; DERRICKSON, 2012). A melanina confere cor à pele e aos cabelos e oferece proteção à pele contra absorção dos raios ultravioletas nocivos (IRION, 2005).

A epiderme não é vascularizada e recebe oxigênio e nutrientes por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme.

Diversas camadas de queratinócitos em diferentes estágios de desenvolvimento formam a epiderme (Figura 1). Na pele espessa, onde a exposição ao atrito é maior, a epiderme contém cinco camadas: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (TORTORA; DERRICKSON, 2012). Na pele fina a

epiderme é mais simples, faltando freqüentemente as camadas granulosa e lúcida e apresentando uma camada córnea mais reduzida.

A camada germinativa ou basal é a mais profunda da epiderme, constituída por uma única coluna de queratinócitos cubóides ou colunares. Algumas células dessa camada são células-tronco que sofrem atividade mitótica para manter a constante renovação da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). À medida que as células se dividem, elas empurram as mais velhas em direção às camadas mais superficiais (TORTORA; DERRICKSON, 2012), enquanto outras permanecem na camada basal e continuam a se dividir (DE ALMEIDA, 2009). As células dessa camada contém filamentos intermediários de queratina que vão tornando-se cada vez mais numerosos à medida que a célula avança para a superfície (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Acima da camada basal, encontra-se a camada espinhosa responsável em fornecer força e flexibilidade à pele. As células mais superficiais dessa camada tornam-se, de certa forma, mais achatadas (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

A camada granulosa encontra-se na metade da epiderme e mostra a continuação do achatamento dos queratinócitos da camada anterior (IRION, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As células dessa camada contém queratina e grânulos lamelares. Esses grânulos liberam uma secreção rica em lipídeos que contribuem na formação de uma barreira contra a entrada de substâncias externas e para tornar a pele impermeável à água (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

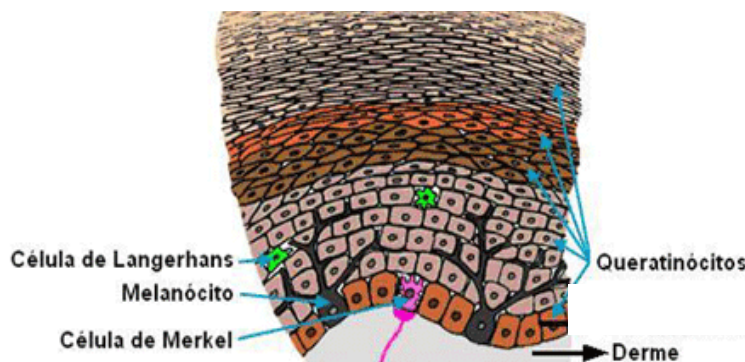
A camada lúcida é composto por queratinócitos achatados e mortos que contém numerosos filamentos de queratina. Está presente apenas na pele espessa, como nas pontas dos dedos, palma das mãos e planta dos pés.

A camada córnea é a mais externa, constituída por queratinócitos achatados e mortos, os quais estão continuamente sendo perdidos e repostos por células das camadas mais profundas. O interior dessas células é repleto de queratina. As múltiplas camadas de células mortas protegem as camadas mais profundas contra lesões e invasões microbianas.

Assim sendo, as células recém formadas na camada basal são empurradas lentamente para a superfície. Enquanto as células se movem de um estrato a outro, elas acumulam cada vez mais queratina. Finalmente as células queratinizadas descamam sendo substituídas por células subjacentes, as quais

também se tornarão queratinizadas. Na epiderme humana, o processo completo no qual as células se formam no estrato basal e alcançam à superfície, tornando-se queratinizadas e descamando, leva aproximadamente 15 a 30 dias, dependendo da região do corpo e da idade (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; DERRICKSON, 2012). Nos animais, dependendo da espécie, este ciclo completo geralmente leva de 20 a 30 dias (KÖNIG; LIEBICH, 2011).

FIGURA 1 – Distribuição dos queratinócitos e outros tipos celulares nas camadas epidérmicas



Fonte adaptada: TIPOS... [200-?].

2.3 Matriz Extracelular e Lâmina Basal

Os organismos multicelulares são compostos por células e também por elementos intercelulares. Estes últimos se agrupam sob o nome de matriz extracelular (ME). A ME consiste em uma substância fundamental líquida, gelatinosa e fibras protéicas (TORTORA; DERRICKSON, 2012). Sua quantidade varia de acordo com o tecido. Nos tecidos conjuntivos, como a derme da pele, as células estão dispersas em meio abundante de ME e é esta que suporta grande parte da força mecânica ao qual o tecido é submetido. Nos tecidos epiteliais, como na epiderme da pele, onde as células estão unidas em camadas, a ME é escassa. Neste caso, as próprias células e não a matriz suporta a maioria dos estresses mecânicos (CARROLL, 2010; ALBERTS et al., 2011).

A ME apresenta componentes protéicos que, agregados, formam estruturas fibrosas como o colágeno e a elastina, responsáveis pela manutenção estrutural e elástica dos diversos tecidos e, ainda, por aqueles que não formam fibras como as glicoproteínas (fibronectina e laminina) e as glicosaminoglicanas e proteoglicanas. A fibronectina tem como função fazer adesão das células não epiteliais à matriz, enquanto que a laminina é responsável pela adesão das células epiteliais à lâmina basal. As glicosaminoglicanas e as proteoglicanas formam um gel hidratado, semifluído, denominado substância fundamental (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). A substância fundamental contém água (TORTORA; DERRICKSON, 2012) e uma variedade de polissacarídeos e proteínas (CARROLL, 2010; ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; TORTORA; DERRICKSON, 2012). Além de preencher os espaços entre as células e as fibras do tecido conjuntivo (MICHALANY; MICHALANY, 2002), a substância fundamental forma um substrato capaz de fornecer condições adequadas para o crescimento e diferenciação celular dos diversos tecidos e ainda permitir a circulação de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos nos tecidos conjuntivos. Esse gel também é importante durante o desenvolvimento embrionário, na regeneração dos tecidos e na cicatrização. Sua interação com o colágeno contribui para a firmeza da ME (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

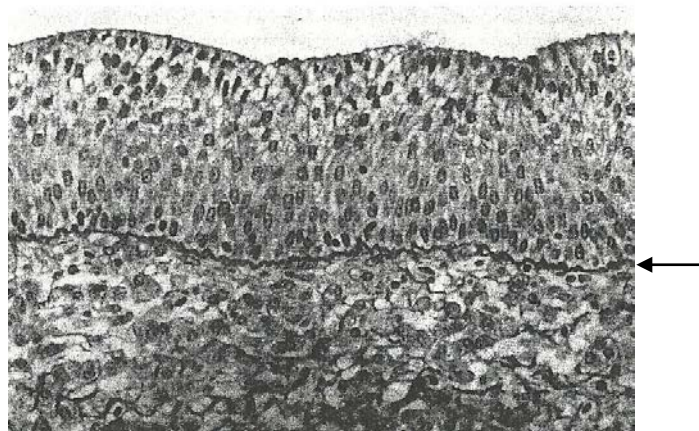
Na interface das células basais do tecido epitelial com a camada de tecido conjuntivo subjacente sobre o qual se apóiam, a ME forma uma camada fina e resistente, a lâmina basal (Figura 2), composta por fibras protéicas e outras macromoléculas (GARTNER; HIATT, 2007; ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; TORTORA; DERRICKSON, 2012) que ajudam na ligação e sustentação do epitélio (TORTORA; DERRICKSON, 2012). A lâmina basal é considerada como uma parte especializada da ME (DE ROBERTIS; HIB, 2006) e é visível apenas ao microscópio eletrônico (CARROLL, 2010). As células epiteliais da camada basal unem-se à lâmina basal subjacente através de estruturas denominadas hemidesmossomos (DE ROBERTIS; HIB, 2006; ALBERTS et al., 2011).

Os termos lâmina basal e membrana basal são freqüentemente utilizados como sinônimos (SIMANDL, 2010). A membrana basal geralmente é formada pela fusão de duas lâminas basais, portanto, no microscópio óptico, apresenta-se mais espessa que uma lâmina basal isolada (JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 2008). Tecnicamente, a lâmina basal é um componente da membrana basal (SIMANDL, 2010).

A lâmina basal é constituída por moléculas de colágeno tipo IV imersos em diversas proteínas, como a laminina e a proteoglicana. Os componentes da lâmina basal são produzidos por células epiteliais, endoteliais e musculares, enquanto que na ME são secretados por células do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Na pele, a lâmina basal serve como filtro seletivo para moléculas que se movem entre a epiderme e derme (CARROLL, 2010) e ainda funciona de suporte para o epitélio sobrejacente (GARTNER; HIATT, 2007). Funções adicionais incluem a facilitação da atividade mitótica; regulação da diferenciação celular, ligando-se a fatores de crescimento; modulação do metabolismo celular e atua no direcionamento para a migração celular (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008) como na reepitelização durante a cicatrização de ferida (GARTNER; HIATT, 2007).

FIGURA 2 – Fotomicroscopia de epitélio com sua lâmina basal



Fonte: Junqueira e Carneiro (2012).

Lâmina basal (seta) separando o epitélio do tecido conjuntivo subjacente.

2.4 Derme

A derme é a segunda parte mais profunda da pele, onde se apóia a epiderme e une esta à hipoderme. Ela sustenta a epiderme e atua como fonte primária de nutrição. É formada principalmente por tecido conjuntivo contendo fibras colágenas e elásticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SIMANDL, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2012). Apresenta espessura variável de 1mm a 4mm,

nas diferentes partes do corpo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). É formada por duas camadas: uma superficial, derme papilar e outra mais profunda, derme reticular (IRION, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SIMANDL, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2012).

A camada papilar é fina e consiste em fibras colágenas (IRION, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SIMANDL, 2010), principalmente do tipo III e IV (IRION, 2005) e substância fundamental (PORTH; SOMMER, 2010). É constituída de tecido conjuntivo frouxo, o qual forma pequena saliência que se projeta na superfície inferior da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; DERRICKSON, 2012), denominada papila dérmica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SIMANDL, 2010). As papilas aumentam a área de contato entre a derme e a epiderme, sendo freqüentes nas zonas sujeitas a pressões e atritos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Algumas delas contêm vasos sanguíneos (SIMANDL, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2012) responsáveis pela nutrição e oxigenação das camadas epidérmicas da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SIMANDL, 2010) e outras contêm terminações nervosas sensíveis ao tato e terminações nervosas livres, associadas às sensações de temperatura, dor e coceira. (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

A derme reticular é a área mais espessa da derme (SIMANDL, 2010). É formada por tecido conjuntivo denso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), o qual contém feixes firmemente reunidos de fibras colágenas, fibras elásticas (SIMANDL, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2012) e substância fundamental (SIMANDL, 2010). Entre essas fibras são encontradas células adiposas (TORTORA; DERRICKSON, 2012) que, em sua maioria, encontram-se agrupadas formando a hipoderme (FOX, 2007; GARTNER, HIATT, 2007) e ainda estruturas derivadas da epiderme: folículos pilosos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríferas. A combinação de fibras colágena e elástica fornece elasticidade e extensibilidade à pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; DERRICKSON, 2012).

A derme é composta por diferentes tipos celulares que estão envolvidos na cicatrização do tecido conjuntivo, podendo ser produzidos no próprio tecido, como podem vir de outras partes do organismo habitando-o temporariamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAGNANO, 2009), tais como: fibroblastos, fibrócitos, miofibroblastos, macrófagos e leucócitos sanguíneos, particularmente

neutrófilos, eosinófilos, e linfócitos (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ARAÚJO, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2012).

2.4.1 Fibroblastos

São as células mais abundantes do tecido conjuntivo (TORTORA; DERRICKSON, 2012) responsáveis pela síntese da substância fundamental, bem como pela produção de fibras colágena e elástica, além dos glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas que farão parte da ME (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; DERRICKSON, 2012). Estão envolvidos na produção de fatores de crescimento que controlam a proliferação e diferenciação celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A capacidade regenerativa dos tecidos conjuntivos é observada em caso de destruição tecidual por lesões traumáticas ou inflamatórias. Nesses casos, os espaços deixados pela lesão em tecidos onde as células não são capazes de regenerar-se, são preenchidos por uma cicatriz de tecido conjuntivo. A cicatrização depende da capacidade do tecido conjuntivo de se regenerar e a principal célula envolvida na cicatrização é o fibroblasto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAGNANO, 2009). Raramente os fibroblastos passam por divisão celular (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), mas podem fazê-lo durante a cicatrização (GARTNER; HIATT, 2007).

2.4.2 Fibrócitos

Os fibrócitos são fibroblastos em estado quiescente. Com estímulos adequados, como durante a cicatrização, os fibrócitos reverterem para o estado de fibroblastos, reativando sua capacidade de síntese (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAGNANO, 2009).

2.4.3 Miofibroblastos

São fibroblastos que sofreram modificações induzidas por moléculas de sinalização presentes na ME regional. São abundantes em áreas de cicatrização de feridas, participando do fechamento das feridas após as lesões, processo conhecido

como contração da ferida (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAGNANO, 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012).

2.4.4 Macrófagos

São células com grande atividade fagocítica. Desenvolvem-se a partir de um tipo de glóbulo branco derivados da medula óssea e circulantes no sangue, os monócitos (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; DERRICKSON, 2012). Sob um sinal adequado, os monócitos deixam a corrente sanguínea e penetram no tecido conjuntivo através das paredes das vênulas e capilares. Neste tecido eles amadurecem, adquirindo características morfológicas e funcionais de macrófagos (HALL, 2011), podendo chegar a um tempo de vida de dois meses (GARTNER; HIATT, 2007).

Os macrófagos estão distribuídos na maioria dos órgãos e constituem o sistema fagocitário mononuclear (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAGNANO, 2009), atuando como células de defesa (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TORTORA; DERRICKSON, 2012). Em algumas regiões do corpo podem receber nomes específicos, como as células de Langerhans na pele e os monócitos no sangue (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAGNANO, 2009). Eles fagocitam restos celulares, elementos anormais da ME, células neoplásicas, bactérias e elementos inertes que penetram no organismo. São células secretoras capazes de produzir uma variedade de substâncias, como as citocinas, que participam dos processos inflamatórios e reparação dos tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Quando estimulados durante a resposta imunológica, passam por modificações fisiológicas e metabólicas, tornando-se macrófagos ativos. Neste momento adquirem novas características aumentando sua capacidade de matar, fagocitar e digerir partículas estranhas. Quando o material a ser eliminado é muito grande, vários macrófagos podem fundir-se formando uma célula gigante de corpo estranho multinucleado (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.4.5 Neutrófilos

Os neutrófilos originam-se dos mieloblastos encontrados na medula óssea e ao atingirem a maturidade são liberados para a corrente sanguínea, onde podem permanecer por aproximadamente 4 a 8 horas antes de migrarem para os tecidos (GASPARD, 2010). Correspondem por 55% a 65% da totalidade de leucócitos. São importantes na fagocitose e eliminação de microorganismos, principalmente no combate às infecções bacterianas. Representam as células mais numerosas na fase inicial de inflamações (PEREIRA, 2012). Seus grânulos citoplasmáticos contêm enzimas e outras substâncias destinadas à degradação e morte de microorganismos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PEREIRA, 2012). Engolfam material estranho de quantidade e tamanho menor que os macrófagos (PORTH; SOMMER, 2010). Os neutrófilos apresentam nos tecidos uma sobrevivência de 4 a 5 dias, ocorrendo sua morte ao exercerem a função fagocítica ou por senescência (GASPARD, 2010; HALL, 2011).

2.4.6 Eosinófilos

Estão presentes em número pequeno, constituindo 1% a 3% do total de leucócitos (GASPARD, 2010). Sua contagem elevada frequentemente indica uma condição alérgica ou uma infecção parasitária (GASPARD, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2012). Nas reações alérgicas os eosinófilos liberam enzimas ou mediadores químicos que destoxificam os agentes associados às reações alérgicas. Nas infecções parasitárias, utilizam marcadores de superfície para ligar-se ao parasita e, em seguida, liberam enzimas hidrolíticas para matá-lo. (GASPARD, 2010).

2.4.7 Linfócitos

Constituem 20% a 30% da contagem de leucócitos totais (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). Originam-se na medula óssea e desempenham suas funções no tecido conjuntivo. Eles migram para compartimentos específicos do corpo, onde amadurecem e expressam marcadores e receptores específicos de superfície, onde são responsáveis pelo funcionamento do sistema imunológico

(GARTNER; HIATT, 2007). Estas células reconhecem moléculas estranhas presentes em diferentes agentes infecciosos, combatendo-as por meio de resposta humoral (produção de imunoglobulina) e resposta citotóxica mediada por células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Dependendo das moléculas localizadas em sua superfície, podem ser subdivididos em três tipos: células B, células T e células *natural killer* (NK) (GASPARD, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2012). As células B diferenciam-se em plasmócitos, os quais produzem anticorpos que ajudam a destruir bactérias e a inativar suas toxinas. As células T eliminam os vírus, fungos, células cancerosas e algumas bactérias (TORTORA; DERRICKSON, 2012), além disso, através da liberação de moléculas sinalizadoras como as citocinas (linfocinas), elas induzem respostas específicas de outras células do sistema imunológico (GARTNER; HIATT, 2007). As células NK atacam uma variedade de micróbios infecciosos e certas células tumorais (TORTORA; DERRICKSON, 2012).

2.5 Fisiopatologia do Processo Cicatricial

Ferida é definida como qualquer interrupção na continuidade de um tecido corpóreo, causada principalmente por trauma ou desencadeada por uma afecção clínica (LEITE et al., 2012). Com o rompimento tecidual, logo se inicia o processo de reparo, que consiste em um conjunto coordenado de eventos moleculares e celulares que interagem para reparar o dano e promover a cicatrização. Tal evento é um processo dinâmico envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se organizam de forma harmoniosa a fim de se restabelecer a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; PAGNANO et al., 2008).

2.6 Classificação de Feridas de Acordo com o Comprometimento Tecidual

2.6.1 Ferida de espessura parcial

A perda tecidual limita-se à epiderme, ou porção mais alta da derme. A reparação se faz pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da

pele adjacente não lesionada. Como resultado tem-se uma cicatriz freqüentemente imperceptível (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

2.6.2 Ferida de espessura total

A cicatrização desse tipo de lesão é bem mais complexa e de longa duração quando comparada às de espessura parcial. Ocorre comprometimento completo da epiderme, derme e tecido celular subcutâneo, podendo acometer músculos e ossos. Há a necessidade da formação do tecido de granulação seguido de epitelização e contração da ferida, até seu total reparo, resultando em uma cicatriz totalmente perceptível (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; BORGES, 2008)

2.7 Processos Biológicos da Cicatrização

O processo de cicatrização de feridas é um mecanismo complexo caracterizada por fases distintas não seqüenciais, já que cada uma delas contribui com seu efeito no tempo e intensidade certos (PAGANELA et al., 2009). Didaticamente, alguns autores classificam o processo cicatricial em três etapas básicas: inicialmente um estágio inflamatório, seguido por um de proliferação e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; ISAAC et al., 2010). Outros autores o classificam de forma mais completa, em cinco fases principais: hemostasia, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (PAGNANO et al., 2008; PAGANELA et al., 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012).

2.7.1 Hemostasia

Após um dano tecidual, as alterações nas células endoteliais, a ruptura de vasos sanguíneos e extravasamento de seus constituintes (plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas), incitam compostos vasoativos a promoverem uma vaconstricção dos vasos sanguíneos lesados e o início da coagulação sanguínea, através da ativação e agregação plaquetárias, visando diminuir a perda sanguínea para o espaço extravascular. A agregação plaquetária e a coagulação

sangüínea formam uma cobertura rica em fibrina (coágulo) que, além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a penetração de agentes exógenos, fornece um ambiente para que as plaquetas secretem fatores de crescimento, citocinas e elementos da ME, disponibilizando uma matriz provisória necessária para a migração celular (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012). Os mediadores do processo inflamatório recrutam macrófagos e neutrófilos ao local da ferida, os quais secretam fatores específicos, que regem as fases subseqüentes do processo cicatricial.

2.7.2 Inflamação

Intimamente ligada à fase anterior, a fase inflamatória é caracterizada pela presença de células inflamatórias no tecido cicatricial, como os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (OLIVEIRA; DIAS, 2012) ou neutrófilos, macrófagos e linfócitos, cuja participação é fundamental para regular o processo de reparação, pois secretam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento, que atuam como sinalizadores moleculares. Os PMNs são responsáveis pela fagocitose das bactérias e permanecem por um período de três a cinco dias a partir do momento da injúria tissular (SCHIRATO, et al., 2006).

Os macrófagos fagocitam bactérias, removem e degradam fragmentos celulares e corpos estranhos e ativam o desenvolvimento de tecido de granulação. Essas células permanecem do terceiro ao décimo dia após a lesão e atuam como células apresentadoras de antígeno e fonte de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células epiteliais e a angiogênese e atraem fibroblastos, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Os linfócitos, que aparecem na ferida em aproximadamente uma semana, apresentam um papel não muito definido na cicatrização. No entanto, sabe-se que, com suas moléculas sinalizadoras (linfocinas), tem importante influência na estimulação de macrófagos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; OLIVEIRA; DIAS, 2012).

2.7.3 Proliferação

A proliferação inicia dentro de dois a três dias da lesão (PORTH; SOMMER, 2010) e é responsável pelo fechamento da ferida propriamente dito. É dividida em três subfases: reepitelização, fibroplasia e neovascularização.

A reepitelização inicia-se horas após a lesão, com a migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos não danificados oriundos da margem da ferida para formar uma camada de superfície similar àquela destruída pela injúria. Diferentes fatores de crescimento são os responsáveis pelo aumento de mitoses e hiperplasia do epitélio (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). O plano de movimento das células epiteliais migrantes requer umidade e vascularização no leito da ferida e é impedido na presença de superfície seca ou necrótica (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; PORTH; SOMMER, 2010). Quando uma crosta se forma na ferida, as células epiteliais migram entre ela e o tecido viável subjacente; quando uma porção significativa da ferida é coberta por tecido epitelial, a crosta se destaca (PORTH; SOMMER, 2010).

A fibroplasia ocorre a partir da proliferação dos fibroblastos na região mais superficial da ferida (PAGANELA et al., 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012). Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo que sintetizam e secretam colágeno e outros elementos intercelulares necessários para a cura de feridas. Além disso, eles produzem uma variedade de fatores de crescimento que induzem o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) a partir de vasos preexistentes e a proliferação e migração de células endoteliais (PORTH; SOMMER, 2010). A neovascularização fornece metabólitos e oxigênio para nutrir o novo tecido que prolifera na área lesionada. A nova rede vascular com aspecto rosado e granular expande-se para o centro da lesão, estabelecendo-se o tecido de granulação (PAGANELA et al., 2009; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009), o qual é produzido de três a quatro dias após a indução da lesão. O tecido de granulação consiste em vasos sanguíneos neoformados, células inflamatórias, fibroblastos e os produtos de fibroblastos, incluindo o colágeno, elastina, fibronectina, proteases e as glicosaminoglicanas, componentes essenciais para a formação da nova ME (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; PAGANELA et al., 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012). De acordo com Mestre, Rodrigues e Cardoso (2012), os

fibroblastos além de serem as células principais na produção de ME, também são importantes para impedir a sua degradação quando formada.

À medida que o fluxo sanguíneo e a oxigenação vão sendo restabelecidos, os vasos neoformados começam a diminuir. A partir deste evento inicia-se a fase de contração das bordas da lesão. (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; PAGANELA et al., 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012).

1.7.4 Contração

É o movimento centrípeto das paredes marginais da ferida de espessura total. Esta ação é realizada pelos fibroblastos ativados, os quais diferenciam em miofibroblastos. O miofibroblasto é uma célula que está presente no tecido de granulação e confere atividade contrátil responsável pelo fechamento das feridas após as lesões. Contêm fibras intracelulares de actina e miosina e formam conexões especializadas com a ME e outras células presentes dentro da lesão. Os miofibroblastos aproximam as margens da ferida forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem e, desta maneira, oferecer o suporte para diminuir o tamanho da lesão (ISAAC et al., 2010; PAGANELA et al., 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012).

1.7.5 Remodelação

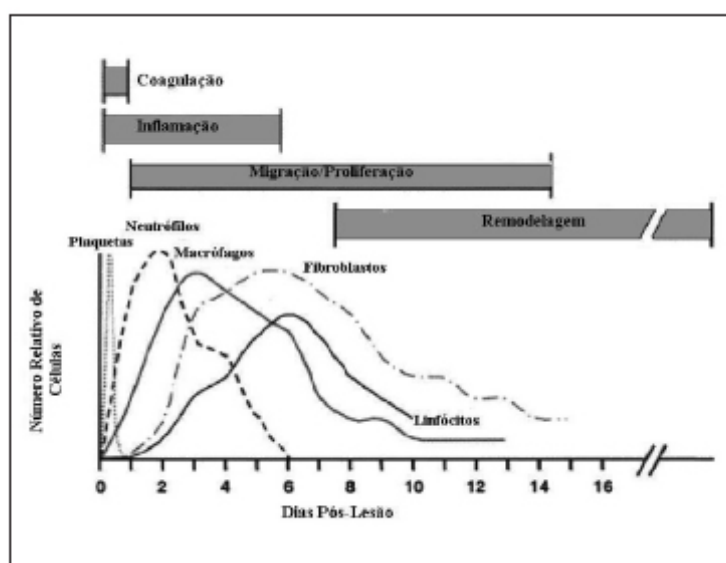
A fase final do processo cicatricial consiste na remodelação do colágeno e da matriz (PAGANELA et al., 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012) na tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009); pode durar meses, dependendo da extensão da ferida (OLIVEIRA; DIAS, 2012). É o período no qual os elementos reparativos da cicatrização são transformados para tecido maduro de características bem diferenciadas. Durante o processo de maturação e remodelagem, acentua-se a síntese e deposição de colágeno e a maioria dos vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida levando à maturação da cicatriz com reduzido número de células (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; OLIVEIRA; DIAS, 2012). O conteúdo aquoso da matriz diminui, aumentando a agregação das fibras de colágeno que, gradativamente, apresentam-se mais espessas resultando em uma

configuração mais regular da cicatriz, que está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Assim, a lesão torna-se mais resistente após a maturação do colágeno (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Ao final dessa etapa, os folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido o desaparecimento dos neocapilares (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A representação gráfica da especificidade celular correlacionada temporalmente com as fases da cicatrização pode ser observada na figura 3.

FIGURA 3 – Fenômenos sequenciais na recuperação tecidual em relação aos dias pós lesão



Fonte: Mendonça e Coutinho-Netto (2009).

2.8 Tipos de Cicatrização

2.8.1 Cicatrização por primeira intenção

Esse tipo de cicatrização ocorre quando as bordas da ferida são aproximadas por meio de sutura ou outros meios. Não há grande perda tecidual, o exsudato é mínimo e não há presença de infecção (SILVA et al., 2011). Estas feridas

geralmente cicatrizam sem complicações e com formação de discreto tecido cicatricial. As fases proliferativa e de maturação envolvem uma simples reparação e regeneração tecidual devido a formação de pouco tecido de granulação (BORGES, 2008).

2.8.2 Cicatrização por segunda intenção

Ocorre quando há perda celular ou tecidual mais extensa, cujas bordas estão distantes ou estejam contaminadas por agentes infecciosos ou contenham corpos estranhos. A cicatrização é mais intensa e depende inteiramente da neovascularização e remodelação da ME para restaurar a perda tecidual através da contração da ferida, restabelecer a tensão normal do tecido e reduzir o tamanho da cicatriz (PAGANELA et al., 2009).

2.9 Fatores Interferentes na Cicatrização de Feridas

O processo de cicatrização pode ser afetado adversamente por diversos fatores, locais e sistêmicos.

Os fatores locais estão relacionados principalmente ao movimento e à presença de resíduos dentro da ferida, como por exemplo: tecido necrosado, corpos estranhos, contaminação bacteriana e hipóxia tecidual. Estes fatores podem atuar como barreira física para o desenvolvimento do tecido de granulação e deposição de colágeno, podendo também exacerbar a inflamação, alterando a resposta inflamatória. Ferida com alta mobilidade é propensa à inflamação crônica devido à perturbação repetitiva dos novos capilares, depósito de colágeno e fragilidade do novo epitélio. Ao contrário, a completa imobilização da área pode levar a um arranjo desorganizado do novo colágeno no interior da ferida, diminuindo a força de tensão resultante. Dentre os fatores locais, a infecção é a causa mais importante do retardo da cicatrização.

Dos fatores sistêmicos que dificultam a cura de feridas, inclui o estado nutricional, presença de doença de base (diabetes, alterações cardiovasculares e de coagulação), infecção e uso de medicamentos sistêmicos, como por exemplo: anticoagulantes, antiagregantes plaquetários e corticosteróides. A deficiência protéica e, principalmente, a vitamina C, inibe a síntese de colágeno e de

componentes da matriz e tecido de granulação, retardando a cicatrização. O uso de doses múltiplas de antiinflamatórios esteroidais restringe a fase inflamatória do processo cicatricial causando efeito inibitório na taxa e na qualidade da cicatrização (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

2.10 Plaquetas e Fatores de Crescimento

Plaquetas são pequenos fragmentos celulares derivados dos megacariócitos da medula óssea. Por meio da participação na coagulação sanguínea, atuam como primeira linha de defesa nas hemorragias (PARDO et al. 2012). São células discóides, anucleadas e possuem de 5 a 7 μm de diâmetro e largura menor que 3 μm em humanos (VENDRUSCOLO et al., 2012b). Seus valores de referência variam entre 140.000 a 400.000 plaquetas/ μL (KLEIN; WAGNER; SILVA, 2011). Sob circunstâncias normais permanecem cerca de 8 a 9 dias na circulação antes de serem removidas pelas células fagocíticas do baço (GASPARD, 2010). Nos cães, seu tamanho pode variar de 2,2 a 3,7 μm de diâmetro e 0,5 μm de espessura, com uma concentração circulante de aproximadamente 200.000 a 600.000 plaquetas/ μL e meia-vida intravascular variável de 3 a 7 dias (REBAR et al., 2003).

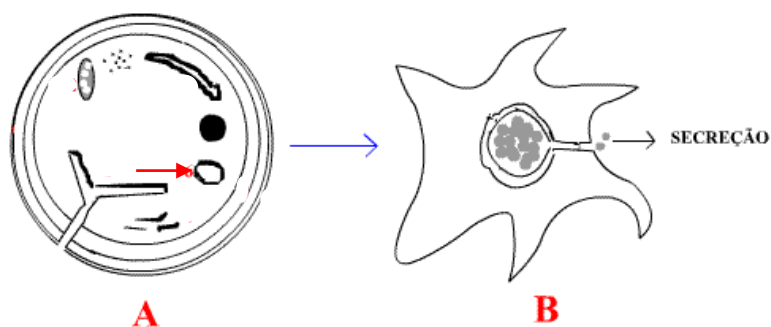
Estruturalmente, estes fragmentos contêm no citoplasma microfilamentos de proteínas (actina e miosina), citocinas, grânulos e fatores bioativos (MAIA; SOUZA, 2009; VENDRUSCOLO et al., 2012b) que estão envolvidos com a regulação dos aspectos básicos da reparação tecidual, além da coagulação sanguínea (VENDRUSCOLO et al., 2012b).

Normalmente as plaquetas estão no estado inativo (MAIA; SOUZA, 2009). Sua ativação pode ser realizada por agentes fisiológicos (ex: trombina) e farmacológicos (ex: gluconato de cálcio) (VENDRAMIN et al., 2006). Esses agonistas desencadeiam seus efeitos através da interação com receptores plasmáticos das plaquetas (MAIA; SOUZA, 2009). Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfológicamente e desenvolvem pseudópodes através de seus microfilamentos protéicos, que, contraídos, promovem a agregação plaquetária e, posteriormente, a liberação e degranulação de seus grânulos citoplasmáticos (MAIA; SOUZA, 2009; PARDO et al. 2012) (Figura 4). Em particular, os grânulos alfa (α -grânulos) são ricos em fatores de crescimento com diversas ações biológicas.

Os fatores de crescimento são peptídeos sinalizadores responsáveis pela regulação do metabolismo celular por meio da interação com receptores específicos situados na membrana plasmática das células alvo. Após a formação do complexo receptor-fator de crescimento, ocorre um aumento da transcrição gênica e conseqüente produção de proteínas que desencadeiam a proliferação e diferenciação celular, além do aumento da síntese de ME e colágeno, bem como a angiogênese, o que facilita o processo de reparação e regeneração tecidual de forma mais rápida e eficiente (MAIA; SOUZA, 2009; PAGNANO et al., 2009; PARDO et al., 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012b).

A degranulação plaquetária propicia a liberação dos seguintes fatores de crescimento: fator de crescimento transformador- β (TGF- β), responsável pela ativação de fibroblastos resultando em deposição de colágeno e cicatrização da ferida; fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) aumenta a vascularização tissular, promove a proliferação de fibroblastos e aumento da quantidade de colágeno, estimula a formação do tecido de granulação; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimula a angiogênese, mitogênese e a permeabilidade vascular; fator de crescimento epitelial (EGF) induz o crescimento de tecido epitelial e promove a angiogênese; fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) sinaliza as células mesenquimais e epiteliais a migrarem, dividirem e aumentarem a síntese de colágeno e matriz (ALMEIDA et al., 2008; VENDRUSCOLO et al., 2012b), fator de crescimento fibroblástico (FGF) apresenta efeitos mitogênicos, regula a migração e diferenciação de suas células alvo, além de funções citoprotetoras (PAGNANO, 2009); fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) promove a angiogênese e adesão plaquetária (MAIA; SOUZA, 2009).

FIGURA 4 – Estrutura das plaquetas



Fonte adaptada: Famadas (2014).

A- Plaqueta não ativada com suas organelas citoplásmicas incluindo os α -grânulos (seta vermelha) contendo diversos fatores de crescimento; B- Plaqueta ativada com seus grandes pseudópodes. O conteúdo de seus grânulos foi liberado.

2.11 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O PRP foi descrito no início dos anos 70, mas com aplicação em procedimentos cirúrgicos após 1989. Na literatura, este composto pode aparecer com outras denominações, como plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido de plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento e gel de plaquetas (PARDO et al., 2012).

Ao longo da última década, avanços significativos foram feitos na otimização de diagnósticos osteomusculares e de reparação. Como resultado, a pesquisa evoluiu para reconhecer métodos preventivos e tratamentos inovadores com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente e reduzir o impacto social dispendiosa dos tecidos moles e patologias articulares. O tratamento com PRP se destaca pela sua relação custo-benefício e capacidade regenerativa, portanto, uma é alternativa eficaz aos tratamentos convencionais por conta de sua concentração supra-fisiológica das plaquetas ricas fatores de crescimento que desempenham importante papel no processo de cura (GORDIN, 2011).

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que pode se tornar prejudicado pela influência de vários fatores, conforme mencionados anteriormente, resultando em uma cicatrização lenta, já que nem sempre o tratamento convencional pode proporcionar bons resultados. Neste caso, o gel de PRP surge como uma terapia avançada para estimular a cicatrização de feridas agudas e crônicas (CARTER; FYLLING; PARNELL, 2011).

2.11.1 Mecanismo de ação e obtenção do PRP na forma gel

O PRP é um concentrado natural de fatores de crescimento, com ação quimiotática, mitogênica, angiogênica e antiinflamatória. Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas e concentrados no PRP, exercem grande influência no processo de reparação e cicatrização; eles são capazes de acelerar e modular os processos de reparação, atuando na proliferação e diferenciação celular e formação

de ME (YAMADA et al., 2012), principalmente os fatores de crescimento TGF- β , PDGF, IGF-I (YIN et al., 2014) e outras proteínas que modulam a inflamação e a cicatrização (SILVA; CARMONA; REZENDE, 2012).

Além da presença de quantidade variável de leucócitos, demonstrando sua atividade antimicrobiana contra diversos agentes patológicos (GOBBI; VITALE, 2012), acredita-se que o PRP seja ainda capaz de bloquear a ação de moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas a partir de macrófagos, atuando de forma antiinflamatória e analgésica (YAMADA et al., 2012).

A técnica para obtenção do PRP é simples e de baixo custo, podendo ser realizado utilizando-se centrífugas convencionais ou equipamentos que permitam a separação dos constituintes do sangue total (MAIA; SOUZA, 2009). Consiste na centrifugação do sangue total recém colhido, utilizando-se citrato de sódio como anticoagulante, de modo a sedimentarem-se as hemácias e manterem-se os leucócitos e as plaquetas em suspensão no plasma (PARDO et al., 2012). O processo permite a concentração de grande quantidade de plaquetas no menor volume de plasma (MARX, 2004), alcançando até seis vezes sua concentração inicial (MARX et al., 1998). O citrato de sódio é o anticoagulante de escolha por não alterar os receptores de membrana das plaquetas (PARDO et al., 2012).

Atualmente, diversos protocolos são utilizados para a obtenção do PRP, cada um com sua peculiaridade em relação à capacidade de concentração de plaquetas, bem como no processo de liberação dos fatores de crescimento pelas plaquetas (D'ELIA et al., 2009; KLEIN; WAGNER; SILVA, 2011). Independente do método utilizado é recomendado que ele seja capaz de aumentar a contagem plaquetária em uma concentração bem acima da encontrada no sangue total, desde que sejam preservadas a estrutura e função das plaquetas, caso contrário, sua ação terapêutica poderá ser prejudicada (ALEIXO et al., 2011). Além disso, as condições assépticas na manipulação do sangue durante o preparo e utilização do PRP devem ser observadas, de modo a evitar a sua contaminação (PARDO et al., 2012).

Maia e Souza (2009) descrevem em estudo que a concentração de plaquetas no PRP depende da contagem inicial no sangue total, ou seja, quanto maior o número inicial de plaquetas, mais rico será o PRP. Dessa forma, um número reduzido de plaquetas no sangue basal é um fator limitante para adequada concentração de plaquetas.

De acordo com Marx et al. (1998), um protocolo de dupla centrifugação e força de rotação adequada, é essencial para concentrar as plaquetas durante o preparo do PRP. A primeira centrifugação separa as células vermelhas do plasma, devido à diferença de densidade. Na segunda centrifugação ocorre a concentração das plaquetas, produzindo o PRP e o plasma pobre em plaquetas (PPP) (LACCI; DARDIK, 2010; VENDRUSCOLO et al., 2012a). Para Vanat et al. (2012), o tempo de centrifugação de 10 minutos foi o mais adequado para a espécie canina.

A adição de trombina ou gluconato de cálcio no PRP resulta na ativação das plaquetas e início do processo de coagulação formando o gel de PRP, que é rico em fatores de crescimento (MARX, 2004; VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009; LACCI; DARDIK, 2010; CAMARGO et al., 2012; VANAT et al., 2012). A ativação das plaquetas deve ser realizada próxima ao momento da aplicação terapêutica, de forma a assegurar uma adequada concentração dos fatores de crescimento no ambiente da ferida (MAIA; SOUZA, 2009).

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. cap. 23: O sistema imunológico, p. 1195-1254.
- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. cap. 20: Comunidades celulares: tecidos, células-tronco e câncer, p. 689-731.
- ALEIXO, G. A. S. et al. Comparison between two protocols to obtain platelet-rich plasma in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 63, n. 3, p. 567-573, jun. 2011.
- ALMEIDA, A. R. H. et al. Platelet-rich plasma, platelet-poor plasma and fat grafts use in face liftings: case reports. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 82-88, abr./jun. 2008.
- ARAÚJO, A. K. L. **Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouratea sp.***. 2010. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mechanisms involved wound healing: a revision. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51, jan./mar. 2005.
- BORGES, E. L. Evolução da cicatrização. In: BORGES, E. L. et al. **Feridas: como tratar**. 2. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008. p. 31-43.
- CAMARGO, J. et al. Plasma rico em plaquetas (PRP) como sistema de entrega local de antibiótico en infecciones óseas: estudio in vitro. **Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatologia**, Santa Fé de Bogotá, v. 26, n.1, p. 39-49, mar. 2012.
- CARTER, M. J.; FYLLING, C. P.; PARNELL, L. K. S. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. **Eplasty**, v. 11, n. e38, p. 382-410, sep. 2011.
- CARROLL, E. W. Características celulares e tissulares. In: PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. v. 1, cap. 4, p. 60-95.
- D'ELIA, C. O. et al. The use of platelet rich plasma enriched with boné marrow aspirate in puddu tibial osteotomy. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 508-512, 2009.
- DE ALMEIDA, P. C. C. **Estudo da transição dermoepidérmica dos enxertos de pele e sua relação com o surgimento de vesículas**. 2009. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DE ROBERTIS, E.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 6: A junção das células entre si e com a matriz extracelular, p. 95-105.

DEROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 24, n. 9, p. 276-281, jul./aug. 2009.

FAMADAS, L. C. Hemostasia. 2014. Disponível em: <http://www.famadas.blogspot.com.br/>. Acesso em: 6 maio 2014.

FORNI, F. et al. Platelet gel: applications in dental regenerative surgery. **Blood Transfusion**, v. 11, n. 1, p. 102-107, jan. 2013.

FOX, S. I. **Fisiologia humana**. 7. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 1: O estudo da função corporal, p. 4-21.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

GASPARD, K. J. Células sanguíneas e sistema hematopoético. In: PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. v. 1, cap. 12, p. 260-268.

GOBBI, G.; VITALE, M. Platelet-rich plasma preparations for biological therapy: applications and limits. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 22, n. 1, p. 10-15, mar. 2012.

GORDIN, K. Comprehensive scientific overview on the use of platelet rich plasma prolotherapy (PRPP). **Journal of Prolotherapy**, v. 3, n. 4, p. 813-825, dec. 2011.

HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. cap. 33: Resistência do corpo à infecção: leucócitos, granulócitos, sistema monocítico-macrofágico e inflamação, p. 447-456.

IRION, G. **Feridas**: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores. Rio de Janeiro: LAB, 2005. cap. 1: Anatomia e fisiologia da pele, p. 4-15.

ISAAC, C. et al. Processo de cura de feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 89, n. ¾, p. 125-131, jul. 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia molecular e celular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 12: Biologia da interação célula-matriz extracelular, p. 245-255.

KAFASHI ELAHI, R.; MOUSAVI, G. H.; MOHAJERI, D. Effects of topical heterologous blood serum and bovine thrombin activated platelet rich plasma in

experimental corneal stromal ulcers in rabbit. **Advances in Environmental Biology**, v. 6, n. 1, p. 95-99, jan. 2012.

KAUX, J. F.; CRIELAARD, J. M. Platelet-rich plasma application in the management of chronic tendinopathies. **Acta Orthopaedica Belgica**, v. 79, n. 1, p. 10-15, fev. 2013.

KLEIN, C. P.; WAGNER, S. D.; SILVA, J. B. Obtenção de plasma rico e plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 509-513, out./dez. 2011.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

LACCI, K. M.; DARDIK, A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 83, n. 1, p.1-9, mar. 2010.

LEITE, A. P. et al. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 198-207, set. 2012.

MAIA, L.; SOUZA, M. V. Components rich in platelets used in wound healing tendon, ligaments and osteo-articular diseases of animals. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1279-1286, jul. 2009.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, jul./ago. 2003.

MOLINA-MINÃÑO et al. Plasma rich in growth factors and bone formation: a radiological and histomorphometric study in New Zealand rabbits. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 275-280, jul./sep. 2009.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, jun. 1998.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489-496, apr. 2004.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Cellular aspects of wound healing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MESTRE, T.; RODRIGUES, A.; CARDOSO, J. Wound healing: therapeutics. **Revista da Sociedade Portuguesa de Venereologia**, v. 70, n. 4, p. 423-431, oct. 2012.

MICHALANY, J.; MICHALANY, N. **Anatomia e histologia da pele**. São Paulo: Lemos, 2002.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Wounds healing: stages and influencing factors. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

PAGANELA, J. C. et al. Abordagem clínica de feridas cutâneas em eqüinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 104, n. 569-572, p. 13-18, 2009.

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. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p.1662-1666, set. 2008.

PAGNANO, L. O. **Análise da cicatrização na pele de coelhos após tratamentos de feridas com biomateriais associados à fração de proteína do látex natural da seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. 2009. 94 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PARDO, M. et al. Principais usos do plasma rico em plaquetas na medicina veterinária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 9, n. 18, jan. 2012.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: BOGLIOLO, L. **Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 7, p. 183-217.

PORTH, C. M.; SOMMER, C. Inflamação, reparo tecidual e cura de feridas. In: PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. v. 1, cap. 18, p. 389-411.

REBAR, A. H. et al. **Guia de hematologia para cães e gatos**. Roca: São Paulo, 2003. cap. 10: Plaquetas, p. 133-156.

REZENDE, U. M. et al. Effect of platelet-rich plasma on impact-induced chondrocyte apoptosis. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 102-105, mar/apr. 2011.

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

SHAN, G. Q. et al. Evaluation of the effects of homologous platelet gel on healing lower extremity wounds in patients with diabetes. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 42, n. 1, p. 22-29, mar. 2013.

SILVA, R. C. et al. Feridas cirúrgicas. In: SILVA, R. C. L; FIGUEIREDO, N. M. A, MEIRELES, I. B. et al. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. 3. ed. São Caetano do Sul: Yendis, 2011, p. 501-523.

SILVA, R. F; CARMONA, J. U; REZENDE, C. M. F. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 4, p. 847-852, aug. 2012.

SIMANDL, G. Estrutura e função da pele. In: PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. v. 2, cap. 5, p. 1574-1586.

SUZUKI, S.; MARIMOTO, N.; IKADA, Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, n. 4, p. 595-606, fev. 2013.

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

TIPOS de células da epiderme. In: **Toxicologia**. [200-?]. Disponível em: <http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mlI.pele.htm>. Acesso em: 10 fev. 2014.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VANAT, N. et al. Technique modification for platelet: rich plasma prepare in dogs. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 313-322, jan./mar. 2012.

VENDRAMIN, et al. Platelet-rich plasma and growth factors: processing technique and application in plastic surgery. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 24-28, jan./fev. 2006.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO D.; FRANCO T. R. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 212-218, abr./jun. 2009.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO D.; FRANCO T. R. Use of autologous platelet-rich plasma in skin grafts surgeries in chronic wounds. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-594, out./dez. 2010.

VENDRUSCOLO, C. P. et al. Evaluating the effectiveness of different protocols for preparation of platelet rich plasma for use in equine medicine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 106-110, fev. 2012a.

VENDRUSCOLO, C. P. et al. Platelet-rich plasma: a new therapeutic approach for equine medicine. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 1, p. 33-43, mar. 2012b.

YAMADA, A. L. M. et al. Platelet-rich plasma in the treatment of articular chondral defects experimentally induced in horses: clinical, macroscopic, histopathological and histochemical evaluation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 2, p. 323-332, apr. 2012.

YIN, Z. et al. Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: An in vitro study. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, n. 7, p. 1039-1050, jul. 2014.

YUAN, T.; ZHANG, C. Q.; WANG, J. H. C. Augmenting tendon and ligament repair with platelet-rich plasma (PRP). **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 3, n. 3, p. 139-149, jul./sep. 2013.

ARTIGO¹**Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas heterólogo na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos**

Karina GB Abegão², Rosa MB Nogueira³, Eliane S Santos², Cecília B Laposy³, Gisele A Nai⁴, Bruno N Bracale² e Inara G Delfim²

Resumo

O plasma rico em plaquetas é fonte de diversos fatores de crescimento e surge como uma nova biotecnologia na reparação tecidual, com grande potencial terapêutico. Pacientes com problemas de saúde geral e ausência de volume de sangue necessário para produção autóloga deste concentrado, podem ficar limitados para receber este tratamento inovador. Para ultrapassar a limitação, o presente estudo avaliou os efeitos do gel de plasma rico em plaquetas obtido a partir de um cão saudável, na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos mediante análises morfológicas, morfométricas e histológicas. Foram produzidas duas incisões no dorso de seis coelhos utilizando “punch” de 8 mm de diâmetro. Aleatoriamente, um dos lados foi denominado Controle (A), permanecendo o contralateral Tratado (B).

¹Artigo elaborado seguindo as normas do Journal of Biomaterials Applications

²Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil

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

⁴Departamento de Patologia, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, Brasil

Autor correspondente:

Karina GB Abegão, Mestrado em Ciência Animal, Rua Maria Barbosa 22, 19400-000, Presidente Venceslau, São Paulo, Brasil

Email: ka.gomes_pp@ig.com.br

Solução fisiológica a 0.9% e gel de plasma rico em plaquetas heterólogo foram aplicados topicamente nas lesões (A) e (B) respectivamente, nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 de pós-operatório. Observações macroscópicas registradas nos dias mencionados acima, incluindo o 17º, no qual também foi realizada uma biópsia para análise histológica, demonstraram semelhança entre as lesões em relação às variáveis estudadas, sensibilidade dolorosa, cor da ferida, edema, hiperemia, exsudato, crosta e tecido de granulação. O processo de contração da área das lesões (A) e (B) evoluiu similarmente de forma linear, de modo que, histologicamente, reepitelização total foi alcançada em 90% das lesões (A) e 100% das lesões (B), sem diferenças estatisticamente significantes. Tais diferenças também não foram constatadas entre as feridas em relação aos demais parâmetros histológicos analisados: presença de crosta, neovascularização, colagenização, quantidade de fibroblastos e macrófagos, tipo celular e intensidade do processo inflamatório. Os resultados desta pesquisa sugerem que o gel de plasma rico em plaquetas heterólogo foi capaz de promover a cicatrização de feridas dérmicas em coelhos, sem efeitos prejudiciais.

Palavras-chave

Plasma rico em plaquetas, heterólogo, cicatrização, ferida cutânea, coelho

Introdução

A cicatrização de feridas dérmicas é um processo dinâmico que depende de um conjunto de eventos bioquímicos e celulares coordenado por citocinas e fatores de crescimento, que ocorrem de forma sobrepostas.¹ Os fatores de crescimento são liberados a partir da degranulação de plaquetas ativadas e por células no local da lesão para promover a migração e proliferação celulares, resultando na formação de novos vasos sanguíneos e de tecido de granulação, essenciais para a reparação de feridas.²

Grânulos alfa contidos no interior das plaquetas contêm vários tipos de fatores de crescimento com efeitos benéficos na cicatrização dos tecidos,³ incluindo fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF)⁴ e fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF).⁵

O plasma rico em plaquetas (PRP) surge como uma nova biotecnologia para acelerar o processo normal de cura de lesões cutâneas e musculoesqueléticas em várias espécies, com resultados promissores.⁶ É uma fração de plasma que contém uma maior concentração de plaquetas do que os níveis da linha de base no sangue total,⁷ geralmente obtido por dois processos de centrifugação do sangue.² A adição de gluconato de cálcio neste concentrado resulta na ativação das plaquetas e início do processo de coagulação formando o gel de plaquetas rico em fatores de crescimento.^{8,9}

A utilização clínica do PRP vem crescendo consideravelmente, como no tratamento de tendinites⁵ e tendinopatias crônicas¹⁰, na promoção da cicatrização de feridas,¹¹ em enxertos ósseos¹² e cutâneos,¹³ e como adjuvante em cirurgia de rejuvenescimento e lipoenxertia facial.¹⁴

Apesar da eficácia comprovada do gel de PRP autólogo em vários estudos, outra modalidade de tratamento seguro seria necessária nos casos em que as condições gerais do paciente tornassem inviável e/ou contra-indicada a utilização de seu próprio

sangue.¹⁵ Resultados benéficos com o uso de sangue heterólogo foram demonstrados por Rezende et al.¹⁶ ao concluírem que a injeção intra-articular de PRP obtido por meio de doadores humanos, apresentou efeito protetor e reduziu as taxas de apoptose em lesões de cartilagem em coelhos, bem como a cura de úlcera corneana em coelhos por meio da associação de PRP com soro sanguíneo heterólogo.¹⁷ Outra indicação de fonte heteróloga foi relatada por Suzuki, Morimoto e Ikada² ao utilizarem sangue canino para obtenção de PRP a ser implantado em ratos, justificado pela dificuldade encontrada na coleta de sangue de pequenos animais.

Dados estes resultados, buscou-se avaliar a cicatrização de feridas dérmicas produzidas experimentalmente no dorso de coelhos, tratadas ou não com gel de plasma rico em plaquetas heterólogo, sob os aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos.

Com base na eficácia do PRP nos estudos mencionados, a hipótese é de que o PRP heterólogo sob a forma gel, aplicado topicamente e de forma seriada, seja capaz de promover a cicatrização tecidual.

Materiais e métodos

Modelo animal

Este estudo foi realizado no Biotério de Experimentação da Universidade do Oeste Paulista e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo número 1170. Seis coelhos brancos da raça Nova Zelândia, três machos e três

fêmeas, clinicamente saudáveis, com idade e peso médio de 150 dias e 3.0 ± 1.0 kg respectivamente, foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com alimentação e água à vontade, em local com temperatura ($22^0 \pm 2^0$ C) e fotoperíodo controlados (12 h claro/escuro). Respeitou-se o período de aclimação de sete dias antes do início do experimento.

O tamanho da amostra configurada neste estudo foi baseado de forma a manter um número de animais compatível com a necessidade de resultados científicos confiáveis e válidos do ponto de vista de significância estatística, bem como com respeito às questões bioéticas. Além disso, trabalhos anteriores realizados e publicados por pesquisadores corroboram com menor número do tamanho amostral conforme previsto neste estudo.^{9,13,16,18-20}

Técnica operatória

Após contenção manual dos animais foi realizada a tricotomia da região dorsal (próximo a inserção da escápula) utilizando um tricotomizador elétrico (AGC[®]) e lâmina número 40. Em seguida, foram anestesiados via intramuscular (IM), com Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin[®] 2%) e Cloridrato de zolazepam (Zoletil[®] 50) em associação, na dose 15 mg/kg.²¹ A pele foi demarcada com uma caneta para retroprojeter no local da excisão cirúrgica e, após a antissepsia da pele com solução alcoólica a 10% e delimitação da área com campo cirúrgico estéril, foi aplicado

anestésico local, lidocaína 2%¹⁸ com vasoconstrictor (1.0 mL). Em seguida, removeu-se lateralmente à linha mediana dorsal, um fragmento de pele do lado esquerdo e direito de cada animal, utilizando um *punch* estéril de 8 mm de diâmetro, preservando a musculatura. A divulsão da tela subcutânea foi realizada com tesoura de ponta romba e pinça anatômica até sua total ressecção. Após procedimento cirúrgico os animais receberam Cloridrato de tramadol (0.5 mg/kg),²² IM, 12/12 h durante três dias consecutivos para controle da dor.

Tratamento das feridas

Aleatoriamente, as feridas cirúrgicas esquerda e direita de cada animal foram denominadas respectivamente, Controle (A) e Tratada (B). As lesões foram tratadas as segundas e quintas-feiras^{13,15} nos momentos M0 (dia da indução da ferida), M3 (3 dias), M7 (7 dias), M10 (10 dias) e M14 (14 dias).²³ Antecedendo a terapia tópica, efetuou-se limpeza das lesões utilizando gaze estéril e solução de cloreto de sódio a 0.9%[®], seguida da aplicação da mesma solução na ferida Controle (A) e de gel de PRP heterólogo na ferida Tratada (B). Todo o leito das feridas Tratada (B), inclusive suas bordas, foi coberto com gel de PRP (Figura 1). Após cada tratamento, as lesões Controle (A) e Tratada (B) foram protegidas com rayon estéril (1.0 cm²) e fita hipoalergênica (Micropore 3M[®]) no momento M0, sendo este substituído nos demais momentos por um curativo adesivo de formato circular (Band-Aid[®]).

Obtenção e preparação do PRP heterólogo gel

As amostras de sangue foram obtidas de um único cão adulto saudável, sem raça definida, com peso médio de 25 kg.

Previamente ao início do experimento, após contenção e antissepsia da pele do cão doador, colheu-se da veia jugular externa,⁹ utilizando tubo de coleta a vácuo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 4.0 mL de sangue para hemograma e contagem do número de plaquetas (contador automático Sysmex Poch Diff 100iV-Roche[®]) com o objetivo de confirmar o estado geral de saúde do animal e obter os valores plaquetários iniciais no sangue total.²⁴

No dia inicial do experimento repetiu-se a coleta de sangue realizada a vácuo (4.0 mL) com citrato de sódio como anticoagulante,⁹ o qual foi empregado na produção do PRP, seguindo o protocolo proposto por Vendramin, et al.⁸

A amostra de sangue foi submetida a uma centrifugação (centrífuga Excelsa II Modelo 206-BL Fanem[®]) a 200 gravidades (G) por 10 min, permitindo a formação de duas camadas: uma inferior, vermelha, com as hemácias e outra superior, amarela, com plasma e plaquetas. Entre essas duas camadas havia uma faixa fina e esbranquiçada denominada zona de névoa, contendo leucócitos e plaquetas maiores.

Todo o plasma e 200 μ L da zona de névoa foram pipetados para um tubo seco e estéril e encaminhado para nova centrifugação (400 G por 10 min). Além disso, foram transferidos mais 200 μ L da zona de névoa para um segundo tubo seco e estéril.

Após a segunda centrifugação, formaram-se dois níveis distintos: um superior amarelo e outro no fundo do tubo, vermelho, que correspondem respectivamente ao plasma pobre em plaquetas (PPP) e ao botão eritrocítico-plaquetário. O sobrenadante (PPP) foi descartado e 200 μ L da parte correspondente ao botão eritrocítico-plaquetário foram transferidos para o tubo contendo a zona de névoa previamente separada. Em seguida, este tubo foi homogeneizado com o intuito de ocorrer a dispersão das plaquetas e formação do PRP, totalizando 400 μ L. No momento do tratamento da ferida, adicionou-se ao tubo gluconato de cálcio a 10%, na proporção de 4:1 (400 μ L de PRP para 100 μ L de gluconato de cálcio) para a formação do gel que foi obtido após 5 a 10 min em banho-maria (37°C). O volume final de PRP em forma de gel foi de aproximadamente 0.5 mL.

Avaliação macroscópica

Todos os animais foram submetidos a avaliações morfológicas e morfométricas em diferentes momentos durante o período de experimento, no M0, M3, M7, M10, M14 e M17 (17 dias).

Os coelhos foram avaliados quanto ao peso (Kg) utilizando balança eletrônica digital (ELC-10[®]) e suas lesões fotografadas por câmara digital modelo Coolpix P510 (Nikon[®]).

Os parâmetros clínicos relacionados à evolução do processo cicatricial utilizados neste trabalho foram baseados em estudos sobre cicatrização de feridas cutâneas,^{25,26} com adaptação de seus escores, tais como: sensibilidade dolorosa (0- ausente; 1- presente, considerada quando havia uma ou mais mudanças no comportamento do animal, tais como: inquietude, agitação, vocalização e movimento de virar a cabeça com intenção de morder após contato com a lesão),²⁷ coloração da ferida (1- rósea; 2- amarelada; 3- pálida; 4- cianótica), edema, hiperemia, exsudato, crosta e tecido de granulação (0- ausente; 1- presente), características do exsudato quando aplicado (1- seroso; 2- sanguinolento; 3- purulento).

Para proceder à análise morfométrica, os animais foram submetidos à reintervenção anestésica adotando o mesmo protocolo utilizado para indução das feridas. Empregando-se um paquímetro digital milimetrado (DC-60 Western[®]) foi realizada a mensuração dos diâmetros maior e menor da ferida e, a partir desses elementos, foi calculada a área utilizando-se da equação matemática descrita por Prata et al.:²⁸ $A = \pi \times R \times r$, onde A = área da ferida, R = raio maior, r = raio menor. O cálculo do percentual de contração da ferida foi expresso por meio da fórmula utilizada por Ribeiro et al.:²⁵ $Af - Ai / Ai \times 100$, onde Ai = área inicial da ferida (M0) e Af = área final da ferida (M17).

Processamento e avaliação histológica das amostras

No M17 (último dia de experimento), após a sedação dos animais utilizando o mesmo protocolo anestésico mencionado anteriormente, a biópsia foi realizada com auxílio de um *punch* de 8 mm de diâmetro, abrangendo área central e borda da ferida. Os fragmentos de pele retirados foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 h e posteriormente inclusos em parafina. Cortes de 5 µm foram obtidos e corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) para avaliação global dos cortes de tecido e pelo Tricrômio de Masson para identificação das fibras colágenas. A análise histológica foi realizada pelo mesmo patologista sem o conhecimento prévio da identificação das amostras. Os dados obtidos pelas técnicas de coloração foram classificados de acordo com a intensidade em que foram encontrados e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico, sendo eles: crosta fibrino-leucocitária (0- ausente, 1- presente), quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas (0- ausente, 1- pequena, 2- moderada, 3- grande), neovascularização (0- ausente, 1- discreta, 2- moderada, 3- intensa), intensidade do processo inflamatório (0- sem inflamação; 1- leve; 2- moderada; 3- severa), bem como o tipo de célula inflamatória presente (1- neutrófilos, 2- linfócitos 3- mista), concentração de macrófagos (0- ausente, 1- discreta, 2- moderada, 3- intensa) e reepitelização (0- ausente, 1- parcial, 2- total).²⁹

Análise estatística

Para determinar se o peso corpóreo dos animais, bem como o percentual de contração e área total das lesões Controle (A) e Tratada (B) diferiram entre momentos, recorreu-se ao teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, com verificação do pressuposto de esfericidade dos dados pelo teste de Mauchly e contrastes pelo método de Sidak. As duas últimas variáveis foram comparadas entre as feridas (A) e (B), dentro de cada momento, pelo teste t não pareado. Para verificar se os parâmetros histológicos diferiram entre as feridas (A) e (B), recorreu-se ao teste não paramétrico de Wilcoxon. Os parâmetros clínicos das lesões mensuradas por escores, comparados entre momentos, tanto das feridas (A) como das feridas (B), foram analisados pelo teste não paramétrico de Friedman, com contrastes pelo teste de Dunn e, quando comparados entre elas ((A) x (B)) dentro de cada momento, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para todas as análises utilizou-se o programa computacional SPSS, v. 13.0 e adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Resultados e discussão

A plaquetometria do PRP está diretamente relacionada à contagem plaquetária inicial, a qual deve estar de acordo com os valores referenciados para a espécie no sangue basal. Neste estudo, o animal doador apresentou contagem inicial de 266×10^3 plaquetas/ μL , confirmando a viabilização de suas amostras para o preparo do PRP.²⁴

Técnica de dupla centrifugação e força de rotação selecionada para obtenção do PRP evitou a liberação antecipada dos fatores de crescimento contido nas plaquetas,²⁴ promovendo sua ação no processo de reparação das feridas Tratada (B). A ativação plaquetária por meio da adição de gluconato de cálcio a 10% imediatamente antes do tratamento dessas lesões nos assegurou, de acordo com Maia e Souza,⁵ uma adequada concentração desses fatores no PRP, sendo os mais importantes: fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I).³

Todos os animais utilizados não apresentaram estresse aparente, alimentando-se normalmente e sem alterações de comportamento sugestivas de dor. Assim como em nosso estudo, alguns autores que trabalharam com PRP na cicatrização de feridas, observaram sua ação direta na diminuição da dor no local da lesão,³⁰ bem como na redução da exigência de analgésicos em pós-operatório de pacientes submetidos à artroplastia de joelho³¹ e à cirurgia de rejuvenescimento facial.¹⁴

O processo de reparação tecidual compreende três fases principais com características próprias que se desenvolvem concomitantemente, sendo elas: fase inflamatória, caracterizada pela presença de células inflamatórias³² e sinais flogísticos no local da lesão, como edema, hiperemia e exsudato;²⁵ fase proliferativa, com formação do tecido de granulação e deposição de fibras colágenas e elásticas, e a fase de remodelação, onde ocorre uma diminuição do tamanho da cicatriz.³²

O aspecto das lesões Controle (A) e Tratada (B) permaneceu com coloração rósea no decorrer do experimento, sem características macroscópicas de contaminação ou presença de tecido necrótico. Caracterizando o pico da fase inicial do processo inflamatório,²⁵ edema discreto foi observado ao redor das feridas tratadas com gel de PRP heterólogo (2/6) no M3, mantida em uma delas no momento M10, e total desaparecimento nas avaliações subseqüentes. Leve hiperemia foi verificada em uma dessas feridas no M3. Características clínicas similares não foram observadas nas feridas Controle (A). Semelhantemente, DeRossi et al.¹⁸ registraram resposta inflamatória nos primeiros dias após a indução de lesões de equinos com diminuição após 12 dias do procedimento cirúrgico. A presença de exsudato inflamatório não foi observada em nenhuma das lesões do atual estudo, corroborando com descrição feita por outros autores.^{23,30}

O uso do gel de PRP heterólogo não implicou na presença de sinais sugestivos de infecção ou reação alérgica nas lesões Tratada (B), o que também não foi relatado por Rezende et al.¹⁶ ao utilizarem PRP heterólogo líquido intra-articular, em coelhos. Resultados semelhantes foram observados em tratamentos com PRP autólogo em humanos.^{33,34} A ausência de infecção observada deve-se à presença de quantidades variáveis de leucócitos com atividade antimicrobiana no PRP.^{7,35} No entanto, devemos ressaltar que, no estudo atual, as feridas cirúrgicas eram limpas e a aplicação de técnica

asséptica no manuseio do sangue durante a preparação e utilização do PRP, contribuíram para esse achado.

Neste trabalho, a presença de crosta seca foi observada em 80% do total das lesões estudadas, em diferentes momentos a partir do M7, com diferença estatisticamente significativa ($p=0.03$) no M10, demonstrando uma maior evidência na ferida Controle (A) (5/6) em relação à ferida Tratada (B) (1/6). Diferença estatisticamente significativa não foi encontrada no M14 e M17 ($p>0.05$) estando de acordo com as características epiteliais histológicas realizadas no M17. Algumas crostas destacaram-se espontaneamente a partir do M10 em ambas as lesões, não ocorrendo sangramento após a retirada das remanescentes no M14. Tal procedimento, também utilizado por Oliveira et al.,³⁶ além de facilitar a avaliação macroscópica, aumentou a área de tecido viável em contato com a lesão e permitiu a aplicação da solução fisiológica e do gel de PRP diretamente sobre o leito das feridas Controle (A) e Tratada (B), respectivamente.

Em nenhum momento das avaliações deste estudo foi perceptível a formação de tecido de granulação. Segundo Ribeiro et al.,²⁵ alguns fatores são responsáveis por promover a hipergranulação tecidual, como a localização da lesão, mobilidade da região, perfusão tecidual alterada, infecções e traumas. De acordo com a justificativa apontada pelos autores, uma vez que não estava presente nenhum dos fatores expostos, é possível compreender porque a hipergranulação não foi observada nessa avaliação.

No processo fisiológico da cicatrização, o infiltrado inflamatório tende a diminuir à medida que o colágeno se concentra,³⁷ normalmente por volta dos 14 dias.²³ Confirmado por meio da avaliação microscópica no M17, verificou-se o predomínio de moderada quantidade de fibroblastos (Figura 2 (c) e (d)) e fibras colágenas (detalhadas na Figura 2 (e) e (f)), bem como pela discreta presença de vasos sanguíneos neoformados (Figura 2 (c) e (d)) tanto nas feridas Controle (A) como Tratada (B), não estatisticamente significantes, caracterizando o início da última fase da cicatrização (remodelação) descrita por Oliveira e Dias.³² No entanto, embora não houvesse diferença significativa nos resultados a seguir ($p > 0.05$), a análise histológica revelou que 90% (5/6) das feridas tratadas com gel de PRP heterólogo apresentavam infiltrado inflamatório neutrofílico-linfocitário variando de leve a moderado (Figura 2 (d)) com discreta presença de macrófagos, contrapondo à leve infiltrado neutrofílico-linfocitário em 10% (1/6) das feridas Controle (A) e, portanto, ausência em 90% delas (Figura 2 (c)). Discreta concentração de macrófagos foi observada em menor número nas feridas tratadas com soro fisiológico (4/6). Yamada et al.¹⁹ ao avaliarem o efeito do PRP autólogo em lesões condrais articulares, concluíram, através da análise do líquido sinovial, que o tratamento também não minimizou de forma significativa o grau de inflamação articular em relação ao grupo tratado com solução salina. Os mesmos autores apontaram como solução mais provável que, apesar dos efeitos antiinflamatórios do PRP demonstrados em alguns estudos,^{20,23,35} plaquetas degranuladas em lesões

tissulares podem ser capazes de ativar mediadores químicos como as citocinas, podendo alterar a resposta inflamatória durante o reparo tecidual.

Em relação à área das lesões, observou-se decréscimo estatisticamente significativo tanto das feridas Controle (A) como Tratada (B) ao longo do tempo (Figura 3). No entanto, a comparação das duas feridas não evidenciou o efeito do gel de PRP heterólogo na redução da área cirúrgica com relação ao tratamento feito com solução fisiológica, visto que as médias percentuais de contração entre as duas feridas não demonstraram diferenças significativas nos cinco momentos de observação (Figura 4 e Tabela 1). Estes achados diferem dos obtidos em outros trabalhos que tiveram resultados superiores com o uso do gel de PRP,^{16,33,38,39} mas é semelhante aos resultados de Bauer et al.²³

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão da contração das feridas (%) tratadas com solução fisiológica (A) e com gel de plasma rico em plaquetas heterólogo (B).

Momentos (dias)	Contração das feridas (%)		Significância (p)
	A	B	
M3	18,42±14,21	23,28±12,24	0.540
M7	27,68±18,08	38,08±13,34	0.283
M10	43,46±25,33	50,54±10,86	0.543
M14	80,64±28,60	84,14±12,40	0.789
M17	96,44±7,93	96,74±4,69	0.938

Na avaliação macroscópica, a evolução do processo cicatricial ocorreu de forma semelhante entre as feridas do estudo, conforme demonstrada na Figura 5. Completo

fechamento da lesão foi observado mais precocemente em apenas uma ferida Controle (A) (1/6) no M14, enquanto que nenhuma das feridas Tratada (B) encontravam-se totalmente cicatrizadas nesse mesmo período. No momento subsequente (M17), o número de lesões com fechamento completo foi idêntico para as duas feridas (3/6). Uma das características da última fase do processo de reparação tecidual é a regressão endotelial⁴⁰ e, corroborando com esta informação, microscopicamente 100% (6/6) das feridas Tratada (B) encontravam-se totalmente reepitelizadas no 17º dia de pós-operatório (M17), não diferindo estatisticamente das feridas Controle (A) com 90% (5/6) (Figura 2 (a) e (b)). Diante do exposto, em casos como este que estudamos feridas não associadas a um comprometimento sanguíneo e localizadas em região com boa circulação,²⁵ as feridas cicatrizaram normalmente e o PRP heterólogo não foi capaz de reduzir o processo de cicatrização além do normal. Em contraste, alguns trabalhos que apresentaram efeitos benéficos do PRP, estudaram feridas crônicas, localizadas em regiões periféricas ou em pacientes com algum tipo de comprometimento circulatório.^{10,15,16,34,39,40}

Conclusão

Dentro das condições experimentais utilizadas neste estudo, podemos afirmar que o tratamento com gel de PRP heterólogo foi capaz de promover a cicatrização de feridas dérmicas em coelhos, sem efeitos prejudiciais.

Referências

1. Mestre T, Rodrigues A and Cardoso J. Wound healing - therapeutics. *Revista SPDV* 2012; 70(2): 423-433.
2. Suzuki S, Marimoto N and Ikada Y. Gelatin gel as a Carrier of platelet-derived growth factors. *J Biomater Appl* 2013; 28(4): 595-606.
3. Yin Z, Yang X, Jiang Y, et al. Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: An in vitro study. *J Biomater Appl* 2014; 28(7): 1039-1050.
4. Vendruscolo CP, Watanabe MJ, Maia L, et al. Platelet-rich plasma: a new therapeutic approach for equine medicine. *Vet e Zootec* 2012; 19(1): 33-43
5. Maia L and Souza MV. Componets rich in platelets used in wound healing tendon, ligaments and osteo-articular diseases of animals. *Ciênc Rural* 2009; 39(4): 1279-1286.
6. Molina-Miñano F, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, et al. Plasma rich in growth factors and bone formation: a radiological and histomorphometric study in New Zealand rabbits. *Braz Oral Res* 2009; 23(3): 275-280.
7. Yuan T, Zhang CQ, Wang JHC. Augmenting tendon and ligament repair with platelet-rich plasma (PRP). *Muscles Ligaments Tendons J*; 2013; 3(3): 139-149.
8. Vendramin FS, Franco D and Franco TR. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. *Rev Bras Cir Plást* 2009; 24(2): 212-218.
9. Vanat N, Medeiros TNS, Balarin MRS, et al. Technique modification for platelet – rich plasma prepare in dogs. *Semina Ciênc Agrar* 2012; 33(1): 313-322.
10. Kaux, JF and Crielaard JM. Platelet-rich plasma application in the management of chronic tendinopathies. *Acta Orthop Belg* 2013; 79(1): 10-15.
11. Lacci KM and Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med* 2010; 83(1): 1-9.
12. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(6): 638-646.
13. Vendramin FS, Franco D and Franco TR. Use of autologous platelet-rich plasma in skin grafts surgeries in chronic wounds. *Rev Bras Cir Plást* 2010; 25(4): 589-594.
14. Almeida ARH, Menezes JA, Araújo GKM, et al. Platelet-rich plasma, platelet-poor plasma and fat grafts use in face liftings: case reports. *Rev Bras Cir Plást* 2008; 23(2): 82-88.
15. [Shan GQ](#), [Zhang YN](#), [Ma J](#), et al. Evaluation of the effects of homologous platelet gel on healing lower extremity wounds in patients with diabetes. *Int J Low Extrem Wounds* 2013; 42(1): 22-29.

16. Rezende UM, Silva RBB, Bassit ACF, et al. Effect of platelet-rich plasma on impact induced chondrocyte apoptosis. *Acta Ortop Bras* 2011; 19(2): 102-105.
17. Kaffashi Elahi R, Mousavi, GH and Mohajeri D. Effects of topical heterologous blood serum and bovine thrombin activated platelet rich plasma on experimental corneal stromal ulcers in rabbit. *Adv Environ Biol* 2012; 6(1): 95-99.
18. DeRossi R, Coelho ACAO, Mello GS, et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cir Bras* 2009; 24(4): 276-281.
19. Yamada ALM, Carvalho AM, Oliveira PGG, et al. Platelet-rich plasma in the treatment of articular chondral defects experimentally induced in horses: clinical, macroscopic, histopathological and histochemical evaluation. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2012; 64(2): 323-332.
20. Silva RF, Carmona JU and Rezende CMF. The use of intra-articular platelet rich-plasma as a postsurgical treatment of cranial cruciate ligament rupture in a dog. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2012; 64(4): 847-852.
21. Kanashiro GP, Cassu RN. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade SF. *Manual de terapêutica veterinária*. 3rd ed. São Paulo: Roca, 2008, pp.728-745.
22. Paolozzi RJ, Cassu RN, Cruz SF et al. Different doses of tramadol in dogs: analgesic, sedative and cardiopulmonary effects. *Cienc Rural* 2011; 41(8): 1417-1423.
23. Bauer JA, Correa L, Lima FLM, et al. Effect of platelet-rich plasma on the standardized dermal wound healing in rats. *Periodontia* 2009; 19(3): 98-108.
24. Aleixo GAS, Coelho MCOC, Teixeira MN, et al. Comparison between two protocols to obtain platelet-rich plasma in dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2011; 63(3): 567-573.
25. Ribeiro G, Martins CB, Silva MAG, et al. Topical use of ketanserin on healing of experimentally-induced skin wounds in horses. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61(1): 144-148.
26. Martins MF, Caetano FAM, Sírío OJ et al. Evaluation of the *Achatina fulica* snail mucoglycoprotein secretion in surgical injury done in rabbits. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2003; 40(3): 213-218.
27. Pohl VH, Carregaro AD, Lopes C, et al. Correlation between visual analog scale, Melbourne pain scale and Von Frey filaments in post-operative pain evaluation in bitches submitted to ovariectomy. *Cienc Rural* 2011; 41(1): 154-159.
28. Prata MB, Haddad CM, Goldenberg S, et al. Use tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em rato. *Acta Cir Bras* 1988; 3(2): 43-48.
29. Mori, GG, Moraes IG, Nunes DC, et al. Biocompatibility evaluation of alendronate paste in rat's subcutaneous tissue. *Traumatology* 2009; 25: 209-212.

30. Carter MJ, Fylling CP, Parnell, LKS. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty* 2011; 11(e38): 382-410.
31. Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, et al. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. *Int Orthop* 2007; 31(3): 309-313.
32. Oliveira IVP and Dias RVC. Wound healing: stages and influencing factors. *Acta Veterinaria Brasilica* 2012; 6(4): 267-271.
33. Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, et al. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury, Int J Care Injured* 2008; 40(8): 801-805.
34. Malavolta EA, Gracitelli MEC, Sunada EE, et al. Platelet-rich plasma in arthroscopic repairs of complete tears of the rotator cuff. *Rev Bras Ortop* 2012; 47(6): 741-747.
35. Anitua E, Prado R, Sánchez M, et al. Platelet-rich plasma: preparation and formulation. *Oper Tech Orthop* 2012; 22(1): 25-32.
36. Oliveira ST, Leme MC, Pippi NL, et al. Preparations of comfrey (*Symphytum officinale L.*) on cutaneous wound healing in rats. *Rev FZVA* 2000; 7/8(1): 65-74.
37. Nunes JT, Araújo KS and Melo Neto PM. Histological study of wound healing using milk colostrum. *Conscientiae Saúde* 2012; 11(3): 377-382.
38. Anitua E, Aquirre JJ, Algorta J, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 84(2): 415-421.
39. Rezaie A, Mousavi G, Mohajeri D, et al. Effect of autogenous platelet-rich plasma (PRP) on femoral cancellous bone defect healing in Alloxan-induced diabetic rabbits. *Aust J of Basic and Appl Sci* 2011; 5(5): 800-808.
40. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. *Acta Cir Bras* 2006; 21(3): 55-65.



Figura 1. Gel de plasma rico em plaquetas (PRP) heterólogo cobrindo todo o leito e borda da ferida Tratada (B).

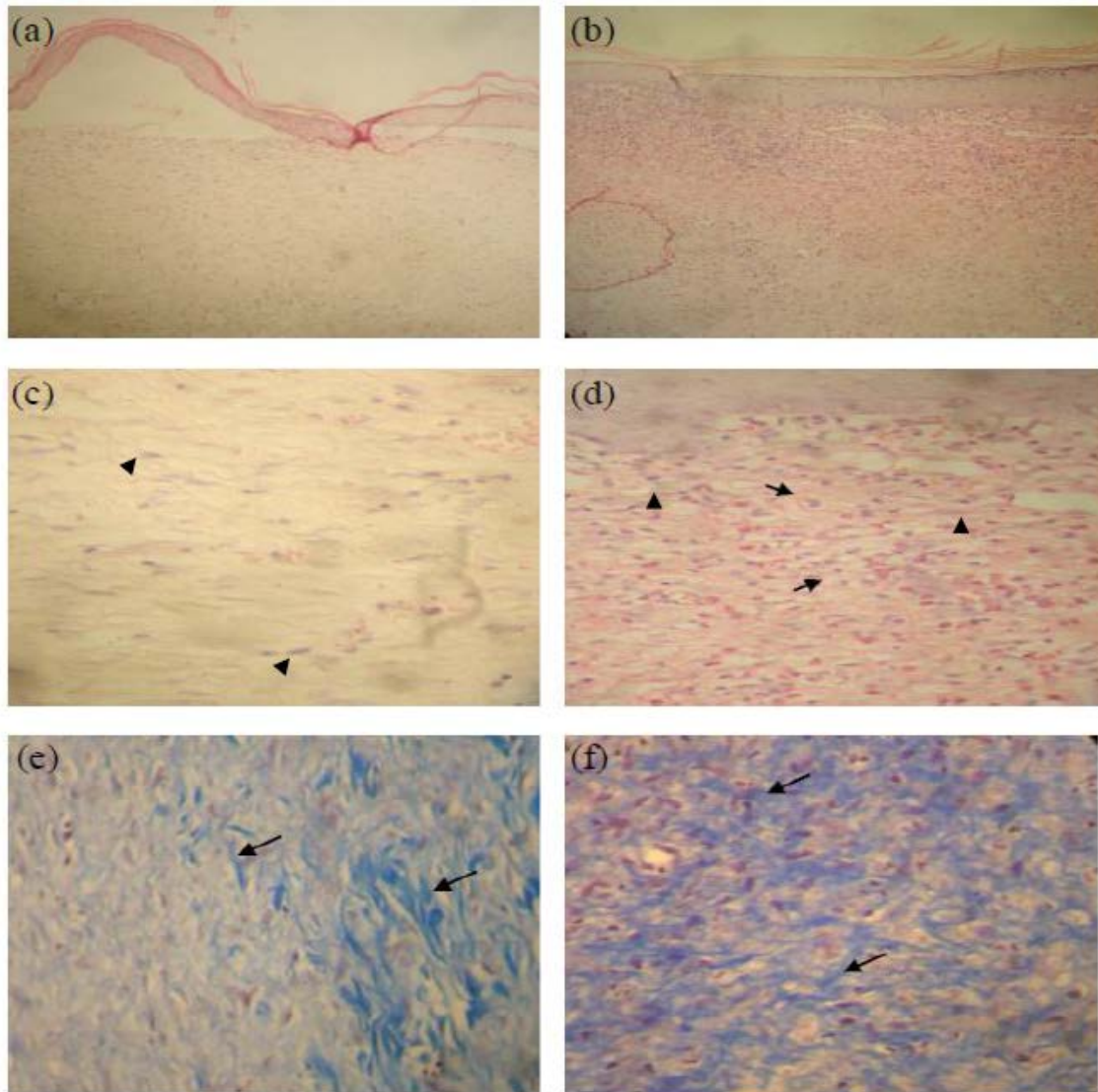


Figura 2. Fotomicroscopia das feridas Controle (esquerda) representada pelas letras (a), (c), (e) e Tratada (direita), representada pelas letras (b), (d), (f). Hematoxilina-eosina. (a) e (b) (aumento de 100 \times) – reepitelização total, (c) (aumento de 400 \times) – discreta neovascularização, ausência de infiltrado inflamatório e moderado número de fibroblastos (cabeça de seta), (d) (aumento de 400 \times) – discreta neovascularização, moderado infiltrado inflamatório linfocítico (seta menor) e moderado número de fibroblastos (cabeça de seta). Tricrômio de Massom. (e) e (f) (aumento de 100 \times) – detalhe das fibras colágenas (seta maior).

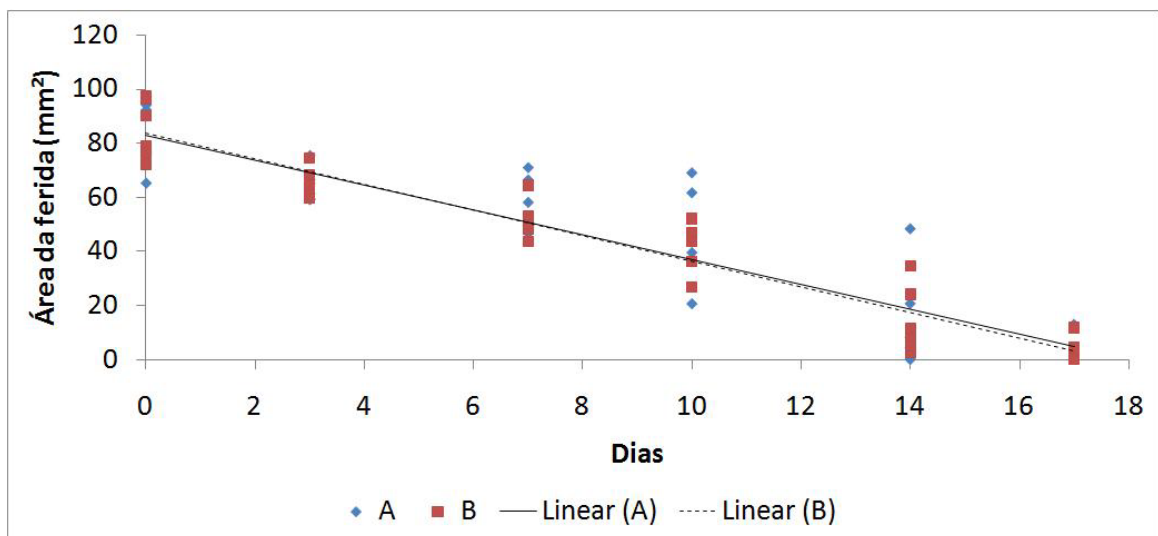


Figura 3. Avaliação morfométrica das feridas Controle (A) e tratada com gel de PRP heterólogo (B). Observar o decréscimo de forma linear da área das lesões (A) e (B) no decorrer do experimento.

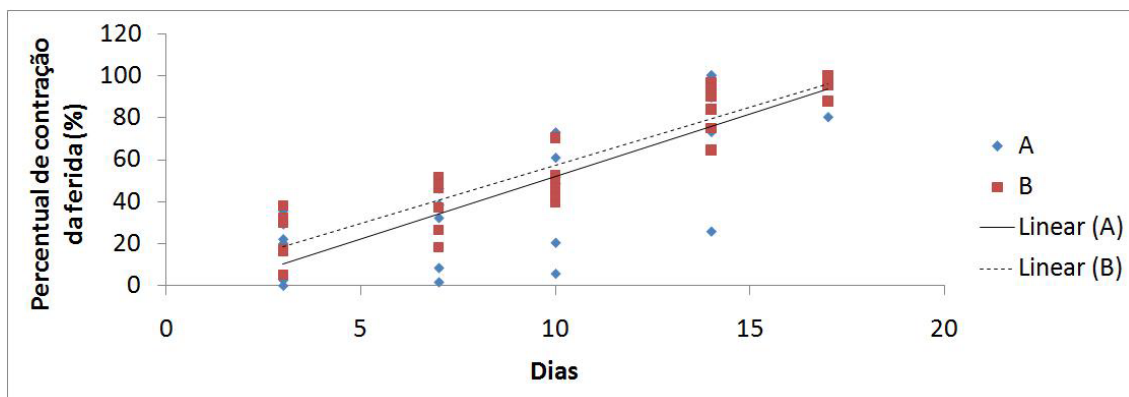


Figura 4. Percentual de contração das feridas Controle (A) e tratada com gel de PRP heterólogo (B). Observar o aumento semelhante de regressão tecidual das lesões (A) e (B) no decorrer dos dias avaliados.

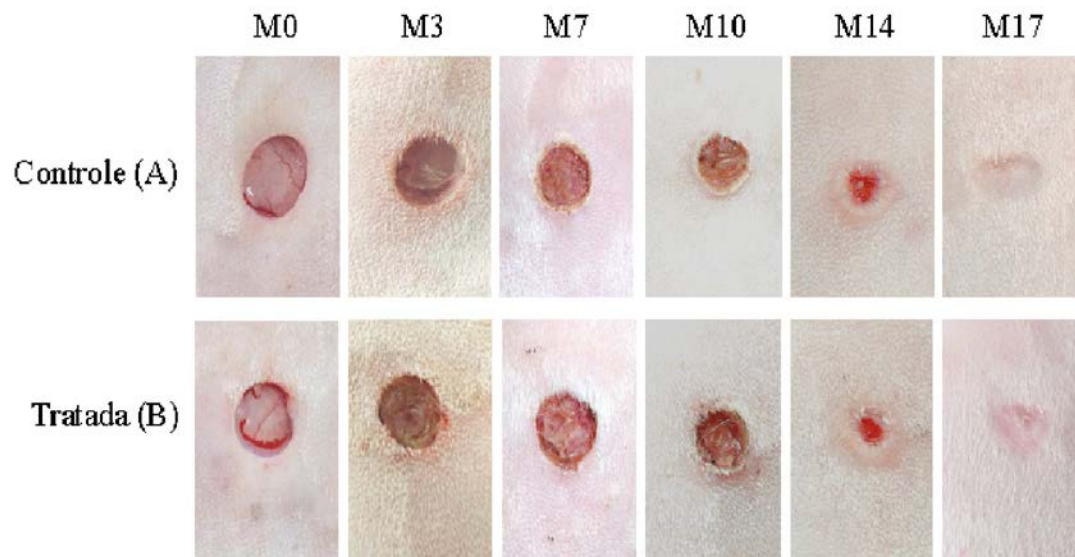


Figura 5. Coelho 6: Aspecto macroscópico das lesões. Observar a semelhança da evolução do processo cicatricial das lesões Controle (A) e tratada com gel de PRP heterólogo (B) nos diferentes momentos de avaliação (M0, M3, M7, M10, M14, M17).

ANEXO

Manuscript Submission Guidelines

Journal of Biomaterials Applications

1. [Peer review policy](#)
2. [Article types](#)
3. [Authorship](#)
4. [How to submit your manuscript](#)
5. [Journal contributor's publishing agreement](#)
 - 5.1 [SAGE Choice and Open Access](#)
6. [Statements and conventions](#)
 - 6.1 [Acknowledgments](#)
 - 6.2 [Declaration of conflicting interests](#)
 - 6.3 [Funding acknowledgement](#)
 - 6.4 [Other statements and conventions](#)
7. [Permissions](#)
8. [Manuscript style](#)
 - 8.1 [File types](#)
 - 8.2 [Journal style](#)
 - 8.3 [Reference style](#)
 - 8.4 [Manuscript preparation](#)
9. [After acceptance](#)
 - 9.1 [Proofs](#)
 - 9.2 [E-Prints](#)
 - 9.3 [SAGE production](#)
 - 9.4 [OnlineFirst publication](#)
10. [Further information](#)

Journal of Biomaterials Applications is a fully peer reviewed international journal that publishes original research and review articles that emphasize the development, manufacture and clinical applications of biomaterials.

1. Peer review policy

Journal of Biomaterials Applications operates a conventional single-blind reviewing policy in which the reviewer's name is always concealed from the submitting author.

All manuscripts are reviewed initially by the Editors and only those papers that meet the scientific and editorial standards of the journal, and fit within the aims and scope of the journal, will be sent for outside review.

Authors are requested to suggest the names, affiliations and contact information of up to six individuals who may be suitable to serve as referees, but the Editors are under no obligation to use all or any of these individuals as reviewers.

Peer Review Process: We endeavour to obtain at least 2 referee's reports. All manuscripts are reviewed as rapidly as possible, and an editorial decision is generally reached within 4-6 weeks of submission

[Back to top](#)

2. Article types

Journal of Biomaterials Applications publishes original research and review articles that emphasize the development, manufacture and clinical applications of biomaterials. The Journal considers the following kinds of article for publication:

Peer-reviewed articles by biomedical specialists from around the world cover:

- New developments in biomaterials ·R&D, properties and performance, evaluation and applications
- Applications in biomedical materials and devices - from sutures and wound dressings to biosensors and cardiovascular devices
- Current findings in biological compatibility/incompatibility of biomaterials

[Back to top](#)

3. Authorship

Papers should only be submitted for consideration once the authorization of all contributing authors has been gathered. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

1. have made a substantial contribution to the concept and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data
2. drafted the article or revised it critically for important intellectual content
3. approved the version to be published.

Authors should meet the conditions of all of the points above. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Please refer to the ICMJE Authorship guidelines at http://www.icmje.org/ethical_1author.html.

[Back to top](#)

4. How to submit your manuscript

Before submitting your manuscript, please ensure you carefully read and adhere to all the guidelines and instructions to authors provided below. Manuscripts not conforming to these guidelines may be returned.

Journal of Biomaterials Applications is hosted on SAGE track a web based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Please read the Manuscript Submission guidelines below, and then simply visit [http:// http://mc.manuscriptcentral.com/jba](http://mc.manuscriptcentral.com/jba) to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne [Online Help](#).

All papers must be submitted via the online system. If you would like to discuss your paper prior to

submission, please refer to the contact details below.

If you would like to discuss your paper prior to submission, or seek advice on the submission process please contact the Managing Editor, Jonathan Knowles, at the following email address: JBA@eastman.ucl.ac.uk

Submissions should be made by logging in and selecting the Author Center and the 'Click here to Submit a New Manuscript' option. Follow the instructions on each page, clicking the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen. If at any stage you have any questions or require the user guide, please use the 'Get Help Now' button at the top right of every screen. Further help is available through ScholarOne's® Manuscript Central™ customer support at +1 434 817 2040 x 167.

To upload your files, click on the 'Browse' button and locate the file on your computer. Select the designation of each file (i.e. main document, submission form, figure) in the drop down next to the browse button. When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button

Review your submission (in both PDF and HTML formats) and then click the Submit button

You may suspend a submission at any point before clicking the Submit button and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation e-mail. You can also log back into your author centre at any time to check the status of your manuscript.

Please ensure that you submit editable/source files only (Microsoft Word or RTF) and that your document does not include page numbers; the Journal of Biomaterials Applications SAGETRACK system will generate them for you, and then automatically convert your manuscript to PDF for peer review. Furthermore, it is imperative that authors remove from their submissions any information that will identify them or their affiliations to reviewers. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be by email.

[Back to top](#)

5. Journal contributor's publishing agreement

Before publication SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is an exclusive licence agreement which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the society. For more information please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the SAGE Journal Author Gateway.

Journal of Biomaterials Applications and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of articles published in the Journal. Equally, we seek to protect the reputation of the Journal against malpractice.

Submitted articles may be checked with duplication-checking software. Where an article is found to have plagiarised other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where the authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article (removing it from the journal); taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; banning the author from publication in the journal or all SAGE journals, or appropriate legal action.

5.1 SAGE Choice and Open Access

If you or your funder wish your article to be freely available online to non subscribers immediately

upon publication (gold open access), you can opt for it to be included in SAGE Choice, subject to payment of a publication fee. The manuscript submission and peer review procedure is unchanged. On acceptance of your article, you will be asked to let SAGE know directly if you are choosing SAGE Choice. To check journal eligibility and the publication fee, please visit [SAGE Choice](#). For more information on open access options and compliance at SAGE, including self author archiving deposits (green open access) visit [SAGE Publishing Policies](#) on our Journal Author Gateway.

[Back to top](#)

6. Statements and conventions

6.1. Acknowledgements

Any acknowledgements should appear first at the end of your article prior to your Declaration of Conflicting Interests (if applicable), any notes and your References.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an 'Acknowledgements' section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

6.2 Declaration of conflicting interests

Within your Journal Contributor's Publishing Agreement you will be required to make a certification with respect to a declaration of conflicting interests. *Journal of Biomaterials Applications* does not require a declaration of conflicting interests but recommends you review the good practice guidelines on the [SAGE Journal Author Gateway](#).

6.3 Funding Acknowledgement

To comply with the guidance for Research Funders, Authors and Publishers issued by the Research Information Network (RIN), *Journal of Biomaterials Applications* additionally requires all Authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. Please visit [Funding Acknowledgements](#) on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding or state in your acknowledgments that: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

6.4 Other statements and conventions

Non applicable.

[Back to top](#)

7. Permissions

Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the SAGE Journal Author Gateway.

[Back to top](#)

8. Manuscript style

8.1 File types

Only electronic files conforming to the journal's guidelines will be accepted. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are Word DOC, RTF, XLS. LaTeX files are also accepted. Please also refer to additional guideline on submitting artwork below.

8.2 Journal Style

Journal of Biomaterials Applications conforms to the SAGE house style. [Click here](#) to review guidelines on SAGE UK House Style.

8.3 Reference Style

Journal of Biomaterials Applications adheres to the SAGE Vancouver reference style. [Click here](#) to review the guidelines on SAGE Vancouver to ensure your manuscript conforms to this reference style.

If you use [EndNote](#) to manage references, download the SAGE Vancouver output file by following [this link](#) and save to the appropriate folder (normally for Windows C:\Program Files\EndNote\Styles and for Mac OS X Harddrive:Applications:EndNote:Styles). Once you've done this, open EndNote and choose "Select Another Style..." from the dropdown menu in the menu bar; locate and choose this new style from the following screen.

8.4 Manuscript Preparation

The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3cm for left and right hand margins and 5cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point.

8.4.1 Your Title, Keywords and Abstracts: Helping readers find your article online

The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article online through online search engines such as Google. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting SAGE's Journal Author Gateway Guidelines on [How to Help Readers Find Your Article Online](#).

8.4.2 Corresponding Author Contact details

Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Academic affiliations are required for all co-authors. These details should be presented separately to the main text of the article to facilitate anonymous peer review.

8.4.3 Guidelines for submitting artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#).

Figures supplied in colour will appear in colour online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For specifically requested colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from SAGE after receipt of your accepted article.

Centred title should be brief, followed by centred name, affiliation, address, country, and postal code (zip) of author(s). Indicate to whom correspondence and proofs should be sent, including a telephone number, fax number and e-mail address.

Include a 300-word abstract and a list of key words.

ILLUSTRATIONS

Artwork should be supplied as EPS files, or TIFF files at a minimum resolution of 300 dpi for superior reproduction.

Lettering should be planned for 50% reduction; text should be readable after reduction.

Illustrations should be referred to as Figure 1, Figure 2 etc.

TABLES. Number consecutively and type on a numbered, separate page.

Please use arabic numerals and supply a heading. Column headings should be explanatory and carry units. Do not include vertical rules.

UNITS & ABBREVIATIONS. SI units should be used.

SYMBOLS. A list of symbols used and their meanings should be included if a large number of symbols appears in the text.

8.4.4 Guidelines for submitting supplemental files

Journal of Biomaterials Applications does not currently accept supplemental files.

8.4.5 English Language Editing services

Non-English speaking authors who would like to refine their use of language in their manuscripts might consider using a professional editing service. Visit [English Language Editing Services](#) on our Journal Author Gateway for further information.

[Back to top](#)

9. After acceptance

9.1 Proofs

We will email a PDF of the proofs to the corresponding author for checking and correction. Proofs should be corrected carefully; the responsibility for detecting errors lies with the author.

9.2 E-Prints

SAGE provides authors with access to a PDF of their final article. For further information please visit [Offprints and Reprints](#) on our Journal Author Gateway.

9.3 SAGE Production

At SAGE we place an extremely strong emphasis on the highest production standards possible. We attach high importance to our quality service levels in copy-editing, typesetting, printing, and online publication (<http://online.sagepub.com/>). We also seek to uphold excellent author relations throughout the publication process.

We value your feedback to ensure we continue to improve our author service levels. On publication all corresponding authors will receive a brief survey questionnaire on your experience of publishing

in *Journal of Biomaterials Applications* with SAGE.

9.4 OnlineFirst Publication

A large number of journals benefit from OnlineFirst, a feature offered through SAGE's electronic journal platform, SAGE Journals Online. It allows final revision articles (completed articles in queue for assignment to an upcoming issue) to be hosted online prior to their inclusion in a final print and online journal issue which significantly reduces the lead time between submission and publication. For more information please visit our [OnlineFirst Fact Sheet](#).

[Back to top](#)

10. Further information

Any correspondence, queries or additional requests for information on the Manuscript Submission process should be sent to the Editorial Office as follows:

Jonathan Knowles, at the following email address: JBA@eastman.ucl.ac.uk

[Back to top](#)



SAGE UK Style Guide

CONTENTS

1.		
2.	<u>Article opening material</u>	3
	2.1 <u>Headings</u>	3
	2.2 <u>Article types</u>	3
	2.3 <u>Article title</u>	3
	2.4 <u>Author names, affiliations, and corresponding address</u>	4
	2.5 <u>Abstract and keywords</u>	5
	2.6 <u>Running heads</u>	5
3.	<u>General style and layout</u>	6
	3.1 <u>Logo and imprint box</u>	6
	3.2 <u>Figures</u>	6
	3.3 <u>Tables</u>	6
	3.4 <u>Lists</u>	7
	3.5 <u>Maths/equations</u>	7
	3.6 <u>Appendices</u>	7
	3.7 <u>Note and footnotes</u>	8
	3.8 <u>Book reviews</u>	9
4.	<u>Spelling, punctuation and formatting</u>	9
	4.1 <u>Author style/voice</u>	9
	4.2 <u>General spelling rules</u>	9
	4.3 <u>Punctuation and formatting</u>	9
	4.4 <u>Abbreviations</u>	11
5.	<u>Technical content: maths, equations, etc.</u>	13
	5.1 <u>Maths notation convention</u>	13
	5.2 <u>Equations</u>	13
	5.3 <u>Units</u>	14
	5.4 <u>Symbols and operators</u>	14
6.	<u>Appendices</u>	15
	6.1 <u>General STM acceptable 2-letter abbreviations</u>	15
	6.2 <u>Engineering acceptable 2-letter abbreviations</u>	16

2. Article opening material

2.1 Headings

1. Headings should have an initial capital with everything else lowercase, unless proper names.
2. Italics can be included in A heads (H1) if needed, e.g. mathematical symbol or genus name.
3. Headings are unnumbered and formatted as below.
4. Where headings are referred to in the text use section names, as headings are not numbered.

A head (H1) (bold with initial cap, all the rest lowercase)

Introduction

The mucosa of the small and large intestines is the largest reservoir of tissue macrophages (M ϕ) in both humans and mice.¹ Although M ϕ possess various

B head (H2) (italic with initial cap, all the rest lowercase)

Human samples

Human specimens of normal large intestine were obtained from normal tissues of three patients with colon cancer who had their large intestine resected for

C head (H3) (same as B head, but set as first line of paragraph, full out; italic with initial cap, all the rest lowercase, followed by a full stop. Following text runs on)

Single nucleotide primer extension. The PCR product from bisulfite-treated genomic DNA was cleaned with ExoSAP (USB) prior to SNUPE reaction. For calibra-

Headings for Abstract, Keywords, Funding, Acknowledgements, Conflict of interest (in that order), References, Appendices are same as A head but smaller font size

Acknowledgements

We thank Dr van Lookeren Campagne (Genentech) for providing blocking mAb against CRlg (clone 14G8) and isotype control mAb (anti-ragweed).

(CEs: where a template is being used there is no need to format these. Where no template is being used, please format as bold/italic, but there is no need to mark the font sizes, TS will format.)

2.2 Article types

Where a journal displays article types, these should appear on the first page of each article, left aligned above the horizontal rule, and in italics.

General technical or research papers should be classified as *Original Article* (with uppercase initial caps) for STM, and *Article* for HSS. (Check with the PE, as there is some variation between journals.)

Other usual paper types are as follows: *Review Article*, *Case Study*, *Technical Note*, *Case Report*. Individual journals may also have other paper types, as agreed with the Editor. Where no particular convention has been agreed, *Original Article* should be followed for STM, and *Article* for HSS.

2.3 Article title

Please format with an initial capital only and remaining words lower case, unless proper names. Italics can be included where necessary (e.g. genus name). Run on subtitle after colon, with initial capital after colon.

2.4 Author names, affiliations, and corresponding address

Authors

List authors in the order that they appear on the manuscript. Authors' first name should be in full, middle names should be initials *without* full stops (e.g. Simon PS Sharma) and no spaces between multiple initials. No series comma before the 'and' before the final author name.

Affiliations

Affiliations should contain only the following: department *or* faculty, institution, country. Some HSS journals may have institution and country only. Do not include titles, positions, qualifications, street names, or postcodes/zip codes. Affiliations should *not* end in a full stop.

STM: author names should be annotated with superscripted numbers (CE: do not use automated endnotes against names and affiliations). If all authors are at the same affiliation no superscript numerals are required. Affiliations appear separately with the corresponding address at the bottom of the right column (see next page):

Mark A Creager¹, Reena L Pande¹ and William R Hiatt^{2,3}

HSS: affiliations should directly follow each author name, as follows:

Mark A Creager

(Department of Engineering,) Southampton University, UK

Reena L Pande

(Department of Engineering,) Southampton University, UK

William R Hiatt

County Hospital, CA, USA; Harvard Medical School, USA

Multiple affiliations are separated by a semi-colon.

Corresponding author

The affiliations and corresponding author information is positioned as follows:

Bottom of the right column on the first page of each paper, separated from the text with a horizontal rule (some exceptions apply for specific journals).

Corresponding author:

John Smith, Department of Social Studies, South Bank University, 4 Sample Road, London SE17 9OP, UK
Email: john.smith@sbu.ac.uk

STM: Affiliations and corresponding author details should appear as follows, bottom of right column.

HSS: corresponding author appears in the same position, minus the affiliations.

¹Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Borstel, Germany

²Microbiology Department, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland

³Novartis, Basel, Switzerland

Corresponding author:

Sven Müller-Loennies, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 22, D-23845 Borstel, Germany.
Email: sml@fz-borstel.de

Please remove any fax or telephone numbers, titles (e.g. Dr, Professor), positions (e.g. Senior Lecturer).

Please note: 'Email' with cap E and without hyphen. Email should start a new line. There *should* be a full stop after the country in the corresponding address.

Affiliations and corresponding address text should be left aligned, not justified, to avoid irregular spacing between words.

2.5 Abstract and keywords

Abstract should appear in bold without a colon, text should start on the next line, with no indent.

Keywords (all one word) should appear in bold without a colon. The keywords should start on the next line, separated by commas only, not semi-colons. The first keyword should have an initial cap.

Abstract

Anaphylaxis related to drug therapy with 5-HT₃ antagonists, in particular, palonosetron has not been reported frequently in the literature. Here a case is presented where the patient possibly had an anaphylactic reaction to palonosetron. In this case report, a 40-year-old female with ovarian cancer developed shortness of breath and hypotension after receiving her palonosetron as part of her premedication for chemotherapy. The patient recovered successfully with fluids and supportive care. This case demonstrates that even after successful treatment in the past with palonosetron a patient may later develop a hypersensitivity to the agent.

Keywords

Palonosetron, anaphylaxis, hypersensitivity, 5-HT₃ receptor antagonist

In some journals, Abstracts have sub-headings, e.g. Methods, Conclusion etc. These should be formatted in bold with a colon in bold and each sub-heading should start a new paragraph. The text should run on after each heading with an initial capital.

Submitted/accepted dates

For journals that publish received/revised/accepted dates (applies to specific journals, if unsure please check with the PE), this should appear after the Keywords and be formatted thus:

Date received 29 July 2010; reviewed 30 August 2010; accepted 5 November 2010

Keywords

H5N1, apoptosis, TRAIL, caspase-10

Date received: 30 March 2011; revised: 19 April 2011; accepted: 28 April 2011

2.6 Running heads

Recto: should be author surname(s), e.g. *Smith*, or *Smith and Jones*, or *Smith et al.* (for three or more authors, and et al. is also in italic).

Verso: full journal title in italic, followed by 0(0).

For IMechE journals: e.g. *J. Automobile Engineering 0(0)*, without the Proc. IMechE or journal letter).

Innate Immunity 0(0)

3. General style and layout

3.1 Logo and imprint box

All papers in the standard SAGE design will have a journal logo in the top right with an imprint box underneath (although the logo may be missing on journals that are new to the SAGE design). The imprint box will contain the following information: journal name, vol/issue/page numbers (for papers in production, vol/issue are represented by 0(0), page numbers are the number of pages in the PDF, e.g. 1–9), copyright line, link to permissions web page, DOI, journal URL, SAGE logo:



3.2 Figures

1. STM: All figures should have a key line (i.e. be enclosed in a box). HSS: figures have no key line.
2. Figures should be appropriately sized (done by the TS). They do not need to be a full column width or page width.
3. Figure permissions: any figures reproduced from another publication need permission. In cases where those publishers listed on the STM permission Guidelines page (<http://www.stm-assoc.org/permissions-guidelines/>), permission is not required and only the reference number need be present in the caption. Some publishers ask for certain text, e.g. Elsevier.
4. Source: in cases where permission is required and has been obtained, this should appear below the caption in the following form: Source: reproduced with permission from publisher, year, reference number (Vancouver), author, date (Harvard).
5. Any abbreviations needing to be spelled out should be listed after the caption, starting on the next line, in the following format: IC: internal combustion; PID: proportional–integral–derivative).
6. Captions are positioned below the figures and left aligned.
7. Captions should start, for example, **Figure 1.** (with a full point also in bold) and have a full point at the end. Where the text runs onto multiple lines, the captions need not be justified but should be aligned left.
8. Where figures have multiple parts, these should be labelled as (a), (b), (c), etc. (not A, B, C). Captions should contain subheadings for all parts if not present in the figure itself.
9. All figures should be numbered consecutively and cited in the text as Figure 1, Figure 2 etc. (Figure should be spelled out in full, not abbreviated).
10. Text citations: figures should be referenced in the text as follows: Figure 1, or Figures 1 and 2, or Figures 2 to 4, or Figure 1(a) and (b), or Figure 2(a) to (c). Where the figure citation is not part of the sentence it should be placed in parentheses.

Examples:

Please see Figure 2 for an illustration of the model used

The model used was an X3G standard type, exported from Germany (Figure 2 or see Figure 2).

3.3 Tables

1. Tables do not need to be a full column width or page width, but should be the appropriate width for the content. They will be laid out by the TS so no work is required by CEs on table layout, only on content.
2. Table headings should be left aligned, even when they relate to multiple columns, unless this creates confusion.

3. Tables should only have minimal horizontal rules for clarity, and no vertical rules (done by TS, no need for CE to format).
4. All tables should be numbered consecutively and cited in the text as Table 1, Table 2 etc. (Table should be spelled out in full, not abbreviated).
5. Table permissions: any tables reproduced from another publication need permission. In cases where those publishers listed on the STM permission Guidelines page ([http://www-stm-assoc.org/permissions-guidelines/](http://www.stm-assoc.org/permissions-guidelines/)), permission is not required and only the reference number need be present in the caption. Some publishers ask for certain text, e.g. Elsevier.
6. Source: in cases where permission is required and has been obtained, this should appear below the table in the following form: Source: reproduced with permission from publisher, year, reference number (Vancouver), author, date (Harvard).
7. Any abbreviations needing to be spelled out should be listed under the table (smaller font, TS will format), in the following format: IC: internal combustion; PID: proportional–integral–derivative.
8. General notes to the Table should be positioned below the Table, typeset in a smaller font and should start 'Note:', and end in a full stop. Do *not* add the word 'Note:' unless needed for clarity.
9. Footnotes should be represented in the table by superscript letters ^a, ^b, ^c, etc., and appear below the Table (smaller font, TS will format). Each footnote should start a new line and end with a full stop. These notes should precede the source for the table, if included.
10. Captions are positioned above the table and left aligned.
11. Captions should start, for example, **Table 1.** (with a full point also in bold) and have a full point at the end. Where the text runs onto multiple lines, the captions need not be justified but aligned left.
12. Dates in Tables can be shortened to, for example, 4 Dec 10, if space is lacking. Do not use the form 04/12/10, as this could be confused as 12 April in US.
13. Normal text in columns should always be left aligned. Data in tables should be aligned on units if all the data in that column take the same units. Otherwise, the data should be left aligned. Units in table headings should be enclosed by parentheses, not square brackets (if any brackets are required at all).

3.4 Lists

1. For lists where items are not full sentences, use (a), (b), (c) etc. or bullet points (whichever is more appropriate) and separate items with semi-colons. Start list with a preceding colon and end list with a full stop.
2. For lists where items are full sentences or multiple sentences, use 1. 2. 3. Start list with a preceding full stop or semi-colon (whichever is more appropriate), and end list with a full stop.
3. List numbering/bullets should be full out and left aligned, with text indented and aligned. Lists should be separated from preceding/following text with a line space.
4. Where list items include headings, that heading should be italic, same size as text and end in a full stop. The following text should run on.

3.5 Maths/equations (see section 5, p. 14 for more details)

1. Equations should be left aligned with a 3 mm indent, *not* centred.
2. Equations can be broken at operator symbols (x, -, +, etc.), and continue on the next line, starting with the operator itself.
3. Equations should be separated from text above and below by at least one line space.
4. Any equation numbers should be enclosed in parentheses and right aligned, and aligned horizontally with the bottom line of the equation or equations, where multiple terms are covered by one equation number. (Not all equations need be numbered, see section 5).

General note: text following Figures, Tables, equations does not need to be full out with no indent. If the next block of text after any of these items is a new paragraph, then this may be indented.

3.6 Appendices

Maths notation list

1. Where present, notation should appear as Appendix 1, following the references. The heading *Notation* should be a B-head (not Notations; it is not plural).
2. Abbreviations list should be separated from mathematical notation under a separate B-head *Abbreviations*.

3. Notation should be listed in alphabetical order, English letters first, followed by Greek, followed by numbers, followed by symbols.
4. Subscripts and superscript should come under a separate C-head (italic and smaller font), and symbols should follow the same order as in point 2 above.
5. The Notation section does not need to be cited in the text, like other Appendices.
6. Notation list should be left aligned. Text in the notation section should be left aligned in general, not justified.
7. Please note that a notation list is not compulsory in mathematical papers, as long as all symbols are defined in the text.

Other appendices

1. Numbering of figures/tables/equations in Appendices should follow on from the numbering in the text.
2. All tables/figures should have captions.
3. All appendices should be cited in the text, e.g. (see Appendix 1). If they are not cited, authors need to be queried for a citation position.

3.7 Notes and footnotes

Textual notes

HSS

References: Vancouver style reference citations are represented as textual notes, as a numeral enclosed in a square bracket. Harvard style references are as follows (Smith, 1999).

Any other textual notes: are indicated by a superscript Arabic numeral placed *after* the punctuation. All textual notes should be collected and placed after the text and before the reference section with the heading **Notes**.

STM

References: Vancouver style reference citations are represented as textual notes, as a superscript Arabic numeral. Harvard style references are as follows (Smith, 1999).

Any other textual notes (whether references are Harvard or Vancouver) are indicated by a superscript Arabic letter and the corresponding footnote appears at the bottom of the relevant column.

In STM journals, footnotes should be edited into the text if appropriately and easily incorporated. However, please leave footnotes if this is not possible.

Authors' biographical notes

These should appear at the end of the paper with the heading **Author biography** (or **biographies**), in same font size as References/Funding etc. heading. Follow journal style.

3.8 Book reviews

Please check that the book details are given in this format at the top of each review.

Author, *title*, publisher: place, date of publication; 000 pp.: ISBN, price (hbk), ISBN, price (pbk)

Editor(s) (ed[s]), *title*, publisher: place, date of publication; 000 pp.: ISBN, price (hbk), ISBN, price (pbk)

4. Spelling, punctuation and formatting

4.1 Author style/voice

We will endeavour to keep the author's voice as much as possible:

1. Some authors write in the first person. CEs please note that we will *not* be taking articles out of the first person into the third person.
2. Where American authors have used American spellings, we should also endeavour to keep the author's grammar/punctuation, e.g. closed em-dashes instead of spaced en-dashes, single quotation marks within double, series comma etc.
3. Where UK authors have used -ise spellings throughout their papers in a consistent fashion, please do not change. Where there is inconsistency, use -ize.

4.2 General spelling rules

The general rules are as follows:

- UK spellings should be followed for European articles (-ise is acceptable)
- US spellings should be followed for North American articles
- Rest of the world – follow author style but make it consistent
- Canadian spellings should be standardized to UK or US, depending on author preference
- The following list shows some common exceptions to the '-ize' rule:

<i>Samples</i>							
advertise	arise	devise	enfranchise	expertise	merchandise	promise	surmise
advise	chastise	disenfranchise	enterprise	franchise	misadvise	reprise	surprise
affranchise	circumcise	disguise	exercise	improvise	premise	revise	televise
apprise	comprise	emprise	excise	incise	prise	supervise	treatise

Note also: analyse (for UK), catalyse, dialyse, paralyse.

<i>Do not mix English and US spellings. Some common US variations in spelling:</i>							
analyze	color	favor	fulfill	labor	license (noun)	program	traveler/traveling
behavior	counseling	fetus	gray	mold	pediatrics	practice (verb)	willful

Follow author style regarding use of the possessive's for proper names ending in s. However, 's is not used for classical names, e.g. Socrates' philosophy.

The following books are recommended: *Hart's Rules*; *Fowler's Modern Usage*.

4.3 Punctuation and formatting

Commas

- Follow author style but make consistent
- Oxford or series comma are not generally used; only use an Oxford/series comma if essential for clarity

Parentheses

These can be used throughout. Double sets of parentheses are acceptable, e.g. (see Figure 2(a)). Do not use square brackets in the text, except in the following circumstances.

Square brackets are used only to enclose an author's comment within a quote, e.g. [sic], [emphasis added]. Square brackets are also used for equations and mathematical expressions within the text.

Quotes

Use single quotes, with double quotes within quoted material. (See section 4.1 for exceptions for articles written by US authors.)

Hyphenation

The basic rule is to follow author style but be consistent.

Use of upper and lower case

Check the author's usage first, and make consistent. For specific titles use initial caps, for generic titles use lower case (useful pointers follow):

Institutions, movements, denominations, political parties:

- the Roman Catholic Church
- he has catholic tastes
- They were Bolsheviks
- bolshevism, communism

Titles, ranks:

- the President (referring to a particular one)
- the Spanish Foreign Minister
- a president
- several government ministers

Geographical names:

Capitalize politically defined or geographically named places, use lower case in all other instances.

- the West, the East
- western values, eastern culture
- South Africa
- the south of Scotland

Periods, events:

- Second World War
- rationing during the war

Article and book titles:

Follow the style used in the references.

Roman and italic usage

- Anglicized words should be roman with no accents (common examples follow):

<i>Samples</i>			
ad hoc	coup d'etat	laissez faire	post mortem
a priori	de facto	nouveau riche	raison d'etre
a propos	elite	op. cit.	sine qua non
avant-garde	en masse	per annum	status quo
bona fide	en route	per capita	vice versa
bourgeois/bourgeoisie	et al.	per se	vis-a-vis
cafe	in situ	post hoc	

- Words in other languages – follow author style and make consistent.
- Keep author's own emphasized words or phrases (in italic), unless excessive.
- General: usual italic rules applies, e.g. genus, species, relevant mathematical symbols, x-axis, y-axis, journal/book/magazine names, etc.

Quoted text

Spellings and punctuation in quoted texts should not be altered. If they are obviously incorrect, query with author or insert [sic].

Undisplayed quotes:

Short quotations should be indicated by single quotation marks, with double quotation marks for quotation material within the quote. A full point (or other punctuation) follows the reference for the quote, e.g. '... is the most decisive and important' (Smith, 2003).

Displayed quotes:

Lengthy quotes (40 words or more) should be displayed and indented, with a line space above and below, separating it from the text – follow journal style. Font size will be smaller (TS to format).

Money

For currency use the common symbol or abbreviation: £, US\$, AUD\$, etc. – where the quantity is stated, but not when the unit of currency is being referred to in general terms, examples follow:

- The price of oil rose to US\$25 per barrel.
- The US dollar was at an all-time low.
- £150m, *not* millions or mlns.

Units in the text

1. Where units are referred to in the text in general terms, they should be written out in full.
2. Where a specific quantity is used, the abbreviated form of the unit must be used; e.g. the nails were several centimetres long; the nails were each 2 cm in length.
3. Always use numerals with the abbreviated unit and use abbreviated units wherever possible – in lists of statistics, in tables and line artwork.
4. Numeral and units should be separated by a thin space, i.e. 100 km, not 100km (this does not need to be indicated by the CE, the TS will format, PR/PE to check). NOTE: exception to the thin space rule applies for percent and degree symbols, i.e. 90% and 35.7°
5. Abbreviations of units are the same for singular and plural (do not add an s); they do not take a full point. E.g. 25 min, 55 s
6. Use SI units wherever possible (see specific Journal webpages for more specific notes).

Numbers

1. Spell out numbers one to nine; for numbers 10 and over use numerals, except at the beginning of a sentence. Re-work the sentence if necessary.
2. Use numerals with percentages (use the % symbol, not per cent or percent), with units, in statistical passages, in tables, etc.
3. Spell out and hyphenate one-half, two-thirds, etc.
4. Do not use a comma in 4-digit numbers (thousands) but do use one in 5-digit numbers (tens of thousands) and above, e.g. 5643; 1298; 14,600; 342,885; 1,000,001. Do *not* use a thin space.
5. Do not contract number ranges, e.g. page ranges and dates; i.e. use pp. 24–29, 13–15 October, 1981–1999 etc.
6. Decimal points are never raised off the line.
7. Do not mix spelled-out numerals and units: 6 cm not six cm.

Dates

1. Write out dates in text and refs as follows: 30 September 2003, except in Tables if space is short, then a shortened version may be used, e.g. 11 Sep 08 (do not use 11/9/08, as this could be confused in the US as 9th November).
2. Do not use an inverted comma in decades, e.g. 1960s, mid-1930s. Avoid 80s, etc.
3. Use numerals for centuries (except in history journals where it is spelled out), e.g. a 21st-century dilemma.

4.4 Abbreviations

General

1. Do not use abbreviations in the title of a paper, in the abstract, or keywords, unless the full version is very long and clumsy or the abbreviation is better known than the full term (e.g. DNA). Abbreviations may be used in headings and subheadings if they have already been defined previously in the paper at first usage. If in doubt, spell out.
2. Define an abbreviation the first time that it is used (except in the Abstract): write the term out in full followed by the abbreviation in parentheses. Use the abbreviation consistently thereafter, including at the start of sentences.
3. For plural terms, use plural abbreviations, e.g. low-density lipoprotein, LDL; low-density lipoproteins, LDLs.
4. If you need to abbreviate months or days of the week (for example, in a crowded table), use the first three letters without a full-stop (Mon, Tue; Jan, Feb).

5. If abbreviations are used in a figure or table, they must all be defined in the caption or in a Table note/footnote even if they are also defined in the text.
6. Do not use abbreviations invented by the author of a paper for that paper – ideally, only conventional, generally accepted abbreviations should be used.
7. Do not abbreviate single words (exceptions apply) or use two-letter abbreviations other than those listed below. (Two-letter engineering abbreviations are available in the IMechE Style Guide supplement).
8. Abbreviations consisting of capital letters, and acronyms and contractions, should not take full points, e.g. USA, UK, MA, UN, WHO, PhD, NATO (or Nato), UNESCO (or Unesco), AD, BC
9. Unfamiliar (but generally accepted) abbreviations should always be written out in full when first mentioned, with the abbreviated form following in parentheses, e.g. "The Confederación Española de Derechas Autónomas (CEDA) was formed". Thereafter use the abbreviation.
10. Contractions do *not* take a full point, e.g. Mr, St, Ltd, edn, Dr, neither do contracting degrees (Dr, DPhil, PhD, MSc). The following abbreviations take full points: no., Co., p., pp., vol., ch. (but use vols and chs), e.g., ed. (but use eds), et al., etc., i.e., cf., (note that this means 'compare' and not 'see'), n.d.
11. No comma after e.g., i.e. or cf. Etc. has a full stop and is usually preceded by a comma in a list. They may be used in lists or figure or table legends, and within parentheses.
12. In reference lists, notes, footnotes, corresponding author address (if required) and authors' biographical notes, please use the standard abbreviated form for American states (and Canadian/Australian territories). Please spell out in full in the text (see section 7.3 for full list of US state abbreviations).

Some journals use abbreviations that do not need to be spelled out, even at first usage. For a full list of abbreviations that do not need to be spelled out for each individual journal, please visit the journal webpage.

STM abbreviations: some abbreviations of terms that we do not define in full are listed here (follow style given):

- SD = standard deviation
- SEM = standard error of the mean
- NS = not significant
- a.m. in the morning (but use 24-hour clock if possible)
- p.m. in the afternoon
- N/A = not applicable
- Chemical symbols (H_2O , H_2SO_4) may be used without definition. However, write in full unless this is inappropriate (e.g. 'Water consists of hydrogen and oxygen'; 'Nitric oxide is also found in peripheral nerves'). Refer to *Scientific terminology* notes for further guidance.

See the Appendix (pp. 26 and 27) for a full list of accepted general two-letter STM abbreviations and engineering abbreviations.

5. Technical content: maths, equations, etc.

5.1 Maths notation convention

There is no specific convention for mathematical notation in terms of matrices, vectors, variables, operators, functions, subscripts, superscripts and scalars. CE please follow the author's symbols and notation conventions, ensuring that these are consistent throughout the paper.

Please query the author if any symbols are unclear, duplicated with more than one definition, or undefined.

5.2 Equations

Layout of equations

1. Equations should be left aligned on a 3 mm indent, *not* centred.
2. Equations should be numbered in sequence throughout the text, with the numbering continuing through all appendices. However, equations only need to be numbered if cited in the text, and not all equations necessarily need to be numbered.
3. Equation numbers should be set flush right and in sequence. Each numbered equation should have its own line.
4. No punctuation is used before or after an equation (i.e. no commas, colons, hyphens etc.)
5. The equation number should align with the *bottom line of equation*. Where the equation number covers multiple equations, it should align with the bottom line of the last equation.
6. When referred to in text, equations take the form 'equation (1)'. When a range of equation numbers is referred to, use the form: equations (1) and (2); equations (1) to (3); equations, (1), (2), and (5) to (7).

With the assumptions outlined previously, conservation of momentum and the definition of velocity change gives

$$m_1 u_1 + m_2 u_2 = m_1 v_1 + m_2 v_2 \quad (1)$$

$$\Delta v = v - u \quad (2)$$

Equations (1) and (2) lead to

$$\Delta v_1 = -\Delta v_2 \frac{m_2}{m_1} \quad (3)$$

A diagram showing a generalized impact configuration

7. If two or more small equations or conditions can fit on one line, then they should be well separated with a 2-em space. Commas and words, set upright not italic, may be used to enhance clarity.
8. Equations in text must be reduced to one line depth. Display equations are built up to two line depth. For instance, the equation $(x - y)/(x^2 + 2y - 3)$ runs on in the text but for display becomes

$$\frac{x - y}{x^2 + 2y - 3}$$
9. CEs: Spaces between + and – and other operators need not be marked. TS will format.
10. Unless separating small equations and conditions, as shown above, odd words between equations such as 'where', 'and', 'thus', 'therefore' should be on a separate line from the equations and flush left. Only use initial capitals for these if they start a new sentence.
11. When a single equation has been presented with a label/header (e.g. 'momentum conservation equation', 'blade element momentum theory', etc.), present the label before the equation, full left, half-line above, and in roman.
12. Where an equation is too long to fit on one line, take over whole terms starting if possible with a + or – or = symbol, and indent.
13. Where a bracketed term has to be split over lines move the second part to the right to show it is still part of the same term (align to the right of the bracket).
14. Pairs of opening and closing brackets should be the same size, even when they are on different lines.
15. Where an equation breaks at an equals sign indent a further em in from the first line.
16. Where equations are split over 2 lines, the break should occur before the operator:

$$\begin{aligned} & m_2(1 + e_p)(U_{2p} - U_{1p}) \\ & = (m_1 + m_2)\Delta v_1 - m_1 h_1 \Delta \omega_1 - m_2 h_2 \Delta \omega_2 \end{aligned} \quad (9)$$

5.3 Units

SI preferred. Expressions such as rpm, psi, cfm, gpm, mph, kph, tsi, revs should be avoided. Use instead r/min, lbf/in², gal/min, mile/h, km/h, ton/in², rotational speed, etc.

Notes: Greek μ in μm should always be roman; MPa and GPa should always have a capital P.

5.4 Symbols and operators

A thin non-breaking space should separate symbols and operators from numerals, and be present either side of multiplication dots and all operators, e.g. +, -, =, x, <, >, etc. (this does not need to be indicated by the CE, the TS will format)

Appendices and notation (see section 2.6, p. 7)

6. Appendices

6.1 General STM acceptable 2-letter abbreviations (should be defined on first mention):

AH	arterial hypertension	ML	maximum lysis
AP	anteroposterior	MR	magnetic resonance
AR	androgen-receptor	MS	multiple sclerosis
AS	ankylosing spondylitis	ND	no data
AT	anti-thrombin	NF	nuclear factor
BP	blood pressure	NK	natural killer
CE	centre–edge	OD	optical density
CF	cystic fibrosis	OR	odds ratio
CI	cardiac index	OS	overall survival
CI	confidence interval	PC	protein C
CO	cardiac output	PD	potential difference
CP	cerebral palsy	PD	progressive disease
CR	complete response	PE	probable error
CT	clotting time	PP	pulse pressure
CT	computed tomography	PR	partial response
ED	emergency department	PT	prothrombin time
ED50	median effective dose	RA	rheumatoid arthritis
EU	European Union	RA	right atrium
FA	fatty acid	Rh	rhesus
FA	folinic acid	RQ	respiratory quotient
FR	fixed ratio	RR	relative risk
GH	growth hormone	RR	response rates
GM	genetically modified	RT	room temperature
GP	general practitioner	RV	right ventricle
Hb	haemoglobin	SE	standard error
HR	heart rate	SV	stroke volume
IR	infrared	TB	tuberculosis
LD50	median lethal dose	TC	total cholesterol
LH	luteinising hormone	TF	tissue factor
LV	left ventricle	TS	thymidylate synthase
mAb	monoclonal antibody	TT	thrombin time
ME	medial epicondyle	UV	ultraviolet
ME	myalgic encephalomyelitis	VD	venereal disease
MI	myocardial infarction		

6.2 Engineering acceptable 2-letter abbreviations (should be defined on first mention):

AC/DC	alternating current/direct current	HC	hydrocarbon
A/C	air conditioning	KF	Kalman filter
AI	artificial intelligence	MR	magnetorheological
AI	auto-ignition	MR	magnetic resonance
CA	crank angle (also used as a unit of measurement)	MS	mass spectrometry
CC	combustion chamber	MW	molecular weight
CG	centre of gravity	NN	neural network
CI	compression ignition	NS	Navier–Stokes
CM	centre of mass	PI	proportional–integral
CV	cyclic variability	PM	particulate matter
DI	direct injection	<i>Re</i>	Reynold's number
EA	evolutionary algorithm	RF	radio frequency
EM	electromagnetic	RI	rollover index
EV	electric vehicle	SD	standard deviation
FE	finite element	SI	spark ignition
GA	genetic algorithm	TC	traction control
GT	gas turbine	UV	ultraviolet

6.2 SAGE Vancouver

1. General

1. Reference numbers have full points in the reference list.
2. Please ensure that publications are referenced in the order in which they appear in the text.
3. Journal titles should be abbreviated according to the standard in the Index Medicus. If unsure, please check for any inconsistencies within reference lists. For STM journals, please refer also to the following: <http://scieng.library.ubc.ca/coden/>.
4. Do not separate initials with spaces or full points, but add a full point after last initial before the title.
5. Up to three authors may be listed. If more, then list the first three authors and represent the rest by et al. Fewer author names followed by et al. is also acceptable. Where et al. is used, it should always be upright, not italic in both references and textual citations.
6. Last Names containing de, van, von, De, Van, Von, de la, etc. should be listed under D and V respectively. List them as: De Roux DP and not Roux DP, de. When cited in the main text without the first name, use capitals for De, Van, Von, De la, etc. (Van Dijk, year)
7. Names containing Jr or II should be listed as follows:
 - Author Last Name Initial Jr (year)
 - Author Last Name Initial II (year)

2. Text citations

Please use superscript numerals *after* the punctuation (STM) or numbers in square brackets (HSS), and check that it corresponds to the correct number in the reference list.

3. Reference styles

Book

1. Huff D. *How to lie with statistics*. 4th ed. London: Penguin, 1991, p.51.

Chapter in book

1. Huff D and Black TL. Comprehensive statistics. In: Miller C and Smith H (eds) *How to lie with statistics*. 4th ed. London: Penguin, 1991, pp.51–55.

Journal article

1. Ludbrook J, Miller T and Russel A. Musculovenous pumps in the human lower limb. *Am Heart J* 1966; 71: 635–641.

2. Araki C, Black TL, Patberg FT, et al. Significance of calf muscle pump function in venous ulceration. *J Vasc Surg* 1994; 20: 872–879.

Journal article published ahead of print

1. Ludbrook J. Musculovenous pumps in the human lower limb. *Am Heart J*. Epub ahead of print 12 June 2011. DOI: 10.1177/095443271167940.

Website

1. Smith JR. Choosing your reference style. *Online Referencing* 2(3), <http://orj.sagepub.com> (2003, accessed 12 October 2008).

2. National Center for Professional Certification. Factors affecting organizational climate and retention, www.cwla.org/programmes/triechmann/2002fbwfiles (2002, accessed 10 July 2010).

Conference paper

1. Peters J. Musculovenous pumps in the human lower limb. In: *ASME conference on automatic transmissions* (ed A O'Brien), Pisa, Italy, 29 May–2 June 2003, paper no. GE1234, pp.4–10. New York: ASME.

Thesis/dissertation

1. Clark JM. *Referencing style for journals*. PhD Thesis, University of Leicester, UK, 2002.

Patent and patent applications

1. Smith ST. *Referencing styles for journals – a new method*. Patent 12346-ZH, USA, 2011.

2. Jones P. *Referencing styles for journals – a new method*. Patent application 12346-ZHA, USA, 2011.

Report (published/unpublished)

1. MacDonald S. The state of social welfare in the UK. Report, University of Durham, UK, June 2011.

2. Citigroup Ltd. *How to make your money work for you*. Report for the Department of Finance. Report no. 123345, 13 June 2011. Oxford: OUP.

SAE/JSAE etc. papers

1. Clark JM. A new exhaust gasket manifold for powertrains. SAE paper 2002-0101234, 2002.

Newspaper/magazine

1. Clark JM. Referencing style for journals. *The Independent*, 21 May 2006, p.10.

Package insert (medical etc.)

1. Eisai Inc. Aloxi (package insert). New York: Eisai Inc, 2008.

Manual (automotive etc.)

1. Fiat. Driver's manual, Fiat Uno 4-litre diesel model, December 2010.

Standard

1. ISO 27799:2008. Information security management in health.

Manuscript Submission Guidelines

►Pre-submission: helping readers find your article

Before you submit your manuscript, go back and review your title, keywords and abstract. These elements are key to ensuring that readers will be able to find your article online through online search engines such as Google. More information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords can be found here: [How to Help Readers Find Your Article Online](#).

One simple thing you can do to improve your article's visibility and ensure proper indexing and cross-linking is to provide **full names for all authors**. Please refer to [our guidelines](#), prepared in consultation with Google Scholar, for more information.

►Submitting your article

Each SAGE journal has its own Editorial office and its own instructions for authors. To submit your article, go to the [list of SAGE journals](#), select the one you wish to submit to, click on the Instructions for authors to get details on how to submit your article.

►Submitting your article via SAGE Track

Many SAGE journals use SAGE Track, a web-based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Please check your chosen journal's individual submission guidelines to see if it is hosted on SAGE Track.

Important note: If you are submitting to your journal via SAGE Track, please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne [Online Help](#).

►For authors submitting to medical journals

Authorship

Papers should only be submitted for consideration once the authorization of all contributing authors has been gathered. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

1. have made a substantial contribution to the concept and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data
2. drafted the article or revised it critically for important intellectual content
3. approved the version to be published.

Authors should meet the conditions of all of the points above. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section.

Please refer to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) authorship guidelines at http://www.icmje.org/ethical_1author.html

Research ethics

All papers reporting animal and human studies must include whether written consent was obtained from the local Ethics Committee or Institutional Review Board. **Please ensure that you have provided the full name and institution of the review committee and an Ethics Committee reference number.**

We accept manuscripts that report human and/or animal studies for publication only if it is made clear that investigations were carried out to a high ethical standard. Studies in humans which might be interpreted as experimental (e.g. controlled trials) should conform to the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and typescripts must include a statement that the research protocol was approved by the appropriate ethical committee. In line with the Declaration of Helsinki 1975, revised Hong Kong 1989, we encourage authors to register their clinical trials (at <http://clinicaltrials.gov> or other suitable databases identified by the ICMJE, http://www.icmje.org/publishing_10register.html). If your trial has been registered, please state this on the Title Page. When reporting experiments on animals, indicate on the Title Page

which guideline/law on the care and use of laboratory animals was followed.

Patient consent

Authors are required to ensure the following guidelines are followed, as recommended by the International Committee of Medical Journal Editors, Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information, including patients' names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that a patient who is identifiable be shown the manuscript to be published.

Identifying details should be omitted if they are not essential. Complete anonymity is difficult to achieve, however, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. When informed consent has been obtained it should be indicated in the submitted article.

Randomized controlled trials

All randomized controlled trials submitted for publication should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information.

►Formatting your article

Please refer to the submission guidelines specific to your chosen journal.

When formatting your references, please ensure you check the reference style followed by your chosen journal. Here are quick links to the [SAGE Harvard](#) reference style, the [SAGE Vancouver](#) reference style and the [APA](#) reference style.

If you use [EndNote](#) to manage references, you can download the SAGE Harvard output file [here](#) and the SAGE Vancouver output file [here](#).

►Artwork guidelines

Illustrations, pictures and graphs, should be supplied with the highest quality and in an electronic format that helps us to publish your article in the best way possible. Please follow the guidelines below to enable us to prepare your artwork for the printed issue as well as the online version.

- **Format:** TIFF, JPEG, PDF: Common format for pictures (containing no text or graphs). EPS: Preferred format for graphs and line art (retains quality when enlarging/zooming in). MS Office files (Word, Powerpoint, Excel) are also accepted
- **Placement:** Figures/charts and tables created in MS Word should be included in the main text rather than at the end of the document. Figures and other files created outside Word (i.e. Excel, PowerPoint, JPG, TIFF, EPS, and PDF) should be submitted separately. Please add a placeholder note in the running text (i.e. "[insert Figure 1.]")
- **Resolution:** Bitmap based files (i.e. with .tiff or .jpeg extension) require a resolution of at least **300 dpi** (dots per inch). Line art should be supplied with a resolution of 600 dpi.
- **Format:** TIFF, EPS or PDF. MS Office files (Word, Powerpoint, Excel) are also accepted provided they meet certain conditions. For more information, see below.
- **Colour:** Please note that images supplied in colour will be published in colour online and black and white in print (unless otherwise arranged). Therefore, it is important that you supply images that are comprehensible in black and white as well (i.e. by using colour with a distinctive pattern or dotted lines). The captions should reflect this by **not** using words indicating colour.



- **Dimension:** Check that the artworks supplied match or exceed the dimensions of the journal. Images **cannot** be scaled up after origination
- **Fonts:** The lettering used in the artwork should not vary too much in size and type (usually sans serif font as a default).

▶ **Supplemental files**

Selected journals are able to support supplemental files. Please check the submission guidelines for the relevant journal if you would like to submit supplemental material. Please refer to the following document for general guidance: [Supplemental data on SJ - Guidelines for Authors](#)

▶ **Permissions**

Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the SAGE Journal Author Gateway.