

**ANÁLISE DO COLÁGENO E ANGIOGÊNESE DE FERIDAS DÉRMICAS DE
COELHOS TRATADOS COM PRP AUTÓLOGO GEL**

VALÉRIA CARDOSO MOREIRA

**ANÁLISE DO COLÁGENO E ANGIOGÊNESE DE FERIDAS DÉRMICAS DE
COELHOS TRATADOS COM PRP AUTÓLOGO GEL**

VALÉRIA CARDOSO MOREIRA

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

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

636.089 65 Moreira, Valéria Cardoso.

M838a

Análise do colágeno e angiogênese de feridas dérmicas de coelhos tratados com prp autólogo gel / Valéria Cardoso Moreira. – Presidente Prudente, 2016.

28 f.: il.

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

Bibliografia.

Orientador: Cecília Braga Laposy.

1. Plasma rico em plaquetas autólogo. 3. Cicatrização de feridas. 4. Fibras colágenas. I. Título.

VALÉRIA CARDOSO MOREIRA

**ANÁLISE DO COLÁGENO E ANGIOGÊNESE DE FERIDAS DÉRMICAS DE
COELHOS TRATADOS COM PRP AUTÓLOGO GEL**

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

Presidente Prudente, 23 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Sergio e Maria Inês que, além de todo o apoio, sempre me incentivaram nos meus estudos, por sempre acreditar na minha capacidade e me transmitir suas serenidades.

Ao meu marido Alessandro, que demonstrou paciência e compreensão nos momentos mais difíceis, por ter me incentivado dia a dia e pelos sábios conselhos dados durante este período e principalmente por ter sido pai e mãe durante minha ausência com nossas filhas, amor você é especial na minha vida, te amo infinitamente.

As minhas filhas Júlia e Laura, vocês são a história de amor mais bonita, que o destino escreveu na minha vida. Cada vez que coloco meu olhar em vocês, sei por que eu existo. Agradeço minhas filhas amadas, por toda paciência com a mamãe durante esse imenso período de estudos, mas são exemplos positivos que quero deixar para vocês.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Ao professor Zeca e ao Mestre Guilherme Osaki, pela imensa ajuda com a parte histológica deste trabalho.

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

À minha amiga e sócia Marry, companheira em todos os momentos, fossem eles bons ou ruins, preocupantes ou gratificantes, temerosos ou agradáveis, obrigada pelo convívio, parceria e à cima de tudo pela amizade, sem seu apoio seria muito difícil seguir em frente. Valeu a pena chorar muito e hoje sorrir com tranquilidade.

À mestranda Eveline, obrigada pela ótima companhia nas idas a Botucatu, mas principalmente por toda ajuda oferecida e prestada durante o desenvolvimento deste trabalho com grande disposição sempre.

À minha amiga e coordenadora do Curso de Tecnologia em Estética e Cosmética Bruna, pelo apoio e compreensão quando precisei me ausentar das aulas, e também pelo grande apoio para obtenção deste título de Mestre.

À minha amiga e parceira de trabalho Carla, agradeço imensamente toda paciência e dedicação aos pacientes durante minha ausência, me orgulho de tê-la comigo durante todos esses anos.

À toda minha família, meus pais, meus sogros, meu irmão, meu cunhado e cunhadas, sobrinhos, por me apoiarem sempre e acreditarem em mim. Obrigada por todo carinho e incentivo, e por compreenderem a minha ausência nos últimos meses. Amo todos vocês!

Ao meu amigo e sócio Júnior Previato, pelo apoio nos meus momentos de ausência com a ergonomia, e pelo grande incentivo na minha carreira, sempre acreditando no meu potencial. Amizade pra ser guardada para sempre no lado esquerdo do meu peito.

Aos meus amigos da turma do esquentado, por terem paciência comigo, onde tive que me ausentar por um período, mas nunca deixaram de me incentivar para a conclusão desse mestrado, meu muito obrigado a cada um de vocês.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista”.

(Aldo Novak)

RESUMO

Análise do colágeno e angiogênese de feridas dérmicas de coelhos tratados com PRP autólogo gel

Avanços científicos significativos nos últimos dez anos foram feitos para verificar os efeitos do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e a sua contribuição não só para o processo hemostático, mas também para cicatrização de feridas através da liberação de fatores de crescimento que têm propriedades de indução de regeneração tecidual. Avaliou-se o efeito do PRP autólogo gel e a qualidade de fibras colágenas produzidas após realização de ferida dérmica em 6 coelhos da raça Nova Zelândia tratados ou não com PRP autólogo gel. As lesões foram acompanhadas durante 17 dias. Nos dias 7, 10, e 17, os animais foram avaliados quanto ao comportamento das feridas morfológica e morfometricamente. Em relação à porcentagem das fibras de colágeno, houve uma quantidade maior ($P < 0,05$) nos coelhos não tratados (85,7%) comparados aos que receberam PRP autólogo em gel (75,0%). Porém, microscopicamente, observou-se aumento de expressão de fibras de colágeno nos coelhos tratados com PRP autólogo gel, mostrando uma disposição mais homogênea com melhor reorganização dessas fibras, evidenciando uma rede densa que envolveu todos os anexos e com vasos neoformados caracterizados pela alta birrefringência da derme. Pode-se concluir neste estudo que o uso do PRP autólogo gel em feridas melhora a qualidade e a reorganização das fibras colágenas.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas autólogo. Cicatrização de feridas. Fibras colágenas. Angiogênese.

ABSTRACT

Analysis of collagen and angiogenesis in dermal wounds of rabbits treated with autologous PRP gel

Significant scientific advances have been made in the last ten years to ascertain the effects of the use of platelet-rich plasma (PRP) and its contribution not only to the hemostatic process, but also wound healing, by releasing growth factors that have tissue regenerating induction properties. The effects of autologous PRP gel and the quality of collagen fibers produced were evaluated after induction of dermal wounds in 6 New Zealand rabbits, treated or not with autologous PRP gel. The wounds were followed for 17 days. On days 7, 10 and 17 the animals were evaluated for the morphological and morphometric behavior of the wounds. Regarding the percentage of collagen fibers, there was a greater quantity ($P < 0.05$) in the untreated rabbits (85.7%) compared to those receiving autologous PRP gel (75.0%). However, microscopically, increased expression of collagen fibers was observed in the samples treated with autologous PRP gel, displaying a more homogenous layout and better fiber reorganization, demonstrating a dense network involving all attachments and newly formed vessels characterized by high dermal birefringence. It can be concluded from this study that the use of autologous PRP gel on wounds improved the quality and reorganization of collagen fibers.

Key-words: Autologous platelet-rich plasma. Wound healing. Collagen fibers. Angiogenesis.

LISTA DE SIGLAS

PRP	– Plasma Rico em Paquetas
FC	– Fator de Crescimento
TGF- β	– Fator de Crescimento Transformador - Beta
PDGF	– Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
VEGF	– Fator de Crescimento Endotelial Vascular
%	– Porcentagem
CEUA	– Comissão de Ética em Uso de Animais
μ m	– Micrômetros
mL	– Mililitros
SC	– Subcutâneo
IM	– Intramuscular
Pc	– Porcentagem de Contração
Ai	– Área inicial
Af	– Área final
M7	– Momento 7 – sétimo dia da cicatrização
M10	– Momento 10 – décimo dia da cicatrização
M17	– Momento 17 – décimo sétimo dia da cicatrização

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Realização das feridas com auxílio de um punch de 8 mm.....	16
FIGURA 2 -	Deposição do gel de PRP autólogo no lado esquerdo do animal, considerado lado tratado.....	16
FIGURA 3 –	Avaliação morfométrica das feridas dos grupos não tratado (A) e tratado (B).....	19
FIGURA 4 –	Aspectos das feridas não tratadas e tratadas com PRP autólogo gel no M17.....	20
FIGURA 5 –	Porcentagem de formação das fibras colágenas de coelhos não tratados (A) e tratados (B) com PRP autólogo gel.....	21

SUMÁRIO

1 ARTIGO	12
ANEXO.....	27

Artigo¹**Análise do colágeno e angiogênese de feridas dérmicas de coelhos tratados com PRP autólogo gel**

Collagen and angiogenesis analysis in rabbit's dermal wounds treated with autologous PRP gel

V.C. Moreira¹, C.B. Laposy¹, J.C. Camargo Filho², L. Justulin Junior³, R.M.B. Nogueira¹, G.A.T. Osaki⁴, G.A. Nai¹, F.F. Lavelli⁵, J.C.M. Silva⁵, M.C. Bertolli⁵

1 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade do Oeste Paulista- Unoeste. Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

2 Faculdade de Ciências e Tecnologia, Unesp. Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

3 Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Unesp. Botucatu, São Paulo, Brasil.

4 Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp. Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

5 Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade do Oeste Paulista- Unoeste. Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Autor para correspondência: Cecília Braga Laposy. Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Presidente Prudente, SP, Brasil. Tel: +55 (18) 3229-2077, fax.: +55 (18) 3229-2080.

E-mail: claposy@unoeste.br

RESUMO

Avanços científicos significativos nos últimos dez anos foram feitos para verificar os efeitos do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e a sua contribuição não só para o processo hemostático, mas também para cicatrização de feridas por meio da liberação de fatores de crescimento que têm propriedades de indução de regeneração tecidual. Avaliou-se o efeito do PRP autólogo gel e a qualidade de fibras colágenas produzidas após realização de ferida dérmica em 6 coelhos da raça Nova Zelândia tratados ou não com PRP autólogo gel. As lesões foram acompanhadas durante 17 dias. Nos dias 7, 10 e 17, os animais foram avaliados quanto ao comportamento das feridas morfológica e morfometricamente. Em relação à

¹ Artigo redigido segundo normas da revista Veterinary Record.

porcentagem das fibras de colágeno, houve uma quantidade maior ($P < 0,05$) nos coelhos não tratados (85,7%) comparados aos que receberam PRP autólogo em gel (75,0%). Porém, microscopicamente, observou-se aumento de expressão de fibras de colágeno nas amostras tratadas com PRP autólogo gel, mostrando uma disposição mais homogênea, melhor reorganização dessas fibras, evidenciando uma rede densa que envolveu todos os anexos, vasos neoformados caracterizados pela alta birrefringência da derme. Pode-se concluir neste estudo que o uso do PRP autólogo gel em feridas melhorou a qualidade e a reorganização das fibras colágenas.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas autólogo. Cicatrização de feridas. Fibras colágenas. Angiogenese.

INTRODUÇÃO

As feridas interferem na qualidade de vida dos doentes e na sociedade em geral (Alves e Vieira 2012). Portanto, é necessário entender que o estado nutricional tem grande importância na evolução da cicatrização, pois interfere em todas as suas fases, realizando suas funções específicas (Bottoni e outros 2011).

Um conceito fundamental na cicatrização é de que todos os tecidos passam pela mesma série de eventos e todas as feridas passam pelas mesmas etapas básicas de reparo (Ethridge e outros 2010). Fazem parte deste processo cicatricial células sanguíneas, matriz extracelular, mediadores celulares e células parenquimatosas (Santuzzi e outros 2011).

Avanços científicos significativos nos últimos dez anos foram feitos para verificar os efeitos do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e a sua contribuição não só para o processo hemostático, mas também para cicatrização de feridas através da liberação de fatores de crescimento (FC) (Ramanathan e Cariappa 2013), sendo identificados como fator de crescimento de transformação-beta ($TGF-\beta$), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (WOO e outros, 2014), que têm propriedades de indução de regeneração de tecidos, sendo muito aplicado nas áreas de odontologia e cirurgia plástica (González e outros 2012). A técnica do PRP tem sido muito usada ultimamente em diversas áreas como na medicina equina, no tratamento de tendinites (Maia e Souza 2009) e na cicatrização de feridas (Derossi e outros 2009), já em humanos, na cirurgia regenerativa dental (Forni e outros 2013), feridas crônicas e enxertos cutâneas (Lacci e Dardik 2010; Vendramin e outros 2010), em tendinopatias crônicas (Kaux 2013) e também na remodelação da matriz extracelular, estimulando fibroblastos dérmicos humanos atuando no rejuvenescimento da pele (Kim e

outros 2011). O tratamento com PRP se sobressai ao se comparar o custo-benefício e sua capacidade de regeneração, tendo assim um papel importante e eficaz aos tratamentos convencionais por conta de sua concentração suprafisiológica das plaquetas ricas em fatores de crescimento essenciais no processo da cicatrização (Gordin 2011).

Outro fator importante nesse processo de regeneração celular são as fibras de colágeno e fibras elásticas que estão localizadas na camada dérmica, inclusas na substância fundamental amorfa, todas produzidas pelos fibroblastos. A porção papilar da derme contém um maior número de fibroblastos e as fibras de colágeno constituídas principalmente por colágeno tipo III, são mais finas e não se agrupam em feixes. Ao contrário do que ocorre na derme reticular, que são constituídas por feixes de colágeno tipo I, distribuídas em vários sentidos, de forma que são cortados longitudinalmente, transversais e obliquamente, mas todos localizam paralelos à superfície cutânea. Essa trama de feixes de colágeno confere ao tecido resistência a trações em qualquer direção, no qual todo o processo de cicatrização será controlado por polipeptídeos chamados fatores de crescimento, que modificarão a fisiologia de suas células-alvo (Isaac e outros 2010).

Estudos recentes avaliaram o uso do PRP em cicatrização de feridas crônicas. Segundo Barrionuevo e outros (2015), mostraram que fonte autóloga gel e homóloga gel são tão eficientes quanto a fonte heteróloga gel, no qual foram capaz de promover a cicatrização de feridas sem efeitos prejudiciais (Abegão e outros 2015).

Dentro desse contexto, este trabalho objetivou caracterizar a quantidade e qualidade de fibras colágenas produzidas após a realização de ferida dérmica em coelhos tratados e não tratados com plasma rico em plaquetas autólogo gel e a sua importância na regeneração tecidual. A hipótese é que o PRP autólogo gel aplicado em ferida dérmica, de forma seriada, promova uma qualidade e distribuição melhor do colágeno, acelerando assim a cicatrização, sem efeitos adversos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas 12 biópsias de feridas dérmicas, experimentalmente induzidas em 06 coelhos adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia (n= 3 machos, n= 3 fêmeas), peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg, tratados e não tratados com PRP autólogo gel. Os coelhos foram contidos manualmente para realização de tricotomia da região dorsal direita e esquerda com máquina de tosa (Andis, AGC2 – USA), utilizando lâmina nº 40. Em seguida, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil® 50 ml, 15mg/Kg-IM) (Kanashiro e outros 2008). Inicialmente, foi realizada antisepsia da

pele com álcool 70% para posterior demarcação do local da lesão com auxílio de caneta, e aplicado 1,0 mL (SC) de anestésico local (cloridrato de Lidocaína a 2% com vasoconstritor). Em todos os coelhos, foram realizadas duas feridas na região dorsal, com auxílio de um punch de 8mm, sendo o lado direito considerado o controle (A) e tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9%[®] e o lado esquerdo (B) tratado com gel autólogo de PRP (Figura 1). O gel de PRP autólogo foi trocado a cada 3 dias num total de 5 momentos (Figura 2). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam cloridrato de Tramadol, na dose de 0,5mg/Kg, IM, 12/12 horas durante 3 dias consecutivos, a fim de se evitar possíveis desconfortos (Santos 2013). O presente estudo foi aprovado pela CEUA sob o protocolo número 2356 da mesma Universidade.



Figura 1- Realização das feridas com auxílio de um punch de 8 mm (Santos e outros 2013).



Figura 2- Deposição do gel de PRP autólogo no lado esquerdo do animal, considerado lado tratado (Santos e outros 2013).

Obtenção e processamento do PRP autólogo gel

Após procedimento anestésico, foi colhido 4 mL de sangue venoso proveniente da orelha utilizando scalp 25G. O material foi transferido para um frasco contendo anticoagulante citrato de sódio. Uma alíquota foi utilizada para a contagem automática de plaquetas (contador automático Sysmex Poch Diff 100iV-Roche) e enviada a centrifugação a 200G (centrifuga Excelsa Baby 206R, São Paulo, SP, Brasil) por 10 minutos. Toda a fração correspondente ao plasma mais 200µL da fração vermelha foi transferida para outro tubo para nova centrifugação (400G por 10 minutos). Formando assim dois níveis diferentes: um superior com coloração levemente amarelada denominada de plasma pobre em plaquetas (PPP) e um inferior, avermelhado. Retirou-se o PPP e do restante foi realizada uma nova

contagem de plaquetas, para verificar se houve uma concentração superior a seis vezes do inicial. Constatada a concentração plaquetária adequada, o PRP líquido foi transformado em gel com adição de gluconato de cálcio a 10%, na proporção de 4:1(Oliveira- Filho e outros 2008). O volume final de PRP em gel foi aproximadamente 0,5mL.

Processamento das amostras

No 17º dia de cicatrização, foi realizada a biópsia com auxílio de um punch de 8 mm de diâmetro, abrangendo área central e borda da ferida. O procedimento anestésico utilizado foi semelhante ao modelo adotado na indução das feridas. Após a retirada das amostras de pele, os fragmentos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e, em seguida, inclusos em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram corados com Picrosirius-red F3BA, para identificação das fibras colágenas por análise morfológica (Lattouf e outros 2014). A análise histológica foi realizada pelo mesmo patologista sem o conhecimento prévio da identificação das amostras.

Avaliação morfológica

Nos dias 7, 10 e 17, os animais foram avaliados clinicamente quanto ao peso em gramas (g), utilizando balança digital marca ELC-10® em estudo de Santos e outros (2013), os autores observaram as características da ferida em relação a cor considerando-se os scores: (1) rósea; (2) amarelada; (3) pálida; (4) cianótica; bordas da ferida: (1) sem granulação; (2) pouca granulação; (3) muita granulação; exsudato: (1) sem exsudato; (2) pouco exsudato; (3) muito exsudato; característica do exsudato: (0) ausente; (1) seroso; (2) sanguinolento; (3) purulento; sensibilidade ao toque : (1) ausente; (2) presente.

A mensuração das bordas das feridas em milímetros foi feita com o auxílio de um paquímetro digital (DC-60 Western®). As medidas obtidas na mensuração foram usadas para calcular a área da ferida através da fórmula: $A = \pi \times R \times r$, onde A = área da ferida, R = raio maior, r = raio menor (Schirato e outros 2006).

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

Avaliação do colágeno e angiogênese por análise de imagem

Para quantificar e avaliar o colágeno e angiogênese foi utilizado à técnica de polarização com o corante Picrosirius-red F3BA (Lattouf e outros 2014). A coloração com Picrosirius permite uma análise quantitativa simples e sensível para medição de colágeno e

proteínas contidas em cortes de tecido. Essa técnica permite a determinação e quantificação do colágeno maduro e imaturo. No sistema RGB (*Red, Green, Blue*) as fibras de colágeno maduro, tipo I, mais espessas e fortemente birrefringentes, aparecem em amarelo, laranja e vermelho; enquanto as fibras do colágeno imaturo, tipo III, mais finas, dispersas e fracamente birrefringentes, aparecem em verde. Através desse método, é possível quantificar a área ocupada por cada tipo de colágeno em cada campo pré-determinado do corte histológico (Greca e outros 2005).

Captação das imagens

Para a captação das imagens, utilizou-se microscópio de luz de polarizada (Leica DMLB, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a uma câmera (Leica DFC300 FX, São Paulo, SP, Brasil). As imagens observadas no microscópio foram projetadas em um monitor através de um software analisador de imagem (Leica QWin Plus, São Paulo, SP, Brasil). O sistema apresenta, na tela do computador, a imagem original digitalizada a partir da lâmina histológica e, ao lado, três histogramas de frequência das intensidades, vermelho, verde e azul. A partir desta representação, o sistema calcula as quantificações desejadas e todos os dados relativos a esses cálculos são apresentados em planilha própria do programa. Foram, então, selecionados aleatoriamente 3 campos da derme superficial (camada papilar), 3 campos da derme profunda (camada reticular). As imagens foram capturadas com padronização de objetiva de aumento de 20 vezes, intensidade máxima de luz do microscópio e polarização em plano de 90°.

Análise estatística

Para validação dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foram realizados respectivamente os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene. Para avaliar a área das feridas, análise de variância de medidas repetidas foi utilizada com o teste de validação de esfericidade de Mauchly e correção pelo teste de Sidak. Para as análises histopatológicas, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para avaliar as diferenças entre as feridas tratadas e não tratadas com PRP autólogo gel. Para todas as análises, adotou-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Em relação à porcentagem da contração da ferida, verificou-se que a média de contração da ferida tratada com PRP autólogo gel (B), foi de 95,9%. Enquanto que a ferida controle (A) ficou com 88,5%, observando-se diferença significativa (Figura 3).

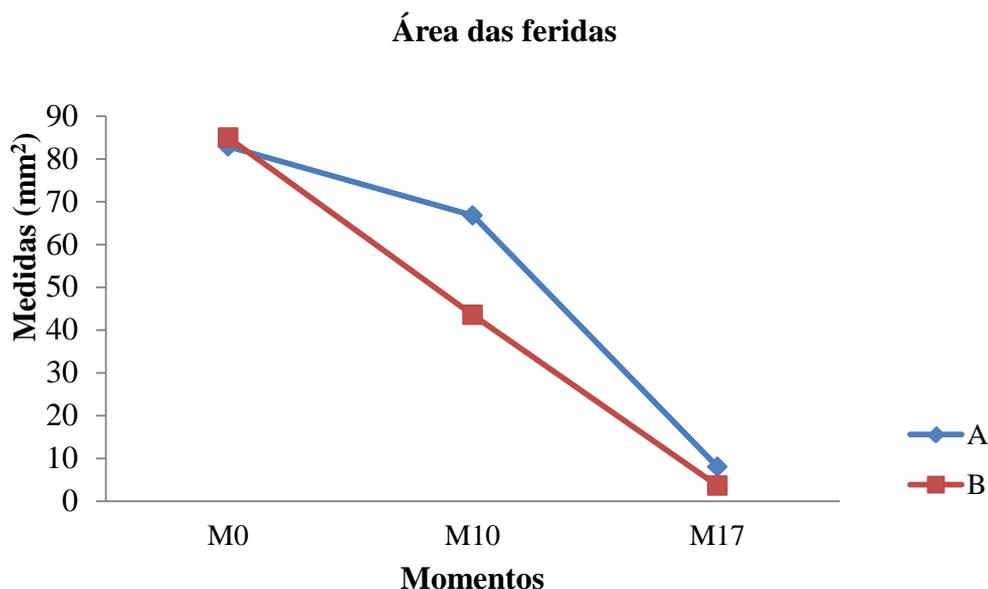


Figura 3. Avaliação morfométrica das feridas dos grupos não tratado (A) e tratado (B) Observar o decréscimo de forma linear das lesões tratadas com gel de PRP autólogo gel.

Aos 17 dias de experimento, o aspecto de ambas feridas (controle e tratada, respectivamente Figuras 4A e 4B) permaneceram com coloração rósea, sem características de contaminação ou presença de tecido necrótico. Havendo uma reepitelização parcial tanto dos fibroblastos quanto das fibras colágenas nas amostras de pele que não receberam tratamento (Figura 4-C). Já no grupo tratado ocorreu uma neovascularização discreta, grande número de fibroblastos e discreto infiltrado inflamatório (Figura 4-D).

Ao avaliarmos o colágeno, observou-se que nos animais não tratados com PRP houve uma preservação da arquitetura da matriz extracelular, principalmente das fibras de colágeno tipo III, que são mais finas, dispersas e fracamente birrefringentes, mostrando também a formação dos anexos cutâneos, representados por pelos e glândulas nas áreas mais claras. Já na parte mais rosa escuro localizadas na derme reticular, encontram-se as fibras colágenas tipo I, mais grossas e se agrupam em feixes, sendo fortemente birrefringentes (Figura 4- E).

Já nos animais tratados com PRP autólogo gel observou-se a reorganização das fibras de colágeno. Quanto à histoarquitetura dessas fibras, pode-se observar, por meio da coloração de Picrosírius, uma rede densa envolvendo todos os anexos, vasos sanguíneos neoformados que se caracterizam pela alta birrefringência da derme (Figura 4- F).

Segundo Pierard 1989; Borges e outros 2007; Coleman 2011; Lattouf e outros 2014, em seus estudos relatam que as cores da polarização dependem apenas da organização tridimensional da molécula e da espessura das fibras, e não da composição de tipos

específicos de colágeno presente nas fibras, o que seria mais indicado realizar uma análise através da técnica de imunohistoquímica.

Entretanto, no lado tratado com PRP autólogo gel, observou-se um aumento de anexos e intensa birrefringência das fibras de colágeno, assim como preservação da organização das mesmas, em que a rede de fibras colágenas apresentou-se mais homogênea e inalterada no que diz respeito à quantidade de anexos cutâneos, comparados ao controle (Figuras 4-G e 4-H).

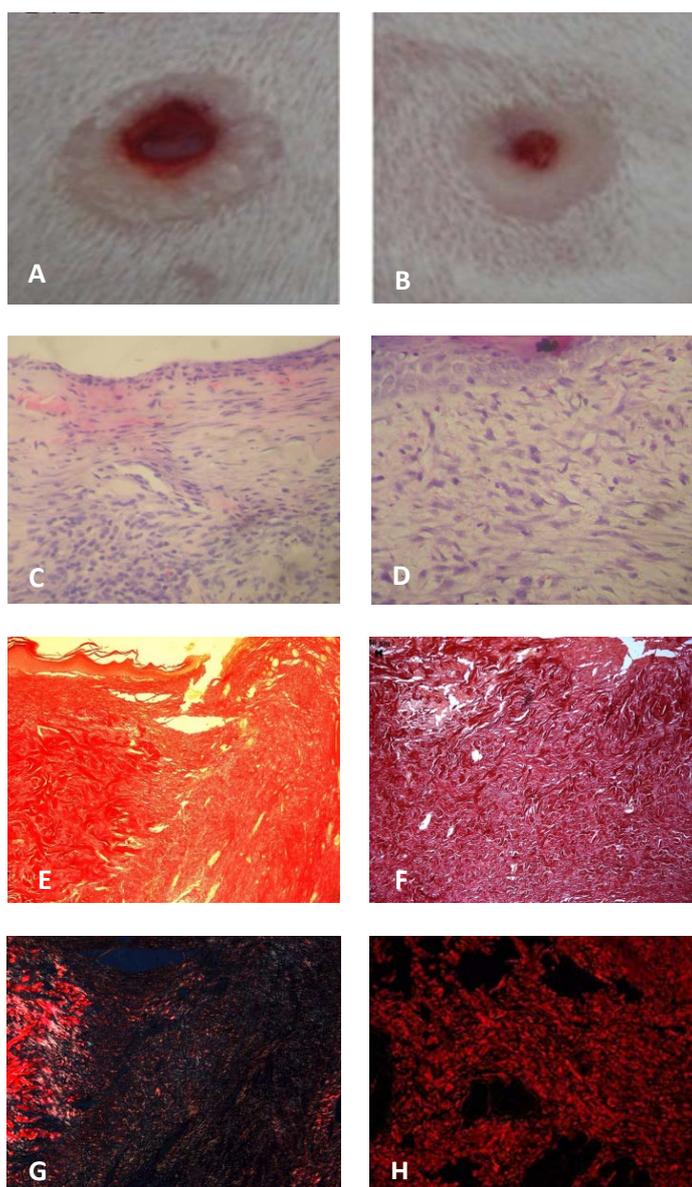


Figura 4. Aspectos das feridas não tratadas e tratadas com PRP autólogo gel no M17. À esquerda, imagens da lesão não tratada e à direita, imagens da lesão tratada com PRP autólogo gel. Imagens macroscópicas das lesões: A (não tratada) e B (tratada) – redução da ferida com presença de crostas mais intensas. Fotomicroscopia: C – reepitelização parcial (Hematoxilina-

eosina, aumento de 100x). D – neovascularização discreta, grande número de fibroblastos e discreto infiltrado inflamatório (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x). Coloração com Picrosirius (aumento de 200x): E – preservação da matriz extracelular e F – reorganização das fibras colágenas mais delgadas e espessas. Avaliação da coloração com Picrosirius à luz polarizada (aumento de 200x): H – verifica-se uma angiogênese, formação de anexos cutâneos, glândulas e um aumento de expressão e homogeneidade de fibras colágenas, evidenciado pela alta birrefringência em vermelho, quando comparado ao controle (G).

Em relação a análise realizada, a porcentagem de formação das fibras de colágeno, houve uma quantidade maior ($P < 0,05$) nos coelhos não tratados (85,7%) comparados aos coelhos tratados com PRP autólogo em gel (75,0%), ou seja, a cicatrização teve o mesmo padrão de estiramento, fazendo com que o processo de cicatrização seja próximo ao verificado em feridas não tratadas (Figura 5).

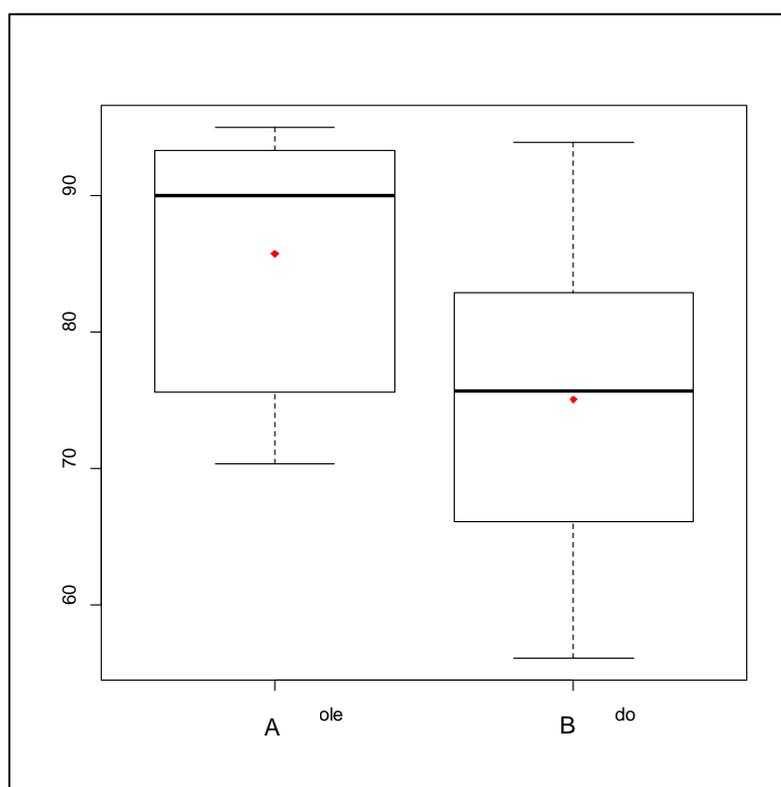


Figura 5- Porcentagem de formação das fibras colágenas de coelhos não tratados (A) e tratados (B) com PRP autólogo gel. As linhas do interior dos boxes denotam 50% dos dados-mediana; as linhas superiores a 75% dos dados; e as inferiores, 25% dos dados. As linhas externas ao boxe indicam os limites dos valores máximos e mínimos.

DISCUSSÃO

Segundo Carmona e outros (2011), em seus estudos verificaram que a utilização de concentrados de plaquetas autólogas acelerou a cicatrização de ferida, reduzindo a inflamação, estimulando a capacidade de regeneração dos tecidos lesionados em cavalos com doenças degenerativas do sistema músculo-esquelético, tais como osteoartrite e tendinopatia uma vez que essas plaquetas segregam fatores de crescimento, que induzem a quimiotaxia, diferenciação e proliferação celulares, neovascularização, e produção de matriz extracelular. Resultado similar foi encontrado por Pazzini (2014), em que avaliou o uso do PRP em cirurgia reconstrutiva em coelhos, quanto a avaliação da exequibilidade da técnica, achados macroscópicos e histopatológicos. Os resultados encontrados nesse estudo foram significativos quando se avaliou a proliferação vascular no grupo com PRP, no qual esse composto promoveu uma angiogênese no local da aplicação da cirurgia reconstrutiva, mas quando se avaliou intensidade dessa proliferação vascular no grupo tratado, os resultados foram semelhantes entre os grupos experimentais, não apresentando diferença significativa.

O estudo de Pazzini (2014) corrobora os resultados achados neste presente estudo, em que embora não tenha ocorrido uma melhora entre as variáveis nas análises histopatológicas, foi possível visualizar no lado tratado com PRP autólogo gel uma discreta proliferação de fibroblastos e colagenização, promovendo o suprimento de oxigênio e nutrição da ferida, favorecendo o processo cicatricial. Podemos correlacionar tal fato com os fatores de crescimento presentes nas plaquetas, por serem atuantes na fase inicial da cicatrização, (Fernandez-Sarmiento e outros 2013) responsáveis por estimular a angiogênese, mitogênese, permeabilidade capilar, induzindo crescimento do tecido epitelial. Além disso, o colágeno apresentou fibras mais dispostas e melhor distribuídas na derme papilar como na reticular, resultados semelhantes aos achados de Borges e outros (2014).

Atalay e outros (2015), avaliando os efeitos do PRP homólogo e amlodipina na reparação óssea em ratos, concluíram que a amlodipina usada isoladamente não teve efeito negativo e nem positivo, mas quando adicionado PRP foi significativamente positivo. A grande maioria dos estudos relata que o PRP acelerou o processo de cicatrização óssea (Del Fabbro e outros 2011, Monteiro e outros, 2011, Albanese e outros 2013) enquanto outros relatam diferentes resultados (De Vasconcelos e outros 2007; Griffin e outros 2009). Essas controvérsias podem ser pelo método de confecção do PRP, devido às diferenças nas proporções de fatores de crescimento, dosagem, tempo e frequência das inserções de PRP nas feridas, podendo interferir nas condições cicatriciais (Salamama e outros 2015).

Vale a pena salientar que, foi avaliada a qualidade e a quantidade de colágeno presente na ferida após 17 dias e que essas diferenças relatadas acima podem ter indiretamente influenciado no resultado deste presente estudo, pois diferentes concentrações de PRP autólogo em gel podem atuar na proliferação celular determinando o resultado final. Isto se compara com o estudo de Quarteiro e outros (2015) no qual avaliaram os efeitos histológicos do PRP homólogo no reparo do tecido muscular em ratos e verificou que a quantidade de colágeno nas lesões tratadas com PRP foi significativamente menor do que a das demais lesões após sete dias do procedimento, mas o processo inflamatório se mostrou mais intenso nas lesões tratadas com PRP em comparação ao grupo controle, mas se equiparou as dos demais grupos no 21º dia; todavia, os aspectos morfológicos dessas lesões mostraram-se similares ao das lesões tratadas 21 dias após o procedimento. O mesmo foi verificado no estudo de Forni e outros (2013) que utilizaram os fatores de crescimento obtidos a partir do plasma rico em plaquetas autólogo gel para regeneração óssea periodontal em humanos, observaram um aumento da proliferação microvascular nos primeiros 20 dias, seguido pela atividade dos osteoblastos, melhorando assim a quantidade de tecido ósseo.

Além disso, as concentrações de diferentes de fatores de crescimento no PRP obtidos de diferentes espécies (ratos, coelhos, ovelhas e humanos) apresentam variações significativas (Forni e outros 2013). Daí a necessidade de protocolos mais padronizados para que aumente, de fato, os efeitos do PRP no tratamento de feridas.

Esses achados representam uma variabilidade nos resultados ao uso do PRP na cicatrização de ferida, corroborando os achados do presente estudo, no qual apontou uma angiogênese e proliferação vascular positiva.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso do PRP autólogo gel em feridas cirúrgicas em coelhos produziu uma cicatrização de boa qualidade com uma maior angiogênese, melhor distribuição e organização das fibras colágenas, sendo uma alternativa viável no tratamento de feridas.

REFERÊNCIAS

ABEGÃO, K.G.B., BRACALE, B.N., DELFIM, I.G., SANTOS, E.S., LAPOSY, C.B., NAI, G.A., GIUFFRIDA, R. & NOGUEIRA, R.M.B. (2015) Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cirúrgica Brasileira* **30**, 209-215.

- ALBANESE A., LICATA M.E., POLIZZI B. & CAMPISI G. (2013) Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immunity & Agein* **10**, 23. doi: 10.1186/1742-4933-10-23.
- ALVES, P. & VIEIRA, M.(2012) Ensino em feridas: formação pré-graduada em enfermagem. *Journal of Tissue Regeneration and Healing* **1**, 4-9.
- ATALAY, Y., BOZKURT, M.F., GONUL, Y., CAKMAK, O., AGACAYAK, K.S., KÖSE, I., HAZMAN, O., KELES, H., TURAMANLAR, O. & EROGLU, M. (2015) The effects of amlodipine and platelet rich plasma on bone healing in rats. *Drug Design, Development and Therapy* **9**, 1973-1979. doi: 10.2147/dddt.S80778.
- BORGES, L.F., GUTIERREZ, P.S., MARANA, H.R.C. & TABOGA, S.R. (2007) Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron* **38**,580-583.
- BORGES, L., CUZZI, T., MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. & MANELA-AZULAY, M. (2014) Erbium Laser Fracionado no tratamento de fotoenvelhecimento: estudo randomizado, clínico e histopatológico comparativo dos métodos ablativo (2940nm) x não-ablativo (1540nm) após 3 meses. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **89**, 250-8.
- BARRIONUEVO, D.V., LAPOSY, C.B., ABEGÃO, K.G., NOGUEIRA, R.M., NAI, G.A., BRACALE, B.N. & DELFIM, I.G. (2015) Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Laboratory Animals* **49**, 209-214.
- BOTTONI, A., BOTTONI A., RODRIGUES, RC. & CELANO, R.M.G.(2011) Papel da nutrição na cicatrização. *Revista Ciências em Saúde* **1**, 98-103.
- CARMONA, J.U., LOPEZ, C. & GIRALDO, C.E. (2011) O uso do concentrado de plaquetas autólogo na terapia regenerativa músculo-esquelética crônica equina. *Archivos de Medicina Veterinária* **43**, 1-10.
- COLEMAN, R. (2011) Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochemica* **113**, 231-233.
- DE VASCONCELOS, G.B.C, GONÇALVES, P.F & PIMENTEL, S.P, (2007) Platelet rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res.* **18**, 649–654.
- DEROSSI, R., COELHO, A.C.A.O., MELLO, G.S., FRAZÍLIO, F.O., LEAL, C.R.B., FACCO, G.G. & BRUM, K.B. (2009) Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cirúrgica Brasileira* **24**, 276-281.

- DEL FABBRO, M., BORTOLIN, M., TASCHIERI, S. (2011) Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **40**, 891–900. doi: 10.1016/j.ijom.2011.04.009.
- ETHRIDGE, R. T.; LEONG, M. & PHILLIPS, M.T. (2010) Cicatrização de feridas. *Tratado de cirurgia*. Rio de Janeiro: Elsevier.
- FERNÁNDEZ-SARMIENTO, A., DOMINGUEZ, J.M., GRANADOS, M.M., MORGAZ, J., NAVARRETE, R., CARRIUO, J.M., GÓMEZ-VILIAMANDOS, R.J., MUÑOZ-RASCÓN, P., MARTIN DE LAS MUÍAS, J., MILLÁN, Y., GARCÍA-BALLETBÓ, M. & CUGAT, R. (2013) Histological Study of the Influence of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) on the Healing of Divided Achilles Tendons in Sheep. *J Bone Joint Surg Am* **95**, 246-55.
- FORNI, F., MARZAGALLI M., TESEI P. & GRASSI A. (2013) Platelet gel: applications in dental regenerative surgery. *Blood Transfusion* **11**, 102-107. Doi: 10.2450/2012.0007-12
- GONZÁLEZ, M., ARTEAGA-VIZCAÍNO, M., BENITO, M. & BENITO, M. (2012) Application of platelet rich plasma (PRP) and its derivatives in dental implantologie and plastic surgery. *Investigación Clínica* **3**, 408-418.
- GORDIN, K. (2011) Comprehensive scientific overview on the use of platelet rich plasma prolotherapy (PRPP). *Journal of Prolotherapy* **3**, 813-825.
- GRECA, F.H., RAMOS, E.J.B., DALLOLMO, V.C., SILVA, A.P.G., MIMA, W.H., GRIFFIN, X., SMITH, C. & COSTA, M. (2009) The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury* **40**, 158–162.
- ISAAC, C., LADEIRA, P.R.S., REGO, F.M.P., ALDUNATE, J.C.B. & FERREIRA, M.C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista Medicina (São Paulo)* **89**,125-131.
- KANASHIRO, G.P. & CASSU, R.N. (2008) Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade, S.F. Manual de terapêutica veterinária. 3 ed. São Paulo: Roca, 728-745.
- KAUX, J.F. & CRIELAARD, J.M. (2013) Platelet-rich plasma application in the management of chronic tendinopaties. *Acta Orthopaedica Belgica*, **79**, 10-15.
- KIM, D.H., JE, Y.J., KIM, C.D., LEE, Y.H., SEO, Y.J., LEE, J.H. & LEE, Y. (2011) Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Annals of Dermatology*, **23**, 424-431.
- LACCI, K.M. & DARDIK, A. (2010) Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale Journal of Biology and Medicine*, **83**, 1-9.

- LATTOUF, R., YOUNES, R., LUTOMSKI, D., NAAMAN, N., GODEAU, G., SENNI, K. & CHANGOTADE, S. 2014 Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *Journal of Histochemistry and Cytotechnology*, **62**, 751-758.
- MAIA, L. & SOUZA, M.V. (2009) Components rich in platelets used in wound healing tendon, ligaments and osteo-articular diseases of animals. *Ciência Rural*. Santa Maria, **39**,1279-1286.
- MONTEIRO, B.S., DEL CARLO, R.J., ARGÔLO NETO, N.M., BONFÁ, L.P., VILORIA, M.V., NEVES, C.D., CARVALHO, P.H. & BRITO, A.F.S. (2010) Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos. *Revista Ciência Rural*, **40**, 1590-1596.
- OLIVEIRA-FILHO, M.A., ALMEIDA, L.E., PEREIRA, J.A., NASSIF, P.A.N., CZECZKO, N.G., KUME, M.H. & SILVA, M.B.G. (2008). Plasma rico em plaquetas de coelhos: introdução a um modelo experimental. *ABCD: arquivos brasileiros de cirurgia digestiva* **21**, 175-179.
- OLIVEIRA, S.T., LEME, M.C., PIPPI, N.L., RAISER, A.G., MANFRON, M.P., (2000). Formulations of comfrey (*Symphytum officinale* L.) in the healing of skin wounds in rats. *Rev. FZVA* **7/8**, 65-74.
- PAZZINI, J M. (2014) Plasma rico em plaquetas empregado na cirurgia reconstrutiva em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*): Avaliação da exequibilidade da técnica, achados macroscópicos e histopatológicos. *Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal,88f.*
- PIERARD, G.E. (1989) Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. *Matrix* **9**, 68-71.
- QUARTEIRO, M.L., TOGNINI, J.R.F., OLIVEIRA, E.L.F. & SILVEIRA I. (2015) O efeito do plasma rico em plaquetas no reparo de lesões musculares em ratos. *Revista Brasileira de ortopedia* **50**, 586-595.
- RAMANATHAN, A. & CARIAPPA, K. M. (2013) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration after removal of cysts and benign tumours of the jaws. *Oral and Maxillofacial Surgery* **18**, 445-452. doi: 10.1007/s10006-013-0435-0.
- SALAMANNA, F., VERONESI, F., MAGLIO, M., DELLA BELLA, E., SARTORI, M. & FINI, A. (2015) New and Emerging Strategies in Platelet-Rich Plasma Application in

Musculoskeletal Regenerative Procedures: General Overview on Still Open Questions and Outlook. *BioMed Research International* 2015:846045. doi: 10.1155/2015/846045.

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

SANTUZZI, C.H., BUSS, H.F., PEDROSA, D.F., FREIRE, M.O.V.M., NOGUEIRA, B.V. & GONÇALVES, W.L.S. (2011) Uso combinado da laserterapia de baixa potência e da inibição da ciclooxigenase-2 na reepitelização de ferida incisional em pele de camundongos: Um estudo pré-clínico. *Anais Brasileiro de Dermatologia* **86**, 278-83.

SCHIRATO, G.V., MONTEIRO, F.M.F., SILVA, F.O., LIMA FILHO, J.L., LEÃO, A.M.A.C., & PORTO A.L.F. (2006) The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. *Ciencia Rural* **36**, 149-154

WOO, S. H.; JEONG, H. S.; KIM, J. P.; KOH, E. H.; LEE, S. U.; JIN, S. M.; KIM, D. H.; SOHN, J. H. & LEE, S. H. (2014) Favorable vocal fold wound healing induced by platelet-rich plasma injection. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* **7**, 47-52.

VENDRAMIN, F.S., FRANCO, D., SCHAMALL, R.F. & FRANCO, T.R. (2010) Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* **25**, 4-10.

ANEXO

APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA) PROTOCOLO NÚMERO:2356

Certificado

Página 1 de 1

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

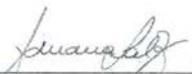
Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS DE FERIDAS DÉRMICAS DE COELHOS TRATADOS COM PRP AUTÓLOGO GEL", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2356 e tendo como participante(s) CECILIA BRAGA LAPOSY (responsável), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (docente), FLAVIA FERNANDES LAVELLI (discente), JESSICA CRISTINA MIOLA DA SILVA (discente), MARIANA CHIARI BERTOLLI (discente), VALERIA CARDOSO MOREIRA (discente), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 4 de Agosto de 2015.



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



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

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 5d2660f1f0a5cff5920d194854a390c8