



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

AMANDA FEBA TETILA

**UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA NO
PROCESSO CICATRICIAL DE FERIDAS DE COELHOS: ESTUDO
LONGITUDINAL**



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

AMANDA FEBA TETILA

**UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA NO
PROCESSO CICATRICIAL DE FERIDAS DE COELHOS: ESTUDO
LONGITUDINAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Braga Laposy

636.932 2
T347u

Tetila, Amanda Feba.

Utilização de Plasma Rico em Plaquetas e Rosuvastatina no processo cicatricial de feridas de colhos: um estudo longitudinal / Amanda Feba Tetila. – Presidente Prudente, 2018.
30f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Braga Laposy

1. Cicatrização. 2. Plasma Rico em Plaquetas. 3. Rosuvastatina Cálcica.

AMANDA FEBA TETILA

**UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA NO
PROCESSO CICATRICIAL DE FERIDAS DE COELHOS: ESTUDO
LONGITUDINAL**

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, 28 de setembro de 2018

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Unesp
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com meu desenvolvimento. Principalmente a minha família, que sempre esteve presente; Agradeço a Deus por não me deixar desistir nessa jornada; A professora orientadora Cecília, pela sua paciência e orientação essenciais para a conclusão desse trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”
Charles Chaplin

RESUMO

A engenharia tecidual, assim como a medicina regenerativa são campos que vêm crescendo nos últimos anos, tendo o objetivo de reparar, regenerar ou substituir tecidos e órgãos lesados. O PRP tem sido bastante estudado nas áreas de cirurgia plástica e dermatologia com enfoque na remodelação de cicatrizes. Numerosos estudos com ainda estão sendo feitos em busca de novas descobertas relacionadas a esse elemento sanguíneo. Evidências estão se mostrando favoráveis ao uso de estatinas em lesões de pele, Além de reduzir o colesterol, as estatinas melhoram a função endotelial, aumentam a estabilidade das placas ateroscleróticas e inibem o processo inflamatório. Neste sentido, o presente estudo analisou as fibras colágenas de feridas de coelhos após tratamento PRP associado ou não à RSV. A hipótese baseia-se que o uso seriado da RSV associado ao PRP possa melhorar a quantidade das fibras colágenas neoformadas após lesão experimentalmente induzida. Foram utilizados 8 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos, tratados com PRP autólogo, rosuvastatina (RSV) e associação (PRP+RSV) Para confecção das quatro feridas no dorso de cada coelho utilizou-se um punch de 8mm. A ferida considerada controle foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9%® e as demais tratadas com PRP isolado e/ou associado à RSV. Os curativos forma trocados a cada 4 dias com aplicação do PRP e rosuvastatina até completarem 16 dias de experimento. Aos 0,7,10,14 e 17 dias foram feitas biópsias para avaliação histopatológica do tecido cicatricial. Com relação à avaliação histopatológica, verificou-se que, ao final de 17 dias de tratamento, houve reepitelização em 100% das feridas que receberam somente PRP, contrapondo com 50% só com rosuvastatina e 75% quando houve associação do biomaterial com a estatina. A associação da rosuvastatina ao PRP inibiu a perda de sangue. O uso do PRP isolado proporcionou 62,5% de neovascularização, contra 50% nas feridas que tiveram associação dos tratamentos. Com relação porcentagem de fibras colágenas ao 17^o dia, todas as feridas apresentaram maior porcentagem de fibras quando comparadas ao controle ($78,27 \pm 4,69$). Embora estatisticamente iguais, observou-se que a ferida que recebeu somente a RSV apresentou a menor quantidade de fibras colágenas ($85,98 \pm 3,51$). Já as feridas que receberam PRP ou PRP e RSV apresentaram, respectivamente $90,07 \pm 6,20$ e $90,76 \pm 3,51$. Conclui-se que o PRP possui maior atividade nos sete primeiros dias da lesão e que o tratamento com a RSV, sozinho ou associado ao PRP não potencializou as demais fases da cicatrização, nem aumentou a porcentagem de fibras colágenas.

Palavras-chave: Cicatrização, Plasma Rico em Plaquetas, Rosuvastatina Cálcica,

ABSTRACT

Tissue engineering, as well as regenerative medicine, are fields that have been growing in recent years, aiming to repair, regenerate or replace damaged tissues and organs. PRP has been extensively studied in the areas of plastic surgery and dermatology with a focus on scar remodeling. Numerous studies with are still being done in search of new findings related to this blood element. Evidence is proving to favor the use of statins in skin lesions. In addition to lowering cholesterol, statins improve endothelial function, increase the stability of atherosclerotic plaques, and inhibit the inflammatory process. In this sense, the present study analyzed the collagen fibers of rabbit wounds after PRP treatment associated or not to RSV. The hypothesis is that serial use of RSV associated with PRP may improve the amount of neofomed collagen fibers after experimentally induced injury. 8 male New Zealand rabbits treated with autologous PRP, rosuvastatin (RSV) and association (PRP + RSV) were used to prepare the four wounds on the back of each rabbit. The treated wound was treated with 0.9% sodium chloride solution and the others treated with PRP isolated and / or associated with RSV. The dressings were changed every 4 days with application of PRP and rosuvastatin until 16 days of experiment. Biopsies were made at 0,7,10,14 and 17 days for histopathological evaluation of the scar tissue. Regarding the histopathological evaluation, at the end of 17 days of treatment, there was re-epithelialization in 100% of the wounds that received PRP only, opposing with 50% only with rosuvastatin and 75% when there was an association of the biomaterial with the statin. The combination of rosuvastatin and PRP inhibited blood loss. The use of PRP alone provided 62.5% of neovascularization, against 50% in wounds that had association of treatments. With regard to the percentage of collagen fibers at 170 days, all wounds had a higher percentage of fibers when compared to the control (78.27 ± 4.69). Although statistically equal, it was observed that the wound that received only RSV had the lowest amount of collagen fibers (85.98 ± 3.51). Wounds that received PRP or PRP and RSV presented 90.07 ± 6.20 and 90.76 ± 3.51 , respectively. It is concluded that the PRP has greater activity in the first seven days of the lesion and that the treatment with RSV, alone or associated with PRP did not potentiate the other phases of healing, nor did it increase the percentage of collagen fibers.

Key words: Cicatrization, Platelet- rich Plasma, Rosuvastatin Calcica,

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
	ANEXO 1.....	27
	ANEXO 2.....	31

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Utilização de plasma rico em plaquetas e rosuvastatina no processo cicatricial de feridas de coelhos: estudo longitudinal

Tetila, AF; Breda, MRS; Silvino, MG; Nogueira, RM; Nai, GA; Laposy, CB

Amanda Feba Tetila – Fisioterapeuta, Pós-Graduanda, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Maria Rosa Santos Breda- Médica Veterinária-Pós-Graduanda, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Mayara Gimenez Silvino- Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Rosa Maria Barilli Nogueira- Dra., Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Gisele Alborghetti Nai- Dra., Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Cecília Braga Laposy- Dra., Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Ao autores declaram que não há conflito de interesses.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-processo número 2016/25938-0).

RESUMO

Objetivo: utilizar o plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não a rosuvastatina com a hipótese de melhorar a cicatrização de feridas induzidas experimentalmente em coelhos analisando as alterações morfológicas das lesões.

Desenho experimental: foram utilizados 8 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos, tratados com PRP autólogo, rosuvastatina (RSV) e associação (PRP+RSV) Para confecção das quatro feridas no dorso de cada coelho utilizou-se um punch de 8mm. A ferida considerada controle foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9%® e as demais tratadas com PRP isolado e/ou associado à rosuvastatina. Os curativos foram trocados a cada 4 dias com aplicação do PRP e rosuvastatina até completarem 16 dias de experimento. Aos 0,7,10,14 e 17 dias foram feitas biópsias para avaliação histopatológica do tecido cicatricial.

Principais Resultados: Com relação à avaliação histopatológica, verificou-se que, ao final de 17 dias de tratamento, houve reepitelização em 100% das feridas que receberam somente PRP, contrapondo com 50% só com rosuvastatina e 75% quando houve associação do biomaterial com a estatina. A associação da rosuvastatina ao PRP inibiu a perda de sangue. O uso do PRP isolado proporcionou 62,5% de neovascularização, contra 50% nas feridas que tiveram associação dos tratamentos. Com relação porcentagem de fibras colágenas ao 17^o dia, todas as feridas apresentaram maior porcentagem de fibras quando comparadas ao controle (78,27±4,69). Entre os tratamentos, não foi verificada alteração significativa. Embora estatisticamente iguais, observou-se que a ferida que recebeu somente a RSV apresentou a menor quantidade de fibras colágenas(85,98±3,51). Já as feridas que receberam PRP ou PRP e RSV apresentaram, respectivamente, 90,07±6,20 e 90,76±3,51.

Conclusões: o PRP possui maior atividade nos sete primeiros dias da lesão e que o tratamento com a RSV, sozinho ou associado ao PRP não potencializou as demais fases da cicatrização, nem aumentou a porcentagem de fibras colágenas.

Palavras-chave: Cicatrização, Plasma Rico em Plaquetas, Rosuvastatina Cálcica,

Introdução

A engenharia tecidual, assim como a medicina regenerativa são campos que vêm crescendo nos últimos anos, promovendo reparação, regeneração ou substituindo tecidos e órgãos lesados.¹

Com relação ao estudo de novas técnicas, o PRP tem sido bastante pesquisado nas áreas de cirurgia plástica e dermatologia com enfoque na remodelação de cicatrizes.^{2,3} Ele corresponde a uma porção de plasma presente no sangue autólogo, com uma concentração de plaquetas maior que a normal^{4,5}. Apresenta fatores de crescimento que atuam estimulando a miogênese e a angiogênese principalmente.^{6,7} Ele destaca-se também pelo seu custo-benefício e sua capacidade regenerativa, sendo uma alternativa eficaz por conta de sua concentração supra-fisiológica das plaquetas ricas em fatores de crescimento que apresentam importante papel no processo de cura, exercendo uma abordagem biológica interessante para auxiliar a cicatrização de tecido.^{8,9} Estudos ainda estão sendo feitos em busca de novas descobertas relacionadas a esse elemento sanguíneo¹⁰.

Há evidências favoráveis ao uso de estatinas em lesões de pele, além de reduzir o colesterol, as estatinas melhoram a função endotelial, aumentam a estabilidade das placas ateroscleróticas e inibem o processo inflamatório.¹¹ Os resultados apresentados em estudos mostram um efeito promissor na administração desse medicamento no processo cicatricial. No entanto, ainda são necessários mais estudos clínicos para avaliar o uso terapêutico das estatinas na cicatrização de feridas.^{12,13} Estudo feito por Parson et al.¹⁴, mostrou que a terapia com rosuvastatina modifica de forma positiva o fluxo sanguíneo basal na pele e as medidas da função neurovascular. No entanto, embora tenha ocorrido uma profunda redução do perfil lipídico, não está claro se este efeito está envolvido no aumento do fluxo sanguíneo e diminuição dos escores de neuropatia e por consequência uma melhora no processo de cicatrização.

A hipótese do estudo baseia-se que o uso seriado da RSV associado ao PRP possa melhorar a quantidade das fibras colágenas neoformadas após lesão experimentalmente induzida. Neste sentido, o presente estudo analisou as

fibras colágenas de feridas de coelhos após tratamento PRP associado ou não à RSV.

Material e Métodos

Animais

O trabalho foi aprovado pela comissão de Ética em Uso de Animais da Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil (protocolo 3478). Foram utilizados 8 coelhos machos adultos (3 ± 1 anos), clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia, peso médio $3,0\pm 1,0$ kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo (12 horas claro/escuro) controlados. Os coelhos permaneceram em adaptação por sete dias antes do estudo. Durante todo o experimento foram mantidos em condições padronizadas de dieta (Supra Coelho Agro, Alisul Alimentos S.A, Maringá, Paraná, Brasil) e água à vontade.

Procedimento anestésico

Os coelhos foram contidos manualmente para realização da tricotomia da região dorsal direita e esquerda. Em seguida, os animais foram anestesiados (intramuscular-IM) com uma associação de cloridrato de Xilazina a 2% (Xilazin[®] 2%) e Cloridrato de Zolazepam (Zoletil[®] 50) na dose de 15mg/Kg intramuscular. Foi aplicado o teste de reflexo ocular para verificar-se se o animal estava realmente sobre efeito da anestesia. Feito isso, aplicou-se previamente 0,1 mL de anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor) no local de cada lesão.¹⁵

Preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)

Após procedimento anestésico, colheu-se 8mL de sangue proveniente da veia auricular utilizando scalp 25G. O material foi transferido para dois frascos contendo o anticoagulante citrato de sódio. Deste material foi retirada uma alíquota para a contagem automática de plaquetas (contador automático Sysmex Poch Diff 100iV- Roche) e depois centrifugado, inicialmente a 200G (centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos para formação de dois

níveis: toda a fração correspondente ao plasma mais 200µL da fração vermelha foi transferida para outro tubo para nova centrifugação (400G por 10 minutos). Nesta segunda etapa formaram-se dois níveis distintos: um superior com coloração levemente amarelado denominado plasma pobre em plaquetas (PPP) e um inferior, avermelhado. Retirou-se o PPP e do restante foi realizada nova contagem de plaquetas, com o objetivo de verificar se houve concentração superior a seis vezes do inicial¹⁶. Após constatação da concentração plaquetária adequada, foram preparados dois tubos: um contendo 200µL de PRP líquido, 200µL de rosuvastatina líquida e 100 µL de gluconato de cálcio a 10%. O segundo tubo contendo 400 µL de PRP líquido e 100 µL de gluconato de cálcio a 10%, sendo que para ambos os frascos o volume final de PRP em gel foi de 0,5mL (Figura 1).

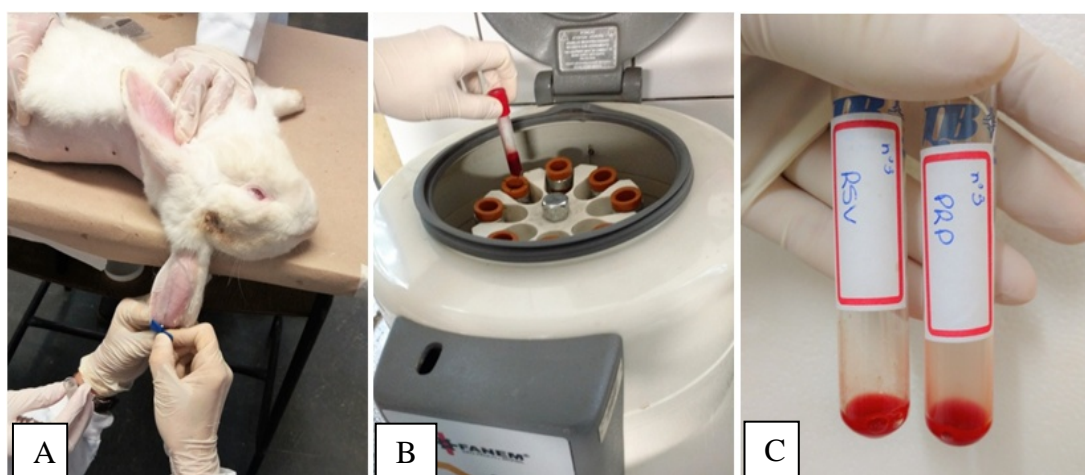


Figura 1.: A-obtenção do sangue pela veia auricular;B- centrifugação das amostras;C –materiais prontos para uso (PRP+RSV e PRP).

Preparo da Rosuvastatina

Formulou-se a RSV a 1,2%[®] (Chikkaballapur, Karnataka, India) na forma líquida a fim de ser incorporada ao PRP e posteriormente todo o material foi transformado em gel com a adição do gluconato de cálcio. Para o tratamento da ferida somente com gel de RSV, formulou-se a RSV a 1,2% na forma gel.¹⁷

Feridas cirúrgicas

Com os animais anestesiados, a pele foi demarcada em quatro locais com auxílio de caneta utilizado um punch de 8mm para realização das feridas cirúrgicas. Os fragmentos foram retirados com auxílio de uma pinça anatômica, preservando a musculatura¹⁸. A ferida considerada controle (lado esquerdo superior) foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9%[®]. A lesão do lado esquerdo inferior recebeu o gel de RSV a 1,2% . A ferida do lado direito superior foi tratada com PRP autólogo na forma gel e a ferida do lado direito inferior recebeu gel de RSV e PRP autólogo gel (Figura 2). Em seguida foi colocado um curativo sobre as quatro feridas (lado direito e esquerdo/ superior e inferior) com ryon estéril e curativo adesivo (Band Aid[®]).

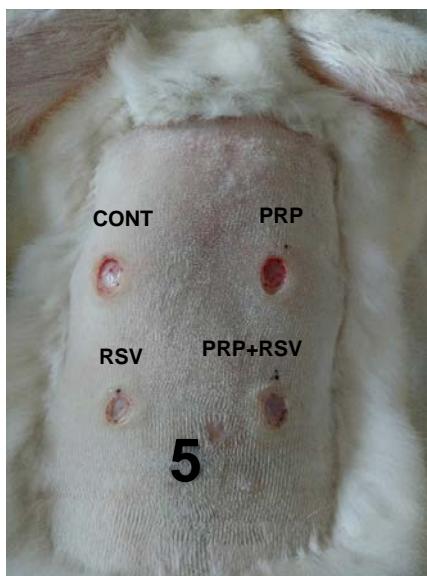


Figura 2: Coelho tricotomizado evidenciando o esquema de tratamento das feridas.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam analgésico cloridrato de Tramadol, na dose de 0,5mg/Kg, IM, 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos, a fim de minimizar o desconforto inicial. A primeira troca dos curativos foi feita 3 dias após a indução das feridas e este segundo curativo permaneceu por mais quatro dias. A partir disso, os tratamentos ocorreram a cada 4 dias, segundo protocolo estabelecido por Vendramin et al.¹⁶, até completarem 16 dias de experimento. A borda do ferimento era retirada, para

realização das biópsias nos momentos 0,7,14 e 17 dias para posterior análise histológica.

As amostras de pele foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se a seguir 4 cortes histológicos de 4 micrômetros de cada animal que foram corados com solução de Hematoxilina-Eosina (H/E) e Picrosírius para aferição do colágeno.

Avaliação do colágeno

Para quantificar e avaliar o colágeno foi utilizado à técnica de polarização com o corante Picrosírius-red F3BA¹⁹. A coloração com Picrosírius 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 verde²⁰.

Captação das imagens

Para a captação das imagens, foi utilizado microscópio de luz de polarizada (Leica DM 750, Wetzlar, Germany) acoplado a uma câmera (Leica ICC 50 HD, Wetzlar, Germany). 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°.

Avaliação histopatológica

Na epiderme foi avaliada degeneração, necrose e regeneração, e na derme: edema, hemorragia, grau de neovascularização, fibrose e tipo de infiltrado inflamatório. Para todos os parâmetros analisados, foi aplicado o sistema de escore, onde: (0) representou ausência, (1) alteração leve, (2) alteração moderada e (3) alteração acentuada. Todas as avaliações foram feitas por um único observador e de forma cega.²¹

Cálculo de contração das feridas

A área da ferida foi mensurada com auxílio de paquímetro digital marca DC-60 Western® nos momentos acima citados e em seguida foi calculado o percentual de contração de cada lesão utilizando modelo matemático proposto por Oliveira et al.²² 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: $Pc = (Af - Ai) \times 100 / Ai$.

Análise estatística

Previamente às análises, todos os grupos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para validação do pressuposto de normalidade dos dados, pelo qual se verificou que as variáveis apresentaram distribuição não-paramétrica. As feridas controle e as dos diferentes tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e dentro de cada grupo, com contrastes pelo método de Student-Newman-Keuls. Para todas as análises considerou-se $P < 0,05$.

Resultados

Análise morfométrica:

Em todos os momentos a ferida foi fotografada com câmera digital. As porcentagens de contração das feridas que receberam a RSV sozinha ou associada ao PRP (letras C e D) foram de 85,4% e 87,4%, respectivamente, já a ferida que recebeu somente o PRP obteve uma contração de 90,9%, muito próxima do controle (93,3%) no 17º dia ($P > 0,05$).

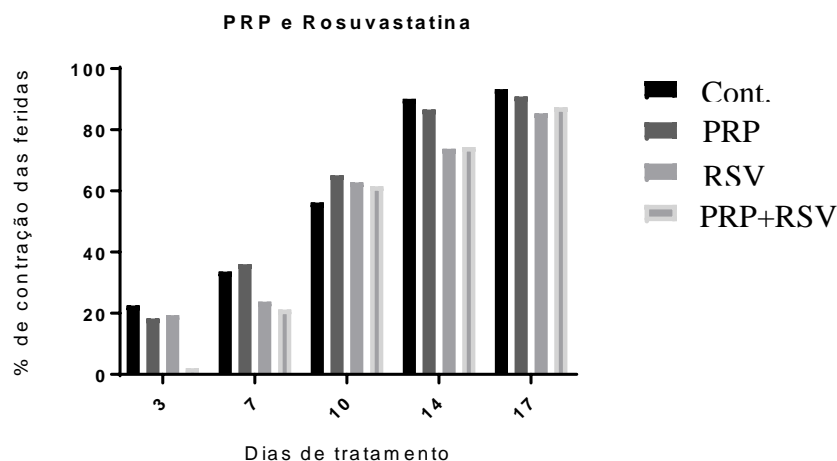


Figura 3: Porcentagem de contração das feridas tratadas com PRP e RSV a 1,2% do 3^o ao 17^o dia.

Macroscopicamente não houve diferenças quanto ao fechamento. O aspecto das feridas permaneceu com coloração rósea durante todo o experimento, sem características macroscópicas de contaminação, excesso de granulação, dor ou presença de exsudato. Nenhuma ferida de todos os tratamentos fechou por completo. Porém, verificou-se que o tratamento com o PRP proporcionou um fechamento mais homogêneo das bordas das feridas, conforme demonstrado na figura 4.

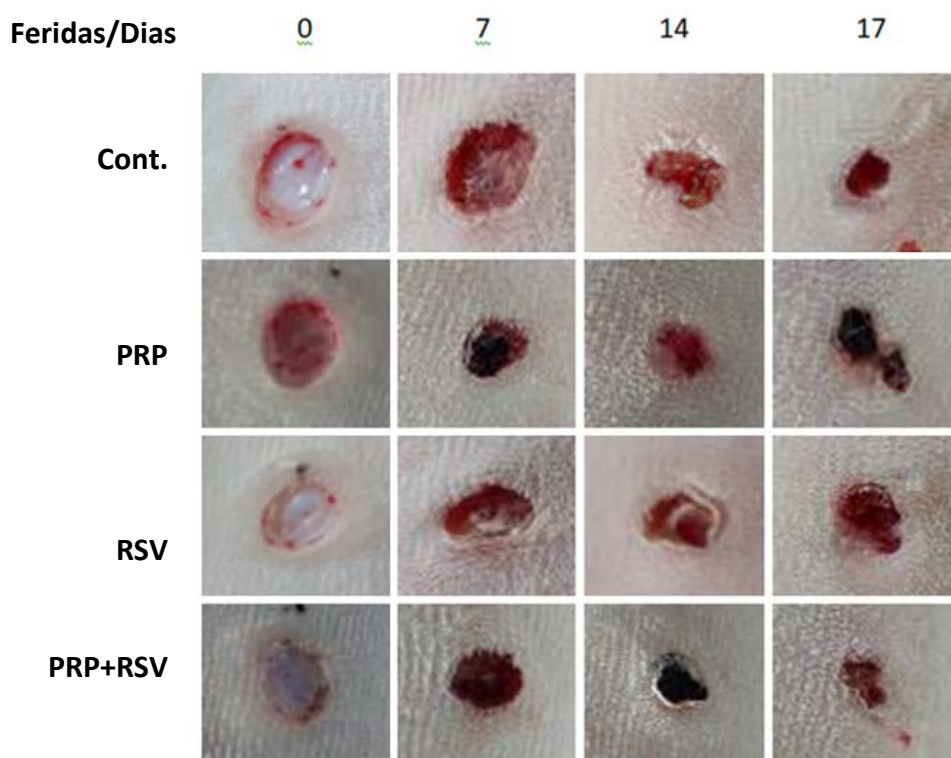


Figura 4. Acompanhamento macroscópico das feridas tratadas com PRP e rosuvastatina a 1,2%.

Avaliação histopatológica

Com relação à avaliação histopatológica, verificou-se ao final de 17 dias de tratamento, houve reepitelização em 100% das feridas (Figura 5) que receberam somente PRP, contrapondo com 50% só com RSV e 75% quando

houve associação do PRP com a RSV quando comparadas ao momento inicial ($P>0,05$)

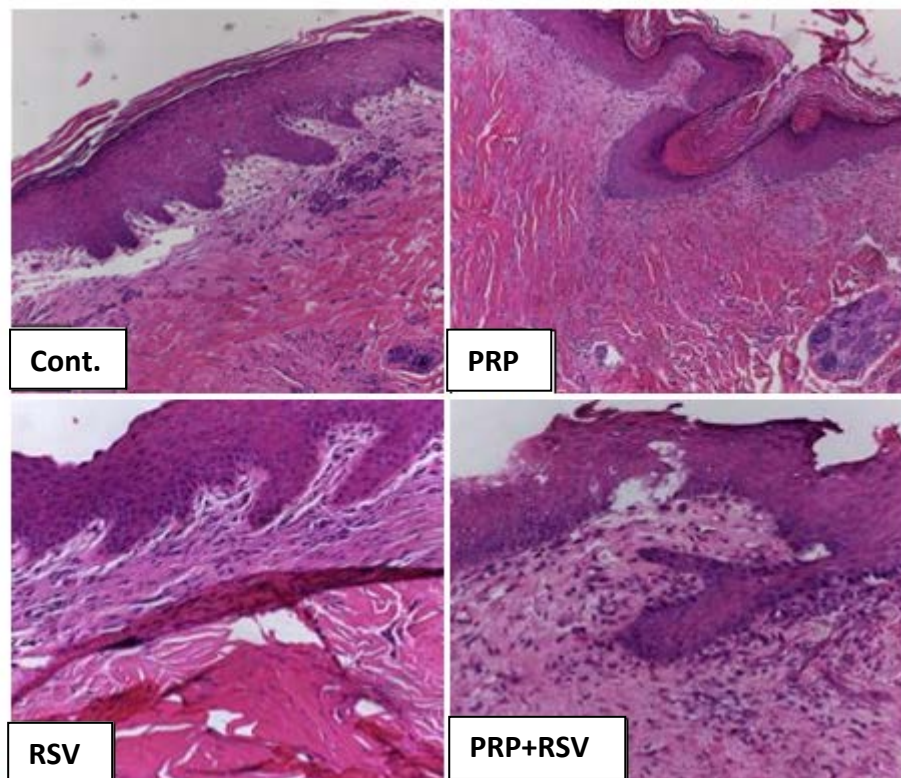


Figura 5. Fotomicroscopia da reepitelização das feridas ao 17^o dia: controle, PRP (Aumento 20X), RSV, PRP + RSV (Aumento 10X). Hematoxilina-eosina. Observar reepitelizações semelhantes nos diferentes tipos de tratamento.

Os diferentes tipos de tratamento proporcionaram um edema em 50% das feridas. Já naquelas que foram tratadas apenas com solução fisiológica, apenas 12,5% evidenciaram edema ao final do experimento.

Quanto à presença de hemorragias, pode-se afirmar que a associação da RSV ao PRP inibiu a perda de sangue, pois em 100% das feridas que receberam este medicamento não apresentaram características hemorrágicas. Verificou-se também que o uso do PRP isolado proporcionou 62,5% contra 50% nas feridas que tiveram associação dos tratamentos (PRP+RSV).

Em relação ao infiltrado inflamatório, ao final do 17^o dia, 100% das feridas que não receberam tratamento apresentaram infiltrado de células polimorfonucleares com intensidade variando de leve a acentuada. Já nas

feridas tratadas apenas com PRP ou associado à RSV, as células predominantes foram mononucleares.

Quanto a fibrose, todas as feridas apresentaram grau acentuado, somente aquelas tratadas com PRP isolado, reduziram a intensidade (moderada).

Com relação porcentagem de fibras colágenas ao 17^o dia, todas as feridas apresentaram maior porcentagem de fibras ($78,27 \pm 4,69$) quando comparadas ao controle ($P > 0,05$). Entre os tratamentos, não foi verificada alteração significativa. Embora estatisticamente iguais, observou-se que a ferida que recebeu somente a RSV apresentou a menor quantidade de fibras colágenas ($85,98 \pm 3,51$). Já as feridas que receberam PRP ou PRP e RSV apresentaram, respectivamente, $90,07 \pm 6,20$ e $90,76 \pm 3,51$. (Figura 6)

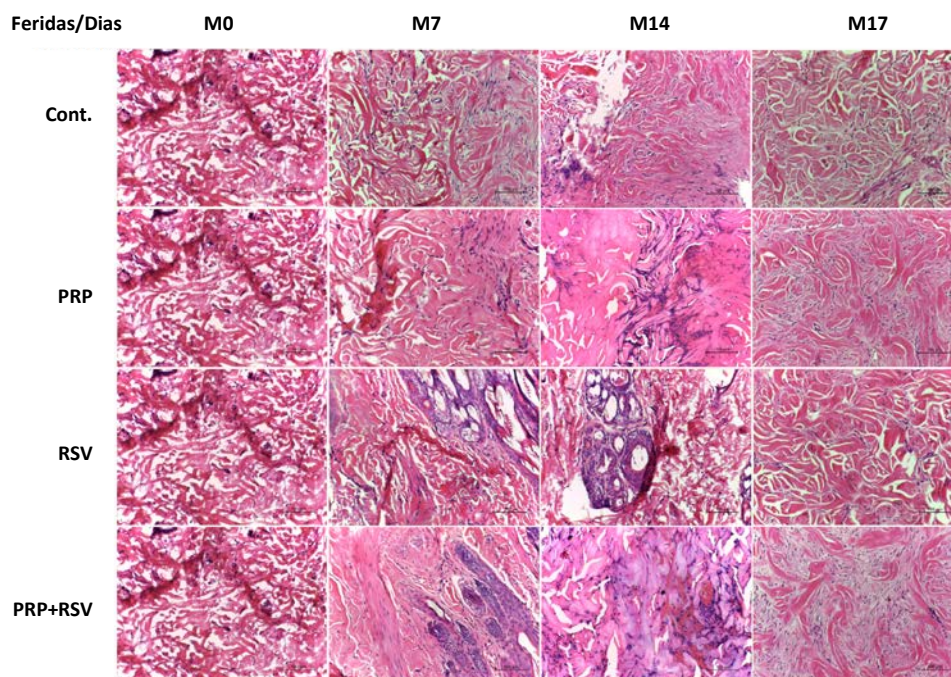


Figura 6: Fotomicroscopia das fibras colágenas nos diferentes momentos de tratamento: controle, PRP (Aumento 20X), RSV, PRP + RSV (Aumento 10X). Hematoxilina-eosina.

Discussão

Mansoub et al. ²³ observaram a cicatrização de feridas em ratos diabéticos, onde a contração da ferida se iniciou mais precocemente nos grupos tratados

PRP ou com células queratinócitas em comparação ao grupo controle. No entanto, quando aplicados em combinação houve um retardo cicatrização das feridas. Já no presente estudo, a porcentagem de contração das feridas feitas em coelhos demonstrou-se maior no grupo controle quando compara aos outros tratamentos. Essa diferença nos resultados pode ser atribuída ao fato de que, no estudo citado acima, os animais tratados eram diabéticos, enquanto no presente estudo, os animais apresentavam-se saudáveis.

Embora seu emprego farmacológico hipolipemiante esteja bem estabelecido, atualmente, as estatinas têm sido investigadas por meio de estudos experimentais, que demonstraram outros efeitos não relacionados ao metabolismo lipídico, denominados efeitos pleiotrópicos²⁴, destacando-se as atividades anti-inflamatórias²⁵, antioxidantes²⁶, imunomoduladoras²⁷, de proliferação celular²⁸, antitrombóticas e ação de proteção endotelial²⁹.

Quanto à atividade anti-inflamatória, uma vez que os isoprenóides são produtos intermediários da via do mevalonato, via inibida pelas estatinas, ao serem inibidos ocorre uma diminuição da ação das proteínas GTP-ases, que são sinalizadoras celulares com efeitos na proliferação e migração celular, controle do mecanismo oxido-redução da célula e apoptose. Quando as estatinas inibem a cascata do mevalonato reduzem a ação das GTP-ases promovendo a atividade da oxido nítrico sintase (eNOS), e suprimindo o estresse oxidativo local, diminuindo a atividade da NF-KB e reduzindo a liberação de citocinas inflamatórias³⁰ o que explicaria o tipo mononuclear ser predominante nas lesões que receberam a rosuvastatina. Resultados semelhantes foram obtidos por Pradeep et al.³¹, que realizaram um ensaio clínico controlado e padronizado com 65 indivíduos com periodontite crônica que foram submetidos a tratamento subgengival com gel de rosuvastatina 1,2% e avaliados por meio de exames clínicos e radiológicos, até completar 6 meses comparados com grupo controle, o qual recebeu placebo. O estudo demonstrou que o tratamento com rosuvastatina estimulou a expressão genica de proteínas morfogenéticas em osteoblastos que levam a redução da reabsorção óssea local e melhora do quadro inflamatório periodontal.

Lin et al.²⁸ conduziu um estudo randomizado com uso de estatinas, avaliando na circulação presença de células progenitoras epiteliais (EPC) periféricas e

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em pacientes com alto risco cardíaco, diabéticos e hipercolesterolêmicos, durante 12 semanas. *In vivo*, quantificou biomarcadores sistêmicos como PCR ultrasensível, óxido nítrico total, IL-10, fator necrosante tumoral (TNF- α), apo-A1 e dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor natural da eNOS. Observaram-se alterações significativas na VEGF maior aumento com uso da pitavastatina, e redução da ADMA. *In vitro* realizou um ensaio de angiogênese para observar a proliferação das células EPC tratadas com as estatinas, observando porcentagem maior de proliferação e aumento da expressão da eNOS. Este estudo propõe um efeito direto das estatinas pitavastatina e atorvastatina, respectivamente, na proliferação de EPC e ativação da eNOS relacionado com o aumento da VEGF, e, o mesmo efeito por via diferente, diminuindo a ADMA. No presente estudo, não foi observado aumento da angiogênese e reepitelização. Porém, um claro benefício das estatinas no contexto da terapia é a diminuição de sangramento, corroborado por Teshima et al.²⁷.

Conclusões

Pode-se concluir que o PRP possui maior atividade nos sete primeiros dias da lesão e que o tratamento com a RSV, sozinho ou associado ao PRP não potencializou as demais fases da cicatrização, nem aumentou a porcentagem de fibras colágenas.

Referências

1. Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M. An introduction to stem cell biology and tissue engineering. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. England: Elsevier, 2015.
2. Gawdat HI, Hegazy RA, Fawzy MM, Fathy M. Autologous platelet rich plasma: topical versus intradermal after fractional ablative carbon dioxide laser treatment of atrophic acne scars. *Dermatol Surg* 2015; 40(2):152-61.
3. Nofal E, Helmy A, Nofal A, Alakad R, Nasr M. Platelet-rich plasma versus CROSS technique with 100% trichloroacetic acid versus combined skin needling and platelet rich plasma in the treatment of atrophic acne scars: a comparative study. *Dermatol Surg* 2014; 40(8):864-73.
4. Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy- future or trend? *Arthritis Res Ther* 2012; 14(4):219.
5. Yuan T, Zhang CQ, Wang J. Augmenting tendon and ligament repair with platelet-rich plasma (PRP). *Muscles Ligaments Tendons J* 2013; 3(3):139.
6. Anitua E, Prado R, Sánchez M, Orive G. Platelet-rich plasma: preparation and formulation. *Oper Tech Orthop* 2012; 22(1):25–32.
7. Sánchez-González DJ, Méndez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept* 2012;2012:519–32.
8. Gordin, K. Comprehensive scientific overview on the use of platelet rich plasma prolotherapy (PRPP). *Journal of Prolotherapy* 2011; 3(4):813-825.
9. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli M L, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015; 23(9):2459-2474.

10. Pazzini J M, Nardi, A B D, Huppes R R, Gering A P, Ferreira M G, Silveira C P, Oliveira J A. Use of platelet rich plasma to stimulate angiogenesis in the thoracodorsal axial pattern flap in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Pesq Vet Bras* 2016;36(2):108-118.
11. Martins, K. B. A. Estudo randomizado da intervenção coronária percutânea após administração da rosuvastatina para prevenção de infarto do miocárdio periprocedimento. Tese, Universidade de São Paulo.
12. Pietrovski EF, Mascarenhas L, Scheeren E, Neves EB. Úlceras do pé diabético podem ser tratadas com estatinas? *Rev Bras Farm* 2012; 93(3):279-82.
13. Raposio E, Libondi G, Bertozzi N, Grignaffini E, Grieco MP. Effects of topic simvastatin for the treatment of chronic vascular cutaneous ulcers: a pilot study. *J Am Coll Clin Wound Spec* 2015; 7(1):13-8.
14. Parson H K, Bundy MA, Dublin CB, Boyd AL, Paulson JF, Vinik AI. Pleiotropic effects of rosuvastatin on microvascular function in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2010; 3:19.
15. Kanashiro GP, Cassu RN. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. Manual de terapêutica veterinária. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008.
16. Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cirur Plast* 2009; 24 (2): 212-218.
17. Pradeep A R, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K, Guruprasad CN, Kumaraswamy KM. Efficacy of Locally Delivered 1.2% Rosuvastatin Gel To Non-Surgical Treatment of Patients With Chronic Periodontitis: A Randomized, PlaceboControlled Clinical Trial. *J Periodontol* 2015; 86:6.

18. Barrionuevo DV, Laposy CB, Abegão KGB, Nogueira RMB, Nai GA, Bracale BN, Delfim IG. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Lab Anim* 2015;13:1-6.
19. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, Changotade S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(10):751-58.
20. Griffin XL, Smith C M, Costa ML. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury* 2009;40(2):158-62.
21. Nai GA, Manzoli LMF, SILVA TCID, Mamede LDQ, Disconzi MEDOM, Giuffrida R Action of ascorbic acid on the healing of malnourished rats' skin wounds. *Rev de Nutri* 2014; 27(4), 459-472
22. Oliveira ST, Leme MC, Pippi NL, Raiser AG. Formulações de confrei (*Symphytum officinale L.*) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. *Revista FZVA* 2000; 7/8 (1): 65-74.
23. Mansoub NH, Gürdal M, Karadadaş E, Kabadayi H, Vatanserver S, Ercan G. The role of PRP and adipose tissue-derived keratinocytes on burn wound healing in diabetic rats. *BiolImpacts* 2018; 8(1):5.
24. Pintó X, Formiga F. Las estatinas, el riesgo de diabetes y el tratamiento de la hipercolesterolemia en la población anciana. *Rev Esp Ger Gerontol* 2015; 47(6): 243–44.
25. Iwata A, Shirai R, Ishii H, Kushima H, Otani S, Hashinaga K et al. Inhibitory effect of statins on inflammatory cytokine production from human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2012; 168 (2): 234–40.

26. Santos FN, Watanabe M, Vasco CF, Fonseca CD, Vattimo MFF. Proteção antioxidante da estatina na lesão renal aguda induzida pela sepse. *Rev Bras Enferm USP* 2014; 48 (5):820-26.
27. Teshima CAS, Watanabe M, Fonseca CD, Vattimo, MFF. Simvastatin and acute ischemic renal injury in rats. *Acta Paul Enfer* 2012; 25(1): 86–9.
28. Lin L-L, Huang C-C, Chen J-S, Wu T-C, Leu H-B, Huang P-H et al. Effects of pitavastatin versus atorvastatin on the peripheral endothelial progenitor cells and vascular endothelial growth factor in high-risk patients: a pilot prospective, double-blind, randomized study. *Cardiovascular Diabetology* 2014; 13: 1–11.
29. Moraes LA, Vaiyapuri S, Sasikumar P, Ali MS, Kriek N, Sage T et al.. Antithrombotic actions of statins involve PECAM-1 signaling. *Blood* 2013; 122(18): 3188–96.
30. Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: beyond lipid lowering. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(8):1198-215.
31. Pradeep AR, Karvekar S, Nagpal K, Patnaik K, Raju A, Priyanka S. Rosuvastatin 1,2 mg in situ gel combined with 1:1 mixture of autologous platelet-rich fibrina and porous hydroxyapatite bone graft in surgical treatment of mandibular class II furcation defects: a randomized clinical control trial. *J Periodontol* 2016; 2016(87):5-13.

ANEXO 1

Normas da Revista

Advances in Skin & Wound Care

Online Submission and Review System

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Advances in Skin & Wound Care, a peer-reviewed, multidisciplinary journal, publishes original investigations, scholarly reviews of the literature, reports on innovative treatments, case series, and practical articles for skin and wound care professionals. Published articles are pertinent for all professionals involved in wound management: physicians, podiatrists, physical and occupational therapists, nurses, dietitians, infection control practitioners, pharmacists, biomedical engineers, and administrators of hospitals, long-term-care facilities, and home health agencies.

The journal welcomes submissions of original articles in all areas of skin and wound management. Manuscripts are considered for publication only if the work has not been published and is not under consideration for publication by another periodical. All authors must reveal affiliation with organizations that have a direct or indirect financial interest in the editorial content or products that are discussed in the manuscript. Manuscript submissions must be accompanied by the Copyright Transfer and Agreement form (CTA) and an author profile form.

Direct all correspondence and questions to:

Advances in Skin & Wound Care

Two Commerce Square
2001 Market Street
Ambler, PA 19002-2758
Philadelphia, PA 19103
Telephone: 215-521-8816
E-Mail: ASWCedit@wolterskluwer.com

Review Process

All submitted papers are subject to a blind peer review. The initial review process takes 2 to 3 months. Reviewers' comments will be shared with the authors.

Accepted manuscripts are subject to editorial revisions for clarity, punctuation, grammar, syntax, and conformity to journal style. If substantive revision is necessary, the manuscript will be returned to the authors for rework based on feedback from the Editor-in-Chief and peer reviewers. The corresponding author will receive a copy of the final manuscript for review prior to publication.

Manuscript Submission

All manuscripts must be submitted electronically to www.lwwesubmissions.com

Original Investigation

Original Investigations should be organized as follows:

- **Title Page:** Include the article title, the full name of each author, highest academic degree, and current affiliation, including city and state. The title page must also include disclosure of conflicts of interest and funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).
- **Abstract:** A structured abstract of no more than 250 words included within the body of the manuscript should contain the following headings: Objective, Design, Setting, Patients (or Participants), Interventions (if any), Main Outcome Measure(s), Main Results, Conclusions, and Keywords.
- **Text:** Include an introduction (with a short literature review and statement of problem), methods, results, discussion (include implications for clinical practice), and conclusions.
- **References:** Authors must use AMA (American Medical Association) style for references. Do not use endnotes in the text. Type the references double spaced, numbering each one consecutively the first time it is cited in the text (do not use the author's name in the text; references must be numbered). Use superscript numbers, placed after the punctuation. List all authors when there are 6 or fewer; for 7 or more, list the first 3 followed by "et al." Authors are responsible for the accuracy of all relevant citations.
- **Book title:** Author(s) (last name and initials, no periods), title (uppercase and lowercase, no quotation marks), edition or volume, city and state/province of publication, publisher, and year. When particular pages are relevant or when the text is referenced several times, list the relevant pages. Example: Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK. Adequacy of Sample Size in Health Studies. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., 1990.
- **Chapter in a book:** Follow the directions for book title, but add chapter title and editors. Example: Brandeis G, Powell J, Bergstrom M. Resident assessment protocol: pressure ulcers. In: Morris JN, Hawes C, Murphey K, et al, editors. Resident Assessment Instrument Training and Resource Guide. Natick, MA: Eliot Press; 1991.
- **Journal articles:** Author(s) (last name and initials, no periods), title of article (lowercase, no quotation marks), abbreviation of the journal as given in the Cumulative Index Medicus, year of publication, volume number, and inclusive pages. If the journal is not paged sequentially throughout the volume, include the issue number in the citation. Example: Allman RM, Laprade CA, Noel LB, et al. Pressure sores among hospitalized patients. *Ann Intern Med* 1986;105:337-42.
- **Publication by an organization:** Follow example format. Example: National Pressure Ulcer Advisory Panel: Statement on Pressure Ulcer Prevention. Buffalo: NPUAP, 1992.
- **Tables:** Put each table on a separate page after the reference list, double spaced; include a title for each one. Number the tables in the order in which they are referred to in the text. Use the Publication Manual of the American Psychological Association, 4th ed. (1994), as a source for the correct format of statistical tests and tables.

- **Illustrations:** Illustrations and photographs (black-and-white or color) must be professional glossy prints or slides; electronic files are acceptable if they are in .tif or .jpg format. Written permission from the patients must accompany the photographs. Model release forms can be supplied if needed. Also, if using previously published material, authors are responsible for obtaining written permission from the publisher before submitting the material. To identify each item of the illustration, type a label and place it on the back of each illustration or photo, identifying it in the order it appears in the text (Figure 1: Cross-section of the foot). Indicate the top of the illustration if it is not apparent. If any items are to be returned, a notice to that effect must be on the label, along with the complete name and mailing address.

Scholarly Review of the Literature

Reviews generally will be written by experts in the field and will be solicited. However, unsolicited reviews that provide a complete overview of the literature on any topic related to skin and wound care will be considered and will be subject to peer review. The text should include a structured abstract of no more than 250 words under the following headings: Objective, Data Sources, Study Selection, Data Extraction, Data Synthesis, Conclusions.

Case Series

A Case Series offers readers practical information and contains reports of a series of cases that have interesting outcomes of care. A minimum of 6 cases is required for a series.

Clinical Concept

New and interesting methods of diagnosis and treatment are included in Clinical Concept. Describe the technique in enough detail so that readers can understand the process.

Online Exclusives

This online-only section seeks a specific scope of article under the heading of "Wound Care Around the World." Articles should detail innovative and resourceful ways that clinicians are helping to heal patients' wounds in all corners of the globe, using available materials. Articles should have a "this is how we do it" here approach, rather than a standard research study. E-mail your manuscript ideas to ASWCedit@wolterskluwer.com. Articles invited for submission will go through the standard peer review and acceptance process.

Letters to the Editor

Letters to the Editor are encouraged. They must be signed and will be subject to editing. Letters that question, criticize, or respond to a previously published paper will be sent to the author of that paper for a reply. **Advances in Skin & Wound Care** encourages this type of professional exchange. Address all correspondence to the Editor-in-Chief.

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other

funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

Open access

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally, immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

The article processing charge (APC) is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by the author, funding agency or institution. Payment must be processed for the article to be published open access. For a list of journals and pricing please visit our [Wolters Kluwer Open Health Journals page](#).

Authors retain copyright

Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant Wolters Kluwer an exclusive license to publish the article and the article is made available under the terms of a Creative Commons user license. Please visit our [Open Access Publication Process page](#) for more information.

Creative Commons license

Open access articles are freely available to read, download and share from the time of publication under the terms of the [Creative Commons License Attribution-NonCommercial No Derivative \(CC BY-NC-ND\) license](#). This license does not permit reuse for any commercial purposes nor does it cover the reuse or modification of individual elements of the work (such as figures, tables, etc.) in the creation of derivative works without specific permission.

Compliance with funder mandated open access policies

An author whose work is funded by an organization that mandates the use of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\) license](#) is able to meet that requirement through the available open access license for approved funders. Information about the approved funders can be found here: <http://www.wkopenhealth.com/inst-fund.php>

FAQ for open access

<http://www.wkopenhealth.com/openaccessfaq.php>

Conflicts of Interest

Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared.

ANEXO 2**Certificado de aprovação da CEUA**

13/08/2018

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS DE FERIDAS DE COELHOS TRATADAS COM BIOMATERIAIS E ROSUVASTATINA", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3478 e tendo como participante(s) CECILIA BRAGA LAPOSY (responsável), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (docente), AMANDA FEBA TETILA (discente), MAYARA GIMENEZ SILVINO (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 07/12/2016.

Vigência do projeto: 09/2016 a 02/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
coelhos Nova Zelândia	16	3 quilos	2 anos	M	Coelhário

Presidente Prudente, 21 de Fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Luiz Rodrigo Garcia Jr.
 Coordenador Científico da CPDI

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