



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

MARIA ROSA SANTOS BREDÁ

**CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO DE FERIDAS INDUZIDAS EM
COELHOS E TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E
ROSUVASTATINA**

Presidente Prudente - SP
2019

MARIA ROSA SANTOS BREDA

**CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO DE FERIDAS INDUZIDAS EM
COELHOS E TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E
ROSUVASTATINA**

Dissertação apresentada à 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.

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Cecília Laposy Santarém

636.089
B831c

Breda, Maria Rosa Santos.

Caracterização das fibras de colágeno de feridas induzidas em coelhos e tratadas com fibrina rica em plaquetas e rosuvastatina / Maria Rosa Santos Breda. – Presidente Prudente, 2019.

25 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Laposy Santarém

1. Biomateriais. 2. Cicatrização. 3. Estatinas. 4. Pele. I. Título.

MARIA ROSA SANTOS BREDÁ

**CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO DE FERIDAS INDUZIDAS EM
COELHOS E TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E
ROSUVASTATINA**

Dissertação apresentada à 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, 10 de abril de 2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Karina Maria Basso
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL
Londrina-PR

Prof.^o Dr.^o Anthony César de Souza Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

À Deus

Pela vida e bênçãos a mim concedidos.

À minha família

Aos meus pais, avós e tios que sempre me apoiaram e que, por vários momentos, fizeram dos meus sonhos seus sonhos. Em especial à minha mãe, por sempre me ajudar no que fosse necessário, além de tantos conselhos e paciência imprescindíveis nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado e sua família

Ao meu namorado, por todos os conselhos, esforços e palavras de motivação. Por aceitar caminhar junto à mim nessa caminhada, lado a lado.

À sua família pelo carinho a mim transmitido como se da família eu pertencesse desde sempre.

Aos meus amigos

Pelas conversas de apoio e motivação.

À minha orientadora

Pela confiança concedida para o desenvolvimento do presente estudo, por toda a paciência e compreensão de sempre e, principalmente, por todos os ensinamentos durante esses anos de parceria (desde a graduação), que me fizeram aprender muito e evoluir profissionalmente e pessoalmente também.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Cecília Laposy, pela oportunidade concedida e pela confiança na realização do presente estudo e por todos os anos anteriores de parceria, compartilhando pacientemente experiências imprescindíveis ao meu crescimento profissional e pessoal. Sem dúvida, não há como não ter admiração e não a considerar um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido. Além de deixar grandes lições, sobretudo, é motivo de inspiração. Minha eterna gratidão, por tudo!

Aos meus pais, em especial à minha mãe, pelo amor incondicional e mesmo nos momentos difíceis, sempre com palavras de motivação, conselhos e soluções para qualquer tipo de situação. Serei eternamente grata por tudo.

Aos meus avós, em especial à minha avó materna, minha segunda mãe, à quem devo quem sou hoje, à quem sonhou e sonha todos os meus sonhos, à quem sempre me espera aos finais de semana e feriados com a mesma recepção de sempre, com muito amor e carinho.

Ao meu namorado, Luís Henrique, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e parceria de sempre, imprescindíveis em todos os momentos.

Aos meus amigos, em especial, à Mayara, Maiara, Tauane e Aline pelas conversas e momentos de distração e companheirismo.

Aos colaboradores, em especial, à equipe do laboratório do Departamento de Morfologia da Unesp de Botucatu – SP, pelos ensinamentos e contribuições no desenvolvimento do projeto. Em especial ao prof. Dr. Luis Antônio Justulin e ao pós-doutorando Sérgio Alexandre (“pei”) pela total disponibilidade. E também à equipe do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Unoeste de Presidente Prudente – SP pela parceria e disponibilidade de sempre.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Unoeste de Presidente Prudente – SP pela oportunidade à mim concedida, sendo uma importante etapa vivenciada. Em especial aos professores do programa, e aos coordenadores Anthony e Cecília pelo trabalho incrível.

À banca do exame de qualificação, composta pelos professores Dr^o Leonardo Mendes, Dr^o Anthony e Dr^a Cecília, pelas colocações e contribuições. E também, desde já, à banca examinadora, composta pelos professores Dr.^a Cecília, Dr.^o Anthony e Dr.^a Karina.

À CAPES e à FAPESP pelos apoios financeiros concedidos para a realização da presente pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001 e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – (Brasil) FAPESP – Processo 2016/25938-0.

Por fim, à todos que de alguma forma, seja direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto e que, porventura, não tenham sido citados.

RESUMO

Caracterização das fibras de colágeno de feridas induzidas em coelhos e tratadas com fibrina rica em plaquetas e rosuvastatina

Nos últimos anos, avanços científicos acerca da cicatrização de feridas de pele vêm sendo alcançados com a utilização de biomateriais como a fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa), e com o uso de estatinas como a rosuvastatina (RSV). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da fibrina rica em plaquetas autóloga, rosuvastatina a 1,2% e associações na cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas no dorso de coelhos por meio da quantificação de fibras colágenas tipos I e III. Foram utilizados 8 coelhos clinicamente hígidos, da raça Nova Zelândia, machos. Quatro feridas com punch de 8mm foram feitas no dorso de cada coelho para receber os seguintes tratamentos: solução fisiológica (considerada ferida controle), FRPa, RSV e associação (FRP+RSV). Os tratamentos foram realizados nos dias 3, 7, 10 e 14. No 17º dia, biópsias da cicatriz foram coletadas para a realização da imuno-histoquímica. O tratamento com FRPa foi o que produziu maior quantidade de fibras colágenas, tendo a predominância do colágeno tipo III, por tratar-se de uma lesão ainda em processo de cicatrização. A ferida que recebeu apenas a RSV apresentou menor quantidade de COL I, que pode ser favorável em situações onde o animal tem a maior probabilidade de desenvolver uma cicatrização hipertrófica. Conclui-se que a utilização da FRP autóloga induz à maior quantidade de fibras colágenas tipo III. O uso da RSV pode ser benéfico em animais que tendem a desenvolver uma cicatriz hipertrófica.

Palavras-chave: Biomateriais. Cicatrização. Estatinas. Pele.

ABSTRACT

Characterization of collagen fibers in rabbits induced wounds and treated with platelet-rich fibrin and rosuvastatin

In recent years, scientific advances in the healing of skin wounds have been achieved with the use of biomaterials such as autologous platelet-rich fibrin (FRPa) and the use of statins such as rosuvastatin (RSV). The objective of the present study was to evaluate the effect of autologous platelet rich fibrin, rosuvastatin at 1.2%, and associations in the healing of experimentally induced cutaneous lesions on the dorsum of rabbits by means of the quantification of type I and III collagen fibers. Eight clinically healthy, male New Zealand rabbits were used. Four wounds with 8mm punch were made on the back of each rabbit to receive the following treatments: physiological solution (considered wound control), FRPa, RSV and association (FRP + RSV). The treatments were performed on days 3, 7, 10 and 14. On the 17th day, scar biopsies were collected for immunohistochemistry. The treatment with FRPa was the one that produced greater amount of collagen fibers, having the predominance of the collagen type III, because it is an injury still in process of cicatrization. The wound that received only RSV presented a lower amount of COL I, which may be favorable in situations where the animal is most likely to develop hypertrophic scarring. It is concluded that the use of autologous FRP induces a greater amount of type III collagen fibers. The use of RSV may be beneficial in animals that tend to develop a hypertrophic scar.

Keywords: Biomaterials. Healing. Statins. Skin.

LISTA DE SIGLAS

FRPa	– Fibrina Rica em Plaquetas autóloga
FRPa + RSV	– Associação de Fibrina Rica em Plaquetas autóloga com Rosuvastatina em gel
HMG CoA	– 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-Coenzima A
PRP	– Plasma Rico em Plaquetas
RSV	– Rosuvastatina

SUMÁRIO

1	Artigo Científico.....	10
	ANEXOS.....	24

ARTIGO¹**Caracterização das fibras de colágeno de feridas induzidas em coelhos e tratadas com fibrina rica em plaquetas e rosuvastatina**

Maria Rosa Santos Breda¹, Yuri Ferreira Vicentini², Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos³, Luis Antonio Justulin Jr⁴, Anthony Cesar de Souza Castilho⁵, Gisele Alborghetti Nai⁵, Cecília Laposy Santarém^{5*}

¹Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: mariarosa-breda@hotmail.com

²Discente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: yurivicentini@hotmail.com

³Pós-doutorando - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: sergioale2030@gmail.com

⁴Professor Assistente Doutor da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: l.justulin@unesp.br

⁵Professores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: claposy@unoeste.br

*Autor para correspondência

Título abreviado: Reparação tecidual pós-tratamento com FRP e RSV

Palavras-chave: 1. Biomateriais 2. Cicatrização 3. Estatinas 4. Pele

Apoio financeiro: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo número 2016/25938-0). Além disso, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Endereço para correspondência:

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Tel: +55 (18) 99623-0772;

Fax: +55 (18) 3229-2080;

E-mail: claposy@unoeste.br

Conflito de interesses: Os autores declaram que não há conflito de interesses.

¹ Artigo elaborado segundo normas da revista Tissue & Cell.

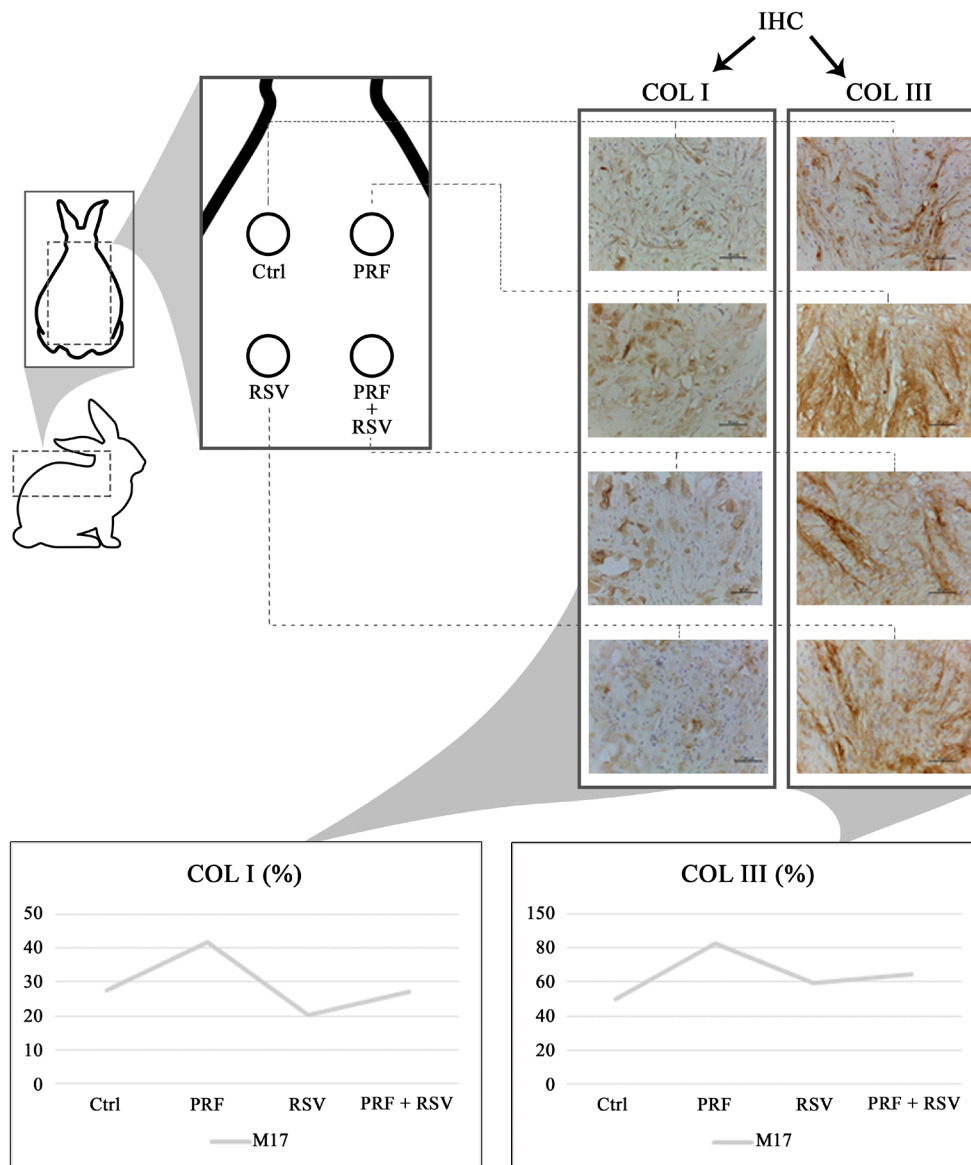
Artigo original

Resumo

Nos últimos anos, avanços científicos acerca da cicatrização de feridas de pele vêm sendo alcançados com a utilização de biomateriais como a fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa), e com o uso de estatinas como a rosuvastatina (RSV). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da fibrina rica em plaquetas autóloga, rosuvastatina a 1,2% e associações na cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas no dorso de coelhos por meio da quantificação de fibras colágenas tipos I e III. Foram utilizados 8 coelhos clinicamente hígidos, da raça Nova Zelândia, machos. Quatro feridas com punch de 8mm foram feitas no dorso de cada coelho para receber os seguintes tratamentos: solução fisiológica (considerada ferida controle), FRPa, RSV e associação (FRP+RSV). Os tratamentos foram realizados nos dias 3, 7, 10 e 14. No 17º dia, biópsias da cicatriz foram coletadas para a realização da imuno-histoquímica. O tratamento com FRPa foi o que produziu maior quantidade de fibras colágenas, tendo a predominância do colágeno tipo III, por tratar-se de uma lesão ainda em processo de cicatrização. A ferida que recebeu apenas a RSV apresentou menor quantidade de COL I, que pode ser favorável em situações onde o animal tem a maior probabilidade de desenvolver uma cicatrização hipertrófica. Conclui-se que a utilização da FRP autóloga induz à maior quantidade de fibras colágenas tipo III. O uso da RSV pode ser benéfico em animais que tendem a desenvolver uma cicatriz hipertrófica.

Palavras-chave: biomateriais, cicatrização, estatinas, pele.

Resumo Gráfico



Highlights

- O tratamento com FRP autóloga induz a maior produção de colágeno tipo III;
- O uso da RSV isolada pode ser uma alternativa viável para minimizar a formação de cicatrizes hipertróficas;
- A associação da RSV à FPR autóloga não apresentou efeitos aditivos sobre o processo de cicatrização;

1. Introdução

A pele é uma estrutura de grande importância, considerada a primeira barreira de defesa e o maior órgão do organismo, recobrando-o como um todo (Reinke and Sorg, 2012). O colágeno, considerado como a maior matriz extracelular da pele, é o elemento responsável pela integridade e resistência estrutural por conferir resistência e elasticidade (Ågren et al., 2015). Os colágenos tipo I e III são os principais tipos encontrados na pele, sendo o colágeno tipo I o mais predominante na pele normal, conferindo maior resistência à tensão por ser uma fibra mais densa, quando comparado ao colágeno tipo III (Xue and Jackson, 2015).

Constantemente, a pele é exposta à ocorrência de lesões em potencial e, neste sentido, a cicatrização é um processo vital, portanto, frente à ocorrência de um fator que provoque a descontinuidade da pele ocasionando uma ferida, é necessário que, imediatamente, um processo de reparo seja iniciado; trata-se do processo de cicatrização (Reinke and Sorg, 2012).

O processo de cicatrização é iniciado com a hemostasia, que compreende a ocorrência de vasoconstrição e atuação das plaquetas, primordiais para interrupção de hemorragia (Sharma et al., 2017). Em seguida, células como neutrófilos, monócitos e macrófagos, são atraídas ao local da lesão e iniciam o processo de inflamação. A principal função destas células é a de defesa contra microrganismos que potencialmente estão presentes na ferida (Minutti et al., 2016). A fase de proliferação compreende o envolvimento de importantes componentes celulares e moleculares, que contribuem para a formação da matriz extracelular e para a formação do tecido de granulação. Por fim, a fase de remodelação que consiste na reorganização das fibras de colágeno, em que colagenases e outras proteases proporcionam organização às fibras de colágeno. Nesta fase, os vasos neoformados deixam de existir e ocorre diminuição das células que antes atuavam no local regenerado (Greaves et al., 2013).

Sendo que, em uma ferida em processo de cicatrização estando em fases anteriores à fase de remodelação, a proporção de colágeno tipo III é maior do que a de colágeno tipo I. Com o decorrer do processo, os fibroblastos produzem o tipo I em maior quantidade, enquanto o colágeno tipo III é degradado por ação da colagenase (Broughton et al., 2006).

Com o intuito de melhorar este processo, principalmente no que diz respeito à qualidade da cicatrização, estudos estão sendo realizados com o uso de biomateriais, tais como a fibrina rica em plaquetas (FRP), e com o uso de estatinas, tais como a rosuvastatina (RSV) (Ehrenfest et al., 2014; Pradeep et al., 2016; Harrison, 2018).

A FRP foi desenvolvida primeiramente em 2001 na França. É considerada uma segunda geração de concentrado plaquetário, constituído por uma rede de fibrina (Ehrenfest et

al., 2014; Bai et al., 2017). Na rede de fibrina contém fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, trombospondina-1, além dos fatores de crescimento que se encontram estocados no interior das plaquetas e são liberados após a ativação das mesmas, sendo elementos essenciais no processo de reparação tecidual (Crisci et al., 2017). Tais elementos, através da liberação de fatores de crescimento, promovem angiogênese, aumento da colagenização e maior proliferação de fibroblastos e proporcionam melhora no processo cicatricial (Fujioka-Kobayashi; Miron; Hernandez, 2016).

Já a RSV é uma estatina hidrofílica sintética de segunda geração, com ação inibidora da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG CoA) redutase, utilizada principalmente no tratamento de hiperlipidemia para redução das concentrações séricas de colesterol (Kones, 2010). Sendo que, atualmente, outros efeitos da RSV vêm sendo investigados, incluindo efeitos anti-fibróticos, anti-inflamatórios, além de efeitos envolvendo a angiogênese e colagenização (Ibrahim and Fahmy, 2016; Pradeep et al., 2016; Wu et al., 2016). Entretanto, sobre esses novos efeitos da RSV, os dados ainda são escassos na literatura.

Partindo do princípio que a FRPa é um biomaterial promissor e há poucos estudos envolvendo a participação de uma estatina de última geração no processo cicatricial, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da FRP autóloga, da RSV e associações sobre a cicatrização de feridas cutâneas, através da quantificação de fibras colágenas tipos I e III de feridas cutâneas experimentalmente induzidas no dorso de coelhos.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 8 coelhos machos adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia, peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg, com idade média de 2 anos, que receberam tratamento com FRP autóloga, RSV e associações. 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 passaram por um período de adaptação de sete dias antes do estudo. Durante todo o experimento foram mantidos em condições padronizadas de dieta e água à vontade. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do uso de animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - Unoeste de Presidente Prudente/SP (protocolo nº 4320).

2.2 Procedimento anestésico

Os coelhos foram contidos manualmente para realização da tricotomia da região dorsal direita e esquerda. Em seguida, foram anestesiados (intramuscular-IM) com uma associação de xilazina (Xilazina[®] 2%, 5mg/Kg IM) e cloridrato de tiletamina e zolazepam (Zoletil[®] 50, 15mg/Kg IM). Além disso, foi aplicado previamente 0,1 mL de anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor) no local de cada lesão (Kanashiro and Cassu, 2008).

2.3 Fibrina Rica em Plaquetas autóloga (FRPa)

Após procedimento anestésico, foram colhidos 2 tubos de 4 mL de sangue venoso proveniente da orelha, utilizando scalp 25G modificado. O material foi acondicionado em tubos sem anticoagulante que passaram por uma única centrifugação em baixa velocidade (200G - centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos. Esse procedimento ativa as plaquetas e a polimerização da fibrina (Narang et al., 2015). Sem o uso de anticoagulante, ocorre o processo natural de coagulação formando o coágulo de fibrina, que foi retirado do tubo e separado dos demais constituintes presentes, estando pronto para ser colocado na ferida (Dietrich et al., 2015).

2.4 Gel de Rosuvastatina (RSV)

Para a formulação do gel de rosuvastatina a 1,2% foi utilizado um solvente compatível para diluição da droga, e posteriormente preparado um gel aristoflex com 20% de glicerina. Para preparar o gel utilizou-se banho-maria para aquecimento da solução (50-60° C) a fim de homogeneizar o polímero com o solvente e a droga, evitando a cristalização do ativo (Grover et al., 2016 com modificações). O gel foi colocado manualmente nas feridas tratadas com RSV isolada ou associada a FRPa, e a quantidade foi suficiente para cobrir a lesão.

2.5 Indução e tratamento das feridas

Com os animais anestesiados, foram feitas antissepsia e demarcação da pele do dorso dos coelhos em quatro locais com auxílio de caneta pilot[®] e um punch de 8mm foi utilizado para realização das feridas cirúrgicas. Os fragmentos foram retirados com auxílio de uma pinça anatômica, preservando a musculatura. Cada ferida realizada recebeu diferentes tratamentos: solução fisiológica (considerada ferida controle), FRPa, RSV e associação (FRP+RSV). Em seguida todas as feridas foram cobertas com ryon estéril e

curativo adesivo (Band Aid[®]). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam cloridrato de Tramadol (0,5mg/Kg, IM, 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos), a fim de minimizar o desconforto inicial.

O tratamento e a troca dos curativos foram realizados nos momentos 0, 3, 7, 10 e 14, segundo protocolo estabelecido por Vendramin et al. (2010) até completarem 16 dias de experimento. No 17º dia, prosseguiu-se com a realização de biópsia da ferida para avaliação.

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ após anestesia com a associação de Cloridrato de Tiletamina e Zolazepam 30 mg/Kg IM e Xilazina a 2% 0,2 mg/Kg IM e a comprovação da morte foi realizada a partir da avaliação dos batimentos cardíacos. Após a eutanásia os animais foram identificados, congelados e armazenados para uso em aulas práticas.

2.6 Análise Imuno-histoquímica

A verificação histológica do processo cicatricial do momento 17 dos colágenos I e III foi realizada através da imuno-histoquímica, usando a técnica de imunoperoxidase indireta. Tal procedimento foi realizado no Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC) do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Universidade Estadual Paulista (Unesp) em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Amostras de pele foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por 24 a 48 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70%. Após os procedimentos padrão para realização de inclusão dos tecidos em parafina, prosseguiu-se com os cortes na espessura de 4 µm e montagem em lâminas silanizadas.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) na panela de pressão (aproximadamente 100° C) em banho-maria, durante 30 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) e submetidas ao processo de bloqueio da peroxidase endógena com a utilização de uma mistura de PBS e peróxido de hidrogênio, durante 10 minutos, no escuro. Em seguida foi feito novo bloqueio com leite desnatado 5% em PBS.

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído em BSA 1% para colágeno tipo I ou colágeno tipo III overnight a 4°C (Tabela 1). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS. Os cortes de pele foram incubados com o anticorpo secundário,

também diluído com BSA 1%, durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. A reação imuno-histoquímica foi então revelada com o DAB (diaminobenzidina).

Devido à presença de bastante colágeno na pele, não foi utilizado controle positivo e, para o controle negativo, um dos cortes não recebeu anticorpo primário (recebeu apenas anticorpo secundário). Em seguida, foram contra-corados com hematoxilina (Souza et al., 2015). Todas diluições utilizadas foram previamente testadas.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para avaliação dos colágenos em feridas de coelhos tratadas com FRP autóloga, RSV e associações.

Tipo de anticorpo	Hospedeiro	Fabricante	Código	Diluição
Anticorpo primário colágeno tipo I (monoclonal)	Camundongo	GeneTex	GTX26308	1:50
Anticorpo primário colágeno tipo III (monoclonal)	Camundongo	Novus Biologicals	NBP1-05119	1:100
Anticorpo secundário - goat anti-mouse IgG H&L (HRP)	Caprino	Abcam	ab6789	1:200

2.8 Captação das Imagens

Para a captação das imagens, foi utilizado microscópio óptico (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. As imagens foram obtidas no aumento de 400x, na região abaixo da epiderme.

A área imunomarcada, apresentando a coloração acastanhada, foi avaliada a partir da técnica de deconvolução de cores, usando o Plugin “Colour Deconvolution” no software Fiji. Para tanto, a imagem foi separada em 3 cores: verde (fundo da lâmina), azul (hematoxilina) e acastanhada (área imunomarcada), sendo apenas esta última utilizada para a quantificação. Na seção “Imagens”, foi selecionado “Threshold” para a seleção das áreas

marcadas e posterior quantificação. Para que não fosse detectada pouca marcação em áreas bastante marcadas ou excesso de marcação em áreas pouco marcadas, foi estabelecido um intervalo de 0-180 para os tons de castanho do histograma. Após a aplicação da máscara na área imunomarcada, foi mensurada a porcentagem desta marcação em relação à área, sendo que uma média foi calculada a partir de 3 imagens obtidas de cada ferida (Andrade et al., 2011).

2.9 Análise Estatística

A avaliação do efeito dos tratamentos foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism, versão 5.01.

Para validação dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foi realizado teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk) e de homogeneidade de variância entre os grupos (Bartlett). Para comparação entre os tratamentos foram realizados os testes Kruskal Wallis e Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Quando avaliamos os efeitos do uso da FRP autóloga, da RSV e da associação entre FRP e RSV em feridas dérmicas induzidas experimentalmente em coelhos, observamos efeitos contagônicos entre a FRP autóloga e a RSV.

No que diz respeito ao tratamento com a FRP autóloga, o percentual de colágeno tipo III foi superior ao controle e aos demais tratamentos ($P < 0,05$) (Fig. 1).

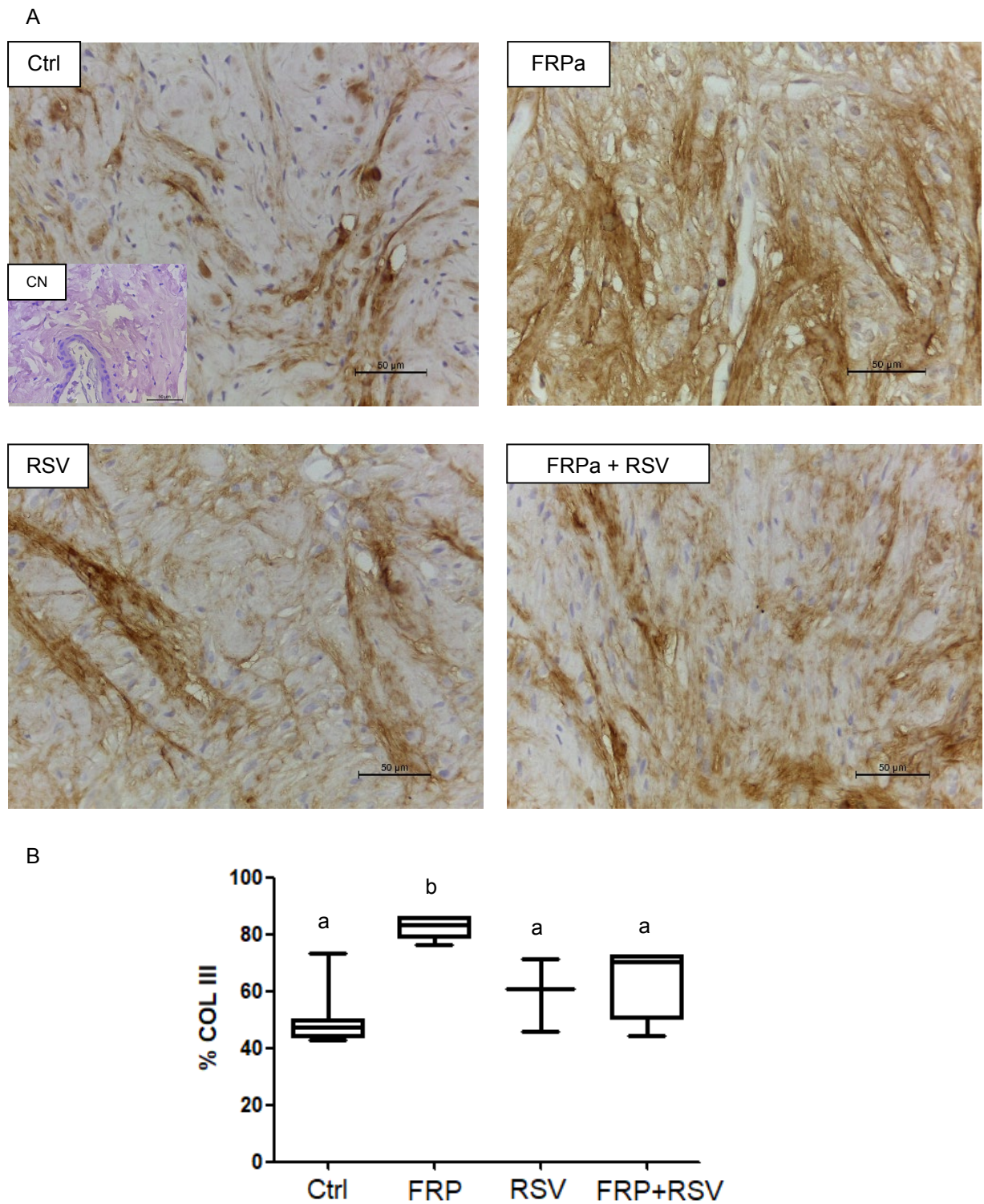


Fig. 1. A. Imunomarcaco para colágeno tipo III (COL III) no momento 17 com controle negativo (CN) e diferentes grupos experimentais. Observar abundância de colágeno tipo III no grupo experimental FRPa. Barra de escala: 50µm. B. Gráfico representando o percentual de colágeno tipo III nos diferentes grupos experimentais. Ctrl=controle; FRPa=Fibrina rica em plaquetas autóloga; RSV=rosuvastatina; FRPa+RSV=fibrina rica em plaquetas autóloga+ rosuvastatina.

Diferentemente da FRP autóloga, o tratamento com a RSV apresentou um percentual de colágeno tipo I bastante reduzido quando comparado aos demais tratamentos e ao controle, mas sem diferença estatística (Fig. 2).

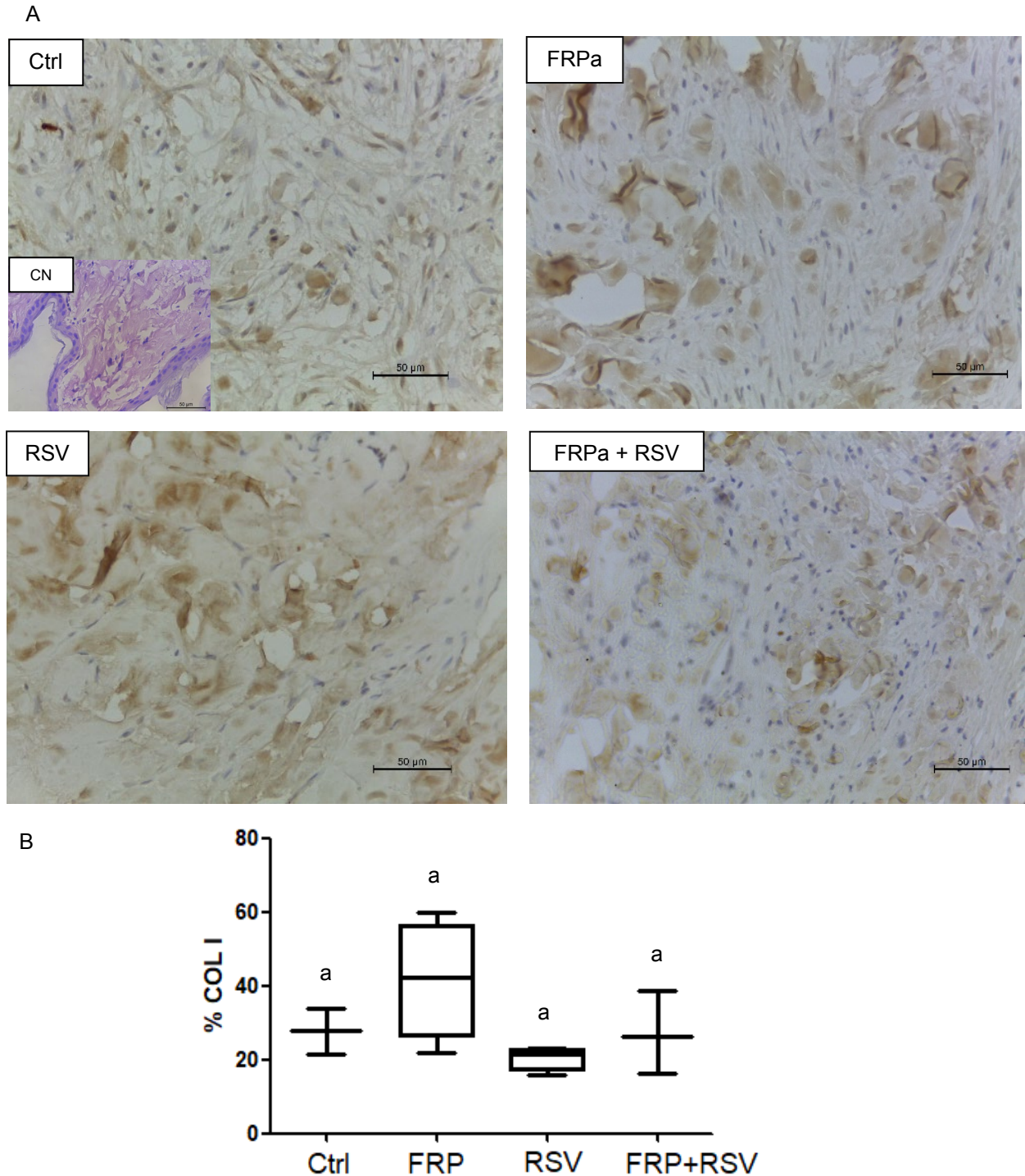


Fig. 2. Imunomarcção para colágeno tipo I (COL I) no momento 17 com controle negativo (CN) e diferentes tratamentos. Barra de escala: 50µm. Gráfico representando o percentual de colágeno tipo I

nos diferentes grupos experimentais. Ctrl=controle; FRPa=Fibrina rica em plaquetas autóloga; RSV=rosuvastatina; FRPa+RSV=fibrina rica em plaquetas autóloga + rosuvastatina.

Em relação à associação da RSV à FRP autóloga não houve aumentos ou diminuições significativas no percentual de colágenos tipo III e/ou tipo I.

4. Discussão

Pela primeira vez, a fim de elucidar os efeitos do uso da FRP autóloga e da RSV, separadamente e em conjunto em feridas dérmicas, nós ilustramos que o tratamento isolado com FRP autóloga foi o que induziu a uma maior produção de colágeno, especificamente, do tipo III e, por outro lado, o uso da RSV reduziu a quantidade de colágeno tipo I.

No nosso estudo, o colágeno tipo III foi o tipo especificamente predominante em relação ao tipo I, pois se trata de uma ferida ainda em processo de cicatrização (Broughton et al., 2006). Segundo Witte e Barbul (1997), uma ferida com predominância de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I, condiz com a fase de inflamação do processo cicatricial sendo que, nas fases seguintes (proliferação e maturação), o colágeno tipo I passa a predominar. Em um estudo, Schwartz et al. (2002) avaliaram a cicatrização por segunda intenção de feridas torácicas e metacarpianas de cavalos, a partir, dentre outros elementos, da avaliação do colágeno, utilizando a coloração com Picrosirius Red. Segundo os autores, a presença de menor quantidade de colágeno tipo I na ferida é evidente até a quarta semana, isto é, cerca de 16 dias, período máximo avaliado pelos autores, sendo o seu aumento gradativo e contínuo com o passar das semanas.

A FRPa, que melhor atuou sobre a proliferação de colágeno tipo III, é uma preparação sólida que persiste liberando grande quantidade de fatores de crescimento mesmo passado alguns dias (Ehrenfest et al., 2014). Além de possuir uma matriz de fibrina que certamente é o elemento determinante na homeostasia e capacidade cicatricial, favorecendo a migração de células formadoras de tecido (fibroblastos e células endoteliais). Os fibroblastos participam do processo de angiogênese e são responsáveis pela colagenização e remodelagem tecidual (Dietrich et al., 2015).

No que diz respeito à rosuvastatina, trata-se de uma estatina capaz de promover efeitos anti-fibróticos, anti-inflamatórios, além de efeitos envolvendo a angiogênese e colagenização (Ibrahim and Fahmy, 2016; Pradeep et al., 2016; Wu et al., 2016). Em nosso estudo, a RSV promoveu redução do colágeno tipo I, o que, segundo Jia et al. (2017), condiz com efeito anti-

hipertrófico. Em seu estudo com o uso de simvastatina em cicatrizes hipertróficas induzidas em orelhas de coelhos, foi observado que a administração de estatinas pode reduzir significativamente a hipertrofia de cicatrizes. Isto sugere que a atuação da RSV em feridas seja a longo prazo, atuando na fase de remodelação e não nas fases anteriores.

O tratamento com FRPa + RSV não foi capaz de causar efeitos no colágeno dérmico, pois ao comparar aos resultados dos tratamentos isolados com a FRP autóloga e a RSV, é sugestivo que tal resultado tenha sido alcançado, principalmente, pela ação da FRP autóloga que atua imediatamente no processo de cicatrização, com interferência da RSV que possui atuação mais tardia no processo de cicatrização, favorecendo o processo de cicatrização nas fases finais, principalmente na fase de remodelação.

Adicionalmente, como o presente estudo avaliou a capacidade de produção de colágeno dos tratamentos, mais estudos acerca da verificação dos elementos moleculares envolvendo o processo cicatricial com o uso da RSV devem ser investigados para melhor elucidação de sua atuação no processo de cicatrização tecidual.

5. Conclusão

Conclui-se que utilização da FRP autóloga induz à maior quantidade de fibras colágenas tipo III e o uso da RSV induz à menor quantidade de fibras colágenas tipo I, sendo assim, a FRP autóloga pode ser uma alternativa viável para ação inicial no processo cicatricial e a RSV uma alternativa viável para ação mais tardia, a fim de minimizar a formação de cicatrizes hipertróficas.

Referências

- Ågren, M.S., Schnabel, R., Christensen, L.H., Mirastschijski, U., 2015. Tumor necrosis factor- α -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.10.001>
- Andrade, T.A.M., Iyer, A., Das, P.K., Foss, N.T., Garcia, J., Coutinho-Netto, A.A., Jordão-Jr, Frade, M.A.C., Frade, M.A.C., 2011. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 44, 1036–1047. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500116>
- Bai, M., Wang, I.V.C., Wang, I.J., Lin, I.M., Wing, I.I., Li, P.C., 2017. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. *Clinics* 72, 116–124. [https://doi.org/10.6061/clinics/2017\(02\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2017(02)09)
- Broughton, G., Janis, J., E Attinger, C., 2006. The Basic Science of Wound Healing, in: *Plastic and Reconstructive Surgery*. p. 12S–34S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>
- Crisci, A., Lombardi, D., Serra, E., Lombardi, G., Gardillo, F., Crisci, M., 2017. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound. *J. Unexplored Med. Data* 2, 77–87. <https://doi.org/10.20517/2572-8180.2017.17>
- Dietrich, F., Duré, G.L., Klein, C.P., Bampi, V.F., Padoin, V., Silva, V.D., Braga-silva, J., 2015. Platelet-Rich Fibrin Promotes an Accelerated Healing of Achilles Tendon When Compared to Platelet-Rich Plasma in Rat. *World J. Plast. Surg.* 4, 101–109.
- Ding, Y., Cui, L., Zhang, W., Sun, H., Zheng, L., 2017. Platelet-Rich Fibrin Accelerates Skin Wound Healing in 0, 1–5. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001091>
- Ehrenfest, D.M.D., Andia, I., Zumstein, M.A., Zhang, C., Pinto, N.R., Bielecki, T., 2014. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP , Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus , clinical implications and perspectives. *Muscle, Ligaments Tendons J.* 4, 3–9.
- Fujioka-kobayashi, M., Miron, R.J., Hernandez, M., 2016. Optimized Platelet Rich Fibrin With the Low Speed Concept : Growth Factor Release , Biocompatibility and Cellular Response 1–17. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160443>
- Greaves, N.S., Ashcroft, K.J., Baguneid, M., Bayat, A., 2013. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J. Dermatol. Sci.* 72, 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.07.008>
- Grover, H.S., Kapoor, S., Singh, A., 2016. Effect of topical simvastatin (1.2 mg) on gingival crevicular fluid interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 levels in chronic periodontitis – A clinicobiochemical study. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.11.003>
- Harrison, P., 2018. The use of platelets in regenerative medicine and proposal for a new classification system: guidance from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 16, 1895–1900. <https://doi.org/10.1111/jth.14223>
- Ibrahim, H.K., Fahmy, R.H., 2016. Localized rosuvastatin via implantable bioerodible sponge and its potential role in augmenting bone healing and regeneration potential role in augmenting bone healing and regeneration. *Drug Deliv.* 23, 3181–3192. <https://doi.org/10.3109/10717544.2016.1160458>
- Jia, S., Xie, P., Hong, S.J., Galiano, R.D., Mustoe, T., 2017. Local Application of Statins Significantly Reduced Hypertrophic Scarring in a Rabbit Ear Model. *Plast. Reconstr. Surg. – Glob. Open* 5, e1294. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001294>
- Kanashiro, G.P., Cassu, R.N., 2008. Anestesia em animais selvagens e de laboratório, in:

- Andrade, S.F. Manual de Terapêutica Veterinária. pp. 728–745.
- Kones, R., 2010. Rosuvastatin, inflammation, C-reactive protein, JUPITER, and primary prevention of cardiovascular disease – a perspective. *Drug Des. Devel. Ther.* 4, 383–413. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S10812>
- Minutti, C.M., Knipper, J.A., Allen, J.E., Zaiss, D.M.W., 2016. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin. Cell Dev. Biol.* 61, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.006>
- Narang, I., Mittal, N., Mishra, N., 2015. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: A clinical study. *Contemp. Clin. Dent.* 6, 63–68. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.149294>
- Pradeep, Garg, V., Kanoriya, D., Singhal, S., 2016. Platelet-Rich Fibrin With 1 . 2 % Rosuvastatin for the Treatment of Intraony Defects in Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J. Periodontol.* 87, 1468–1473. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160015>
- Reinke, J.M., Sorg, H., 2012. Wound Repair and Regeneration. *Eur. Surg. Res.* 49, 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Schwartz, A.J., Wilson, D.A., Keegan, K.G., Ganjam, V.K., Sun, Y., Weber, K.T., Zhang, J., 2002. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1564–1570. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1564>
- Sharma, A., Zakka, L.R., Jr, M.C.M., 2017. Anatomy of the Human Skin and Wound Healing, in: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd (Ed.), *Bioengineering in Wound Healing: A Systems Approach Emphasis*. Singapore, pp. 27–57. https://doi.org/10.1142/9789813144583_0002
- Souza, M.V. De, Silva, M.B., Pinto, J.D.O., Lima, M.B.D.S., Crepaldi, J., Lopes, G.F.M., Santos, H.B. dos, Rbeiro, R.I.M. de A., Thomé, R.G., 2015. Immunohistochemical Expression of Collagens in the Skin of Horses Treated with Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/893485>
- 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. *Rev. Bras. Cir. Plástica* 25, 4–10. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752010000400004>
- Witte, M.B., Barbul, A., 1997. General Principles of Wound Healing. *Surg. Clin. North Am.* 77, 509–528.
- Wu, H., Germanov, A. V., Goryaeva, G.L., Yachmenev, A.N., Gordienko, D.I., Kuzin, V. V., Skoroglyadov, A. V., 1, 2016. The Topical Application of Rosuvastatin in Preventing Knee Intra-Articular Adhesion in Rats. *Med. Sci. Monit.* 22, 1403–1409. <https://doi.org/10.12659/MSM.898237>
- Xue, M., Jackson, C.J., 2015. COMPREHENSE INVITED REVIEWS Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring 4, 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>

ANEXOS

A.CEUA (Aprovação da Comissão de Ética em uso de Animais)

03/01/2019

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 "ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FERIDAS TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA TÓPICA EM COELHOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 4320 e tendo como participante(s) MARIA ROSA SANTOS BREDA (discente), YURI FERREIRA VICENTINI (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO (docente), CECILIA LAPOSY SANTAREM (orientador responsável), 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 07/02/2018.

Vigência do projeto: 12/2017 a 02/2019.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Coelho Nova Zelândia	8	3 quilos	2 anos	M	Coelhário

Presidente Prudente, 18 de Fevereiro de 2018.

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


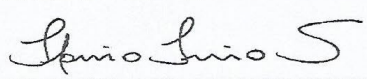
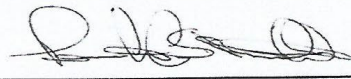

Profª Ms. Adriana Falcão de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 076fd10698142b374967431801e18c8e

<http://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=076fd10698142b374967431801e18c8e>

1/1

B. Laudo da Rosuvastatina

 Nutrifarm Saúde, uma questão de princípios		NUTRIFARM DO BRASIL IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE INGREDIENTES LTDA	11/10/2016 16:51:2
Este documento representa a garantia de que este produto foi devidamente analisado e aprovado em nosso laboratório e portanto encontra-se em conformidade com as especificações dos órgãos federais, estaduais e municipais responsáveis.		Nota Fiscal : 89299 Nº Pedido : 88854	
ROSUVASTATINA CALCICA*			
Lote Interno : RSA0091215/F1(1) Lote Fabricante : RSA0091215 Origem : INDIA Procedência : BRASIL Fabricante : UNIQUE LABORATORIES PRIVATE L	Validade : 01/11/2020 Fabricação : 01/12/2015 Análise : 30/06/2016 Form. Molec : Ca[2(C22H27FN3O6S)] Peso Molec : 1.001,149	D.C.B. : 07818 C.A.S. : 147098-20-2 N.C.M. : 2932.20.00 Nº O. Frac : 4004	
Análises Realizadas pelo Distribuidor :			
Teste :	Especificação :	Resultado :	
Aspecto	Pó cristalino branco a quase branco creme	De acordo	
Solubilidade	Solúvel em acetoneitrila e levemente solúvel em acetona.	De acordo	
Identificação	IR / Reação de precipitação	De acordo	
Água (K.F.)	Máximo 6,0%	2,302	
Substâncias Relatadas	Qualquer impureza individual - Máximo 0,5%	<0,5	
	Total de impurezas - Máximo 1,0%	<1,0	
Teor	98,0% a 102,0% - Base anidra	99,02	
Conteúdo de cálcio	3,5% a 4,5%	4,20	
Rotação Óptica Específica	+14,0° a +18,0°	+14,90°	
Metais pesados	Máximo 20 ppm	<20	
Armazenamento : ARMAZENAR EM RECIPIENTE HERMETICAMENTE FECHADO. MANTER AO ABRIGO DA LUZ GUARDAR EM LOCAL SECO E FRESCO	Ficha de Segurança :	Referência : Método do Fabricante.	
Resultado : Aprovado (X)		Conclusão : Todos os resultados atendem as especificações	
			
Flavio Francisco de Souza Farmacêutico Resp CRF : 63.833-SP		Paulo Cesar Silva Ramalho Supervisor do CQ CRQ IV : 04471803	
		Conferência automatizada 	
		Data de emissão : 11/10/2016 Página :	