



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

GLEYCIANE PIRES CANELA RAMOS

**PRODUÇÃO DE COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS
COM O USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS AUTÓLOGA EM
COELHOS**



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

GLEYCIANE PIRES CANELA RAMOS

**PRODUÇÃO DE COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS
COM O USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS AUTÓLOGA EM
COELHOS**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém

636.932 2
R175p

Ramos, Gleyciane Pires Canela.

Produção de colágeno na cicatrização de queimaduras com o uso de fibrina rica em plaquetas autóloga em coelhos / Gleyciane Pires Canela Ramos. – Presidente Prudente, 2021.
29f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2021.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Laposy Santarém

1. Coelhos. 2. Queimaduras. 3. Fibroplasia.
I. Título.

GLEYCIANE PIRES CANELA RAMOS

**PRODUÇÃO DE COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS
COM O USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS AUTÓLOGA EM
COELHOS**

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

Presidente Prudente, 29 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Orientadora Cecília Laposy Santarém

Universidade do Oeste Paulista Unoeste - Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira

Universidade do Oeste Paulista - Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Karina Maria Basso

Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL) - Londrina- PR

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcelino e Sueli, por todo Incentivo e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida. O amor que sinto por vocês é incondicionalmente.

Meus irmãos Jonathas, Jefferson, Erika, Emanulee e Sarony à minha família é referencia de união e amor. Só tenho que agradecer por vocês acreditarem no meu sonho. E qualquer momento pode contar com vocês em todos os momentos.

Meu esposo, Fernando, que sempre foi meu companheiro meu eterno agradecimento por saber compreender em todos os meus momentos difíceis desta caminhada. Sem ele, cuidando dos afazeres domésticos o cuidado que você teve com nosso filho neste período que fiquei ausente, eu não teria conseguido realizar mais uma etapa da minha vida “mestrado”. E indiretamente foi um grande parceiro de todas as horas, e que teve que suportar a minha ausência em diversos momentos. Mas com certeza essa conquista não é só minha porque você fez parte dela e que esta é umas das muitas conquistas ao seu lado.

Aos meus filhos, Tcharla e Tcharles, minha razão de viver e o meu genro Janderson. Todos ajudaram ao longo desta caminhada e que não há exemplo maior do que a nossa família. A minha estimada família, que tanto aprecio, presto o resultado do esforço realizado no decorrer desta etapa.

Á amiga Cristiane que tive a honra de conhecer no decorrer do curso, uma pessoa iluminada que Deus colocou no meu caminho. A você minha gratidão sempre.

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus, pela dádiva da vida e por me consentir alcançar tantos sonhos nesta minha jornada. Seu infinito amor e compreensão sou grata a Deus por tudo que iluminou o meu coração com força e coragem para superar as dificuldades

À minha orientadora Prof. Dra. Cecília Laposy Santarém, pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço pela confiança e sempre dispostas em me atender com paciência todas as vezes que precisei de ajuda. Retribuo por todos os ensinamentos compartilhados de forma deslumbrante, e por me conduzir nos primeiros passos da pós-graduação. Obrigado por acreditar em mim e compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência. No decorrer do curso já quis desistir varias vezes, mas com sua sabedoria e com suas palavras hoje estou aqui fazendo meus agradecimentos, pois tenho certeza que não chegaria nesta etapa final sem o seu apoio. Você é uma excelente orientadora. Obrigada por tudo.

À Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira a sua contribuição é fundamental para a realização de todas as pesquisas e agradeço por toda ajuda durante a realização desta pesquisa. Muito obrigada!

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciência Animal, pelos ensinamentos que foram construtivos para o meu conhecimento.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado, nos momentos difíceis e nas horas de solenidade. Não teria conseguido sem vocês!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

RESUMO

Produção de colágeno na cicatrização de queimaduras com o uso de fibrina rica em plaquetas autóloga em coelhos

O tratamento de feridas complexas como as queimaduras gerou avanços no uso de engenharia de tecidos e produtos biológicos. A terapia utilizando Fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa) tem apresentado ótimos resultados, pois possui mecanismos e mediadores biológicos que estimulam a angiogênese, promovem crescimento vascular, ativam a proliferação de fibroblastos com consequente aumento da síntese de colágeno, o que difere de outras preparações por promover um alto potencial de cicatrização e neoangiogênese. O presente estudo teve como objetivos avaliar a angiogênese e quantidade de fibroblastos das feridas tratadas ou não com FRPa de forma sequencial e comparativa, além de verificar o potencial de cicatrização da lesão exposta a queimadura e tratada com biomaterial. Foram utilizados 10 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos, distribuídos em dois grupos: grupo C-controle (n=5), que receberam tratamento padrão para queimaduras (5g de creme a base de sulfadiazina de prata a 1%), grupo FRPa (n=5), tratados com biomaterial. Para indução das lesões, após anestesia geral dos animais, foram feitas queimaduras com barra de ferro de 30 cm de comprimento pesando 313gr aquecida previamente em água a 72^o C, e aplicada durante 10 seg/quadrante/coelho. Após este procedimento, os animais receberam cloridrato de Tramadol (4,0mg/Kg, IM), 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos. As biópsias de pele foram realizadas aos 7, 14, 21 e 30 dias pós lesão para avaliar a quantidade de vasos neoformados e fibroblastos. A análise estatística foi realizada a partir do teste de normalidade e homogeneidade de variâncias entre grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. O número de vasos foi maior aos 7 ($14,0 \pm 6,8$) e 21 ($12,8 \pm 2,4$) dias no grupo tratado com FRPa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle ($6,6 \pm 1,4$ e $6,0 \pm 3,2$, respectivamente). A quantidade de fibroblastos foi em média duas vezes maior no grupo que recebeu o biomaterial ($80,8 \pm 15,4$). Conclui-se que o uso da FRPa em queimaduras é uma alternativa viável para aumentar a neovascularização e produção de fibroblastos para uma cicatrização mais eficiente.

Palavras-chave: coelhos, queimaduras, biomaterial, fibroplasia.

ABSTRACT

Collagen production in burns healing with the use of autologous platelet-rich fibrin in rabbits

The treatment of complex wounds such as burns has led to advances in the use of tissue engineering and biological products. Therapy using autologous platelet-rich fibrin (aPRF) has shown excellent results, as it has biological mechanisms and mediators that stimulate angiogenesis, promote vascular growth, activate fibroblast proliferation with a consequent increase in collagen synthesis, which differs from other preparations for promoting a high potential for healing and neoangiogenesis. The present study aimed to evaluate the angiogenesis and amount of fibroblasts in wounds treated or not with aPRF sequentially and comparatively, in addition to verifying the healing potential of the wound exposed to burns and treated with biomaterial. Were used 10 adult male New Zealand rabbits were used, divided into two groups: C-control group (n=5), which received standard treatment for burns (5g of 1% silver sulfadiazine cream), aPRF group (n=5), treated with biomaterial. To induce the lesions, burns were made with a 30 cm long iron bar weighing 313gr previously heated in boiling water until reaching 72⁰C, and applied for 10 sec/quadrant/rabbit. After this procedure, the animals received Tramadol hydrochloride (4.0mg/Kg, IM), twice a day for 3 consecutive days. Skin biopsies were performed at 7,14, 21 and 30 days post-injury to assess the number of neoformed vessels and fibroblasts. Statistical analysis was performed using the test of normality and homogeneity of variances between groups. Differences were considered significant when P<0.05. The number of vessels was higher at 7 (14.0±6.8) and 21(12.8±2.4) days in the group treated with aPRF (p<0.05), when compared to the control (6.6 ±1.4 and 6.0±3.2, respectively). The amount of fibroblasts was, on average, twice as high in the group that received the biomaterial (80.8±15.4). It is concluded that the use of aPRF in burns is a viable alternative to increase neovascularization and fibroblast production for more efficient healing.

Keywords: rabbits, burns, biomaterial, fibroplasia.

LISTA DE SIGLAS

FRPa	– Fibrina rica em plaquetas autóloga
TGF-	– Fator de crescimento transformador beta
β IGF	– Fator de crescimento semelhante a insulina
PDG	– Fator de crescimento derivado de plaquetas
F	– Fator de crescimento derivado de plaquetas
VEG	– Fator de crescimento endotelial vascular
FFGF	– Fator de crescimento fibroblástico
EGF	– Fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
	ANEXOS A- APROVAÇÃO CEUA.....	23
	ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	24

Artigo Científico¹

Uso da fibrina rica em plaquetas autóloga em feridas provocadas por queimaduras em coelhos aumenta fibroplasia

Gleyciane Pires Canela Ramos (pós-graduanda do curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista -Presidente Prudente-São Paulo -Brasil) , MSc; Luiza Sonavenso Ambrosio (estudante do curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista- Presidente Prudente-São Paulo -Brasil); Rosa Maria Barilli Nogueira, Dra. (professora do curso de pós-graduação da Universidade do Oeste Paulista -Presidente Prudente-São Paulo -Brasil); Gisele Alborghetti Nai, Dra. (professora do curso de pós-graduação da Universidade do Oeste Paulista - Presidente Prudente-São Paulo -Brasil); Cecília Laposy Santarém, Dra. (professora do curso de pós-graduação da Universidade do Oeste Paulista -Presidente Prudente-São Paulo -Brasil)

Resumo

Objetivos: avaliar a angiogênese e quantidade de fibroblastos das feridas tratadas ou não com FRPa de forma sequencial e comparativa, além de verificar o potencial de cicatrização da lesão causada por queimadura quando tratada com biomaterial.

Métodos: 10 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos, distribuídos em dois grupos: grupo C-controle (n=5), que receberam tratamento padrão para queimaduras (5g de creme a base de sulfadiazina de prata a 1%), grupo FRPa (n=5), tratados com biomaterial. Para indução das lesões, após anestesia geral dos animais, foram feitas queimaduras com barra de ferro de 30 cm de comprimento pesando 313gr aquecida previamente em água a 72⁰C, e aplicada durante 10 seg/quadrante/coelho. Após este procedimento, os animais receberam cloridrato de Tramadol (4,0mg/Kg, IM), 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos. As biópsias de pele foram realizadas aos 7,14, 21 e 30 dias pós lesão para avaliar a quantidade de vasos neoformados e fibroblastos. A análise estatística foi realizada a partir do teste de normalidade e homogeneidade de variâncias entre grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05. **Resultados:** O número de vasos foi maior aos 7 (14,0±6,8) e 14(15,0±6,3) dias no grupo tratado com FRPa (p<0,05), quando comparado ao controle (6,6±1,4 e 6,0±3,2, respectivamente). A quantidade de fibroblastos foi em média duas vezes maior no grupo que recebeu o biomaterial (80,8±15,4).

Conclusões: o uso da FRPa em queimaduras é uma alternativa viável para aumentar a neovascularização e produção de fibroblastos para um cicatrização mais eficiente.

Palavras-chave: biomaterial, coelhos, colagenização, queimaduras, fibroplasia.

¹ Artigo segue as normas da revista *Advances in Skin & Wound Care*. Fator de Impacto:1,438

Introdução

Feridas causadas por queimaduras trazem alterações anatômicas e funcionais que resultam em aumento da morbidade com alto impacto nos setores de saúde pública em todo o mundo¹. Segundo levantamentos realizados por Carvalho et al.², os EUA gastam aproximadamente 25 bilhões de dólares por ano em tratamentos que muitas vezes são ineficazes. Por este motivo, a cicatriz pós-queimadura é um dos maiores desafios no tratamento desta enfermidade³. Aproximadamente 40% dos pacientes que sofrem a lesão não estão satisfeitos com suas cicatrizes. E cerca de 20% deste total não podem ou não conseguem retornar ao trabalho⁴. No Brasil, ocorrem cerca de 100 mil notificações de casos de queimaduras por ano, com aproximadamente 3.000 mil pessoas que evoluem para o óbito após o trauma⁵.

O tratamento de queimadura e processos de cicatrização continua sendo um aspecto desafiador que ocasiona, em alguns casos, um trauma para o corpo humano, invalidez, morte ou afeta significativamente a qualidade de vida do sobrevivente da queimadura. No entanto, modalidades como debridamento precoce e o enxerto de pele são bem-sucedidos, mas a área doadora do enxerto às vezes é insuficiente e as condições inadequadas do paciente para a cirurgia dificultam o enxerto de pele. Nestas circunstâncias, o uso de produtos que aumentam o processo de cicatrização de feridas geralmente afeta a morbimortalidade do paciente. Assim, há um grande esforço na área científica, acadêmica e tecnológica, para o desenvolvimento e comercialização de diferentes tipos de curativos e farmacoterapias⁶.

Ao longo dos anos, a medicina tradicional foi aprimorada, dando origem a diferentes tratamentos regenerativos. Um deles é o uso da Fibrina rica em plaquetas (FRP) que é um concentrado de plaquetas de segunda geração que consiste em plaquetas e fatores de crescimento coletados no sangue sem o uso de anticoagulantes obtidos por uma única centrifugação^{7,8}. Este biomaterial retém vários fatores de crescimento em uma estrutura de malha de fibrina que, durante a remodelação do tecido libera gradualmente fatores de crescimento e citocinas capazes de melhorar ainda mais o processo cicatricial, promovendo a

proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de colágeno⁹. Pode ser utilizado como uma alternativa para aperfeiçoar o efeito dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas no início da reparação tecidual, que asseguram a resistência natural aos fatores relativos a processos infecciosos ou alérgicos¹⁰.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a síntese de fibroblastos e neovascularização em feridas provocadas por queimaduras e tratadas ou não com FRP autóloga (FRPa) em coelhos. A hipótese baseia-se no aumento da quantidade de fibroblastos e vasos para promoção de uma cicatriz mais homogênea com uso seriado deste biomaterial.

Material e Métodos

Animais:

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista- Presidente Prudente -Brasil (protocolo número 6292). Foram selecionados 10 coelhos machos, adultos ($3,0 \pm 1$ ano), da raça Nova Zelândia, peso médio $3,2 \text{Kg} \pm 0,1$, clinicamente saudáveis. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo (12 horas claro/escuro) controlados e passaram por um período de adaptação prévia de sete dias para evitar estresse da manipulação.

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 animais foram contidos manualmente para realização da tricotomia da região dorsal. Em seguida, anestesiados (intramuscular-IM) com uma associação de cloridrato de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil[®] 50, 30mg/dL IM) e Xilazina a 2% ($0,2 \text{ mg/Kg IM}$)¹¹ e posteriormente aplicado anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor) nos locais das futuras lesões.

Preparo da Fibrina rica em plaquetas autóloga (FRPa)

O sangue foi colhido da veia auricular (4 mL) utilizando um scalp 23G e acondicionado em tubos sem anticoagulante e centrifugado em baixa velocidade (200G - centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos com intuito de ativar as plaquetas e polimerizar a fibrina¹². O coágulo de FRPa foi retirado do tubo e separado dos demais constituintes para ser colocado na área queimada.

Indução das queimaduras

As queimaduras foram causadas com barra de ferro padronizada de 30 cm de comprimento pesando 313g com 5 cm² área, aquecida a 92⁰C durante 2 min. Após chegar a 72⁰C (temperatura aferida por termômetro infravermelho), a barra foi colocada em cada ponto previamente demarcado para queimadura permanecendo por um período de 10 segundos em cada local¹³ (Fig. 1). Após as queimaduras, o Grupo C (controle) recebeu tratamento padrão (2g de creme a base de sulfadiazina de prata a 1%) e o Grupo FRPa (tratado) recebeu o biomaterial em cada lesão. Acrescido ao tratamento tópico, os animais receberam cloridrato de Tramadol (4,0mg/Kg, IM), 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos, a fim de minimizar o desconforto inicial. Em seguida foi colocado um curativo sobre todas as feridas utilizando rayon estéril e curativo adesivo (Band Aid[®]). A primeira troca dos curativos foi realizada com 48 horas. A partir disso, as trocas e tratamento com a FRPa ocorreram a cada 3 dias até completarem 30 dias de experimento.

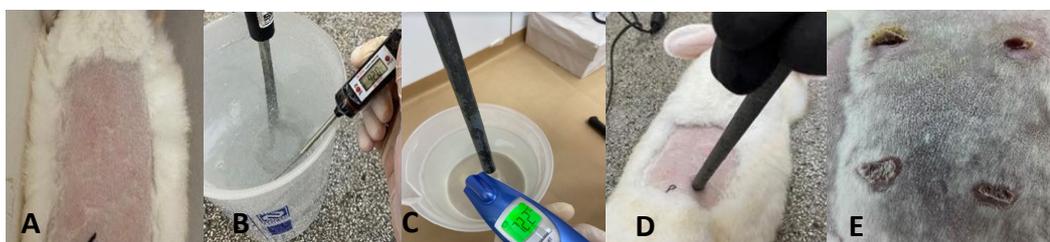


Figura 1. Indução das queimaduras em coelhos: A: tricotomia da região dorsal; B: água a 92⁰C; C: aquecimento da barra (72⁰C); D: indução das lesões; E: lesões feitas.

Avaliação histopatológica

Os fragmentos foram retirados utilizando punch de 6 mm e de forma padronizada aos 7 (canto superior esquerdo), 14 (canto superior direito), 21 (canto inferior esquerdo) e 30 dias (canto inferior direito), preservando sempre a musculatura. Em todos os momentos utilizou-se o mesmo protocolo anestésico da indução das queimaduras (Fig.2).

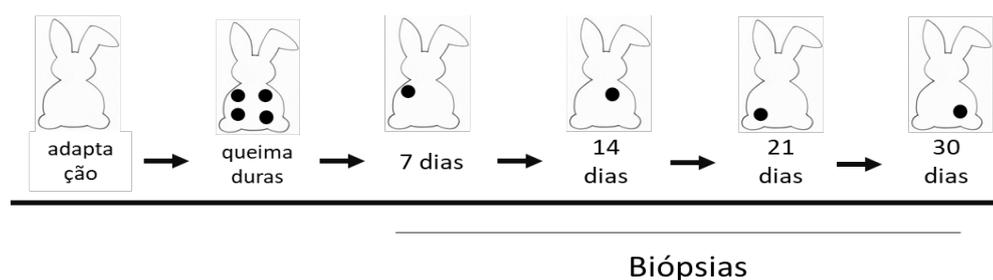


Figura 2. Delineamento experimental das queimaduras e realização das biópsias dos coelhos nos diferentes momentos.

As amostras de pele foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por 24 horas, e posteriormente foram submetidos a processamento conforme a técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina. Após fixação, o tecido foi incluído em blocos de parafina, obtendo-se cortes histológicos de 5 micrômetros de cada animal que foram corados com solução de Hematoxilina-Eosina (H/E) para avaliação dos fibroblastos e angiogênese (média de contagem de 10 campos utilizando, respectivamente as objetivas 10x e 20x). Todas as avaliações foram feitas por um único observador e de forma cega.

Análise Estatística

Todas as variáveis foram avaliadas quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar diferenças entre os tratamentos. As diferenças dentro do mesmo tratamento foram comparadas usando o teste de Student-Newman-Keuls. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

Resultados

O número de vasos (Tab.1, Fig.3) foi maior aos 7 ($14,0 \pm 6,8$) e 14 ($15,0 \pm 6,3$) dias no grupo tratado com FPRa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle ($6,6 \pm 1,4$ e $6,0 \pm 3,2$, respectivamente).

Tabela 1.: Média e desvio-padrão da angiogênese de coelhos submetidos a queimadura e tratados ou não com FRPa (fibrina rica em plaquetas autóloga).

Grupos/Dias	7	14	21	30
Controle	$6,6^{Aa} \pm 1,34$	$8,4^{Aa} \pm 3,05$	$15,0^{Aa} \pm 6,32$	$14,6^{Ab} \pm 8,17$
FPRa	$14,0^{Ba} \pm 6,85$	$15,0^{Aa} \pm 6,32$	$12,8^{Ba} \pm 2,38$	$15,4^{Aa} \pm 4,22$

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre momentos. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre tratamentos.

Já a quantidade de fibroblastos foi em média duas vezes maior no grupo que recebeu o biomaterial ($80,8 \pm 15,4$), em todos os momentos do tratamento, conforme demonstrado na Tab. 2, fig 3.

Tabela 2. Média e desvio-padrão de fibroblastos de coelhos submetidos a queimadura e tratados ou não com FRPa (fibrina rica em plaquetas autóloga)

Grupos/dias	7	14	21	30
Controle	$51,8^{Aa} \pm 19,9$	$45,6^{Aa} \pm 16,05$	$43,0^{Aa} \pm 19,46$	$48,4^{Aa} \pm 7,26$
FRPa	$82,2^{Ba} \pm 20,03$	$99,0^{Ba} \pm 9,66$	$84,4^{Ba} \pm 10,26$	$80,8^{Ba} \pm 18,42$

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre momentos. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre tratamentos.

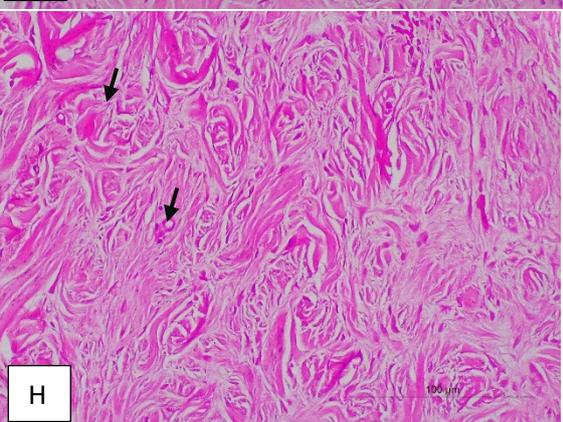
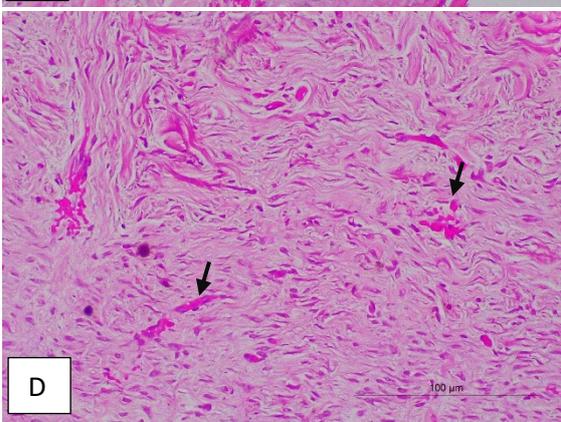
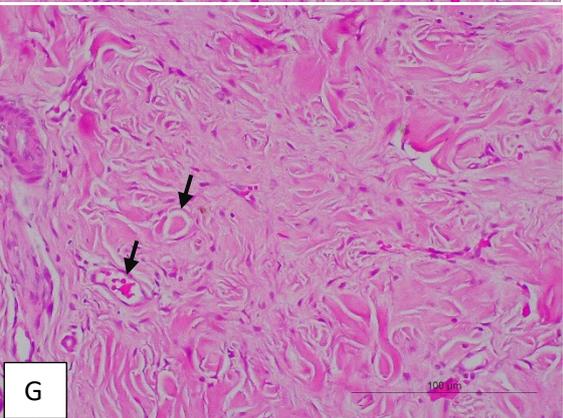
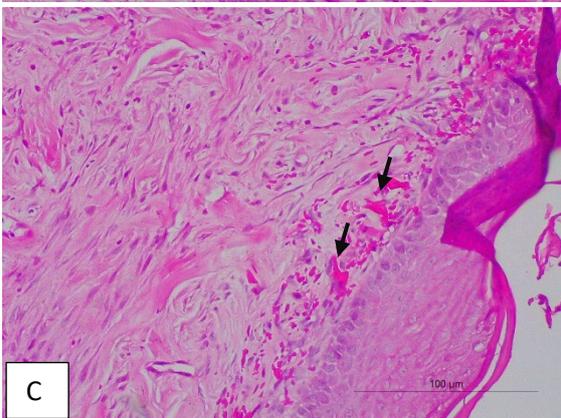
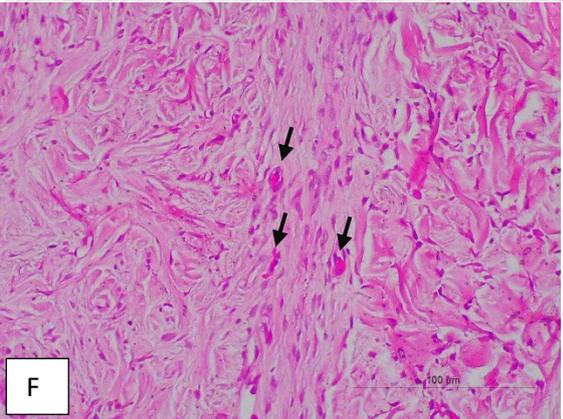
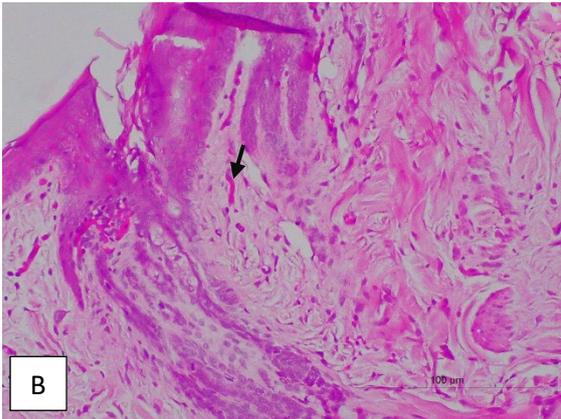
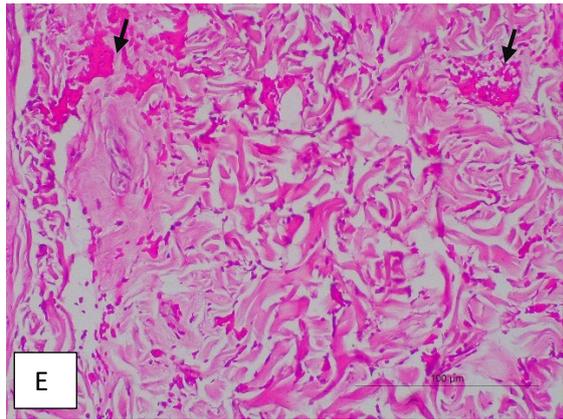
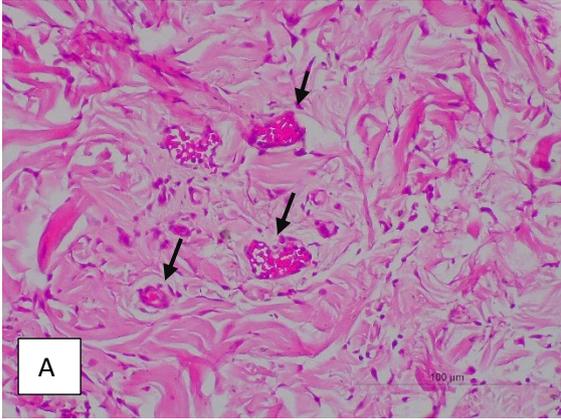


Figura 3: Fotomicroscopia comparando o número de vasos neoformados (setas) e fibroblastos de amostras de pele de submetidos à queimadura e tratados com (Letras E, F, G, H) ou sem FRPa (Letras A, B, C, D) nos dias 7, 14, 21 e 30 respectivamente (Hematoxilina/Eosina, aumento de 400x).

Discussão

Considerada a primeira barreira de defesa do organismo, a pele exerce uma estrutura de grande importância. O processo habitual de reparação de feridas consiste em uma sequência de fases, recuperando a derme e a epiderme, tais como a inflamação, que ocorre até o terceiro dia de lesão; a proliferação, que ocorre do quarto até o vigésimo dia; e remodelação, que vai do vigésimo primeiro dia em diante¹⁴.

As plaquetas secretam uma série de fatores de crescimento e angiogênicos que estimulam a proliferação e ativação de células envolvidas na cicatrização de feridas incluindo fibroblastos, neutrófilos e macrófagos. A presença de uma matriz de fibrina aumenta a distribuição de fatores de crescimento sobre a área da ferida. Além disso, sua estrutura tridimensional rica em plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento persiste no local da aplicação, proporcionando ação prolongada em comparação a outros biomateriais¹⁵.

Os efeitos da FRP são diversos, sendo a ação cicatrizante o enfoque de muitos estudos. Roy et al.¹⁶ comprovaram a ação angiogênica da FRP em feridas isquêmicas, induzidas por meio da proliferação de células endoteliais. Neste estudo o autor analisou a neovascularização por meio de anticorpos anti-fator de von Willebrand (vWF), mostrando aumento de células vasculares endoteliais. No nosso estudo a angiogênese foi avaliada por meio da quantificação de vasos sanguíneos observados, encontrando-se maiores quantidades nos primeiros 14 dias, estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), nos grupos tratados com a FRPa quando comparados ao tratamento padrão para queimaduras. Dohle et al.¹⁷ por meio de culturas celulares *in vitro* demonstraram o efeito cicatrizante, em particular o efeito angiogênico da FRP, fato que corrobora nosso estudo.

No presente estudo, utilizando 200G de força relativa de centrifugação observou-se maiores valores de vasos sanguíneos neoformados nas feridas

com a utilização de FRPa quando comparado às demais, corroborando Kubesch et al.¹⁸ que demonstraram que a força relativa de centrifugação interfere nas características físico- químicas da FRP sólida, de tal forma que a centrifugação com força média (222G) promoveu a confecção de uma trama de fibrina menos densa e mais porosa, refletindo em uma diferença significativa no índice de vascularização, quando comparada à força mais elevada.

Em concordância Ehrenfest et al.¹⁹ e Bagdadi et al.²⁰ já demonstravam que as características da centrífuga como os protocolos de centrifugação impactavam significativamente nas células, fatores de crescimento e arquitetura da FRP, demonstrando também que a quantidade de fatores de crescimento encontrados na FRP está relacionada à presença de leucócitos neste biomaterial.

Na quantificação dos fibroblastos, observaram-se maiores quantidades nos coelhos que foram tratados com FRPa, isso porque a FRP pode modular a cicatrização de tecidos por meio da liberação gradual e prolongada de fatores de crescimento como transformador beta (TGF- β), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), endotelial vascular (VEGF), fibroblástico (FGF) e epitelial (EGF)²¹ garantindo a homeostase e estimulando a angiogênese e proliferação celular^{22,23}.

Além de sua importância nos estágios iniciais da cicatrização (formação de coágulos, liberação direta de fatores de crescimento), as plaquetas podem influenciar todo o processo de regeneração tecidual por meio da modulação da síntese e liberação de VEGF²⁴ por conter grandes quantidades de proteínas pró e antiangiogênicas em populações de grânulos α . Quando ativados, sua liberação, bem como os fosfolípidios e micropartículas derivados de plaquetas, mostram efeitos regulatórios sinérgicos sobre a angiogênese²⁵. No entanto, estudos recentes encontraram concentrados de plaquetas superiores ao plasma ou plaquetas isoladamente em termos de estimulação da proliferação e migração de fibroblastos, quimiotaxia e angiogênese como processos relevantes para a cicatrização de feridas²⁶. Estes estudos aumentam a relevância clínica da produção de produtos derivados de plaquetas, como FRPa para procedimentos regenerativos²⁴.

Conclusões

Conclui-se que o uso da FRPa em lesões causadas por queimaduras é uma alternativa viável para aumentar a neovascularização e produção de fibroblastos para uma cicatrização mais eficiente.

Referencias

1. Morton LM, Phillips, TJ. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74: 589–05.
2. Carvalho CKL, Fernandes BL, Souza MA. Autologous Matrix of Platelet-Rich Fibrin in Wound Care Settings: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *J Funct Biomater* 2020; 11: 31.
3. Finnerty CC, Jeschke MG, Branski LK, Barret JP, Dziewulski P, Herndon DN. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge after burn injury. *Lancet* 2016; 388(10052):1427-36.
4. van Baar ME, Essink-Bot ML, Oen IMM, Dokter J, Boxma H, van Beeck EF. Functional outcome after burns: A review. *Burns* 2006; 32: 1-9.
5. Barcellos LG, Silva APP, Piva JP et al. Características e evolução de acientes queimados admitidos em unidade de terapia intensiva pediátrica. *Rev Bras Ter Intensiva* 2018,30:333-337.
6. Ozecelik U, Erci Y, Bircan HY, et al. Effect of topical platelet-rich plasma on burn healing after partial-thickness. *Burn injury* 2016; 22:1903-09.
7. Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig* 2016; 20:2353–60.
8. Miron, RJ, Zucchelli, G, Pikos, MA et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic review. *Clin. Oral Investig* 2017; 21: 1913–27.

9. Saghiri MA, Asatourian A, Garcia-Godoy F, Sheibani N. The role of angiogenesis in implant dentistry part II: the effect of bone-grafting and barrier membrane materials on angiogenesis. *Med oral patol oral cir bucal* 2016; 21:e526–e37.
10. Carmona JU, Lopez C, Giraldo CE. O uso do concentrado de plaquetas autólogo na terapia regenerativa músculo-esquelética crônica equina. *Arch Med Vet* 2011; 43:1-10.
11. Kanashiro GP, Cassu RN.. Anestesia em animais selvagens e de laboratório, in: Andrade, SF. *Manual de Terapêutica Veterinária* 2008, 728–745.
12. Narang I, Mittal N, Mishra N. 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* 2015;6:63–8.
13. Dutra RC, Pittela F, Ferreira AS et al. Efeito cicatrizante das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em modelos de úlceras dérmicas experimentais em coelhos. *Lat Am J Pharm* 2009, 28:375-382.
14. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res* 2012, 49:35–43.
15. Yu P, Zhai Z, Lu H, Jin X, Yang X, Qi Zuoliang. Platelet-Rich Fibrin Improves Fat Graft Survival Possibly by Promoting Angiogenesis and Adipogenesis, Inhibiting Apoptosis, and Regulating Collagen Production. *Aesthetic Surgery Journal* 2020; 40: NP530–NP45.
16. Roy S, Driggs J, Elgharably, H et al. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Reg* 2011; 19:753-66.
17. Dohle E, Bagdadi KE, Sader R. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. *J Tissue EngRegn Med* 2018;12:598-10.

18. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets* 2018;6:1-12.
19. Ehrenfest DMD, Pinto NR, Pereda A et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets* 2017; 29:171-84.
20. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg* 2019; 45:467–79.
21. Miranda, RC, Ferreira Neto MD. Plasma rico em fibrina para implante imediato: Revisão de literatura. *Id Line Rev. Mult. Psicol* 2019; 13: 889–99.
22. Maniyar N, Sarode, GS, Sarode, SC, Shah J. Platelet-Rich fibrin: A “wonder material” in advanced surgical dentistry. *Med J DY Patil Vidyapeeth* 2018; 11: 287–90.
23. Viana MG. Considerações clínicas sobre o uso do L-PRF na terapêutica de osteonecrose medicamentosa dos maxilares: Relato de caso. *Braz J Health Rev* 2019;2: 3318–27.
24. Nami N, Feci L, Napoliello L, et al. Crosstalk between platelets and PBMC: new evidence in wound healing. *Platelets* 2016; 27:143–48.
25. Walsh TG, Metharom P, Berndt MC. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. *Platelets* 2015; 26:199–11.
26. van der Bijl I, Vlig M, Middelkoop E, de Korte D. Allogeneic platelet-rich plasma (PRP) is superior to platelets or plasma alone in stimulating fibroblast proliferation and migration, angiogenesis, and chemotaxis as relevant processes for wound healing. *Transfusion* 2019; 59:3492-00.

ANEXO A - APROVAÇÃO CEUA

02/09/2021

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação

PERC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE DO COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS COM USO FIBRINA RICA EM PLAQUETAS AUTOLÓGICA EM COELHOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPII) sob o número nº 6282 e tendo como participante(s) GLEVCIANE PIRES CANELA DA SILVA RAMOS (discente), LUIZA SOBYENSO AMBRÓSIO (discente), ROSSA MARIA BARELLI NOGUEIRA (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (discente), CECÍLIA LAPISY 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 da 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 as preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.089, de 15 de Julho de 2009, e com as normas adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 15/07/2020.

Vigência do projeto: 07/2020 a 10/2021.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	ANIMAL VIVO			Origem
		Sexo	Idade	Peso	
coelho	10	3 quilos	2 anos	M	Criatório da Unoeste

Presidente Prudente, 17 de Setembro de 2020.


 Prof. Dr. Carlos Roberto Ramos Jr.
 Coordenador Científico do CPII


 Prof. Msc. Adriana Fátima de Souza
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPII - 18.228-2070 - cpil@unoeste.br
 Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18.228-2070 - cep@unoeste.br
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 18.228-2070 - ceua@unoeste.br

salvo este documento em www.unoeste.br sob o número de acesso de segurança 84734899482x78x0047622787

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Advances in Skin & Wound Care, a peer-reviewed, interprofessional journal, publishes quantitative and qualitative studies, continuing education articles, scholarly reviews of the literature, reports on innovative treatments, case series, case studies, and practical articles for skin and wound care professionals. Published articles translate knowledge into practice for all professionals involved in skin and wound management: physicians, nurses, dermatologists, surgeons, podiatrists, physical and occupational therapists, dietitians, infection control practitioners, pharmacists, biomedical engineers, researchers, academics, and administrators.

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. Manuscript submissions must be accompanied by an author profile form. All authors must reveal their affiliation(s) with organizations that have a direct or indirect financial interest in the editorial content or products that are discussed in the manuscript. Authors must state all relevant 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.

Direct all correspondence and questions to:

Advances in Skin & Wound Care

Two Commerce
Square2001
Market Street

Philadelphia, PA 19103

Telephone: 215-521-8830

E-Mail: ASWCedit@wolterskluwer.com

Manuscript Submission

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

Review Process

All submitted papers are subject to a double-blind peer review. To facilitate blinding, the body of the manuscript should not include any identifiable information, including but not limited to author names/initials, facility names, or specific locations. The initial review process takes 2 to 3 months. Reviewer comments will be shared with the authors. If substantive revision is necessary, the manuscript will be returned to the authors for rework based on feedback from the Editor(s)-in-Chief and peer reviewers. Accepted manuscripts are subject to editorial revision for clarity, punctuation, grammar, syntax, and conformity to journal style. The corresponding author will receive a copy of the final manuscript for review prior to publication.

ARTICLE TYPES

Original Investigation

Original Investigations are scientific feature articles that create original data and translate new findings into practice for improved patient care. These articles should be no more than 6,000 words, and the reference list should be limited to 50 or fewer key recent references.

Continuing (Medical) Education (CE/CME)

A CE/CME article should review the recent literature and key concepts with an interpretation of the evidence for clinical practice. These articles should be written by practicing healthcare professionals and not employees of companies with conflicts of interest on the subject. The submission should be evidence-based and may follow a case format. The CE/CME may reflect scientific evidence, expert opinion, and/or patient preference. The presented data should discuss the impact of the author conclusions/recommendations on healthcare systems (when appropriate). These articles should be no more than 4,500 words, and the reference list should be limited to 25-40 key recent references. The article must also include Practice Points: 4 or 5 bullets that summarize the main clinical takeaways of the article.

Literature Reviews

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. Case Series are any articles describing the specifics of more than one case, up to a dozen patients. Clinical images to accompany the Series are encouraged. Case Series must clearly state within the body of the manuscript that written informed consent was provided by each subject of the case to publish the case details and associated images, if any. Submissions without this statement will be immediately returned to the author.

Case Report

A Case Report offers readers practical information about a single case that may be applicable to clinical care more broadly. The case may detail a rare condition/diagnosis or an unusual outcome; clinical images to accompany the case are encouraged. Case Reports must clearly state within the body of the manuscript that written informed consent was provided by the subject of the case to publish the case details and associated images, if any. Submissions without this statement will be immediately returned to the author.

Letters to the Editor

Advances in Skin & Wound Care encourages this type of professional exchange. Letters are reviewed by the Editor(s)-in-Chief for suitability before publication. They must

be signed and will be subject to editing for style and length. Letters that question, criticize, or respond to a previously published paper will be sent to the author of that paper for a reply. Letters should be between 500 and 1,500 words in length, and should be submitted to ASWCedit@wolterskluwer.com, NOT Editorial Manager, with the subject line "Letter to the Editor."

STYLE GUIDE

Article Organization

- **Title Page:** Should include the following:
 - The article title
 - The full name of each author, all credentials including highest academic degree, and current job/position title and affiliation, including city and state (eg, Jamie Smith, PhD, RN, Associate Professor, School of Medicine, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA) listed in publication order.
 - Please note that **Advances in Skin & Wound Care** does not designate a corresponding author for its features.
 - Any 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). Funding disclosures should be specific and clearly state what support was provided, eg, study materials, travel reimbursement, editorial support, etc.
- **Abstract:** A structured abstract of no more than 250 words included within the body of the manuscript should contain the following headings: Objective, Methods, Results, Conclusions, and 6 Keywords in alphabetical order.
- **Text:** Do not number manuscript sections. The body of the manuscript may include the following:
 - Introduction (including a brief literature review, statement of the problem/clinical relevance, study objective)
 - Methods (including study design, setting, participants, inclusion/exclusion criteria, materials, procedure, etc.)
 - **Regardless of type, every manuscript involving living beings must include an ethics section that addresses institutional review/approval and/or participant/guardian consent, even if the study was exempt. Submissions that do not address this will be immediately returned to the author.**
 - Results
 - Discussion (including implications for clinical practice and limitations sections)
 - Conclusions

References

Authors must use AMA (American Medical Association) style for references. Do not use endnotes in the text. Number each reference consecutively from 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.

- **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.
 - Example: **Collins L, Seraj S. Diagnosis and treatment of venous leg ulcers. Am Fam Physician 2010;81:989-96.**
- **Publication by an organization:** Follow example format; include a hyperlink and last accessed date when applicable.
 - Example: National Pressure Injury Advisory Panel. Pressure Injury Stages. 2016. <https://npiap.com/page/PressureInjuryStages>. Last accessed October 14, 2020.
- **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.
 - Example: Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK. Adequacy of Sample Size in Health Studies. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2018.
- **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, eds. Resident Assessment Instrument Training and Resource Guide. Natick, MA: Eliot Press;2020.

Art Items

- Art items should be submitted as separate document(s).
- Articles should have no more than 6-8 art items, proportional to the length of the manuscript. Figures with multiple parts count as multiple items. Excess or overly long tables and figures will be published online as supplemental digital content at the discretion of the editors.
- **If using previously published material, authors are responsible for obtaining written permission from the copyright holder before submission.**
- **Tables:** Include a title for each table. Number the tables in the order in which they are referred to in the text. Any abbreviations, footnotes, and appropriate credit lines should be listed at the bottom of the table.
- **Figures:** Must be submitted as individual high-resolution electronic files in .tif, .png, or .jpg format. If a figure has multiple parts (Figure 1a, Figure 1b), each must be submitted as a separate file. Images inserted into a Word document are not acceptable. Include a title for each one. Number the figures in the order in which they are referred to in the text. **Written permission from the subject must accompany photographs.** Model release forms can be supplied if needed.

Other

Authors should incorporate the following style considerations into their manuscripts before submission:

- **Advances in Skin & Wound Care** uses American English spellings and grammar conventions.
- Products, devices, and medications should be referred to by their generic names throughout the manuscript. At first mention, authors may place the brand name, manufacturer, and manufacturer location in parenthesis. Trademark and registration symbols should not be used.
- Do not use the first person (we, us, our); instead, third person should be used (study authors, researchers, investigators, etc).
- Spell out all abbreviations at first mention. Abbreviations should only be used for terms that appear three or more times in the text.
- Patient-first language must be used, ie, persons with diabetes, NOT diabetics.
- Please note the following statistical/special character conventions: $P < .05$; $n = 580$; χ^2 test; TNF- α

Clinical Trials

Manuscripts about a clinical trial must meet the International Committee of Medical Journal Editors' (ICMJE) clinical trial registration and data sharing policy.

1. As of July 1, 2018, manuscripts submitted that report the results of clinical trials must contain a data sharing statement.
2. Clinical trials that begin enrolling participants on or after January 1, 2019 must include a data-sharing plan in the trial's registration.

The ICMJE defines a clinical trial as any research project that prospectively assigns people or a group of people to an intervention, with or without concurrent comparison or control groups, to study the relationship between a health-related intervention and a health outcome. For more information, visit the ICMJE Clinical Trials site.

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 for this process.

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>