

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA FERREIRA DE CAMARGO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DA FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

Porto Alegre
2013

FERNANDA FERREIRA DE CAMARGO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DA FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 08 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal - PUCRS

Prof. Dr. Henrique Sarubbi Fillmann - PUCRS

Prof. Dr. Pedro Djacir Escobar Martins - PUCRS

Porto Alegre
2013

FERNANDA FERREIRA DE CAMARGO

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E DA FIBRINA RICA EM
PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Porto Alegre
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

C172e Camargo, Fernanda Ferreira de
Efeito do plasma rico em plaquetas e da fibrina rica em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas em ratos / Fernanda Ferreira de Camargo. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

184 p.: il. gráf. tab. Inclui artigo científico submetido à publicação na PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva.
Coorientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica cirúrgica.

1. CICATRIZAÇÃO. 2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP). 3. FIBRINA. 4. FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF). 5. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS. 6. PELE. 7. FATORES DE CRESCIMENTO. 8. REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA. 9. MEDICINA REGENERATIVA. 10. MODELOS ANIMAIS. 11. ESTUDO EXPERIMENTAL E CEGO NA AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS. 12. RATOS WISTAR. I. Silva, Jefferson Luis Braga da. II. Silva, Vinicius Duval da. III. Título.

C.D.D. 616.546
N.L.M. W0 188

Ao meu querido pai, Sergio Ferreira de Camargo Coimbra (in memmorian). Obrigada por ter deixado em mim a herança dos livros e do estudo. Sinto tua falta todos os dias.

À minha amada mãe, Iveli Pessin Ferreira de Camargo. Obrigada por ser a melhor mãe que alguém poderia desejar e por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva**, por ter incentivado e proporcionado a realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva**, pela incansável orientação e imensa colaboração, imprescindíveis a esta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Pedro Djacir Escobar Martins**, pelo grande exemplo, apoio e valiosa contribuição.

Ao **Prof. Dr. Mário Wagner**, pela análise estatística e orientação em várias etapas desse trabalho.

Ao amigo e acadêmico **Thiago Bozzi de Araújo**, pela imensurável colaboração e dedicação, mesmo que muitas vezes à distância, em todas as etapas da confecção desse trabalho.

À amiga **Patrícia Koehler**, pela disponibilidade e colaboração inestimável.

Aos técnicos do laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica, **Gilmar Moreira** e **Juliana Rangel** pela imensa ajuda e dedicação.

Ao técnico do Laboratório de Patologia, **Tiago Julianni**, pela atenção e confecção das lâminas histológicas.

À **Franciele Dietrich**, pela contribuição e auxílio em muitos procedimentos.

Às acadêmicas, **Martina Wagner**, **Caroline Naujorks** e **Fernanda Osório**, pelo auxílio nas cirurgias, fotografias e artigos.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, **Ernesto Carlos Amaral da Silva**, **Vanessa Regina dos Santos**, e **Alexandra Brum Corrêa**, pela disponibilidade e excelente atendimento.

Aos colegas do laboratório, **Martina Lichtenfels**, **Márcia Donadussi**, **Alessandra Sebben**, **Lucas Colomé** e **Eduardo Goldani**, pelo compartilhamento de tantas experiências.

Aos “meus queridos médicos”, **Rogério Vianna Rocca**, **Gabriel Azambuja Narvaez**, **Guilherme Sudbrack**, **Sergio Ivo Dedavid**, **Jaderson Costa da Costa**, **Eliseu Paglioli Neto**, **Leandro Genehr Fritscher** e **Ana Lúcia Martins Costa**, por terem, tão bem, cuidado da minha saúde, possibilitando, assim, a conclusão desse trabalho.

À **Carla Soares Pereira**, minha eficiente e querida secretária, pelo grande apoio, paciência e inestimável contribuição, fundamentais para a realização dessa pesquisa.

Ao **Dr. Rogério Göttert Cardoso**, pelo apoio pessoal e incentivo para mais essa conquista em minha vida.

Aos meus **familiares** e **amigos**, com quem compartilho essa vitória, pelo carinho, estímulo e, principalmente, por compreenderem minha ausência em tantos momentos.

“Não devemos jamais nos deixar limitar por princípios já testados e consagrados, mas ao contrário, respeitando-os e partindo deles, devemos procurar criar novos caminhos, descobrir novas estradas e ultrapassar os conhecimentos já estabelecidos.”

Ivo Pitanguy

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, comparando os tratamentos entre si e com seus respectivos grupos controle.

Material e Métodos: Foram utilizados 48 ratos Wistar. Duas feridas de 1,0 cm de diâmetro, de espessura total da pele, foram excisadas do dorso dos animais e tratadas com PRP ou PRF e soro fisiológico (modelo emparelhado). As feridas foram avaliadas no pós-operatório imediato e depois de 7 e 14 dias, de forma macroscópica (fotografias) e microscópica (histologia). As fotografias forneceram medidas da área das feridas, possibilitando analisar sua contração (análise morfométrica). As imagens histológicas permitiram calcular a concentração de colágeno nas feridas (análise histomorfométrica) e as lâminas histológicas a descrever suas características.

Resultados: Quanto à análise morfométrica, o efeito do tempo ($P < 0,001$) e dos grupos ($P = 0,022$), ao longo do período de observação, foi estatisticamente significativo. A taxa de contração das feridas tratadas com PRF foi maior do que as tratadas com PRP ($P = 0,030$). Na análise histomorfométrica, a média da concentração de colágeno, nas imagens dos grupos experimentais, apresentou um aumento do 7º para o 14º dia, considerado significativo ($P < 0,001$). Houve grande variação percentual na concentração de colágeno: 129% para a PRF contra 22% para o PRP, porém, sem significância estatística ($P = 0,380$). A descrição histológica das feridas sugeriu que o grupo PRF apresentou maior aceleração do reparo quando comparado ao grupo PRP, apesar da ausência de significância estatística nas características avaliadas. Os grupos de tratamento PRP e PRF não foram estatisticamente superiores aos seus grupos controle nas variáveis estudadas.

Conclusão: Os dados do presente estudo sugerem que o PRP e a PRF não apresentaram resultados mais eficazes do que o soro fisiológico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. No entanto, a PRF mostrou-se superior ao PRP.

Palavras-Chave: Cicatrização. Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Fibrina Rica em Plaquetas (PRF). Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas. Pele. Fatores de Crescimento. Medicina Regenerativa. Modelos Animais. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) on cutaneous wound healing in rats by comparing treated and control wounds.

Material and Methods: Forty-eight Wistar rats were used in the study. Two wounds with 1-cm diameter, of total skin thickness, were excised from the back of the animals and treated with either PRP or PRF and saline (paired model). The wounds were evaluated immediately after the procedure and after 7 and 14 days using macroscopic (photographs) and microscopic (histology) methods. The photographs were used to measure the area of wounds in order to analyse wound contraction (morphometric analysis). The histological images permitted a count-analysis of collagen concentration (histomorphometric analysis) while the histological slides provided the description of the wounds' characteristics.

Results: Morphometric analysis revealed statistically significant time effect ($P < 0.001$) and treatment group effect ($P = 0.022$) over the observation period. The rate of wound contraction was higher in PRF-treated wounds than in PRP-treated wounds ($P = 0.030$). In the histomorphometric analysis, mean collagen concentration, on the images of the experimental groups, increased significantly ($P < 0.001$) from day 7 to day 14. There was wide variation in the percentage of collagen concentration: 129% in the PRF group vs. 22% in the PRP group; however, this difference did not achieve statistical significance ($P = 0.380$). Histology of the wounds suggested a more accelerated healing process in the PRF group vs. the PRP group, despite the lack of statistical significance in the characteristics analyzed. PRP-treated and PRF-treated groups were not statistically superior to their controls in any of the studied variables.

Conclusion: The present results suggest that treatment with PRP and PRF were not more effective than saline for cutaneous wound healing in rats. However, PRF proved to be superior to PRP.

Keywords: Wound Healing. Platelet-Rich Plasma (PRP). Platelet-Rich Fibrin (PRF). Platelet-Derived Growth Factor. Skin. Growth Factors. Regenerative Medicine. Animal Models. Wistar Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo experimental	40
Figura 2 – Grupos de Experimentação.....	40
Figura 3 – Carimbo para marcação	42
Figura 4 – Detalhe do carimbo	42
Figura 5 – Demarcação das circunferências	42
Figura 6 – Punch com 1 cm de diâmetro.....	42
Figura 7 – Confeção das feridas.....	43
Figura 8 – Fragmentos de pele	43
Figura 9 – Tatuagem com azul de metileno	43
Figura 10 – Aplicação do PRP	44
Figura 11 – Aplicação da PRF.....	44
Figura 12 – Curativo com Tegaderm™ Film.....	44
Figura 13 – Punção cardíaca	45
Figura 14 – Primeira centrifugação	46
Figura 15 – Segunda centrifugação	46
Figura 16 – Detalhe das três camadas.....	46
Figura 17 – PRP.....	47
Figura 18 – PRP ativado	47
Figura 19 – Centrífuga Centribio	48
Figura 20 – Membrana de PRF	49
Figura 21 – Detalhe da membrana de PRF	49
Figura 22 – Fotografias do pós-operatório imediato, 7º e 14º P.O.....	50
Figura 23 – Demarcação da amostra de pele	51
Figura 24 – Retirada da amostra de pele.	51
Figura 25 – Tatuagem	52
Figura 26 – Espuma rígida e ponto de identificação à esquerda.....	52
Figura 27 – Lâminas histológicas	53
Figura 28 – Representação dos campos selecionados para a captura das imagens.....	54
Figura 29 – Quantificação do colágeno.....	55
Figura 30 – Gráfico comparativo entre a concentração plaquetária no sangue total, no Plasma Rico em Plaquetas e na Fibrina Rica em Plaquetas.....	59

Figura 31 – Gráfico de linha representando a variação das médias da área (mm ²) das feridas dos grupos de tratamento, ao longo do período de observação	60
Figura 32 – Gráfico de boxplot com as médias da concentração de colágeno no 7º e no 14º P.O. acompanhado de linhas representando a variação entre os dois momentos.....	62
Figura 33 – Histologia da pele sem lesão.....	63
Figura 34 – Imagens histológicas dos Grupos PRP e Controle do PRP (HE)	64
Figura 35 – Granuloma.....	64
Figura 36 – Imagens histológicas dos Grupos PRF e Controle da PRF (HE)	65
Figura 37 – Imagens histológicas dos Grupos PRP e Controle do PRP (picrossírius)	66
Figura 38 – Imagens histológicas dos Grupos PRF e Controle da PRF (picrossírius)	67
Figura 39 – Deposição de colágeno	68
Figura 40 – Importância da polarização	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias geométricas (mínimo-máximo) para a área das feridas (análise morfométrica) com suas respectivas taxas percentuais de contração	60
Tabela 2 – Valores P referentes às comparações <i>post-hoc</i> entre os grupos de tratamento, ao longo do período, com ajuste de Sidak	61
Tabela 3 – Medidas descritivas para a concentração de colágeno na área (mm ²) das feridas cutâneas (análise histomorfométrica) segundo tratamento e tempo	62

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

α	Alfa
&	E
°C	Graus Celsius
=	Igual
>	Maior
\geq	Maior ou igual
\pm	Mais ou menos
®	Marca registrada
<	Menor
\leq	Menor ou igual
/	Por
%	Por cento
Δ	Varição percentual
x	Vezes
apud	em (citado por)
ACD-A	Ácido Citrato Dextrose - A
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
cm	Centímetros
CO₂	Gás carbônico
CaCl²	Cloreto de cálcio
dL	Decilitro
DP	Desvio-padrão
Dr.	Doutor
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
et al.	E outros
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
g	Gramas
g	Aceleração da Gravidade
HE	Hematoxilina e Eosina
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IM	Intramuscular
Kg	Quilograma
m	Metro
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLM	Modelo Linear Misto
mm	Milímetro
mm²	Milímetro quadrado
nº	Número
P.O.	Pós-operatório
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRF¹	Fibrina Rica em Plaquetas
PRGF	Plasma Rico em Fatores de Crescimento
Prof.	Professor
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
rpm	Rotações por minuto
SF	Soro fisiológico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ST	Sangue total
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TM	Trade Mark
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
vs	Versus (contra)

¹ A sigla, em português, de Fibrina Rica em Plaquetas é FRP, porém, optou-se por manter a sigla em inglês: PRF (Platelet-Rich Fibrin), uma vez que não foi encontrado, na literatura, artigo em português com esse descritor. A mesma sigla, em inglês, também foi mantida em dissertação anterior: DIETRICH, Franciele. **Comparação do efeito do plasma rico em plaquetas e fibrina rica em plaquetas no reparo do tendão de aquiles em ratos**. 2012.104f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 PELE	20
2.2 FISILOGIA DA CICATRIZAÇÃO.....	21
2.2.1 Feridas de Difícil Cicatrização	23
2.2.2 Modelos Experimentais	24
2.3 ANATOMIA E FISILOGIA DAS PLAQUETAS	25
2.4 FATORES DE CRESCIMENTO	26
2.4.1 PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)	27
2.4.2 TGF-β (Fator de Crescimento Transformador Beta)	27
2.4.3 FGF (Fator de Crescimento Fibroblástico)	28
2.4.4 VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)	29
2.4.5 IGF (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)	29
2.4.6 EGF (Fator de Crescimento Epidérmico)	29
2.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	30
2.5.1 Preparação do PRP	30
2.5.2 Ativação do PRP	31
2.5.3 Aplicações Clínicas do PRP	32
2.5.4 Contraindicações Relativas e Segurança do PRP	33
2.6 FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF)	34
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 OBJETIVO GERAL.....	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 DELINEAMENTO	39
5.2 ANIMAIS.....	39
5.3 MODELO EXPERIMENTAL E GRUPOS DE EXPERIMENTAÇÃO	39
5.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	41
5.4.1 Procedimento Anestésico	41
5.4.2 Técnica Cirúrgica	41
5.4.3 Cuidados Pós-Operatórios	44

5.4.4 Eutanásia	45
5.5 OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	45
5.6 OBTENÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF)	48
5.7 CONTAGEM PLAQUETÁRIA.....	49
5.8 ANÁLISE DE RESULTADOS	49
5.8.1 Análise Morfométrica	50
5.8.2 Análise Histológica	51
5.8.2.1 Coleta das Amostras de Pele	51
5.8.2.2 Confeção das Lâminas Histológicas.....	53
5.8.2.3 Análise Histomorfométrica.....	54
5.8.2.4 Descrição das Características das Feridas	55
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5.10 ASPECTOS BIOÉTICOS	56
6 RESULTADOS	58
6.1 RESULTADOS CLÍNICOS E CIRÚRGICOS	58
6.2 RESULTADO DA CONTAGEM PLAQUETÁRIA	58
6.3 RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	59
6.4 RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	61
6.5 RESULTADOS DA DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FERIDAS ...	63
6.5.1 Coloração Hematoxilina e Eosina	63
6.5.2 Coloração Picrosírius	65
7 DISCUSSÃO	69
8 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A	93
APÊNDICE B	119
APÊNDICE C	127
APÊNDICE D	134
APÊNDICE E - ARTIGO EM PORTUGUÊS	142
APÊNDICE F – SUBMISSÃO DO ARTIGO	163
APÊNDICE G - ARTIGO EM INGLÊS	164
ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP DA PUCRS	184

1 INTRODUÇÃO

A constante busca por cicatrizes mínimas ou imperceptíveis norteia os princípios fundamentais da cirurgia plástica desde os seus primórdios. A possibilidade de manipular a cicatriz cutânea, seja por meio de medidas cosméticas, adição de substâncias, cirurgia ou engenharia genética, estimula os cirurgiões plásticos e impulsiona inúmeras pesquisas.

O conhecimento do processo de cicatrização das feridas e dos diversos fatores que nele podem interferir são condições básicas, atualmente, para que se obtenham cicatrizes de melhor qualidade. Assim, as alterações cicatriciais dos tecidos, que possam advir dos estudos com fatores de crescimento, biologia celular e molecular, engenharia genética ou de tecidos, representam o futuro de muitas especialidades médicas, entre elas a cirurgia plástica.

A cicatrização é um fenômeno fisiológico que se inicia quando há solução de continuidade dos tecidos. É uma reação de defesa do organismo, agredido por qualquer agente traumático, ou mesmo cirurgia, para manter sua integridade.¹

O processo biológico da cicatrização pode ser dividido em três etapas que se sobrepõem no tempo: inflamação, fibroplasia e maturação.¹⁻⁴ A formação da cicatriz é a última etapa desse reparo tecidual.

Inúmeros estudos, com ênfase na engenharia de tecidos, vêm sendo desenvolvidos com o intuito de aperfeiçoar as técnicas de reparo da cicatrização.

Concentrados autólogos derivados de plaquetas como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e a Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) têm sido utilizados para acelerar o processo de regeneração tecidual.⁵⁻⁸

O Plasma Rico em Plaquetas é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma,⁹ sendo essa concentração 4 a 6 vezes acima dos níveis fisiológicos, ou seja, aproximadamente um milhão de plaquetas por microlitro.^{10,11}

A Fibrina Rica em Plaquetas é um concentrado de plaquetas obtido de uma membrana de fibrina. A matriz de fibrina possui componentes favoráveis também à imunidade, elementos, esses, responsáveis pelo potencial terapêutico que ajuda a diminuir os processos inflamatórios e a estimular os mecanismos de defesa contra infecções.¹²

O Plasma Rico em Plaquetas e a Fibrina Rica em Plaquetas são descritos na literatura como fontes potenciais de fatores de crescimento.¹³⁻¹⁵

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos, com efeitos locais e sistêmicos, que potencializam a quimiotaxia, proliferação, diferenciação e secreção celular.¹⁶ São capazes de estimular a angiogênese e promover crescimento vascular. Ativam a proliferação de fibroblastos com consequente aumento da síntese de colágeno.^{17,18} São esses fatores de crescimento que, quando liberados pelas plaquetas, promovem a cicatrização dos tecidos lesados.¹⁷

O Plasma Rico em Plaquetas e a Fibrina Rica em Plaquetas têm se estabelecido como importantes aliados na regeneração de tecidos moles e ósseos e na cicatrização de lesões crônicas e agudas.¹⁹⁻²⁴

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do PRP e da PRF na cicatrização de feridas cutâneas em ratos e comparar os dois grupos de tratamento, entre si e com os grupos controle.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PELE

A pele, ou *cútis*, reveste toda a superfície corporal e protege os tecidos internos de lesões, infecções, calor e perda de fluidos, além de conter terminações nervosas periféricas que permitem a interação do ser humano com o meio externo. Ela desempenha papel essencial no controle de temperatura, dissipando calor via radiação, condução e convecção (acrescido da produção de suor), e proporciona isolamento térmico através da gordura dérmica e hipodérmica. Na pele, mais precisamente na epiderme, encontram-se as células de Langerhans, apresentadoras de antígenos, que migram para os linfonodos regionais quando ativadas por patógenos externos, caracterizando a sua importância imunológica. Há, ainda, uma série de anexos tegumentares que auxiliam a função protetora e sensorial desse órgão humano.^{25,26}

Mais recentemente, a pele humana passa, também, a ser entendida como um órgão neuroendócrino, uma vez que as interações neuroquímicas para manutenção da integridade estrutural e funcional da própria pele interagem e interferem na homeostase sistêmica.²⁷

A pele é contínua com os orifícios corporais: a transição do epitélio escamoso da pele com o epitélio mucoso da boca ou ânus, por exemplo, é bem delimitada. É considerada o maior órgão humano, constituindo 15% do peso corporal. A área de superfície corporal varia com o peso e a altura e é, aproximadamente, 1,8 m² para um homem de 70 kg e 1,70 m de altura.²⁶

Morfologicamente, as três principais camadas da pele são a epiderme, a derme, e o tecido subcutâneo.²⁸ A epiderme compõe a camada superficial e é composta por 4 subcamadas (estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal). O estrato córneo é formado por células “mortas” queratinizadas que se agrupam de maneira estratificada, uma sobre as outras, e, sequencialmente, separam-se e descamam. Abaixo dessa subcamada, encontram-se o estrato granuloso, o estrato espinhoso, e o estrato basal. Essas camadas consistem, basicamente, de queratinócitos, células cuja nutrição provém pela camada dérmica, já que a epiderme é avascular. Melanócitos, na porção inferior da epiderme, contêm melanina, um pigmento escuro cuja concentração é determinada pela genética,

exposição solar, lesões, cicatrização e controle hormonal. A epiderme é formada por uma rede de sulcos, visível a olho nu, na sua porção superficial; esses sulcos tendem a ser mais profundos em regiões de articulações ou de maior enrugamento da pele, como na região frontal da face. Essa camada ainda possui diferentes profundidades, sendo mais grossa em áreas de fricção, como na palma das mãos e planta dos pés. A epiderme é separada da camada tegumentar subsequente, a derme, pela membrana basal, e aderida a ela por meio de junções do tipo hemidesmossomos.²⁵

A derme superficial compõe-se de uma série de papilas, nas quais a epiderme é moldada, denominada derme papilar. A derme reticular, mais profunda, consiste de tecido conjuntivo denso, contendo vasos linfáticos, nervos e uma quantidade considerável de tecido elástico. Na sua porção mais profunda, fibras colágenas e elásticas se misturam. Entre as fibras dessa camada, encontram-se glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, folículos capilares, e adipócitos. A subcamada reticular funde-se com a camada celular subcutânea, a mais profunda e menos aderente porção da pele humana.²⁹

A integridade da epiderme depende de estreitas adesões celulares que formam uma barreira impermeável. A integridade da derme, por outro lado, depende da intercessão das fibras de colágeno e fibras elásticas. A descontinuação dessas camadas constitui situação patológica e aciona uma série de respostas inflamatórias e imunológicas que visam o reparo da lesão e à restituição da função do órgão.²⁶

2.2 FISILOGIA DA CICATRIZAÇÃO

A reparação da integridade dos tecidos ocorre pela regeneração e cicatrização em resposta a traumas e lesões sofridos. A cicatrização é um processo biológico complexo, cujas etapas, embora superpostas, podem ser agrupadas, didaticamente, em três fases: inflamatória, fibroplasia e maturação.¹⁻⁴

A fase inflamatória inicia-se tão logo ocorre a lesão; é proporcional, em intensidade, ao dano causado ao tecido e perdura em torno de quatro dias. O colágeno exposto ativa a cascata da coagulação e o sistema do complemento. Há aderência plaquetária, degranulação e liberação de diversas substâncias vasoativas e quimiotáticas, entre elas, os fatores de crescimento.

A permeabilidade capilar aumenta e inicia-se a migração dos leucócitos com formação de exsudato na ferida, que apresenta, clinicamente, aspecto inflamatório (calor, rubor, tumor e dor).

A ativação da cascata da coagulação leva à hemostasia da lesão. A protrombina se converte em trombina, que, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina. A fibrina é o produto final da cascata da coagulação e é derivado do fator I ou fibrinogênio. A rede de fibrina é o alicerce para a migração dos macrófagos e fibroblastos. Sem a fibrina, a cicatrização é inibida.

Os leucócitos polimorfonucleares são o primeiro tipo celular a migrar para a ferida. São atraídos pela liberação de quimiotáticos. Os neutrófilos penetram a ferida por diapedese. São responsáveis pela limpeza, remoção de corpos estranhos e bactérias e pelo desbridamento de tecidos lesados.³⁰

Entre 24 e 36h, os monócitos migram dos vasos e transformam-se em macrófagos. Os monócitos são os maestros da cicatrização: agem como células fagocitárias, completando a limpeza local. São eles que coordenam a migração e a ação dos fibroblastos, assim como a angiogênese, através dos fatores de crescimento.

Por volta do terceiro ou quarto dia após o trauma começa a fase de fibroplasia, também conhecida como proliferativa ou de regeneração. Sua duração é de aproximadamente 14 dias.

Os fibroblastos surgem, atraídos por quimiotaxia, através de mediadores inflamatórios liberados por plaquetas, leucócitos e macrófagos. Iniciam a síntese e a secreção de componentes da matriz extracelular e de fatores de crescimento que continuam a estimular a cicatrização.

É nessa fase que ocorre a neovascularização e a reepitelização. A partir de 48 a 72h da lesão, começa a intensa atividade mitótica epitelial. A camada epidérmica se espessa por proliferação da camada basal, e as células basais da periferia migram sobre o defeito cicatricial, resultando na epitelização da ferida.

Característica importante do final dessa fase é a contração tecidual realizada pelos miofibroblastos. A contração é responsável pela diminuição do tamanho da lesão e redução do tempo de epitelização.

Os miofibroblastos apresentam características de células musculares lisas e são responsáveis pela aproximação das bordas da ferida através do avanço do

tecido sadio de maneira centrípeta à lesão. São também responsáveis pela contratura cicatricial, efeito indesejável, que, muitas vezes, leva a sequelas.³¹

O tecido formado pela proliferação vascular e pela matriz extracelular sintetizada pelo fibroblasto recebe o nome de tecido de granulação, tendo aspecto granuloso e avermelhado. O miofibroblasto confere capacidade contráctil ao tecido de granulação, reduzindo a área cruenta da ferida nos processos de cicatrização por 2º intenção.

A produção do colágeno atinge seu pico máximo por volta do 21º dia, continuando depois, de forma menos intensa, até que seja atingido o equilíbrio entre produção (fibroplasia) e destruição (colagenólise), já na fase de maturação.³²

Nessa última etapa, também conhecida como fase de remodelação, ocorrem dois eventos bem distintos: a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a regressão endotelial.^{3,4} Inicia-se em torno do oitavo dia e prolonga-se até o sexto mês ou mais.

É nesse período que a força tênsil da cicatriz aumenta até atingir seu platô de maturação, em torno de um ano de evolução.³⁰ O colágeno é o maior componente estrutural da cicatriz e, apesar de ter a função de proporcionar tensão e integridade a todos os tecidos, a tensão de uma cicatriz jamais ultrapassará 80 a 85% da resistência do tecido não lesado.

A regressão endotelial, outra particularidade dessa etapa, ocorre à medida que o metabolismo diminui e abranda o eritema da ferida.

Por fim, a degradação e a remodelação do colágeno proporcionam a mudança de aparência, textura e elasticidade da cicatriz.³¹

2.2.1 Feridas de Difícil Cicatrização

O tipo de lesão ou ferida é que irá determinar o modo de reparo. Feridas crônicas, ou de difícil cicatrização, são definidas como feridas abertas, que apresentam dificuldade de epitelização e não fecham em cerca de 30 dias. Essas feridas são incapazes de criar um tecido de granulação resistente. Vários fatores estão associados com a inibição da cicatrização: infecção, hipóxia tecidual, traumas repetidos, presença de tecido necrótico e radioterapia. Algumas doenças também podem interferir, como insuficiência arterial e venosa, diabetes, imunodeficiência

adquirida, doenças nutricionais e metabólicas e até o uso de medicações, como corticoides.³¹

Feridas abertas, de espessura total e com perda de tecidos moles, cicatrizam da mesma forma que as feridas fechadas, passando pelas etapas inflamatória, proliferativa e de remodelação. No entanto, essas etapas são mais longas, principalmente a proliferativa. Há muito mais formação de tecido de granulação e contração. É o que chamamos de cicatrização por 2º intenção.^{4,31}

2.2.2 Modelos Experimentais

São vários os animais utilizados para o estudo da cicatrização, porém, os mamíferos são os que mais se assemelham ao homem na deposição de colágeno nas feridas. Os roedores, principalmente os ratos, são seguidamente escolhidos devido ao baixo custo, à facilidade de transporte e obtenção e pelo pouco espaço que ocupam.³³

Kashyap et al. (1995)³⁴ consideraram o dorso dos roedores o melhor local para a confecção das lesões, pois evita-se, dessa forma, a lambedura da ferida por outros animais, assim como a irritação por contato e o autocanibalismo.

As feridas lineares suturadas já foram descritas como as mais usadas em estudos de cicatrização cutânea,³³ porém, mais recentemente, Dorset-Martin (2004)³⁵ referiu uma igualdade entre feridas incisionais e excisionais.³⁵ No entanto, segundo Cohen & Mast (1990),³³ feridas abertas que cicatrizam por 2º intenção promovem um tecido cicatricial que permite melhor quantificação.³³

Experimentos em animais demonstram que a ferida contrai aproximadamente 0,6 a 0,75 mm por dia, independentemente do seu tamanho, pela capacidade contrátil dos miofibroblastos.^{36,37} Pesquisas sobre a cicatrização de feridas em ratos observam que a reparação da pele se completa em 18 dias, porém, após 10 a 12 dias, a área de uma lesão com cerca de 1 cm se aproxima a zero.³⁸

Cross et al. (1995)³⁸ abordaram a diversidade de trabalhos publicados sobre o tamanho mais apropriado das lesões cutâneas, assim como sua profundidade e formato. Os autores explicaram que o estresse, físico e metabólico, causado por uma ferida muito grande, em relação à área de superfície corporal total do rato, pode influenciar nos resultados da cicatrização de uma pesquisa. Para minimizar o estresse dos animais, Cross et al. (1995)³⁸ preferiram feridas de 1,5 cm a feridas com

2,0 cm. Além disso, determinaram que o rato é o melhor modelo animal a ser adotado em pesquisas sobre o processo da cicatrização. Enfatizaram ainda a simplicidade, reprodutibilidade e previsibilidade que o modelo animal deve ter.³⁸

No entanto, de acordo com Dorset-Martin (2004),³⁵ a cicatrização da pele do rato não mimetiza, perfeitamente, a cicatrização da pele humana devido às suas diferenças morfológicas.³⁵ A ausência de um limite definido entre a derme papilar e a derme reticular é uma dessas diferenças. A derme do rato é mais espessa e não apresenta tecido subcutâneo, tampouco tela muscular subcutânea.³⁹

McFarlane et al. (1965)³⁹ referiram que os vasos sanguíneos, responsáveis pela irrigação cutânea dos ratos, são subdérmicos, como os da pele humana, além de apresentarem as mesmas alterações da macro e microvascularização.

Nos estudos experimentais sobre cicatrização cutânea em ratos, as avaliações macroscópicas e microscópicas das feridas ocorrem, de um modo geral, no 3º, 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório, englobando, dessa forma, todas as fases da cicatrização.⁴⁰⁻⁴³

2.3 ANATOMIA E FISIOLOGIA DAS PLAQUETAS

As plaquetas, além do importante papel na hemostasia, são fontes ricas em fatores de crescimento. Esses fatores, quando liberados pelas próprias plaquetas, desencadeiam o processo de reparação tecidual, potencializando a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular e estimulando a angiogênese.^{44,45}

As plaquetas são células sanguíneas produzidas na medula óssea. Têm a forma discoide, com aproximadamente 1-3 µm de diâmetro. Sua contagem normal no sangue varia de 150.000 a 400.000 plaquetas/µL, sendo a meia-vida cerca de 7 a 10 dias, quando então são removidas pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial.⁴⁶⁻⁴⁸ Esses fragmentos citoplasmáticos anucleados contêm organelas, mitocôndrias, microtúbulos e três tipos de grânulos.

Os α-grânulos, estruturas intracelulares das plaquetas, contêm fatores de coagulação, fatores de crescimento, serotoninas e cálcio. Quando ativadas pelo contato com a trombina, as plaquetas mudam o seu formato e desenvolvem pseudópodos, que promovem agregação e subsequente liberação do conteúdo dos α-grânulos, num processo conhecido como degranulação.⁴⁹

A degranulação das plaquetas implica na liberação dos fatores de crescimento no local da ferida, no momento em que ocorre a lesão.^{13,47,50} Os fatores de crescimento estimulam a migração e a proliferação celular dentro da matriz de fibrina, constituindo os primeiros estágios do processo de cicatrização.⁷

Após a agregação, as plaquetas tornam-se mais viscosas, dando início ao tampão hemostático. A função das plaquetas, no início da hemostasia, é formar esse tampão. O tampão plaquetário é uma tentativa de parar a perda sanguínea através dos vasos danificados.

A hemostasia secundária é iniciada com a ativação dos fatores de coagulação e a formação de uma rede de fibrina que estabilizará o tampão de plaquetas. Além disso, a formação temporária do tampão de plaquetas e fibrina, no local da lesão, previne a entrada de micro-organismos. De forma simplificada, é o próprio processo de coagulação que causa a secreção dos fatores de crescimento contidos nos α -grânulos.

2.4 FATORES DE CRESCIMENTO

Os fatores de crescimento são polipeptídios que promovem a proliferação, diferenciação e quimiotaxia, induzindo a migração de variadas células. Agem tanto de forma parácrina quanto autócrina, estimulando ou inibindo a expressão dos genes através de suas células-alvo na ferida.⁵¹

Muitos fatores de crescimento existem em várias isoformas, com diversos tipos de receptores presentes nas feridas, o que aumenta a complexidade de suas funções. Os fatores de crescimento são capazes de induzir efeitos em múltiplos tipos de células e provocar uma série de funções biológicas em diversos tecidos. O efeito sinérgico de diferentes fatores tem uma consequência positiva na cicatrização.

Após a aplicação do PRP e da PRF nos tecidos e da degranulação e retração do coágulo, os fatores de crescimento são depositados na matriz extracelular.

De acordo com Lorenz & Longaker (2006),⁴ o fator de crescimento, utilizado em doses farmacológicas, tem efeito benéfico no processo de cicatrização, acelerando as taxas de cura em feridas normais ou, em alguns casos, em feridas de difícil cicatrização, como as feridas diabéticas.

Os fatores de crescimento se depositam na matriz extracelular de tecidos normais na forma latente. Quando ocorre a lesão e a matriz é destruída, os fatores são liberados na forma ativada e, assim, ajudam no início e na regulação do processo de reparo, daí a importância, também, da matriz extracelular na regeneração das feridas.⁴

São diversos os fatores de crescimento:^{10,13,14}

- **PDGF** (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), com 3 isômeros: **PDGF-a**, **PDGF-b** e **PDGF-ab**.
- **TGF-β** (Fator de Crescimento Transformador Beta) com 2 isômeros: **TGF-β1** e **TGF-β2**.
- **FGF** (Fator de Crescimento Fibroblástico).
- **VEGF** (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular).
- **IGF** (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina).
- **EGF** (Fator de Crescimento Epidérmico).

2.4.1 PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)

O fator de crescimento derivado de plaquetas parece ser um dos primeiros fatores presentes na ferida e inicia a cicatrização do tecido conectivo através da promoção do colágeno e da síntese de proteínas.

Macrófagos, células endoteliais e fibroblastos sintetizam e secretam PDGF na ferida. O fator de crescimento derivado de plaquetas estimula os fibroblastos a sintetizarem nova matriz extracelular e aumenta a quantidade de colagenase por eles secretada, o que indica o papel desse fator na remodelação dos tecidos.¹⁴ O efeito do PDGF é dependente da presença de outros fatores de crescimento.¹³ Também ativa o TGF-β.¹³⁻¹⁵

2.4.2 TGF-β (Fator de Crescimento Transformador Beta)

É um grupo de proteínas envolvido na formação e desenvolvimento de vários tecidos. É encontrado, predominantemente, nas plaquetas e nos ossos, mas pode ser liberado por várias células no local da lesão, incluindo macrófagos, fibroblastos e queratinócitos.^{4,49} De acordo com Dohan (2006),¹⁵ pertence a uma “super família”, com mais de 30 membros.

O TGF- β está associado às estratégias de tratamento para reduzir ou prevenir cicatrizes, como no caso dos estudos de cicatrização fetal, onde há a possibilidade de a cicatriz não se formar. É um dos fatores mais importantes no reparo do tecido conectivo e na regeneração óssea, em todos os seus estágios, além de sua importância em ser um dos primeiros a iniciar o processo de cicatrização. Promove a quimiotaxia de fibroblastos, macrófagos e monócitos para a lesão.⁴

O aumento da taxa de reparo é feito à custa do aumento da fibrose, o que pode não ser adequado durante a cicatrização normal da pele. O aumento da atividade do TGF- β está associado com a fibrose patológica em diferentes sistemas orgânicos, incluindo coração, pulmão, cérebro, fígado e rins. Embora seu mecanismo de regulação seja complexo, ele pode ser considerado um regulador inflamatório pela sua capacidade de induzir fibrose cicatricial.¹⁵

O fator de crescimento transformador beta estimula a síntese da matriz extracelular por meio do aumento de colágeno, elastina e glicosaminoglicanos. Promove a mitogênese dos precursores de osteoblastos e a inibição da formação de osteoclastos.^{4,49} Antagoniza a atividade biológica do EGF, PDGF e FGF.¹⁴ Pode ainda estimular/inibir a mitogênese endotelial e fibroblástica.¹³ Em estudos *in vitro*, esses efeitos variam de acordo com a quantidade aplicada.¹⁵ Também regula os efeitos mitogênicos de outros fatores de crescimento.

2.4.3 FGF (Fator de Crescimento Fibroblástico)

A produção de colágeno pelos fibroblastos é ativada por esse fator, assim como a contração e a remodelação dos tecidos.

Apresenta uma ampla gama de funções biológicas, específica para cada isoforma. Os primeiros membros da família de FGF a serem purificados foram o FGF-1 (FGF ácido) e FGF-2 (FGF básico). Ambos são produzidos pelas células endoteliais, fibroblastos e macrófagos. O FGF-1 participa na proliferação, diferenciação, angiogênese e migração celular. O FGF-2 estimula o crescimento de fibroblastos, mioblastos, osteoblastos, células neuronais, células endoteliais, queratinócitos e condrócitos.¹⁴

O FGF é secretado na matriz extracelular, onde fica inoperante até ser ativado pela lesão tecidual.

Segundo Lorenz & Longaker (2006),⁴ tanto o FGF-1 quanto o FGF-2 estimulam as células endoteliais a se dividirem e formarem novos capilares. Outras isoformas (FGF-7 e FGF-10), juntamente com o fator de crescimento epidérmico, estimulam a proliferação e a epitelização de queratinócitos.

O fator de crescimento fibroblástico parece ser promissor no tratamento de feridas de difícil cicatrização.

2.4.4 VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

Esse fator de crescimento é a chave reguladora da angiogênese e da vasculogênese.¹⁴ Sua função é criar novos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embriológico e após traumas ou lesões. Estimula a permeabilidade capilar e é liberado pelas plaquetas, fibroblastos, macrófagos e queratinócitos.⁵²

A expressão do VEGF é potencializada em resposta à hipóxia. Quando uma célula não recebe oxigênio suficiente, o fator induzido pela hipóxia estimula a liberação de VEGF.

Assim como outros fatores de crescimento, também induz a proliferação das células endoteliais, promove a migração celular e inibe a apoptose.⁵²

2.4.5 IGF (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

Estimula a síntese do colágeno pelos fibroblastos¹⁴ e interage, sinergicamente, com o PDGF e o FGF para facilitar a proliferação dos mesmos.

Apresenta efeitos sobre o metabolismo ósseo, podendo aumentar a osteogênese em processos cicatriciais.⁵³ Age como um fator autócrino e parácrino.¹³

2.4.6 EGF (Fator de Crescimento Epidérmico)

Conforme Sanchez (2003),¹³ et al. esse foi o primeiro fator de crescimento descrito. É liberado pelos queratinócitos e promove a proliferação de células epiteliais, endoteliais e de fibroblastos, estimulando e acelerando diretamente a reepitelização. Aumenta o efeito e a produção de outros fatores de crescimento¹³, bem como a angiogênese.¹⁴

Múltiplos fatores de crescimento podem ser acrescentados a feridas de difícil cicatrização, para que se obtenha um aumento, clinicamente significativo, na qualidade e na aceleração do reparo. A combinação de diferentes fatores pode ser necessária para tratar essas feridas, sendo que, numa mesma lesão, podemos ter que neutralizá-los ou aumentá-los, é a chamada regulação biomolecular do reparo.⁴⁹

Everts et al. (2006)⁴⁹ descreveram a vantagem do uso de concentrados plaquetários, em comparação à utilização isolada de fatores de crescimento recombinantes.

2.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O Plasma Rico em Plaquetas, segundo Marx (2001)¹⁰, é a concentração de, no mínimo, 1.000.000 de plaquetas/ μ L em um volume de 5 mL de plasma. Derivado do sangue autólogo, o PRP é obtido por meio de centrifugação⁵⁴ e contém 4 a 6 vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos normais.¹¹

A ação atribuída ao PRP é acelerar e estimular a cicatrização dos tecidos devido à alta concentração dos fatores de crescimento presentes nas plaquetas.^{9,55-57}

Após uma lesão tecidual, seja por trauma ou cirurgia, o reparo inicia com a formação do coágulo de plaquetas, seguido pela ativação da cascata de coagulação, degranulação das plaquetas e liberação dos fatores de crescimento, que são fundamentais para a cicatrização.^{13,47}

2.5.1 Preparação do PRP

O PRP é preparado do sangue total autólogo por meio de diferentes técnicas, desde separadores de células sanguíneas de bancos de sangue, até simples centrífugas portáteis de mesa.^{58,59} A escolha do sistema a ser utilizado depende do tipo de procedimento cirúrgico que necessitará de PRP. Centrífugas de mesa são utilizadas em procedimentos cirúrgicos que necessitam pequena quantidade do produto.⁵⁶

Os métodos de plasmaferese realizados em bancos de sangue ficam limitados em função do alto custo da produção⁶⁰ e da demora na disponibilidade do PRP, quando comparados com dispositivos portáteis. Quando o PRP é preparado

em bancos de sangue, demanda um sistema logístico altamente controlado, para evitar incompatibilidade do produto antes da aplicação no paciente.⁴⁹

Outra limitação dos separadores celulares de bancos de sangue é o grande volume sanguíneo necessário para o preparo do PRP (250 a 500 mL a mais de sangue total). As centrífugas de mesa podem ser usadas para produzir PRP a partir de pequenos volumes de sangue total (50 a 150 mL).⁴⁹

A simplificação do preparo do PRP, utilizando-se centrífugas portáteis, foi uma alternativa para a redução de custos e permitiu a difusão, em grande escala, de pesquisas sobre o gel.^{50,54,61}

Quando o PRP é preparado em centrífugas de mesa, o sangue é coletado pela aspiração em seringas. Para evitar o trauma das plaquetas durante a aspiração sanguínea, uma agulha, com diâmetro maior do que 17 gauges é utilizada. O sangue autólogo é coletado com anticoagulante ACD-A (ácido citrato dextrose-A), em geral, em uma taxa de 1 a 2 mL de ACD-A para cada 10 mL de sangue total. O sangue aspirado é cuidadosamente agitado para que se misture com o anticoagulante.⁴⁹

Dentre as técnicas utilizadas para o preparo do PRP, a realizada por meio da coleta de uma amostra de sangue autólogo, que passa por dupla centrifugação,⁹ é das mais difundidas. A vantagem de se utilizar sangue do próprio paciente é o risco praticamente nulo de infecções ou reações imunes.

A primeira centrifugação separa as células vermelhas do plasma, que contém leucócitos, plaquetas e fatores de coagulação. A segunda centrifugação separa o plasma pobre em plaquetas do plasma rico em plaquetas.⁹

Independentemente do uso de separadores celulares ou centrífugas portáteis de mesa, o importante é que o PRP tenha uma contagem de plaquetas acima dos valores basais.

2.5.2 Ativação do PRP

Para iniciar a liberação dos fatores de crescimento do PRP, as plaquetas devem ser ativadas. A trombina é um dos mais potentes ativadores das plaquetas e induz a liberação imediata dos fatores de crescimento do PRP de uma forma dose-dependente.^{62,63} Existem trombinas comercializadas, derivadas do plasma bovino, que não são isentas de complicações, como o desenvolvimento de anticorpos contra

fatores de coagulação. Alternativamente, o PRP pode ser ativado com trombina autóloga.^{49,64}

A adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) e trombina desencadeia a ativação do processo de coagulação.¹⁶ A trombina ativa diretamente as plaquetas e o cloreto de cálcio antagoniza o efeito do anticoagulante presente na amostra, resultando em um gel de plaquetas viscoso e solúvel.^{47,60} A seguir, a solução pode ser aplicada nos locais desejados, como enxertos, retalhos ou feridas. Uma vez ativadas, as plaquetas iniciam a secreção dos fatores de crescimento dos α -grânulos em 10 minutos, e 95% de todos os fatores são liberados na primeira hora,^{16,17} tornando-se disponíveis aos tecidos circunjacentes.⁶⁵

2.5.3 Aplicações Clínicas do PRP

Estudos em número crescente têm demonstrado um efeito significativo do PRP, principalmente na regeneração óssea^{9,66} e em cirurgias odontológicas.^{16,67,68}

Defensores do concentrado plaquetário citam que há um efeito benéfico na cicatrização de tecidos moles¹⁶ e na redução da incidência de infecções e perdas de sangue no pós-operatório.^{69,70}

O PRP é utilizado na cicatrização óssea:⁶⁰ nos tratamentos de fraturas, para acelerar seu reparo, e nos enxertos ósseos, para aumentar sua integração.⁴⁹

Também tem sido empregado em cirurgias periodontais⁷¹ e reconstruções bucomaxilofaciais.^{20,72,73}

De acordo com Farrag (2007),⁷⁴ o plasma enriquecido com plaquetas contém fibrina, que tem importância fundamental na agregação plaquetária durante a hemostasia. Esse efeito adesivo do PRP permite que ele seja usado no transoperatório, para a prevenção ou diminuição de hemorragias cirúrgicas. Além da fibrina, o PRP possui proteínas, como a fibronectina e a vitronectina, que promovem adesão celular.

Segundo Man et al. (2001),⁶⁹ o PRP ajudou a diminuir complicações como hematomas, seromas e sofrimento vascular nos retalhos. Estudo focalizado em cirurgias cosméticas evidenciou que o sangramento capilar cessou mais rapidamente com a aplicação do gel de plaquetas. Há evidências de que o uso do PRP acelera a cicatrização, reduz o tempo de cirurgia, elimina a necessidade de drenos, reduz o uso de curativos de pressão e diminui a dor no pós-operatório.⁶⁹

De acordo com Sclafani (2009),⁷⁵ na cirurgia plástica, o gel de plaquetas estimulou a cicatrização após procedimentos faciais e facilitou a adesão de enxertos. Proporcionou, ainda, o aumento dérmico em sulcos nasolabiais e o tratamento de sequelas de acne.⁷⁶ De um modo geral, potencializou a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura.^{50,77,78} Uebel et al. (2006)⁷⁹ publicaram estudo sobre o uso do PRP na cirurgia de calvície, com resultados positivos na integração dos microimplantes capilares.⁷⁹ Ainda na cirurgia plástica, segundo Almeida et al., (2008),⁸⁰ a adição de PRP à lipoenxertia de face, além de ter proporcionado melhor integração do enxerto, também aumentou a durabilidade dos adipócitos.

Braga-Silva et al. (2006)⁸¹ pesquisou o PRP na regeneração e recuperação funcional de nervos periféricos.⁷⁴ Também foi empregado na cicatrização e remodelamento de tendões⁸² e como agente terapêutico na osteomielite.⁸³

Estudos *in vitro* com PRP demonstraram estímulo na proliferação de cultura de fibroblastos dérmicos.⁸⁴

Trabalhos publicados mostraram a reparação de feridas epiteliais em pacientes com úlceras crônicas^{22,85,86} e em pacientes com feridas agudas.^{24,87} A cicatrização de úlceras diabéticas em membros inferiores também foi relatada.²³

Conforme Everts et al. (2006),⁴⁹ muitos dados sobre a utilização do PRP foram obtidos em cirurgias orais, bucomaxilofaciais, tratamento de feridas e cirurgias cosméticas, devido à disponibilidade de amostras histológicas nesses tipos de tratamento.⁴⁹

2.5.4 Contraindicações Relativas e Segurança do PRP

Contraindicações relativas para a aplicação do gel de PRP incluem contagem de plaquetas abaixo de $10^5/\mu\text{L}$; nível de hemoglobina abaixo de 10 g/dL; presença de tumor no leito da ferida; doença metastática e infecções ativas.

Os pacientes candidatos à aplicação de PRP devem fazer uma avaliação hematológica para excluir desordens sanguíneas ou disfunção plaquetária.⁴⁹

O uso de trombina bovina pode ser reduzido ou eliminado; alternativas mais seguras para a ativação do PRP devem ter preferência,^{14,54} como o uso de trombina autóloga.⁶⁴ No passado, a trombina bovina foi associada com o desenvolvimento de

anticorpos contra alguns fatores de coagulação (V, XI), podendo desenvolver coagulopatias.¹³

Quaisquer preocupações com reações imunológicas ou transmissão de doenças, como SIDA e hepatite, que ocorrem com produtos do sangue homólogo, são eliminadas com o PRP, uma vez que ele é produzido com sangue autólogo.⁶

Apesar dos fatores de crescimento apresentarem propriedades mitogênicas, não há nenhuma evidência de que promovam desenvolvimento tumoral, ou de que estejam envolvidos em carcinogênese.^{88,89}

2.6 FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF)

Descrita por Choukroun et al.¹² em 2001, a PRF não é, como muitos acreditam, uma “cola de fibrina”, nem tampouco um concentrado plaquetário clássico.¹² A Fibrina Rica em Plaquetas é uma matriz cicatricial autóloga,⁹⁰ definida como um concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com alto potencial regenerativo.¹²

A capacidade de regeneração tecidual ocorre da mesma forma que no PRP, pelo acúmulo de plaquetas e liberação de citocinas, ou fatores de crescimento, no coágulo de fibrina.¹⁵ Segundo Ehrenfest et al. (2009),⁷ a grande densidade do coágulo de fibrina pode servir como uma matriz biológica curativa que apoia a migração celular e a liberação dessas citocinas.⁷ Dohan et al. (2006)¹⁵ também afirmaram que, durante o processamento da PRF por meio da centrifugação, as plaquetas são ativadas, e a sua maciça degranulação implica na liberação de citocinas capazes de estimular a migração e a proliferação celular dentro da matriz de fibrina, constituindo os primeiros estágios da cicatrização.¹⁵

O’Connel et al.(2008)⁹¹ sugeriram que a PRF promove um liberação gradativa das citocinas ao longo de 7 dias, diferente do PRP, que age apenas precocemente. As citocinas “presas” na PRF e liberadas gradualmente são capazes de acelerar a reparação tecidual por um período de tempo mais prolongado, no entanto, o elemento chave desse processo cicatricial é a própria estrutura da rede de fibrina.⁸ A atividade biológica da molécula de fibrina é suficiente, por si só, pela capacidade cicatricial da PRF.⁹⁰

A PRF é obtida de modo semelhante ao PRP, por meio da centrifugação de uma amostra de sangue, a 3.000 rpm (velocidade de cerca de 400 bvg) por 10 minutos.

Contudo, não há, nessa técnica, a adição de anticoagulante, trombina bovina ou cloreto de cálcio, sendo essa a grande diferença entre a PRF, o PRP e os adesivos de fibrina.⁹⁰ A PRF resulta de uma polimerização natural e progressiva que acontece durante a centrifugação.^{15,92} A densidade da rede de fibrina é determinada, principalmente, pela concentração de fibrinogênio durante o preparo.⁷

A ativação das plaquetas e da cascata de coagulação ocorre pelo contato da amostra de sangue com as paredes do tubo plástico, que será colocado na centrífuga. Uma vez centrifugado, o coágulo de fibrina (PRF) é obtido no meio do tubo, entre os corpúsculos vermelhos ao fundo e o plasma acelular (PPP) no topo (sobrenadante).⁹⁰ É na rapidez da coleta do sangue e da sua transferência para a centrífuga que reside o êxito dessa técnica, caso contrário, somente um pequeno coágulo de sangue, sem consistência, será formado.⁹⁰

Segundo Dohan et al. (2006)¹⁵, as plaquetas se acumulam na parte inferior do coágulo de fibrina, principalmente na junção entre as células vermelhas e a própria membrana, peculiaridade essa que deve ser levada em conta quando do uso clínico da PRF, uma vez que, a “extremidade vermelha” da PRF pode ser mais eficaz do que a parte superior do coágulo de fibrina.

Outra característica importante da PRF é ser uma ferramenta imunológica que estimula os mecanismos de defesa e não apenas um concentrado plaquetário.⁹³ De acordo com Dohan et al. (2006),⁹³ durante o processamento da PRF, os leucócitos podem secretar citocinas, em reação ao fenômeno hemostático e inflamatório artificialmente induzido no tubo centrifugado. O conceito de que a PRF pode ser um regulador imune, com habilidades inflamatórias, explica a redução de infecções pós-operatórias quando usada em procedimentos cirúrgicos.⁸ A capacidade de defesa contra infecções da PRF é muito significativa, tanto pelas propriedades quimiotáticas das citocinas, quanto pela neovascularização que elas proporcionam, facilitando o acesso ao local da ferida.⁹³

Conforme Dohan et al. (2006),⁹³ os mediadores inflamatórios fazem parte do recrutamento fibroblástico, induzem proliferação e estimulam a atividade biossintética, levando à secreção de proteases, bem como à síntese de macromoléculas matriciais.⁹³

A membrana de PRF é forte, elástica e flexível, além de possuir uma arquitetura favorável para apoiar todo o processo cicatricial.⁹⁰ É a estrutura da matriz de fibrina o elemento chave responsável pelo real potencial terapêutico da PRF, muito embora as plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento exerçam papéis fundamentais.⁸ As plaquetas ficam presas na rede de fibrina⁹⁰ e liberam, gradativamente, os fatores de crescimento.⁸

Angiogênese, imunidade e cobertura epitelial são, segundo Choukroun et al. (2006)⁸, as três chaves da cicatrização e da maturação dos tecidos moles. A membrana de PRF é capaz de apoiar o desenvolvimento desses três fenômenos, simultaneamente. A fibrina é, em outras palavras, o guia natural da angiogênese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos no local da lesão.⁸ A PRF é favorável ao desenvolvimento da microvascularização e é capaz de guiar a migração do epitélio celular em sua superfície. Sua utilização parece ser muito interessante em casos de feridas infectadas, pois a matriz de fibrina constitui um suporte natural para a imunidade ao promover a migração dos leucócitos.⁸

Outra grande vantagem da PRF é a simplificação do processo de obtenção, sem manipulação bioquímica do sangue.⁹² A PRF apresenta uma diferença importante em relação aos adesivos ou selantes de fibrina que é a diminuição do risco de transmissão de doenças. Os adesivos de fibrina tinham um pequeno risco de contaminação viral, com a possibilidade de transmissão de doenças, por serem produtos derivados do sangue. A PRF não utiliza trombina bovina, portanto, esse risco inexistente.⁸

Um dos limitantes do uso da PRF é que apenas um pequeno volume pode ser usado, uma vez que provém do sangue do paciente, e a quantidade produzida é pequena. Além disso, por possuir células imunes e moléculas plasmáticas antigênicas, a PRF de cada paciente só pode ser usada por ele mesmo.⁸

As aplicações clínicas da PRF se baseiam na aceleração cicatricial dos tecidos, devido ao desenvolvimento de uma neovascularização efetiva, fechamento acelerado da ferida, rápida remodelação do tecido cicatricial e total ausência de eventos infecciosos.⁸ Suas aplicações clínicas são, basicamente, as mesmas do PRP. No entanto, a diversidade da configuração da matriz de fibrina é crucial para o entendimento das diferenças da cinética biológica entre os dois concentrados plaquetários.

3 JUSTIFICATIVA

As cicatrizes cutâneas afetam, de forma direta, todos os aspectos da cirurgia plástica, portanto, o sucesso de uma cirurgia está fortemente atrelado à aparência final da cicatriz obtida.

Pesquisas focadas no desenvolvimento de estratégias para reduzir o tamanho das cicatrizes, prevenir cicatrizes inestéticas ou acelerar e melhorar o processo de cicatrização e, conseqüentemente, a qualidade da cicatriz, são cada vez mais necessárias e valorizadas.

O Plasma Rico em Plaquetas e a Fibrina Rica em Plaquetas são concentrados plaquetários que proporcionam tratamentos autólogos com potencial para estimular o processo biológico natural da cicatrização e auxiliar na regeneração de diversos tecidos, inclusive da pele.

Nesse contexto, pesquisar os efeitos biológicos do PRP e da PRF na cicatrização cutânea proporciona subsídios científicos que fundamentam seu uso clínico, o que poderá permitir, no futuro, agregar mais uma importante tática ao arsenal da cirurgia plástica.

Avaliar a otimização do processo de cicatrização cutânea, por meio da aplicação desses tratamentos, é o objetivo dos pesquisadores.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a contração das feridas, por método macroscópico (morfométrico), no pós-operatório imediato, no 7º e 14º dias do processo cicatricial, nos grupos experimentais.
- 2- Avaliar a concentração de colágeno nas feridas, por método microscópico (histomorfométrico), no 7º e 14º dias do processo cicatricial, nos grupos experimentais.
- 3- Descrever as características das feridas, por método histológico, quanto à presença ou à ausência de crosta, reepitelização, angiogênese e deposição de colágeno, no 7º e 14º dias do processo cicatricial, nos grupos experimentais.
- 4- Comparar os efeitos dos tratamentos PRP e PRF entre si e com seus respectivos grupos controle.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Estudo experimental, controlado, com cegamento.

5.2 ANIMAIS

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 48 ratos Wistar (*rattus norvegicus albinus*), machos adultos (acima de 60 dias de vida), com média de 254 g de massa corporal, selecionados aleatoriamente do vivário do Laboratório de Habilidades Médicas da PUCRS. Os animais, nascidos e criados no local, não necessitaram período de aclimação.

Durante a fase experimental, todos os animais receberam ração padronizada para roedores e água *ad libitum*. Foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, autoclaváveis e em ambiente ventilado. A temperatura foi mantida em 22°C e a umidade controlada (55+ou-15%). O ciclo claro-escuro de 12h foi obedecido.

5.3 MODELO EXPERIMENTAL E GRUPOS DE EXPERIMENTAÇÃO

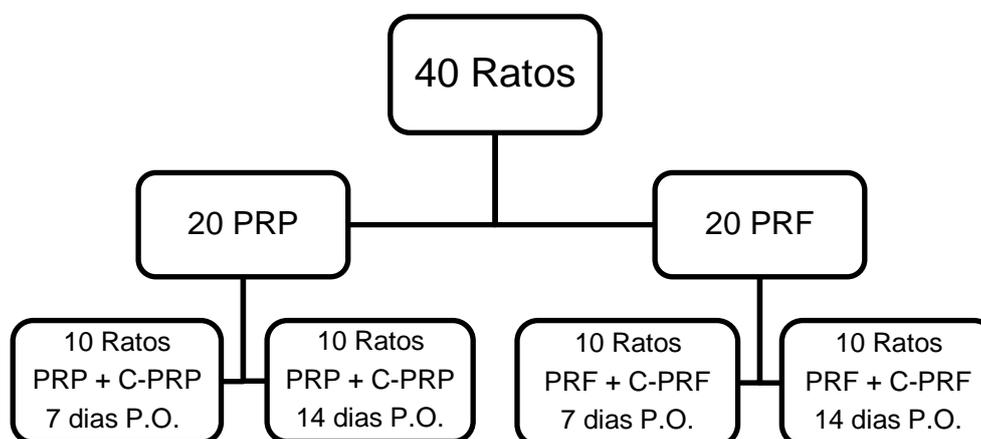
Duas feridas cutâneas foram realizadas, cirurgicamente, no dorso dos ratos, e uma delas foi tratada com PRP ou com PRF. A outra ferida, no mesmo rato (modelo emparelhado), foi tratada com soro fisiológico (SF) 0,9% e considerada o grupo controle (Figura 1).

Figura 1 – Modelo experimental



Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 2 grandes grupos de 20 ratos (20 para o PRP e 20 para a PRF) e, novamente, em 4 grupos de 10 ratos, em um total de 40 (Figura 2). Os outros 8 animais foram utilizados como doadores para a coleta de sangue, sendo 4 para a obtenção do Plasma Rico em Plaquetas e 4 para a Fibrina Rica em plaquetas.

Figura 2 – Grupos de Experimentação



Grupo PRP e Grupo Controle do PRP com 7 dias de P.O. (10 ratos): ferida cutânea tratada com PRP + ferida cutânea tratada com SF 0,9% (controle). Biópsia com 7 dias de pós-operatório.

Grupo PRP e Grupo Controle do PRP com 14 dias de P.O. (10 ratos): ferida cutânea tratada com PRP + ferida cutânea tratada com SF 0,9% (controle). Biópsia com 14 dias de pós-operatório.

Grupo PRF e Grupo Controle da PRF com 7 dias de P.O. (10 ratos): ferida cutânea tratada com PRF + ferida cutânea tratada com SF 0,9% (controle). Biópsia com 7 dias de pós-operatório.

Grupo PRF e Grupo Controle da PRF com 14 dias de P.O. (10 ratos): ferida cutânea tratada com PRF + ferida cutânea tratada com SF 0,9% (controle). Biópsia com 14 dias de pós-operatório.

5.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da Faculdade de Medicina da PUCRS e executados pela mesma cirurgiã.

5.4.1 Procedimento Anestésico

Os ratos, após a pesagem, foram anestesiados com injeção intramuscular (IM) de cloridrato de ketamina, na dose de 60-80 mg/kg, e cloridrato de clorpromazina, na dose de 1,6-2,0 mg/kg, conforme normas e diretrizes éticas para pesquisa com animais da Resolução 879 de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

5.4.2 Técnica Cirúrgica

Após a tricotomia da região dorsal, os ratos foram posicionados em decúbito ventral, e a assepsia realizada com álcool a 70%. Os animais foram colocados sobre um colchão térmico aquecido, para evitar a hipotermia transoperatória.

Foram demarcadas, no dorso dos animais, com um carimbo confeccionado especialmente para essa finalidade (Figuras 3 e 4), duas circunferências, com 1 cm de diâmetro cada uma, que corresponderam a área de pele a ser retirada.

Figura 3 – Carimbo para marcação



Figura 4 – Detalhe do carimbo



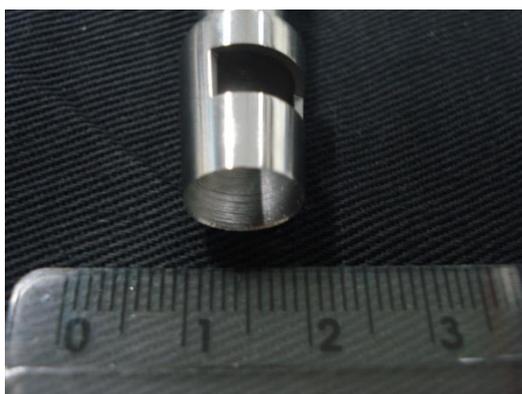
A distância entre cada circunferência foi de, no mínimo 1,5 cm, o que evitou qualquer contato do produto com a ferida controle quando, eventualmente, ocorreu algum extravasamento (Figura 5).

Figura 5 – Demarcação das circunferências



A incisão da circunferência, de 1 cm de diâmetro, foi realizada com *punch* cutâneo, especialmente desenvolvido para cortar a espessa pele do rato (Figura 6).

Figura 6 – Punch com 1 cm de diâmetro



Os fragmentos de pele foram ressecados com lâmina de aço carbono 15 (Feather Safety Razor Co., LTD., Ozaka, Japão), até a exposição da fáscia muscular (Figuras 7 e 8). A hemostasia foi feita por compressão digital, utilizando-se gazes esterilizadas.

Figura 7 – Confecção das feridas



Figura 8 – Fragmentos de pele



Foi realizada uma tatuagem, por meio de punção cutânea, com azul de metileno e agulha de 18G (1,20 x 40 mm), nas 0 - 3 - 6 e 9 horas da circunferência da ferida, que serviu como mais um parâmetro de demarcação do diâmetro, após a sua completa reepitelização (Figura 9).

Figura 9 – Tatuagem com azul de metileno



Nas feridas do lado esquerdo, que corresponderam às feridas dos grupos de tratamento, foram aplicados 100 μ L de PRP ou PRF, de acordo com o grupo a que pertenciam, 7 ou 14 dias de pós-operatório (Figuras 10 e 11). Nas feridas do lado direito, que corresponderam às feridas controle, foram adicionados 100 μ L de SF a 0,9%.

Figura 10 – Aplicação do PRP



Figura 11 – Aplicação da PRF (Platelet-Rich Fibrin)



As feridas cutâneas foram cobertas com uma película de poliuretano, transparente e estéril, chamada Tegaderm™ Film (fabricada pela 3M Health Care, St Paul, MN, EUA), com o objetivo de evitar a perda do produto no momento em que o animal entrasse em contato com a maravalha (Figura 12).³⁸

Figura 12 – Curativo com Tegaderm™ Film



5.4.3 Cuidados Pós-Operatórios

Os animais foram mantidos em caixas individuais para que não houvesse interferência no tratamento por contato da pele entre eles.

Quando a queda espontânea da película utilizada como cobertura das feridas não ocorria, a mesma era retirada após 48h.

Nos primeiros dois dias de pós-operatório, foi administrado, como medicação analgésica, paracetamol 200 mg/mL, na dose de 1 mL/20 mL de água.

Os animais foram monitorados, diariamente, pela equipe cirúrgica. A higienização das caixas, manutenção da alimentação e troca da água foram realizadas, regularmente, por profissional habilitado.

5.4.4 Eutanásia

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados, conforme protocolo descrito anteriormente, e submetidos à eutanásia com sobredose dos mesmos medicamentos, por via intraperitoneal, depois de decorridos 7 ou 14 dias de pós-operatório, conforme o grupo a que pertenciam.

A medicação, que provocou depressão do sistema nervoso central, não causou qualquer sofrimento aos animais. Os demais, que corresponderam aos doadores, morreram pela técnica de exsanguinação.

5.5 OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Foram coletados cerca de 6 mL de sangue, por punção cardíaca, de cada um dos 4 ratos utilizados como doadores, após a anestesia dos mesmos com solução idêntica à descrita para o procedimento cirúrgico (Figura 13).

Figura 13 – Punção cardíaca



O sangue foi colocado em um tubo contendo o anticoagulante ACD-A (ACD Solution A - Becton Dickinson and Company, Broken Bow, NE, EUA), numa quantidade de 20% do volume de sangue coletado, e passou por uma dupla centrifugação, conforme protocolo adaptado.⁹⁴

A primeira centrifugação, a 1.800 rpm (250 g), durante 10 minutos, separou as células vermelhas (camada inferior), do plasma pobre em plaquetas (PPP) (camada superior) e da zona de névoa, onde estão concentradas as plaquetas (camada intermediária) (Figura 14).^{9,95}

O sobrenadante (plasma pobre em plaquetas), juntamente com a zona de névoa e algumas células vermelhas, foi coletado por micropipeta e transferido para um novo tubo, sem anticoagulante, para mais uma centrifugação, dessa vez a 3.600 rpm (1000 g), por 10 minutos (Figura 15).

Figura 14 – Primeira centrifugação

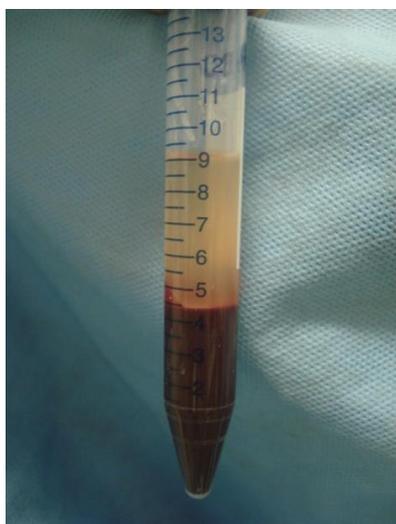
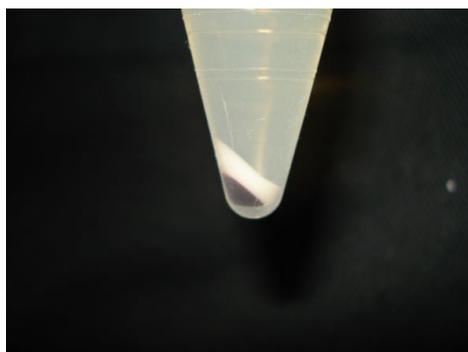


Figura 15 – Segunda centrifugação



Novamente, três camadas distintas foram obtidas. A camada superior, constituída por plasma pobre em plaquetas; a camada inferior, com as células vermelhas ou botão de hemácias; e, entre as duas, a camada intermediária ou zona de névoa, que correspondeu ao PRP (Figura 16).

Figura 16 – Detalhe das três camadas



A camada superior, com o plasma pobre em plaquetas, aproximadamente 2/3 do volume total, foi aspirada e colocada em outro tubo Falcon, para posterior utilização na calibração plaquetária.

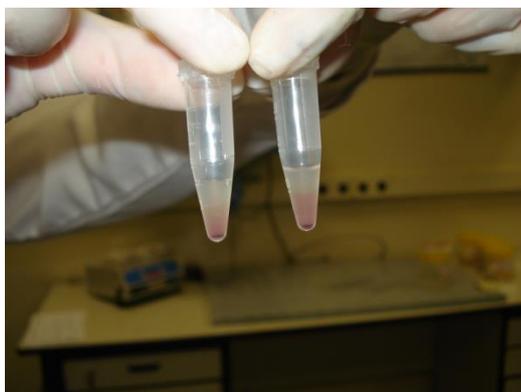
O PRP, em torno de 10% do volume de sangue total coletado, correspondeu ao material precipitado, que foi ressuspendido (Figura 17). Posteriormente, para o uso nas cirurgias, foi calibrado na concentração de 1.000.000 de plaquetas/ μ L e ativado pela adição de cloreto de cálcio e trombina.

Figura 17 – PRP



A ativação do PRP foi realizada em tubos de Eppendorf, com cloreto de cálcio e trombina combinados (1.000 U/mL de trombina em 100 mg de cloreto de cálcio), na proporção de 1:1 e resultou em um gel, exatamente como descrito na literatura (Figura 18).^{62,63,90}

Figura 18 – PRP ativado



Cada ferida cutânea recebeu 100 μ L do gel de PRP, sendo 50 μ L de PRP e 50 de cloreto de cálcio e trombina combinados.

A centrífuga utilizada foi da marca Centribio, modelo 80-2B (Teknika Diagnósticos, Belo Horizonte, MG, Brasil) (Figura 19).

Figura 19 – Centrífuga Centribio



A contagem de plaquetas foi realizada em duas amostras, de 100 μ L cada, uma de sangue total e outra de PRP, portanto, antes da primeira e após a última centrifugação.

5.6 OBTENÇÃO DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF)

Foram retirados aproximadamente 6 mL de sangue de cada um dos 4 ratos doadores, através de punção cardíaca. A anestesia empregada nos animais foi a mesma utilizada nos demais procedimentos, ou seja, injeção IM de cloridrato de ketamina, na dose de 60-80 mg/kg, e cloridrato de clorpromazina, na dose de 1,6-2,0 mg/kg.

O sangue foi então colocado em tubos Falcon, sem anticoagulante ou trombina, e centrifugado, somente uma vez, a 3000 rpm (400 g), durante 10 minutos. Houve, novamente, a separação em 3 camadas: a superior, com o PPP; a intermediária, com o coágulo de PRF e a inferior, com as células vermelhas.⁹⁰

O coágulo, ou membrana, de PRF foi retirado do tubo com pinça e separado dos remanescentes sanguíneos, com tesoura; recortado em pequenos pedaços e aplicado diretamente na ferida, no momento da cirurgia (Figuras 20 e 21).

Figura 20 – Membrana de PRF



Figura 21 – Detalhe da membrana de PRF



A contagem plaquetária foi realizada em uma amostra de sangue total e em outra de PRF. O coágulo de PRF foi depositado em uma placa estéril, para que o soro nele contido fosse liberado. Após 10 minutos, esse soro foi coletado para a contagem de plaquetas.

5.7 CONTAGEM PLAQUETÁRIA

A quantificação das plaquetas, feita no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS, foi realizada no contador automatizado de células sanguíneas CELM, modelo CC530 (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, CELM, Barueri, SP, Brasil). Foram avaliadas amostras de sangue total, PRP e PRF.

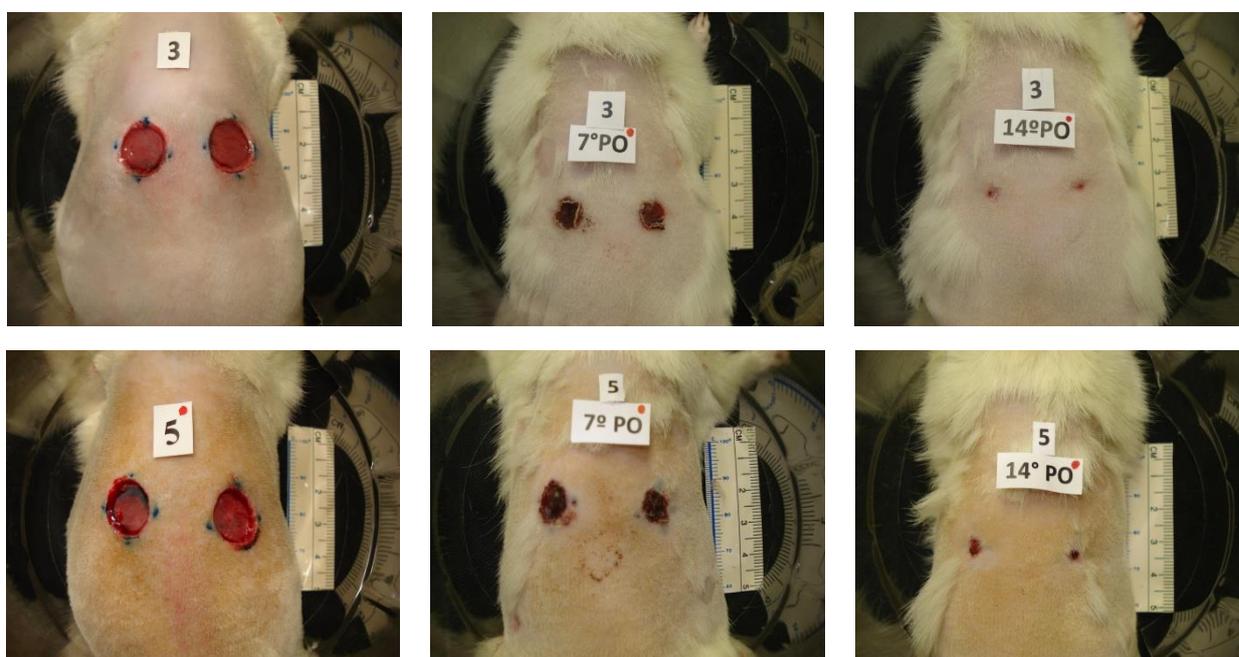
5.8 ANÁLISE DE RESULTADOS

Foi feita por meio de análise morfométrica (macroscopia) e por análise histológica (microscopia). A análise morfométrica permitiu avaliar a contração das feridas, através do cálculo de suas áreas. A análise histológica incluiu a análise histomorfométrica das feridas, para a quantificação de colágeno em cada imagem selecionada, e a descrição das características das feridas, quanto à presença ou ausência de crosta, reepitelização, angiogênese e deposição de colágeno.

5.8.1 Análise Morfométrica

Imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0), no 7º e 14º dias de pós-operatório, todos os animais foram fotografados de forma padronizada, para a análise da contração das feridas, através do cálculo de suas áreas. A realização das fotografias ocorreu sempre com o animal anestesiado, utilizando-se a mesma solução descrita anteriormente (Figura 22).

Figura 22 – Fotografias do pós-operatório imediato, 7º e 14º P.O.



A máquina fotográfica digital, Sony DSC W7 (Sony Corporation, Tóquio, Japão), de 7 megapixels, foi utilizada para o registro de todas as fotos, feitas com flash, mesmo diante de luz artificial, e a uma distância padronizada de 15 cm. Todas as imagens foram obtidas com calibração manual de branco e gravadas em formato JPEG, 3072 x 2304 pixels, cores de 24 bits.

As imagens foram submetidas ao programa Adobe® Photoshop® CS5 Extended, versão 12.0 x32 (Adobe Systems Incorporated, EUA) para a confecção do desenho das áreas das feridas e, posteriormente, transferidas para o programa de morfometria digital. Essa etapa foi realizada pelo mesmo examinador, que não tinha conhecimento da identificação das feridas e respectivos tratamentos.

A análise e o cálculo das áreas, em milímetros quadrados, foram realizados pelo programa Image-Pro[®] Plus (versão 4.5.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA), nas duas feridas, tratamento e controle, de todos os ratos, no pós-operatório imediato, com 7 e 14 dias. A descrição detalhada do procedimento encontra-se no apêndice B.

5.8.2 Análise Histológica

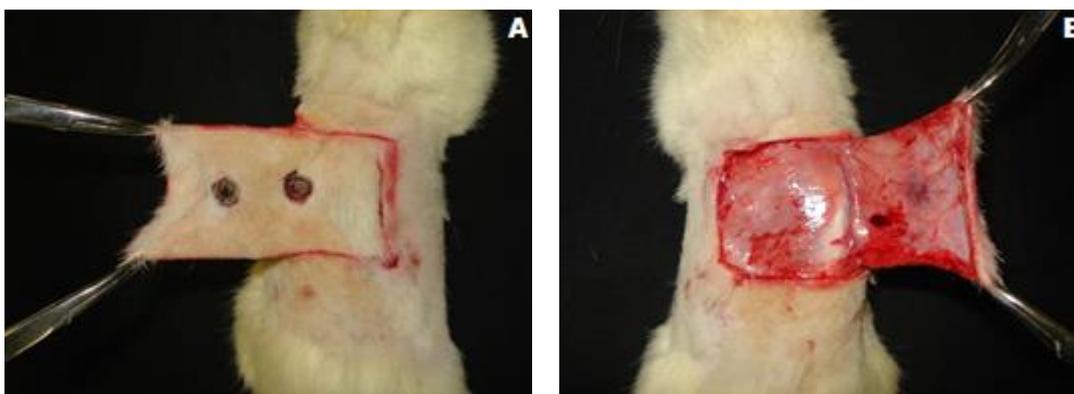
5.8.2.1 Coleta das Amostras de Pele

Decorridos 7 e 14 dias do ato cirúrgico, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia, para posterior coleta das amostras de pele. As amostras de pele incluíram toda a extensão das feridas, com margem de, no mínimo, 1 cm de pele íntegra além da cicatriz e, em profundidade, até a fáscia muscular (Figuras 23 e 24).

Figura 23 – Demarcação da amostra de pele



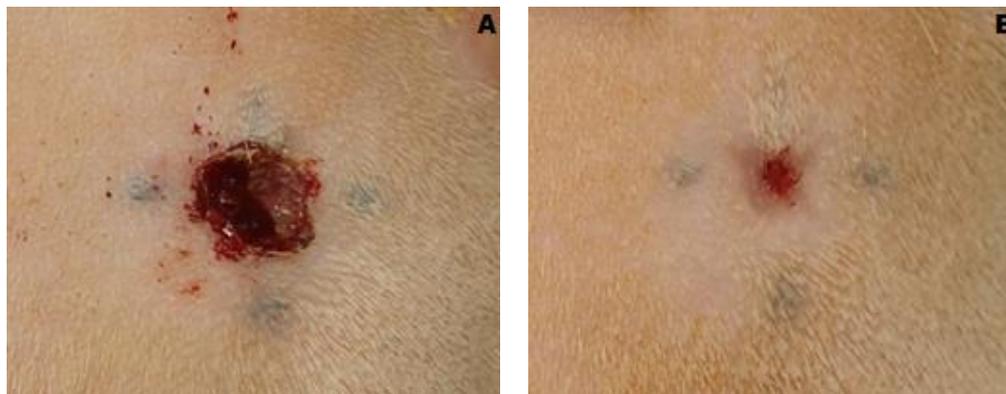
Figura 24 – Retirada da amostra de pele.



A) Vista anterior. B) Vista posterior.

A tatuagem feita na pele do animal, no momento do procedimento cirúrgico, foi utilizada como parâmetro do diâmetro da ferida, nos casos de completa reepitelização (Figura 25).

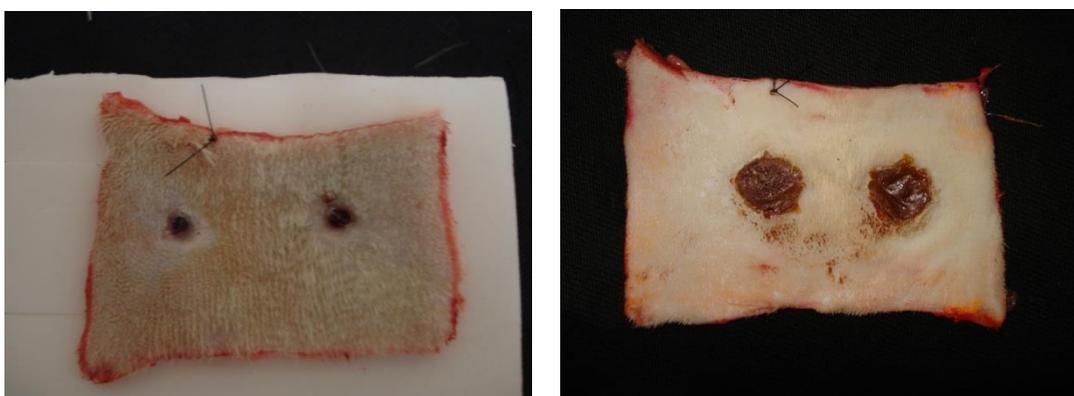
Figura 25 – Tatuagem



A) 7º P.O. B) 14º P.O.

Imediatamente após a retirada, as amostras de pele foram fixadas com pontos, em uma placa de espuma rígida (Figura 26), para mantê-las esticadas. Um ponto simples, de Mononylon® Ethilon® nº 4-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson Produtos Profissionais LTDA, São José dos Campos, SP, Brasil), foi dado na extremidade da pele, na direção das feridas do lado esquerdo, que recebiam o tratamento, para que pudessem ser posteriormente identificadas pelo técnico de patologia que confeccionou as lâminas histológicas (Figura 26).

Figura 26 – Espuma rígida e ponto de identificação à esquerda



As amostras de pele foram colocadas em frascos, contendo formol a 10%, para que suas estruturas morfológicas se mantivessem preservadas. Esses frascos

foram identificados com um número (o mesmo dado ao animal), tipo de tratamento, data da cirurgia e data da coleta da peça.

5.8.2.2 Confeção das Lâminas Histológicas

As amostras de pele, coletadas no 7º e 14º dias de pós-operatório e fixadas em formol a 10%, foram encaminhadas para o processamento histológico convencional, constando de desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo, com cortes de 5 micrômetros de espessura, e submetidos à coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosírius Red (Figura 27).

Figura 27 – Lâminas histológicas



A) e B) Coloração Hematoxilina e Eosina. C) e D) Coloração Picrosírius.

Para cada ferida, foi confeccionada uma lâmina histológica de cada coloração, com 3 a 6 cortes, num total de 160 lâminas. Os cortes foram executados num plano perpendicular à superfície da derme, na região central da ferida cirúrgica. Todas foram codificadas de modo que o examinador não tivesse conhecimento sobre a qual grupo pertencia.

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, sob coordenação do Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, patologista.

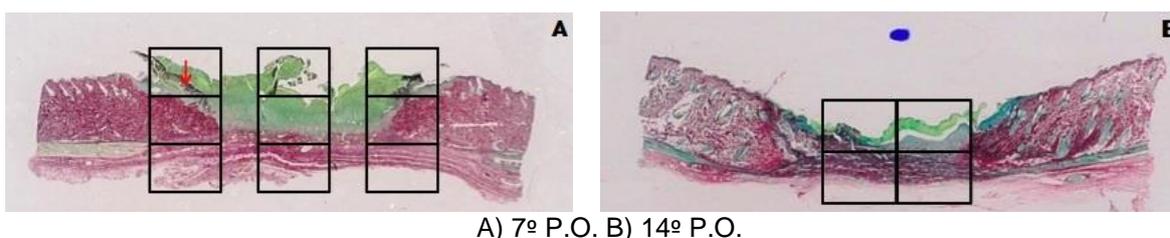
5.8.2.3 Análise Histomorfométrica

A leitura das lâminas para a análise histomorfométrica, que permitiu quantificar a concentração de colágeno nas feridas, foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com ampliações de 50x. As imagens das lâminas foram capturadas pela câmera CoolSNAP™-Pro *cf* (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA), com calibração manual de branco e níveis de cinza e sob iluminação de intensidade fixa, acoplada ao microscópio e esse a um computador. Todas as imagens foram gravadas em formato TIFF sem compressão, com a resolução de 1392 x 1040 pixels, cores de 24 bits.

Para a quantificação de colágeno, foram fotografadas todas as lâminas na coloração picrossírius, sendo que cada imagem foi capturada sob luz normal e luz polarizada.

Nas lâminas do 7º dia de P.O., foram selecionados 9 campos por ferida, de forma padronizada, sendo 3 da parte central, 3 da borda lateral direita e 3 da borda lateral esquerda, sempre de cima para baixo. Nas lâminas do 14º dia de P.O., por apresentarem uma área menor, 4 a 6 campos foram selecionados, a partir do centro da ferida, 2 ou 3 para cada lado, de cima para baixo (Figura 28).

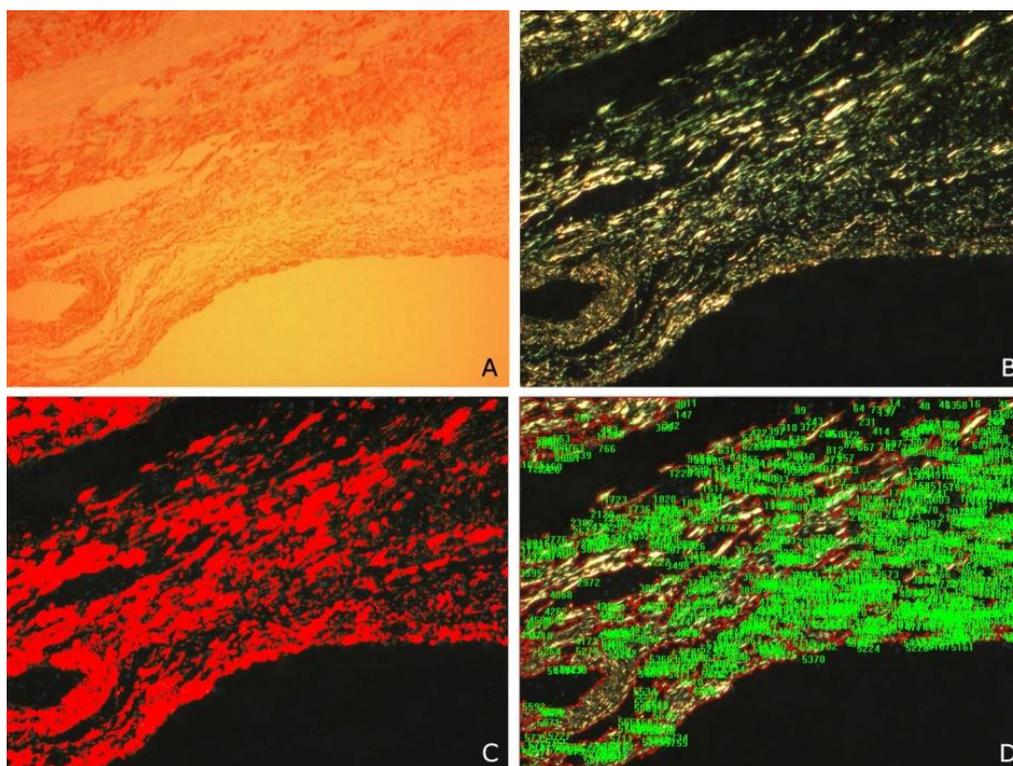
Figura 28 – Representação dos campos selecionados para a captura das imagens



A microscopia de luz polarizada nos permitiu a contagem do colágeno em cada área de ferida capturada, demonstrada com coloração branco-esverdeada. Não houve diferenciação do tipo de colágeno encontrado para a quantificação. Todas as imagens capturadas nessa coloração foram analisadas pelo software Image-Pro® Plus, citado anteriormente. A descrição detalhada desse procedimento encontra-se nos apêndices C e D.

A quantificação do colágeno foi realizada por especialista cego em relação aos grupos de tratamento (Figura 29).

Figura 29 – Quantificação do colágeno



Progressão do processo da contagem do colágeno de ferida cutânea usando o Image-Pro® Plus. A) Captura da imagem sem polarização. B) Captura com polarização. C) Seleção do colágeno da imagem. D) Contagem de colágeno a partir da seleção realizada na imagem.

5.8.2.4 Descrição das Características das Feridas

A leitura das lâminas, coradas com hematoxilina e eosina e picrossírius, foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40, com magnificações de 50x, 100x e 400x, no 7º e 14º dias do processo cicatricial, em todos os grupos experimentais.

As características das feridas foram descritas quanto à presença ou ausência de crosta, reepitelização, e angiogênese, nas lâminas coradas com HE, e quanto à deposição de colágeno, nas lâminas coradas com picrossírius.

Algumas lâminas, na coloração HE, foram fotografadas para fins ilustrativos. Todas as lâminas, na coloração picrossírius, foram fotografadas para a análise histomorfométrica.

O patologista examinador, Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, que descreveu as lâminas, encontrava-se cegado em relação aos grupos de tratamento.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho de amostra para este estudo foi estabelecido partindo-se de nível de significância (α) de 5% e poder estatístico de 90%, para detectar uma diferença de médias padronizada maior ou igual a 1,5 unidades de desvio-padrão entre grupos ($E/S \geq 1,5$). Assim, considerando os valores acima, o tamanho de amostra foi estabelecido em 10 animais por grupo, com duas feridas emparelhadas por animal.

Para comparar a contração da área das feridas (análise morfométrica) entre os grupos, ao longo do período de observação, utilizamos um modelo linear misto (MLM) para medidas repetidas com localização de diferenças pelo teste de *post-hoc* de Sidak. Previamente à utilização do MLM, os dados receberam transformação logarítma. Adicionalmente, para expressar a redução da ferida operatória, apresentamos taxas percentuais de contração ($\Delta\%$).

Para a avaliação da concentração de colágeno (análise histomorfométrica), utilizamos análise de variância de medidas repetidas.

Para a comparação das características das feridas (presença de crosta, reepitelização, angiogênese e deposição de colágeno) utilizamos proporções e o teste exato de Fisher.

O nível de significância adotado no estudo foi de $\alpha=0,05$. Os dados foram processados e analisados com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 21.0.

5.10 ASPECTOS BIOÉTICOS

O presente estudo foi realizado com os cuidados necessários para minimizar a dor e o sofrimento dos animais, em conformidade com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e com a resolução 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

Todos os procedimentos cirúrgicos foram executados sob anestesia, com cloridrato de ketamina e clorpromazina, conforme descrito anteriormente.

A eutanásia foi realizada com sobredose dos mesmos medicamentos utilizados para a anestesia, sem causar sofrimento aos animais, através da depressão do sistema nervoso central.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob o número de registro CEUA 10/00205 (Anexo A).

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS CLÍNICOS E CIRÚRGICOS

A anestesia e a analgesia utilizadas em todos os procedimentos cirúrgicos e no período pós-operatório foram plenamente satisfatórias e permitiram que os animais se mantivessem sem sinais de dor.

Os exames macroscópicos e as fotografias evidenciaram redução gradativa das áreas das feridas cirúrgicas que, com 14 dias, haviam cicatrizado quase que totalmente. Foi constatado que o processo de reparação tecidual seguiu um curso similar ao longo dos períodos observados, quando os grupos de tratamento foram comparados com seus respectivos grupos controle. Contudo, a observação clínica direta das feridas, durante os 14 dias de pós-operatório, revelou uma tendência na aceleração do reparo das lesões tratadas com PRF, em comparação com as tratadas com PRP.

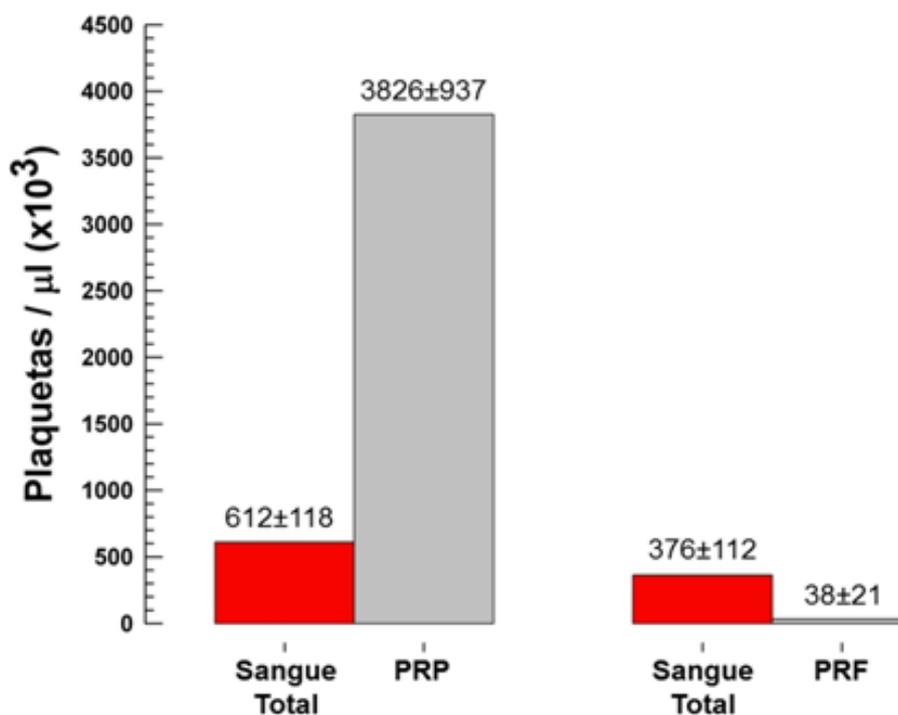
Não foram observados sinais de infecção nas feridas cutâneas e não houve complicações ou perda de animais.

6.2 RESULTADO DA CONTAGEM PLAQUETÁRIA

A média do número de plaquetas do sangue total dos ratos que foram utilizados como doadores de PRP foi de 612.000 ± 118.000 plaquetas/ μL . Após as centrifugações do sangue, a média da contagem plaquetária do PRP foi de $3.826.000 \pm 937.000$ plaquetas/ μL , ou seja, 6,2 vezes mais plaquetas do que no sangue total (Gráfico da Figura 30).

A contagem plaquetária média no sangue total dos ratos doadores da Fibrina Rica em Plaquetas foi de 376.000 ± 112.000 plaquetas/ μL . Após a preparação da PRF, a média de plaquetas encontrada foi de 38.000 ± 21.000 plaquetas/ μL (Gráfico da Figura 30).

Figura 30 – Gráfico comparativo entre a concentração plaquetária no sangue total, no Plasma Rico em Plaquetas e na Fibrina Rica em Plaquetas



ST: sangue total; PRP: plasma rico em plaquetas; PRF: fibrina rica em plaquetas.

6.3 RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As médias da área das feridas no momento inicial (pós-operatório imediato ou dia 0) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($P=0,911$).

Os valores das médias da área das feridas, ao longo do período de observação (fator tempo no Modelo Linear Misto: pós-operatório imediato, 7º e 14º P.O.) e suas respectivas taxas de contração, estão expostos na Tabela 1 e representados no Gráfico da Figura 31.

Taxas percentuais de contração negativas indicaram resposta cicatricial positiva e progressão para o fechamento da ferida.

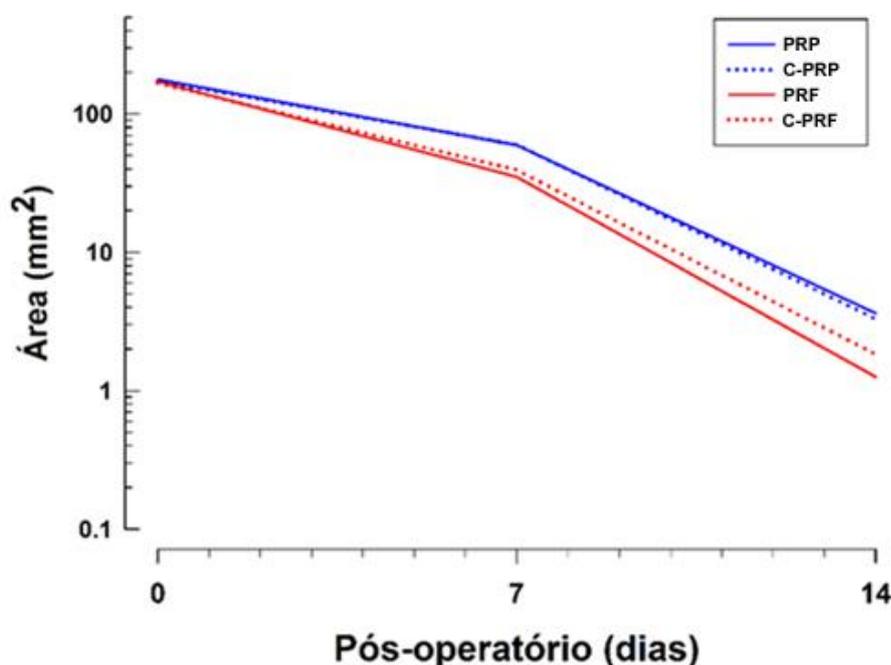
Tabela 1 – Médias geométricas (mínimo-máximo) para a área das feridas (análise morfométrica) com suas respectivas taxas percentuais de contração

Tratamento	Tempo de Pós-Operatório (dias)							
	0		7		14			
	área, mm ²		área, mm ²		área, mm ²			
PRP	177,8	(96,4 -243,8)	59,6	(21,1 -111,9)	-66,5	3,3	(0,1 - 24,1)	-98,1
C-PRP	172,3	(92,6 -255,3)	59,9	(19,7 -126,4)	-65,2	3,0	(0,6 -9,2)	-98,3
PRF	171,9	(64,8 -270,8)	35,0	(2,4 -130,0)	-79,6	1,1	(0,1 -7,5)	-99,2
C-PRF	166,5	(66,6 -283,0)	39,4	(4,1 -116,4)	-76,3	1,6	(0,1 -12,4)	-98,9

$\Delta\%$: taxa percentual de contração; PRP: plasma rico em plaquetas, C-PRP: controle do PRP, PRF: fibrina rica em plaquetas, C-PRF: controle da PRF; $P[\text{tempo}] < 0,001$ e $P[\text{tratamento} \times \text{tempo}] = 0,022$ obtido em modelo linear misto.

De um modo geral, a avaliação do efeito do tempo nessas áreas mostrou-se estatisticamente significativo ($P < 0,001$), atingindo uma taxa global de contração de "-98,6%" entre os quatro grupos.

Figura 31 – Gráfico de linha representando a variação das médias da área (mm²) das feridas dos grupos de tratamento, ao longo do período de observação



PRP: plasma rico em plaquetas, C-PRP: controle do PRP, PRF: fibrina rica em plaquetas, C-PRF: controle da PRF.

O efeito dos grupos sobre a contração da área das feridas ao longo do período de observação (tempo) foi estatisticamente significativo ($P = 0,022$). A taxa de contração do Grupo PRF foi de -79,6% com 7 dias e -99,2% com 14 dias, ou seja, o grupo PRF apresentou a maior taxa de contração (Tabela 1), mas não foi

estatisticamente diferente de seu grupo controle ($P=0,731$). No entanto, contra PRP, que obteve taxa de -66,5% com 7 dias e -98,1% com 14 dias, apresentou diferença significativa ($P=0,030$), e, contra o grupo controle do PRP, atingiu significância limítrofe ($P=0,053$). O Grupo PRP também não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao seu controle ($P>0,999$). As demais comparações entre os grupos podem ser encontradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores P referentes às comparações *post-hoc* entre os grupos de tratamento, ao longo do período, com ajuste de Sidak

	PRP	C-PRP	PRF	C-PRF
PRP	-	>0,999	0,030	0,224
C-PRP	-	-	0,053	0,336
PRF	-	-	-	0,731
C-PRF	-	-	-	-

PRP: plasma rico em plaquetas, C-PRP: controle do PRP, PRF: fibrina rica em plaquetas, C-PRF: controle da PRF.

6.4 RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A média da concentração de colágeno, na análise histomorfométrica das imagens dos quatro grupos, apresentou um aumento, do 7º para o 14º P.O., considerado estatisticamente significativo, $P<0,001$, conforme demonstra a Tabela 3.

Ao analisarmos a quantidade de colágeno nas feridas, entre os grupos de tratamento, PRP e PRF, ao longo do período de observação (7º e 14º P.O.), e compararmos com seus respectivos grupos controle, não encontramos diferenças com significância estatística ($P=0,717$), como mostram a Tabela 3 e o Gráfico da Figura 32.

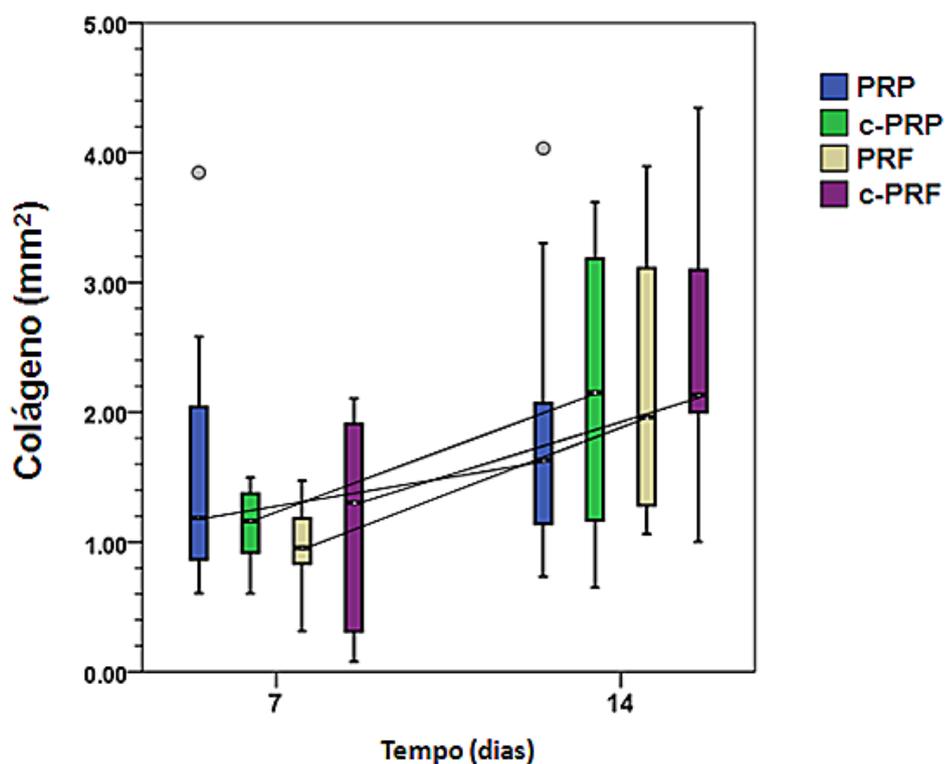
As maiores médias de concentração de colágeno, com 14 dias de pós-operatório, ocorreram nos grupos PRF ($2,22\pm 1,08$) e controle da PRF ($2,44\pm 0,99$). A variação percentual do Grupo Fibrina Rica em Plaquetas foi de 129%, contra apenas 22% do Grupo Plasma Rico em Plaquetas. No entanto, apesar da diferença de 107 pontos percentuais entre PRF e PRP, no período observado, não houve significância estatística entre os grupos, $P=0,380$ (Tabela 3 e Gráfico da Figura 32).

Tabela 3 – Medidas descritivas para a concentração de colágeno na área (mm^2) das feridas cutâneas (análise histomorfométrica) segundo tratamento e tempo

Tempo (dias)	PRP	C-PRP	PRF	C-PRF
7	1,54±1,02	1,11±0,29	0,97±0,34	1,19±0,79
14	1,88±1,04	2,16±1,06	2,22±1,08	2,44±0,99
$\Delta\%$	22%	95%	129%	105%

Os dados são apresentados como média±desvio-padrão; $\Delta\%$: variação percentual; PRP: plasma rico em plaquetas, C-PRP: controle do PRP, PRF: fibrina rica em plaquetas, C-PRF: controle da PRF; $P[\text{tempo}] < 0,001$ e $P[\text{tratamento} \times \text{tempo}] = 0,380$ obtidos em análise de variância de medidas repetidas.

Figura 32 – Gráfico de boxplot com as médias da concentração de colágeno no 7º e no 14º P.O. acompanhado de linhas representando a variação entre os dois momentos



PRP: plasma rico em plaquetas, C-PRP: controle do PRP, PRF: fibrina rica em plaquetas, C-PRF: controle da PRF.

6.5 RESULTADOS DA DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FERIDAS

6.5.1 Coloração Hematoxilina e Eosina

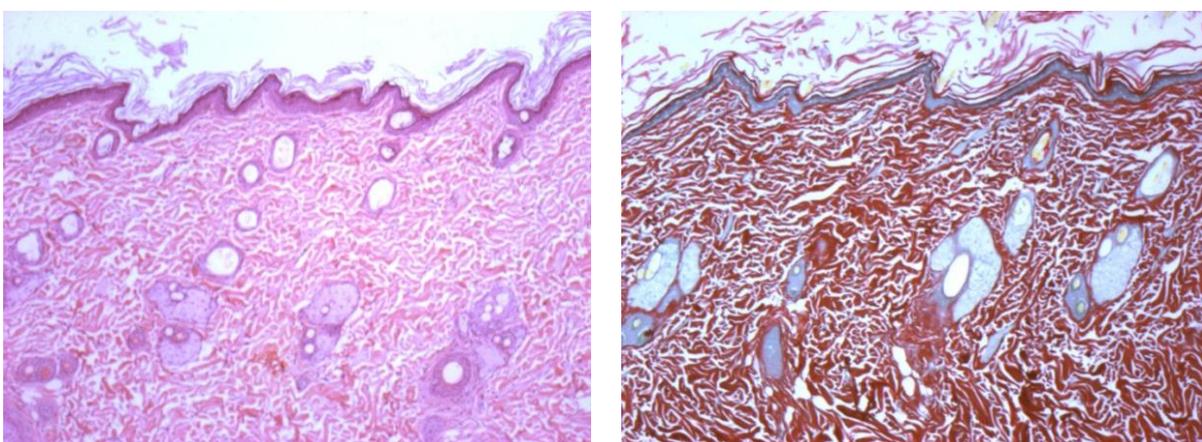
A presença de crosta foi maior no Grupo PRP, e respectivo controle (29/40; 73%), quando comparada ao Grupo PRF, e seu grupo controle (21/40; 53%), nos dois momentos avaliados, $P=0,105$. Além disso, foi mais exuberante no 7º P.O. (34/40; 85%), do que no 14º (16/40; 40%), nos quatro grupos estudados, $P<0,001$.

De um modo geral, a angiogênese (moderada a acentuada) foi mais observada com 7 dias de pós-operatório (38/40; 95%) do que com 14 dias (10/40; 25%; $P<0,001$), nos quatro grupos avaliados. Não foram observadas diferenças, entre os grupos experimentais, no 7º e 14º dias do processo cicatricial ($P>0,9$).

Quanto à reepitelização das feridas, esta foi menos intensa com 7 dias de pós-operatório (15/40; 38%) do que com 14 dias (40/40; 100%; $P<0,001$) nos quatro grupos experimentais. Os grupos PRF e controle do PRF (32/40; 80%), demonstraram reepitelização mais acentuada do que o grupo PRP e controle do PRP (23/40; 58%; $P=0,053$), ao longo do período observado, apesar da significância limítrofe. Não foram identificadas diferenças, quanto à reepitelização das feridas, entre os grupos de tratamento, PRP e PRF, quando comparados aos seus respectivos grupos controle ($P>0,9$).

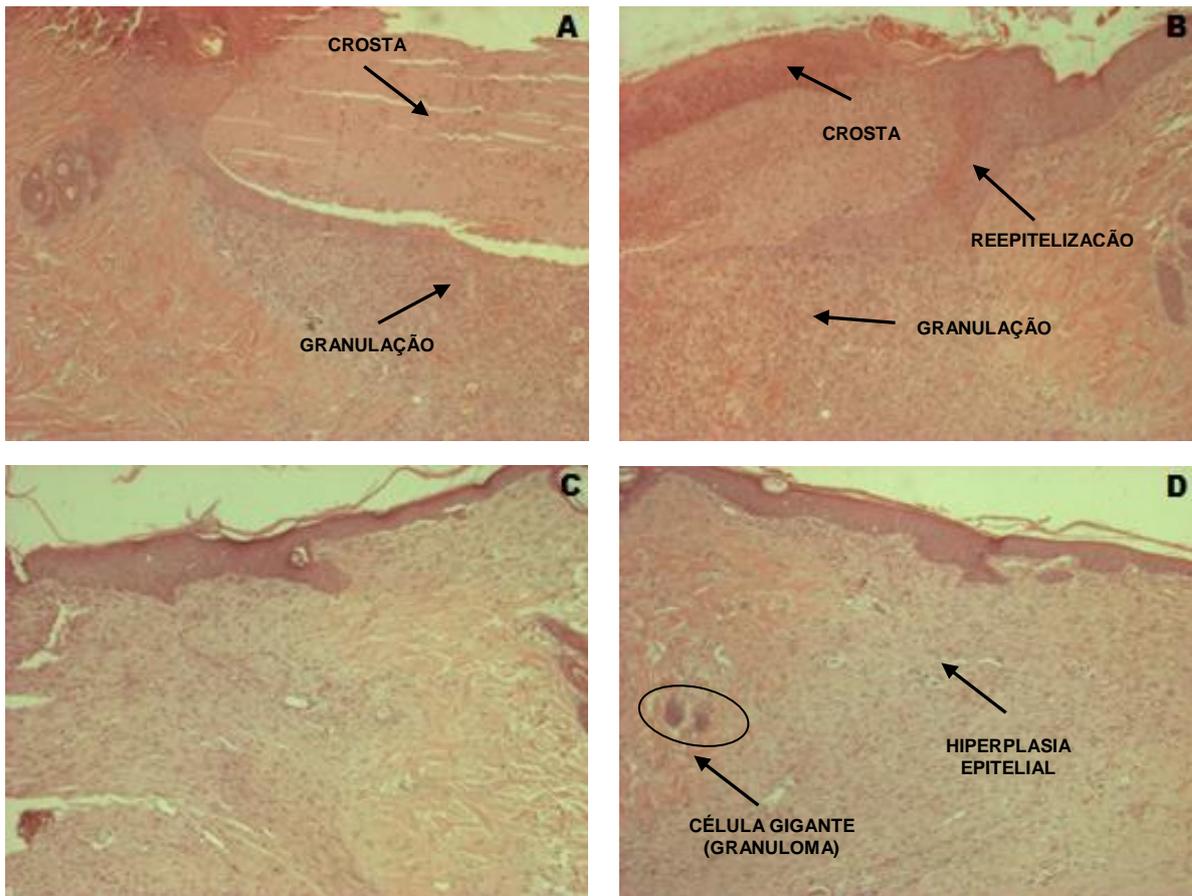
A descrição detalhada das características histológicas das feridas, quanto à presença ou ausência de crosta, angiogênese e reepitelização, de cada lâmina corada com HE, encontra-se no Apêndice A (item 1).

Figura 33 – Histologia da pele sem lesão



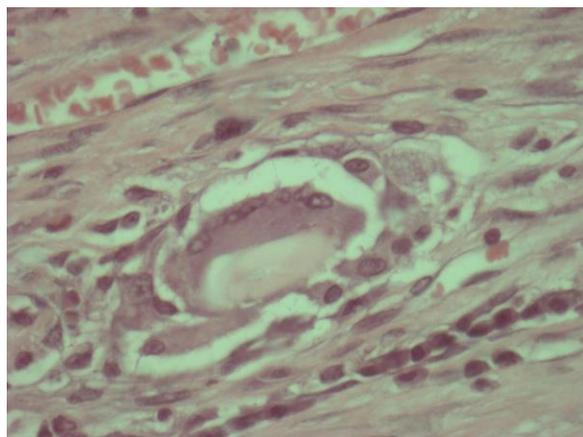
Histologia representativa da pele normal de um rato, sem lesão, nas colorações hematoxilina e eosina (A) e picrosírius (B). Aumento de 50x.

Figura 34 – Imagens histológicas dos Grupos PRP e Controle do PRP (HE)



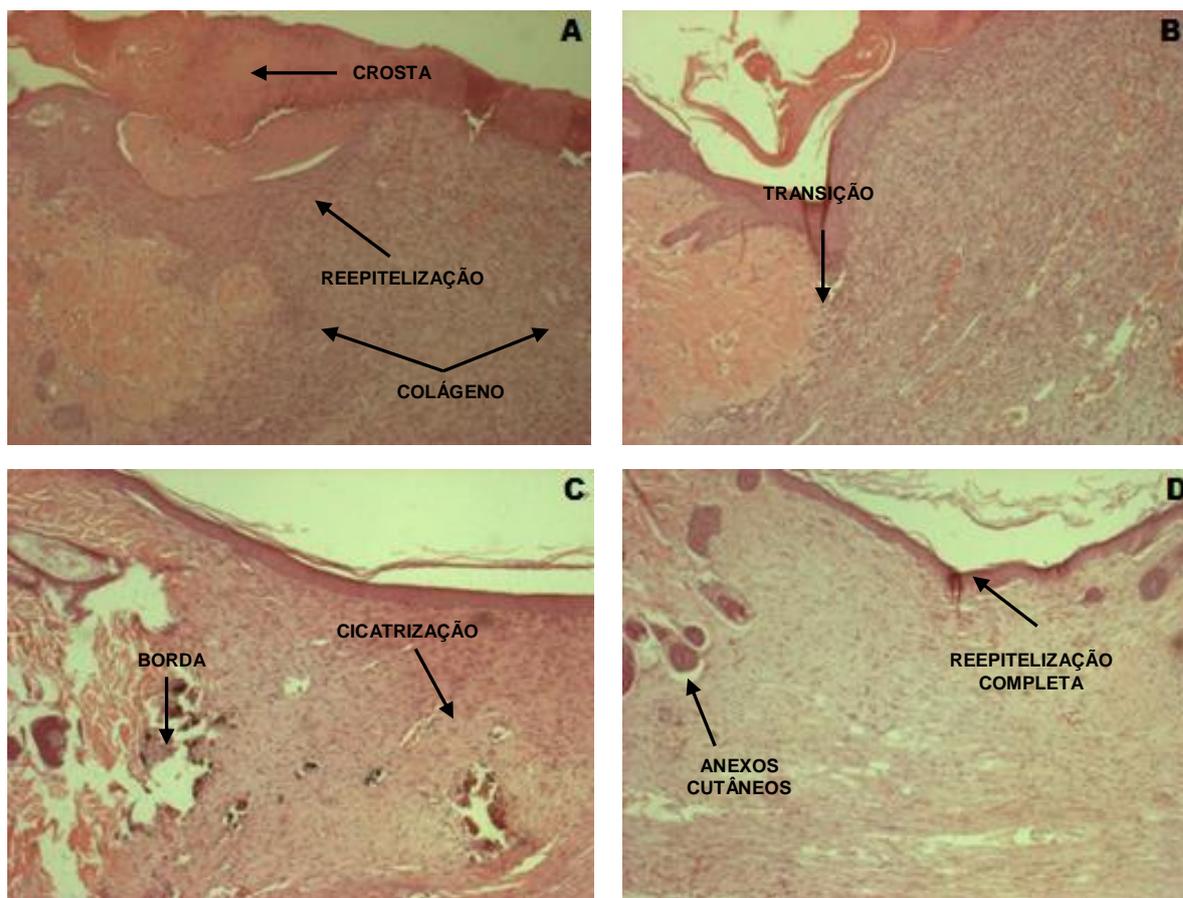
Grupo PRP (A e C) e Grupo Controle do PRP (B e D), no 7º P.O. (A e B) e no 14º P.O. (C e D) na coloração HE. Pode-se observar a presença de crosta, tecido de granulação (proliferação fibroblástica e angiogênese) e reepitelização nas imagens histológicas com 7 dias (A e B) e hiperplasia epitelial e uma célula gigante (granuloma) com 14 dias (D). Aumento de 50x.

Figura 35 – Granuloma



Detalhe da célula gigante ao centro. Aumento de 400x.

Figura 36 – Imagens histológicas dos Grupos PRF e Controle da PRF (HE)



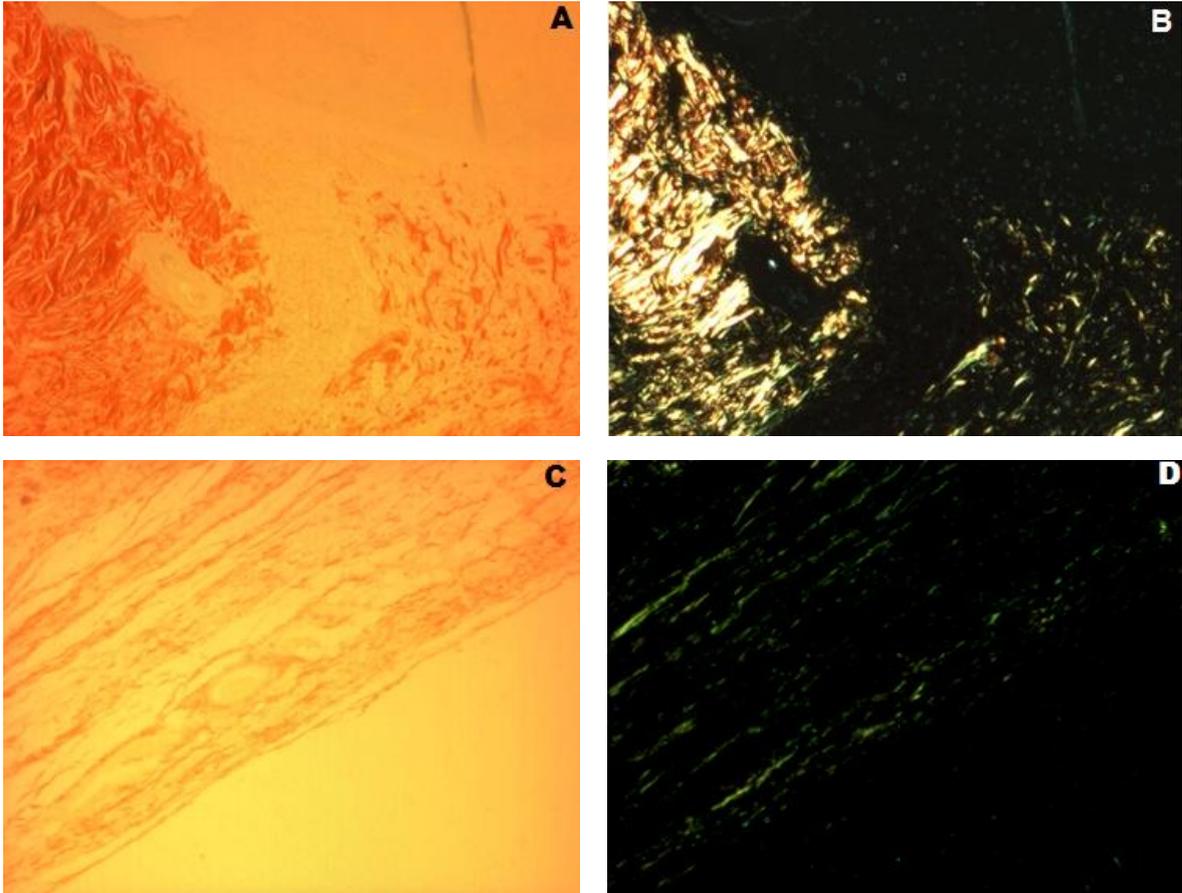
Grupo PRF (A e C) e Grupo Controle da PRF (B e D), no 7º P.O. (A e B) e no 14º P.O. (C e D) na coloração HE. Pode-se observar a presença de crosta, reepitelização e áreas de deposição de colágeno, na figura A, e a transição da borda da lesão para o tecido sadio, na figura B (7 dias) e na figura C (14 dias). Observa-se a presença de anexos cutâneos e reepitelização completa da lesão na figura D (14 dias). Aumento de 50x.

6.5.2 Coloração Picrosírius

A deposição de colágeno foi menos intensa no 7º dia do processo cicatricial (12/40; 30%; $P > 0,9$) e mais intensa no 14º dia (38/40; 95%; $P < 0,001$), nos quatro grupos experimentais. Não observamos diferenças, entre os grupos PRP e PRF, quando comparados aos seus respectivos grupos controle, tanto em 7 quanto em 14 dias de pós-operatório ($P > 0,9$). No entanto, observou-se uma deposição de colágeno superior no grupo PRF (9/20; 45%), no 7º P.O., em comparação ao grupo PRP (3/20; 15%), mas essa diferença não atingiu significância estatística ($P = 0,008$), assim como também não no 14º P.O. ($P > 0,9$).

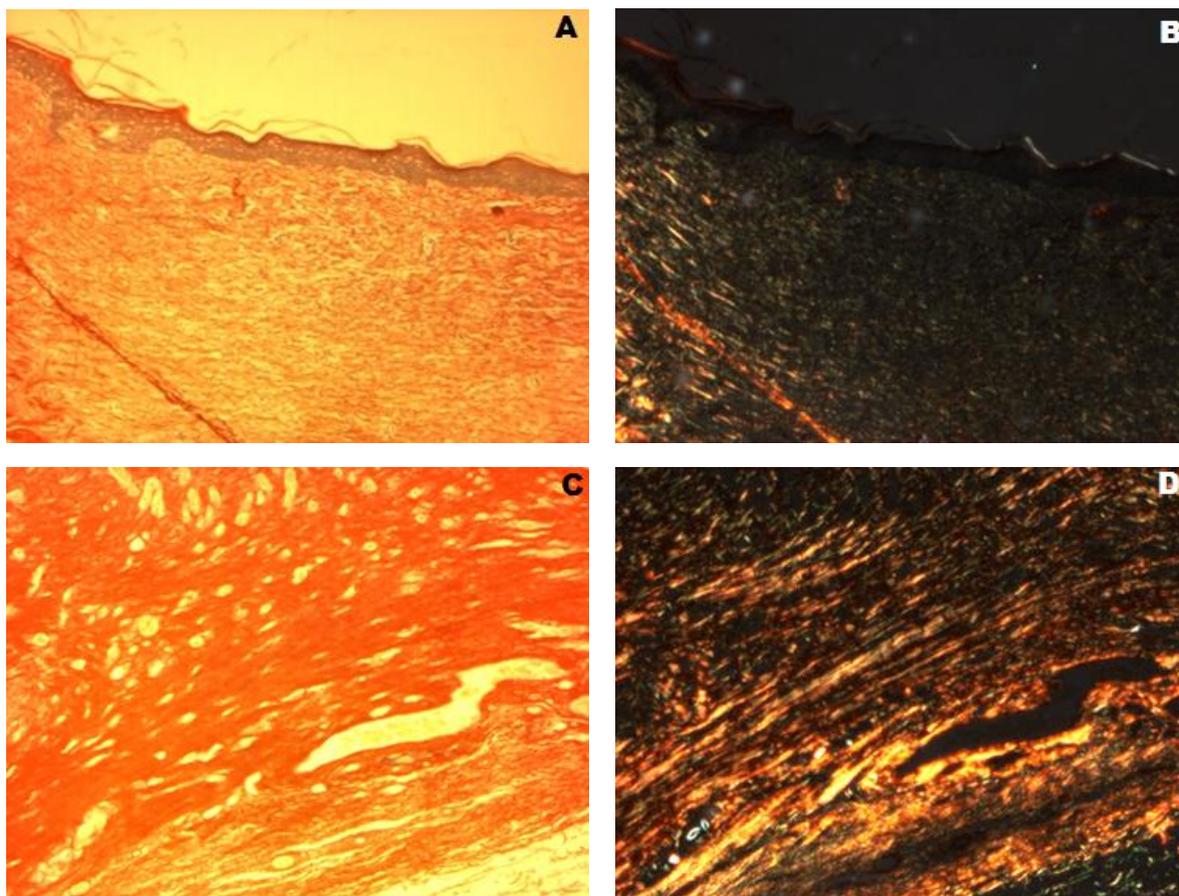
A descrição quanto à deposição de colágeno nas feridas de cada lâmina histológica corada com picrosírius encontra-se no Apêndice A (item 2).

Figura 37 – Imagens histológicas dos Grupos PRP e Controle do PRP (picrosírius)



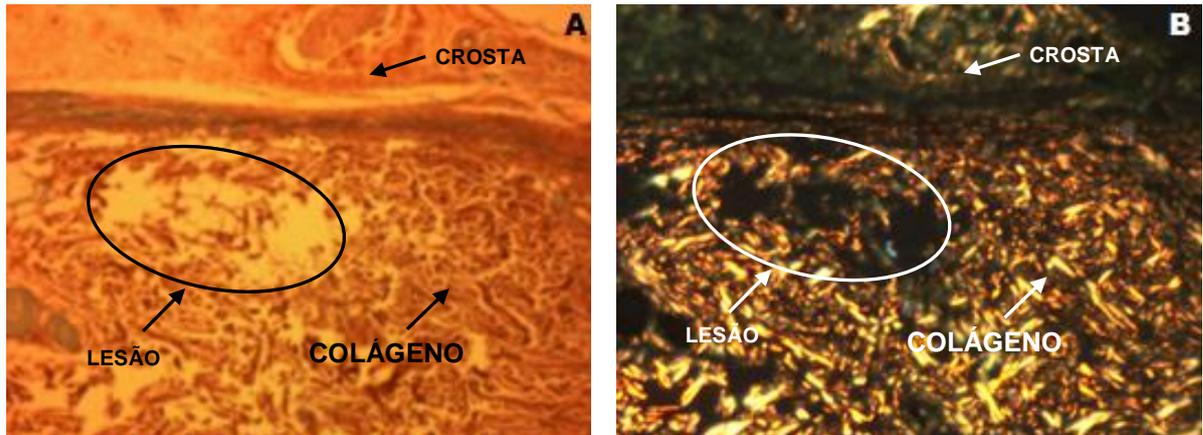
Grupo PRP (A e B) e Grupo Controle do PRP (C e D) com 14 dias de P.O., na coloração **picrosírius**, observada com luz normal (A e C) e sob luz polarizada (B e D). Sob luz polarizada (birrefringência), pode-se observar a presença de bastante colágeno como área de coloração branco-esverdeada (A e B) e pouca colagenização (C e D). Neste caso, o tratamento (figuras A e B) foi melhor do que o controle (figuras C e D). Aumento 50x.

Figura 38 – Imagens histológicas dos Grupos PRF e Controle da PRF (picosírius)



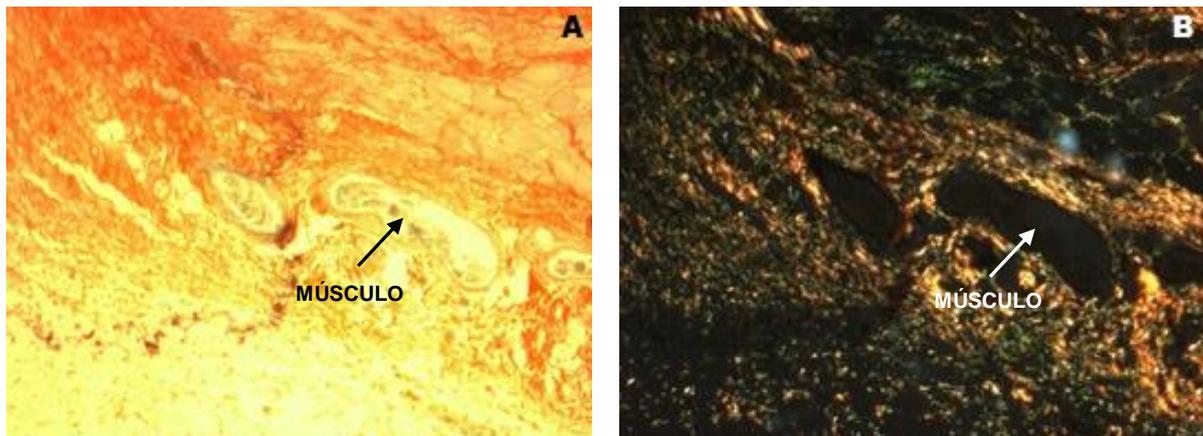
Grupo PRF (A e B) e do **Grupo Controle da PRF** (C e D), com 14 dias de P.O., na coloração **picosírius**, observada sob luz normal (A e C) e sob luz polarizada (B e D). Sob luz polarizada (birrefringência), pode-se observar a presença de bastante colágeno (C e D), como área de coloração branco-esverdeada, e pouca colagenização (A e B). Nesse caso, o controle (figuras C e D) foi melhor do que o tratamento (figuras A e B). Nota-se, ainda, maior quantidade de colágeno nessas figuras, que pertencem aos Grupos PRF e Controle da PRF, do que nas anteriores (Figura 36 A, B, C, D), que pertencem aos Grupos PRP e Controle do PRP. Aumento 50x.

Figura 39 – Deposição de colágeno



Observa-se área de lesão, circulada, sob luz normal (A) e luz polarizada (B). Importante deposição de colágeno (área branco-esverdeada), melhor visualizada com a polarização. Aumento de 50x.

Figura 40 – Importância da polarização



Observa-se a importância da luz polarizada para a melhor visualização da deposição de colágeno. Nota-se que o músculo não corou na figura B, sob luz polarizada, ao contrário da imagem da figura A, capturada sob luz normal. Aumento de 50x.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve um modelo, em ratos, de cicatrização de feridas cutâneas com PRP e PRF. As feridas foram analisadas no pós-operatório imediato e, novamente, depois de 7 e 14 dias. Em geral, o comportamento das feridas tratadas e das feridas controle foi semelhante, ao longo de período de observação, quanto à contração da área e concentração de colágeno. A análise morfométrica sugere que o tratamento com PRF obteve maior aceleração do reparo do que o tratamento com PRP. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos, PRP e PRF, quanto a parâmetros histomorfométricos, apesar da maior concentração de colágeno no grupo PRF, no final do período avaliado.

Feridas cutâneas, causadas pela perda da integridade da pele, seja por trauma ou cirurgia, desencadeiam no organismo mecanismos de reparo imediatos. O tratamento adequado de uma ferida e a qualidade da cicatriz resultante dependem de amplo conhecimento de todo o processo cicatricial.

A reparação de tecidos constitui um desafio constante na área da medicina regenerativa, onde diversos biomateriais têm sido estudados para otimizá-la. Novas terapêuticas adjuvantes, tanto celulares quanto moleculares, estão sendo desenvolvidas para acelerar a cicatrização, inclusive cutânea. A utilização do PRP e da PRF tem sido proposta como forma de aperfeiçoar e acelerar o processo de reparo de tecidos moles e ósseos, em lesões crônicas e agudas.^{7,87,92,96-100}

O dinâmico fenômeno da cicatrização é influenciado por diferentes tipos de células e mediadores biológicos, incluindo os fatores de crescimento. A adição de plaquetas a uma ferida e a liberação dos fatores de crescimento promovem a proliferação, diferenciação e quimiotaxia, induzindo à migração de variadas células para o local lesionado.¹⁶ Esses mediadores celulares estimulam a síntese de colágeno e a angiogênese, bem como a contração e a remodelação dos tecidos, ajudando em todo o processo de reparo.^{4,7,10,49}

A aplicação clínica do Plasma Rico em Plaquetas e da Fibrina Rica em Plaquetas, na regeneração tecidual, tem sido amplamente descrita na literatura, tanto na odontologia^{9,10,67,101} e cirurgia bucomaxilofacial,^{9,20,59,102} como na traumatologia^{16,66} e cirurgia plástica.^{76,103}

Na cirurgia plástica, estética e reparadora, os concentrados plaquetários são utilizados, principalmente, para a restauração de tecidos moles.^{16,104} Trabalhos

publicados referem redução do tempo cirúrgico, da dor e do edema no pós-operatório.^{69,75,105} A melhora da sobrevivência de retalhos e enxertos, a aceleração da reepitelização de tecidos e a redução da incidência de infecções e perdas de sangue, em cirurgia, também foram relatadas.^{69,70}

Há referências sobre a diminuição da necessidade do uso de drenos e curativos de pressão no pós-operatório e da menor incidência de complicações.⁶⁹ O PRP e a PRF são usados para estimular a cicatrização em feridas pós-traumáticas profundas e em grandes ulcerações de tecidos.^{22,24,30,85-87} Cervelli et. al (2009)⁸⁵ relatam o efeito quimiotático dos fatores de crescimento, que causam a migração de neutrófilos e macrófagos, adicionando um componente antimicrobiano à ferida. De acordo com Cieslik-Bielecka et. al (2012),³⁰ situações clínicas complexas, como feridas de difícil cicatrização, se beneficiam dessas propriedades antimicrobianas dos concentrados de plaquetas.

No presente estudo, duas feridas abertas, de difícil cicatrização, foram tratadas com PRP ou PRF e soro fisiológico (modelo emparelhado). O objetivo foi avaliar o efeito desses tratamentos na cicatrização cutânea por segunda intenção, principalmente na fase de fibroplasia, de forma macroscópica e microscópica.

Segundo Marx (2001 e 2004)^{10,17} e Gandhi et al.(2006),¹¹ a concentração de plaquetas, utilizada para fins terapêuticos no PRP, deve ser de, no mínimo, 1.000.000 plaquetas/ μ L, portanto, esse foi o protocolo por nós utilizado.

A contagem plaquetária foi realizada no sangue total dos ratos doadores, no PRP e na PRF, conforme demonstrado no Gráfico da Figura 31. A média do número de plaquetas no sangue total foi de 612.000 plaquetas/ μ L, enquanto no PRP, 3.826.000 plaquetas/ μ L. A alta concentração de plaquetas no PRP, 6,2 vezes mais plaquetas do que no sangue total, confirmou que os resultados obtidos neste estudo são condizentes com os encontrados na literatura.

Alguns autores sugerem que o efeito positivo do PRP pode depender da maior ou menor concentração de plaquetas. Concentrações baixas podem estar associadas a efeitos inexpressivos, em contrapartida, altas concentrações podem determinar efeitos inibitórios.^{106,107}

A contagem plaquetária média no sangue total dos ratos doadores da Fibrina Rica em Plaquetas foi de 376.000 plaquetas/ μ L. Após a preparação da PRF, a média de plaquetas encontrada foi de 38.000 plaquetas/ μ L, em consonância com os

achados relatados por alguns autores, que afirmam que as plaquetas ficam contidas no coágulo de fibrina.^{7,90}

Quanto aos resultados da análise morfométrica obtidos no estudo, verificou-se que as médias da área das feridas cirúrgicas, no pós-operatório imediato, entre os grupos experimentais, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P=0,911$), ou seja, o tamanho inicial das feridas foi confeccionado de forma semelhante.

A avaliação da contração das feridas, por método morfométrico, através do cálculo da área das fotografias, evidenciou que o efeito tempo foi significativo, com $P<0,001$, independentemente do tratamento utilizado. Desse modo, ao longo do período pós-operatório, todos os grupos experimentais apresentaram diminuição significativa da área, possibilitando a contração da ferida e fechamento condizente com o processo normal de cicatrização,¹⁰⁸ como pode ser visto no Gráfico da Figura 31.

A redução da área demonstra o fechamento da ferida, ou seja, quanto maior a sua taxa de redução, maior a contração da ferida operatória, indicando uma cicatrização mais acelerada.^{37,109} Nesse contexto, a Fibrina Rica em Plaquetas e seu grupo controle obtiveram maiores taxas de reduções na área das feridas, quando comparadas ao Plasma Rico em Plaquetas e seu Grupo Controle, conforme demonstrado na Tabela 1. A diferença na taxa de redução do grupo PRF, verificada durante o período pós-operatório, foi estatisticamente significativa ($P=0,030$) quando comparada ao grupo PRP (Tabelas 1 e 2). Dessa forma, os resultados sugerem que o tratamento com PRF possa ter um efeito superior, em relação ao PRP, na aceleração da cicatrização das feridas.

No entanto, a comparação entre os grupos de tratamento, PRP e PRF, com seus respectivos grupos controle, nos permitiu averiguar que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles, com relação à avaliação morfométrica.

Apesar de muitos estudos clínicos e experimentais demonstrarem resultados positivos com o uso de PRP e PRF na cicatrização cutânea,^{47,110-114} algumas pesquisas evidenciam resultados contraditórios, ou mesmo não comprovam sua eficácia.¹¹⁵⁻¹¹⁷ As diferentes técnicas de obtenção dos concentrados plaquetários, os inúmeros modelos experimentais utilizados, e as diferenças nos tipos de lesões cutâneas estudadas podem contribuir para a grande variabilidade dos resultados encontrados.

Everts et al. (2006)⁴⁹ consideram que os estudos experimentais com PRP, em animais, mostram uma tendência a resultados confusos e a dados conflitantes. Uma grande variedade de espécies (coelhos, cachorros, ratos, ovelhas, porcos e camundongos) tem sido utilizada e, muitas vezes, não há informações sequer sobre a contagem de plaquetas.^{7,49} Além disso, em algumas situações, ainda faltam descrições sobre os métodos de produção dos biomateriais. Certos autores, no caso do PRP, nem ativam o concentrado de plaquetas, outros o chamam de PRF, mas utilizam anticoagulante para o seu preparo.¹¹⁸ Alguns estudos incluem poucos animais na amostra, o que torna a análise estatística inviável.⁴⁹

Assim, os vários protocolos usados nas pesquisas tornam as conclusões bastante difíceis, pois, conforme Ehrenfest et al. (2009),⁷ cada método leva a um produto diverso, com potencial de uso e biologia diferentes.

Nossos resultados sugerem que o PRP e a PRF não demonstram superioridade clínica, em relação ao soro fisiológico, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

Resultados publicados na literatura, em estudos com animais^{30,116,117,119-125} e em estudos clínicos,^{67,126-129} corroboram nossos achados, não apenas em relação a lesões cutâneas,^{118,130} mas também em outras estruturas, como ossos, nervos e tendões.^{68,131-135}

Cieslik-Bielecka² (2010, apud Cieslik-Bielecka et al., 2012),³⁰ realizou estudo para estimar a influência do PRP no processo cicatricial de 64 ratos submetidos a ressecções retangulares de pele, no dorso. Análises histológicas e imuno-histoquímicas mostraram a melhora da cicatrização no grupo tratado com PRP, em comparação com o grupo controle, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas. O autor concluiu que o PRP não acelera o processo cicatricial de feridas cutâneas, semelhantemente ao nosso estudo. Segundo Cieslik-Bielecka (2010), o método de análise adotado no trabalho abriu uma nova perspectiva na avaliação dos efeitos do PRP. A neovascularização das lesões foi aferida através da densidade ótica média de uma amostra de tecido, por meio de análise

² CIESLIK-BIELECKA, Agata. **Estimation of an influence of the autogenous growth factors on postoperative wound healing processes in animals and patients with double mandibular fracture, and patients with chronic wounds.** Habilitation work. Medical University of Silesia, 2010 apud CIESLIK-BIELECKA, et al. **L-PRP/L-PRF in Esthetic Plastic Surgery, Regenerative Medicine of the Skin and Chronik Wounds.** Curr Pharm Biotechnol, v. 13, n. 7, p. 1266-77, 2012.

computadorizada (Image-Pro[®] Plus 3.0 version for Windows),³⁰ o mesmo tipo de análise que utilizamos para a quantificação de colágeno.

Camacho-Alonso et al. (2009)¹¹⁹ descreveram o efeito da infiltração de PRGF (plasma rico em fatores de crescimento) na cicatrização de lesões de língua, causadas por laser de CO₂, em 60 ratos. Não foram observadas diferenças significativas nos 2 grupos (o grupo controle não recebeu tratamento) em relação à reepitelização das lesões. Além disso, o grupo controle mostrou uma resolução mais significativa do processo inflamatório após 14 dias.¹¹⁹

Molina-Miñano et al. (2009)¹¹⁶ publicaram artigo sobre o uso do PRP na cicatrização da pele de coelhos. O modelo experimental emparelhado, semelhante ao utilizado em nosso trabalho, consistia em 2 lesões cutâneas, de 6 mm de diâmetro, realizadas com punch, no dorso dos animais. Embora nossas lesões fossem deixadas abertas, essas eram fechadas com 2 pontos de sutura. Após 7 dias de pós-operatório, a reepitelização das lesões foi melhor naquelas que receberam PRP, assim como a resolução do processo inflamatório. No entanto, após 28 dias, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre PRP e controle, nas 2 variáveis estudadas.

Em contraste com as observações de Molina-Miñano et al.(2009),¹¹⁶ Kimura et al. (2005),¹¹⁷ em estudo sobre o PRP na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, obtiveram resultados favoráveis quanto à força tênsil das cicatrizes, após 14 dias, porém, precocemente, no 3º e no 7º dia pós-experimento, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Um modelo de ferida incisional, suturada, foi utilizado, ao contrário do nosso, cujas feridas cicatrizaram por segunda intenção.

Experimentos em animais podem nos dar importantes informações sobre o efeito do PRP, da PRF e dos mecanismos associados, entretanto, conforme afirmaram Cieslik-Bielecka et al. (2012),³⁰ as diferenças entre os concentrados plaquetários na cicatrização humana e de animais e a complexidade dos modelos de cicatrização acabam limitando, consideravelmente, o impacto desses estudos. Para a avaliação de concentrados de plaquetas na cirurgia plástica e determinação dos benefícios em humanos, os autores sugeriram que se façam ensaios clínicos prospectivos e randomizados.³⁰ Contudo, mesmo nesse tipo de estudo, encontramos, na literatura, resultados desfavoráveis ao PRP e à PRF.

Vick et al. (2006),¹²⁶ em ensaio clínico prospectivo, randomizado e controlado, estudaram o uso de concentrados plaquetários autólogos em blefaroplastias bilaterais (cirurgias palpebrais). O objetivo dos autores foi avaliar a cicatrização pós-operatória, quanto a edema e equimose, em 33 pacientes. Os resultados dos exames, fotografias e questionários não evidenciaram diferenças clínicas significativas em relação à diminuição do edema e de equimoses, no grupo tratado com PRP, quando comparado ao grupo controle.¹²⁶

Danielsen et al. (2008)¹³⁰ demonstraram o efeito da Fibrina Rica em Plaquetas na reepitelização de áreas doadoras de enxertos e em enxertos cutâneos, em malha, de 20 pacientes com úlceras de perna. Quanto aos resultados do ensaio clínico, a cobertura epitelial das áreas doadoras não diferiu, significativamente, entre a PRF e o controle, no 5º e no 8º dias de P.O. Não houve diferença estatística na reepitelização macroscópica das áreas doadoras ou receptoras de enxerto. Tampouco houve diferença estatisticamente significativa na flora bacteriana das úlceras ou na dor, durante a troca dos curativos, entre o grupo tratado com PRF e o grupo controle.¹³⁰

De acordo com Martinez-Zapata et al.(2013),¹²⁸ não há evidências suficientes para apoiar o uso rotineiro do PRP autólogo como tratamento para feridas crônicas. Os autores realizaram uma revisão sistemática, na qual foram incluídos 9 ensaios clínicos randomizados, que comparava o PRP autólogo com placebo ou tratamentos alternativos, para feridas crônicas em adultos. A conclusão foi de que não houve diferença estatisticamente significativa nos estudos avaliados, entre o PRP e seu grupo controle, quanto à percentagem de área cicatrizada das feridas crônicas, ou mesmo nas complicações das feridas. Nossos resultados estão em consonância com os dos trabalhos apresentados, apesar das diferenças implícitas entre estudos experimentais e ensaios clínicos.

Em contrapartida, outros ensaios clínicos alcançaram resultados positivos com o uso de concentrados plaquetários em humanos.^{76,77,91,136,137}

Na análise histomorfométrica das imagens do presente estudo, observou-se que a média da concentração de colágeno da área das feridas apresentou um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,001$), do 7º para o 14º P.O., em todos os grupos experimentais, conforme demonstrado na Tabela 3 e no Gráfico da Figura 32. Nossos achados estão de acordo com o processo normal de cicatrização, onde o esperado, na fase de fibroplasia da ferida, é o aumento da síntese de colágeno.³¹ O

colágeno é o maior componente estrutural da cicatriz e tem a função de proporcionar tensão e integridade a todos os tecidos.³¹

Ao compararmos a quantificação de colágeno, entre os grupos PRP e PRF, com seus respectivos grupos controle, no 7º e 14º P.O., não encontramos diferenças significativas ($P=0,717$).

Não obstante, a variação percentual do Grupo Fibrina Rica em Plaquetas foi de 129%, contra apenas 22% do Grupo Plasma Rico em Plaquetas, ou seja, a concentração de colágeno foi maior no grupo PRF do que no grupo PRP, do 7º para o 14º dia de pós-operatório. Entretanto, essas diferenças encontradas não apresentaram significância estatística, $P=0,380$, conforme evidenciado na Tabela 3.

Porém, a observação clínica direta das feridas e a própria avaliação descritiva das lâminas histológicas sugerem uma maior aceleração do reparo naquelas tratadas com PRF. Esta constatação coincide com a maior concentração de colágeno nos grupos PRF e controle do PRF aos 14 dias e com a diferença de 107 pontos percentuais entre PRF e PRP, na análise histomorfométrica.

Apesar da descrição das características das feridas sugerir que a Fibrina Rica em Plaquetas e o controle da PRF apresentaram cicatrização mais acelerada do que o Plasma Rico em Plaquetas e controle do PRP, não foram encontradas diferenças com significância estatística nessas comparações.

Conforme Cieslik-Bielecka et al. (2012),³⁰ a principal diferença da PRF para o PRP é a arquitetura da matriz de fibrina. É essa estrutura característica da matriz a grande responsável pela capacidade terapêutica da PRF, muito embora plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento exerçam papéis importantes.⁸

Segundo Choukroun et al. (2006),⁸ essas peculiaridades da matriz de fibrina fazem com que feridas abertas e infectadas se beneficiem com a utilização de PRF, que é capaz de guiar a migração do epitélio celular em sua superfície, estimular os fibroblastos a produzir colágeno, promover a angiogênese e regular a imunidade. As membranas de PRF protegem, portanto, as feridas abertas, que cicatrizam por segunda intenção, como as do presente estudo, e aceleram sua cicatrização.

É provável que essas características da PRF tenham influenciado nossos achados e justifiquem não só a diferença estatisticamente significativa ($P=0,030$) em relação ao grupo PRP, na análise morfométrica, mas também a maior concentração de colágeno, na análise histomorfométrica.

A PRF é a segunda geração dos concentrados plaquetários.^{8,15,20,90,93} Dados clínicos revelam que esse biomaterial pode ser uma matriz favorável para o desenvolvimento de uma cicatrização sem excesso inflamatório. A inflamação é definida como o fenômeno reacional iniciado em resposta a uma agressão específica. Nos procedimentos cirúrgicos, como o processo inflamatório é inerente ao ato em si, a adição da PRF pode diminuir efeitos prejudiciais, corrigindo excessos destrutivos durante a cicatrização dos tecidos lesados.⁹³

Outra vantagem da PRF é a segurança da preparação sem manipulação bioquímica do sangue, eliminando reações imunogênicas e transmissão de doenças.⁹² Alguns trabalhos apontam, ainda, o papel dos leucócitos nesse biomaterial, tanto pela sua ação anti-infecciosa, quanto pela ação de regulação imune.^{7,93}

He et al.(2009)¹³⁸ compararam a PRF com o PRP, quanto à proliferação e à diferenciação de osteoblastos de ratos em estudo *in vitro*. Os autores concluíram que a PRF expressou um efeito mais controlado e duradouro na proliferação e diferenciação de osteoblastos do que o PRP, uma vez que a estrutura da matriz de fibrina possibilitou uma liberação mais lenta das moléculas solúveis nela presas.¹³⁸

Keyhan et al. (2013)¹³⁹ questionaram qual dos concentrados plaquetários, PRF ou PRP, foi o mais eficaz na lipoescultura facial, com enxerto de gordura, em 25 pacientes. Os resultados sugeriram que a combinação de PRF e gordura foi mais efetiva do que a de PRP e gordura. O seguimento, um ano após a cirurgia, mostrou maior reabsorção do lado enxertado com PRP e gordura.¹³⁹

Suzuki et al. (2013)¹⁴⁰ compararam a PRF com o PRP, adicionados a um gel de gelatina, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. A conclusão de que o gel de gelatina foi um carreador efetivo de fatores de crescimento, e que o gel que continha PRF foi superior ao que continha PRP, na cicatrização de feridas, apoia nossos achados.¹⁴⁰

Pressuposições a respeito das possíveis causas para a falta de efeito positivo dos grupos de tratamento, PRP e PRF, em relação aos grupos controle com soro fisiológico, levam a pensar na eventualidade de um efeito sistêmico, em virtude da proximidade das lesões.

Danielsen et al. (2008)¹³⁰ relataram não terem contado com a possibilidade de um efeito sistêmico do concentrado plaquetário, ao utilizarem um modelo emparelhado, em ensaio clínico randomizado sobre a reepitelização de feridas. Essa

possibilidade também não foi cogitada no presente estudo, ao escolhermos, igualmente, um modelo emparelhado.

Jorgensen et al. (2002)¹⁴¹ estudaram o efeito dose-dependente da aplicação tópica do fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (uma potente citocina), na resposta de um tecido conectivo, usando um modelo experimental de reparo. A administração de uma dose acima de 4 µg desse fator em um braço influenciou a concentração de colágeno encontrada no outro braço (controle) do mesmo paciente, indicando um efeito sistêmico no reparo dos tecidos.¹⁴¹

Outra explicação para que os grupos de tratamento, PRP e PRF, não tenham obtido resultados superiores aos dos grupos controle, em nenhuma das variáveis estudadas, pode ter relação com os achados de Choi et al. (2005)¹⁰⁷ e Weibrich et al. (2004)¹⁰⁶. Choi et al. (2005),¹⁰⁷ em estudo *in vitro*, demonstraram um efeito dose-dependente do PRP sobre a osteogênese, em que a proliferação de células ósseas é suprimida em altas concentrações, e estimulada em concentrações baixas. Weibrich et al. (2004)¹⁰⁶ também sugeriram que o PRP, em concentrações acima de 1.000.000 plaquetas/µL, poderia apresentar um efeito paradoxal, inibindo a regeneração óssea. Entretanto, não há evidências desse tipo de efeito na pele, nem tampouco para PRF.

Segundo Anitua (2006),⁵¹ a variação individual poderia explicar, em parte, alguns dos resultados controversos obtidos com PRP em diferentes estudos sobre regeneração de tecidos. A diferença nos resultados encontrados em pesquisas com humanos e animais pode ocorrer devido à grande heterogeneidade das espécies, uma vez que o PRP e a PRF são produtos biológicos autólogos muito sensíveis, e demandam receptores celulares de tecido específicos.⁴⁹

A variabilidade de produtos obtidos resulta em diferentes efeitos biológicos e, conseqüentemente, na maior ou menor capacidade de regeneração dos tecidos.¹⁴² Nesse sentido, corroboramos com a opinião de diversos autores que sugerem uma padronização dos protocolos para a obtenção dos concentrados, evitando assim a formação de produtos diferentes e a impossibilidade de comparar resultados.^{13,51,57,142} O estabelecimento de um banco de dados clínicos também poderia contribuir para que mais estudos prospectivos, randomizados e controlados, pudessem ser adequadamente executados.^{6,16,142}

Quanto às limitações do presente estudo, conjectura-se que o próprio modelo emparelhado e o tamanho amostral possam ter influenciado a falta de significância

nas comparações entre os grupos de tratamento e controle. É possível que um número de amostra superior pudesse ter alcançado diferenças com maior poder estatístico. Os tempos experimentais, de 7 e 14 dias de P.O., que privilegiaram o estudo da fase de fibroplasia da cicatrização, também podem ter influenciado. Outros achados poderiam ter sido obtidos com um tempo maior de observação, de 21 ou 30 dias, por exemplo.

Embora existam grandes disparidades nos resultados encontrados na literatura e nem todos os mecanismos de ação dos concentrados plaquetários estejam completamente elucidados, o uso de biomateriais terapêuticos tem sido proposto como uma estratégia para potencializar e melhorar a qualidade da regeneração tecidual.

Apesar do presente estudo não ter encontrado diferenças significativas entre os grupos de tratamento e os grupos controle, nossos achados sugerem uma resposta superior da PRF em relação ao PRP, na aceleração da cicatrização, tanto nas análises quantitativas, quanto nas descrições histológicas. Dessa forma, levando-se em conta a importância da cicatrização nas diferentes especialidades médicas, a possibilidade de aperfeiçoar esse processo biológico por meio de tratamentos autólogos seguros, de fácil obtenção e de baixo custo associado, torna o PRP e, principalmente, a PRF, ferramentas promissoras no campo da medicina regenerativa.

Esse campo de pesquisa oferece grandes perspectivas de novas opções terapêuticas e talvez, em futuro próximo, a engenharia de tecidos possa desenvolver biomateriais cada vez mais sofisticados, que venham a atender às necessidades individuais de cada paciente no local do reparo.

8 CONCLUSÃO

Considerando-se as limitações do presente estudo e de acordo com os dados obtidos, é possível concluir:

- 1- A contração das feridas, avaliada por método macroscópico (morfométrico), apresentou redução estatisticamente significativa ao longo do período pós-operatório.
- 2- A concentração de colágeno nas feridas, avaliada por método microscópico (histomorfométrico), apresentou um aumento estatisticamente significativo do 7º para o 14º dia de pós-operatório.
- 3- A descrição das características das feridas, por meio da histologia, sugeriu que o grupo PRF apresentou maior aceleração do reparo, quando comparado ao grupo PRP, apesar da ausência de significância estatística.
- 4- O tratamento com PRF foi estatisticamente superior ao tratamento com PRP, quanto à contração das feridas (análise morfométrica). O tratamento com PRF foi superior ao tratamento com PRP, porém, sem significância estatística, quanto à concentração de colágeno nas feridas (análise histomorfométrica). Os grupos de tratamento, PRP e PRF, não foram estatisticamente superiores aos seus grupos controle, nas variáveis estudadas.

REFERÊNCIAS

- 1 SALGADO FILHO, I.; ZANINI, S. Reparação dos traumas de pele e tecidos moles. In: MÉLEGA, J.; ZANINI, S., *et al* (Ed.). **Cirurgia plástica reparadora e estética**. 2. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.139-145.
- 2 SILVA, J. Correção de Cicatrizes. In: MÉLEGA, J.; ZANINI, S., *et al* (Ed.). **Cirurgia plástica reparadora e estética**. 2. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.147-157.
- 3 MODOLIN, M. Biologia da cicatrização dos tecidos. In: MÉLEGA, J.; ZANINI, S., *et al* (Ed.). **Cirurgia Plástica reparadora e estética**. 2. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.9-13.
- 4 LORENZ, H.; LONGAKER, M. Wound healing: repair biology and wound and scar treatment. In: MATHES, S.J. (Ed.). **Plastic Surgery**. 2. Philadelphia: W.B Saunders, 2006. p.209-230.
- 5 CARTER, M. J.; FYLLING, C. P.; PARNELL, L. K. Use of platelet-rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. **Eplasty**, v. 11, p. 38, 2011. ISSN 1937-5719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028946> >.
- 6 LACCI, K.; DARDIK, A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. **Yale J Biol Med**, v. 83, p. 1-9, 2010.
- 7 EHRENFEST, D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.
- 8 CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 56-60, Mar 2006. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504852> >.
- 9 MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 6, p. 638-46, Jun 1998. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9638695> >.
- 10 MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dent**, v. 10, n. 4, p. 225-8, 2001. ISSN 1056-6163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11813662> >.
- 11 GANDHI, A. et al. The effects of local platelet-rich plasma delivery on diabetic fracture healing. **Bone**, v. 38, n. 4, p. 540-6, Apr 2006. ISSN 8756-3282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368279> >.
- 12 CHOUKROUN, J. et al. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. **Implantodontie**, v. 42, p. 55-62, 2001.

- 13 SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 18, n. 1, p. 93-103, 2003 Jan-Feb 2003. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12608674> >.
- 14 ROZMAN, P.; BOLTA, Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat**, v. 16, n. 4, p. 156-65, Dec 2007. ISSN 1318-4458. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204746> >.
- 15 DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 45-50, Mar 2006. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504850> >.
- 16 ARORA, N. et al. Platelet-rich plasma: a literature review. **Implant Dent**, v. 18, n. 4, p. 303-308, 2009.
- 17 MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 4, p. 489-96, Apr 2004. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085519> >.
- 18 ROBSON, M. C. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. **Wound Repair Regen**, v. 5, n. 1, p. 12-7, 1997 Jan-Mar 1997. ISSN 1067-1927. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984452> >.
- 19 REDAELLI, A.; ROMANO, D.; MARCIANÓ, A. Face and neck revitalization with platelet-rich plasma (PRP): clinical outcome in a series of 23 consecutively treated patients. **J Drugs Dermatol**, v. 9, n. 5, p. 466-72, May 2010. ISSN 1545-9616. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480789> >.
- 20 CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 299-303, Mar 2006. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504861> >.
- 21 FOSTER, T. E. et al. Platelet-rich plasma : from basic science to clinical applications. **Am J Sports Med**, v. 37, p. 2259-2272, 2010.
- 22 CROVETTI, G. et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfus Apher Sci**, v. 30, n. 2, p. 145-51, Apr 2004. ISSN 1473-0502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062754> >.
- 23 DRIVER, V. et al. Autologel Diabetic Foot Ulcer Study Group. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. **Ostomy Wound Manage**, v. 52, n. 6, p. 68-74, 2006.

- 24 KAZAKOS, K. et al. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. **Injury**, v. 40, n. 8, p. 801-5, Aug 2009. ISSN 1879-0267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703188> >.
- 25 COLE, P. et al. The skin and subcutaneous tissue. In: SCHWARTZ, M. D. (Ed.). **Schwartz's Principles of Surgery**. 9: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2010. cap. 16.
- 26 SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Anatomia e Fisiologia. In: SAMPAIO, S. A. P. e RIVITTI, E. A. (Ed.). **Dermatologia**. 3. São Paulo.: Artes Médicas, 2007. cap. 1, p.1-37.
- 27 SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocr Rev**, v. 21, n. 5, p. 457-87, Oct 2000. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041445> >.
- 28 HABIF, T. P. Principles of diagnosis and anatomy. In: HABIF, T. P. (Ed.). **Clinical Dermatology - A Color Guide to Diagnosis and Therapy**. 3. St. Louis - Missouri: Mosby, 1996. cap. 1, p.1-24.
- 29 ARNOLD, H. L.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D. A pele: estrutura básica e função. In: ARNOLD, H. L.; ODOM, R. B., et al (Ed.). **Doenças da Pele de Andrews Dermatologia Clínica**. 8. São Paulo: Manole, 1994. cap. 1, p.1-14.
- 30 CIESLIK-BIELECKA, A. et al. L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, n. 7, p. 1266-77, Jun 2012. ISSN 1873-4316. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740368> >.
- 31 GOGIA, P. Fisiologia da cicatrização de feridas. In: GOGIA, P. (Ed.). **Feridas Tratamento e Cicatrização**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p.1-9.
- 32 GRAGNANI, A. et al. Cicatrização - fibroplastia e fatores de crescimento. In: FERREIRA, L. (Ed.). **Guia de Cirurgia Plástica**. 1. Barueri: Manole, 2007. p.49-53.
- 33 COHEN, I. K.; MAST, B. A. Models of wound healing. **J Trauma**, v. 30, n. 12 Suppl, p. S149-55, Dec 1990. ISSN 0022-5282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2254974> >.
- 34 KASHYAP, A. et al. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on wound healing. **Am Surg**, v. 61, n. 6, p. 486-91, Jun 1995. ISSN 0003-1348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7762895> >.
- 35 DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair Regen**, v. 12, n. 6, p. 591-9, 2004 Nov-Dec 2004. ISSN 1067-1927. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15555049> >.

- 36 PEACOCK, E. E.; VAN WINKLE, W. **Repair of skin wounds**. 2. Philadelphia: W.B. Saunders., 1976. 204-270
- 37 VAN WINKLE, W. Wound contraction. **Surg Gynecol Obstet**, v. 125, p. 131-142, 1967.
- 38 CROSS, S. E. et al. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **Br J Plast Surg**, v. 48, n. 4, p. 189-97, Jun 1995. ISSN 0007-1226. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7640850> >.
- 39 MC FARLANE, R. M.; DEYONG, G.; HENRY, R. A. The desing of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast Reconst Surg**, v. 35, p. 177-182, 1965.
- 40 GARROS, I. et al. Extrato de passiflora edulis na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cir Bras**, v. 21, p. 55-65, 2006.
- 41 AMARAL, M. L. G.; CARNEIRO, L. M. A.; SANTOS, M. R. M. Efeito do leite humano na cicatrização de feridas abertas em ratos. **Rev Paraense Med**, v. 20, p. 13-8, 2006.
- 42 SANTOS, L. Efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 17, p. 220-224, 2002.
- 43 ARAÚJO, C. F. R. et al. Efeitos do agarol® e do trigliceril® sobre a cicatrização de pele. Estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 13, p. 232-37, 1998.
- 44 PIETRZAK, W. et al. Platelet-rich plasma and platelet-poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. **J Craniof Surg**, v. 18, n. 3, p. 559-567, 2007.
- 45 SANTOS, M.; SANTOS, M. O sangue e medula óssea. In: PONTUAL, M. e MAGINI, R. (Ed.). **Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica**. Santos: São Paulo, 2004. cap. 1, p.3-44.
- 46 EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. **Plast Reconstr Surg**, v. 118, n. 6, p. 147-159, Nov 2006. ISSN 1529-4242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051095> >.
- 47 EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 6, p. 1502-8, Nov 2004. ISSN 1529-4242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509939> >.
- 48 MEHTA, S.; WATSON, J. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. **J Orthop Trauma**, v. 22, n. 6, p. 432-8, 2008.

- 49 EVERTS, P. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **J Extra Corpor Technol**, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006.
- 50 VENDRAMIN, F. S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plastica. **Rev Col Bras Cir**, v. 33, p. 24-8, 2006.
- 51 ANITUA, E. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends Biotechnol**, v. 24, n. 5, p. 227-34, May 2006. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540193> >.
- 52 NEUFELD, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J**, v. 13, n. 1, p. 9-22, Jan 1999. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872925> >.
- 53 GIANNOBLE, W. V. Periodontal tissue engineering by growth factors. **Bone**, v. 19, p. 23-37, 1996.
- 54 LANDESBURG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 58, n. 3, p. 297-300; discussion 300-1, Mar 2000. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716112> >.
- 55 MARX, R. E.; GARG, A. K. The biology of platelets and the mechanism of platelet-rich plasma. In: MARX, R. E. e GARG, A. K. (Ed.). **Dental and Craniofacial Applications of Platelet-Rich Plasma**. Chicago: Quintessence books and publishing Co., 2005. cap. 1, p.3-30.
- 56 WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K.; HAFNER, G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 2, p. 184-90, 2002 Mar-Apr 2002. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958400> >.
- 57 WEIBRICH, G. et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 20, n. 1, p. 118-23, 2005 Jan-Feb 2005. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15747683> >.
- 58 KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **J Extra Corpor Technol**, v. 36, n. 1, p. 28-35, 2004.
- 59 ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 14,

- n. 4, p. 529-35, 1999 Jul-Aug 1999. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453668> >.
- 60 SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 6, p. 879-82, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11151589> >.
- 61 EFEOGLU, C.; AKCAY, Y. D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparation platelet-rich plasma: an experimental study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, 2004.
- 62 LACOSTE, E.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. **J Periodontol**, v. 74, n. 10, p. 1498-507, Oct 2003. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14653397> >.
- 63 FRÉCHETTE, J. P.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet-rich plasma: growth factor content and roles in wound healing. **J Dent Res**, v. 84, n. 5, p. 434-9, May 2005. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840779> >.
- 64 VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Rev Bras Cir Plást**, v. 24, n. 2, p. 212-218, 2009.
- 65 SU, C. Y. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. **Transfusion**, v. 48, n. 11, p. 2414-2420, 2008.
- 66 WROTNIAK, M.; BIELECKI, T.; GAŹDZIK, T. S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. **Ortop Traumatol Rehabil**, v. 9, n. 6, p. 227-238, 2007.
- 67 ANITUA, E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. **Pract Proced Aesthet Dent**, v. 13, n. 6, p. 487-93; quiz 487-93, Aug 2001. ISSN 1534-6846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544821> >.
- 68 PLACHOKOVA, A. S. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 6, p. 539-45, Jun 2008. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422984> >.
- 69 MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plast Reconstr Surg**, v. 107, n. 1, p. 229-37; discussion 238-9, Jan 2001. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176628> >.

- 70 VALBONESI, M. et al. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. **Int J Artif Organs**, v. 25, n. 4, p. 334-8, Apr 2002. ISSN 0391-3988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027145> >.
- 71 KAWASE, T. et al. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. **J Periodontol**, v. 74, n. 6, p. 858-64, Jun 2003. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886997> >.
- 72 PETRUNGARO, P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. Interview by Arun K. Garg. **Dent Implantol Update**, v. 12, n. 6, p. 41-6, Jun 2001. ISSN 1062-0346. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11993379> >.
- 73 PETRUNGARO, P. S. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. **Compend Contin Educ Dent**, v. 22, n. 9, p. 729-32, 734, 736 passim; quiz 746, Sep 2001. ISSN 1548-8578. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11692397> >.
- 74 FARRAG, T. Y. et al. Effect of platelet-rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. **Laryngoscope**, v. 117, n. 1, p. 157-65, Jan 2007. ISSN 0023-852X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202946> >.
- 75 SCLAFANI, A. P. Applications of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. **Facial Plast Surg**, v. 25, n. 4, p. 270-6, Nov 2009. ISSN 1098-8793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19924600> >.
- 76 _____. Safety, efficacy, and utility of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. **Arch Facial Plast Surg**, v. 13, n. 4, p. 247-51, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1538-3660. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339469> >.
- 77 CERVELLI, V. et al. Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 15, n. 4, p. 625-34, Dec 2009. ISSN 1937-3392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19231923> >.
- 78 _____. Autologous platelet-rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. **Aesthetic Plast Surg**, v. 33, n. 5, p. 716-21, Sep 2009. ISSN 1432-5241. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19588189> >.
- 79 UEBEL, C. O. et al. The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery. **Plast Reconstr Surg**, v. 118, n. 6, p. 1458-66; discussion 1467, Nov 2006. ISSN 1529-4242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051119> >.

- 80 ALMEIDA, A. R. H. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. **Rev Bras Cir Plast**, v. 23, p. 82-8, 2008.
- 81 BRAGA-SILVA, J. et al. Efeitos das células-tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta Ortop Bras**, v. 14, p. 273-5, 2006.
- 82 ANITUA, E. et al. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. **J Biomed Mater Res A**, v. 77, n. 2, p. 285-93, May 2006. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400654> >.
- 83 IA, W.; ZHANG, C. Comment on "Platelet-rich plasma as a novel therapeutic agent in osteomyelitis." **Med Hypotheses**, v. 73, n. 2, p. 270-1, Aug 2009. ISSN 1532-2777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19321269> >.
- 84 KRASNA, M. et al. Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. **Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat**, v. 16, n. 3, p. 105-10, Sep 2007. ISSN 1318-4458. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17994170> >.
- 85 CERVELLI, V.; GENTILE, P.; GRIMALDI, M. Regenerative surgery: use of fat grafting combined with platelet-rich plasma for chronic lower-extremity ulcers. **Aesthetic Plast Surg**, v. 33, n. 3, p. 340-5, May 2009. ISSN 1432-5241. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156458> >.
- 86 ANITUA, E. et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 84, n. 2, p. 415-21, Feb 2007. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17595032> >.
- 87 HOM, D. B.; LINZIE, B. M.; HUANG, T. C. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. **Arch Facial Plast Surg**, v. 9, n. 3, p. 174-83, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1521-2491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519207> >.
- 88 LANDESBURG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risks of using platelet-rich plasma gel. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 56, n. 9, p. 1116-7, Sep 1998. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734779> >.
- 89 MARTINEZ-GONZALEZ, J. M. et al. Do ambulatory-use platelet-rich plasma (PRP) concentrates present risks? **Med Oral**, v. 7, n. 5, p. 375-90, 2002 Nov-Dec 2002. ISSN 1137-2834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415222> >.
- 90 DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med**

- Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 37-44, Mar 2006. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504849> >.
- 91 O'CONNELL, S. M. et al. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 6, p. 749-56, 2008 Nov-Dec 2008. ISSN 1524-475X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128245> >.
- 92 RAJA, V. S.; NAIDU, E. M. Platelet-rich fibrin: evolution of a second generation platelet concentrate. **Indian J Dent Res**, v. 19, p. 42-46, 2008.
- 93 DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 3, p. 51-5, Mar 2006. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504851> >.
- 94 NAGAE, M. et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. **Tissue Eng**, v. 13, n. 1, p. 147-58, Jan 2007. ISSN 1076-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518588> >.
- 95 OBARRIO, J. J. et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology-case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 20, n. 5, p. 486-97, Oct 2000. ISSN 0198-7569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11203586> >.
- 96 LUCARELLI, E. et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. **Eur Cell Mater**, v. 20, p. 13-23, 2010.
- 97 LYNCH, S. E. et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **J Periodontol**, v. 62, n. 11, p. 710-6, Nov 1991. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1753324> >.
- 98 OYAMA, T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 5, p. 555-8, May 2004. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122558> >.
- 99 MARGOLIS, D. J. et al. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. **Diabetes Care**, v. 24, n. 3, p. 483-8, Mar 2001. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289472> >.
- 100 SAAD SETTA, H. et al. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. **Int Wound J**, v. 8, n. 3, p. 307-12, Jun 2011. ISSN 1742-481X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470370> >.

- 101 BASHUTSKI, J. D.; WANG, H. L. Role of platelet-rich plasma in soft tissue root-coverage procedures: a review. **Quintessence Int**, v. 39, n. 6, p. 473-83, Jun 2008. ISSN 1936-7163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057743> >.
- 102 WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 55, n. 11, p. 1294-9, Nov 1997. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371122> >.
- 103 PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. **Burns**, v. 36, n. 1, p. 4-8, Feb 2010. ISSN 1879-1409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541423> >.
- 104 EVERTS, P. A. et al. The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery: a review. **Surg Endosc**, v. 21, n. 11, p. 2063-8, Nov 2007. ISSN 1432-2218. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17436045> >.
- 105 POWELL, D. M.; CHANG, E.; FARRIOR, E. H. Recovery from deep-plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel: a pilot study. **Arch Facial Plast Surg**, v. 3, n. 4, p. 245-50, 2001 Oct-Dec 2001. ISSN 1521-2491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710858> >.
- 106 WEIBRICH, G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, v. 34, n. 4, p. 665-71, Apr 2004. ISSN 8756-3282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050897> >.
- 107 CHOI, B. H. et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 34, n. 4, p. 420-4, Jun 2005. ISSN 0901-5027. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16053853> >.
- 108 HUNT, T. K.; VAN WINKLE, W. Wound healing: normal repair. In: DUNPHY, J. E. (Ed.). **Fundamentals of Wound Management in Surgery**. South Plainfield, New Jersey: Chirurgecom, 1976. p.1-68.
- 109 PEACOCK, E. E. **Wound Repair**. Philadelphia: W.B. Saunders., 1984.
- 110 SELL, S. A. et al. A case report on the use of sustained release platelet-rich plasma for the treatment of chronic pressure ulcers. **J Spinal Cord Med** v. 34, p. 122-127, 2011.
- 111 CERVELLI, V. et al. Treatment of traumatic scars using fat grafts mixed with platelet-rich plasma, and resurfacing of skin with the 1540 nm nonablative laser. **Clin Exp Dermatol**, v. 37, p. 55-61, 2011.

- 112 CHO, J. M. et al. Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice. **Journal of Plastic**, v. 64, p. 31-39, 2010.
- 113 NAKAMURA, S. et al. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of grafts in rats. **Ann Plast Surg**, v. 65, n. 1, p. 101-106, 2010.
- 114 ONO, I. The effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the breaking strength of acute incisional wounds. **Journal of Dermatological Science**, v. 29, p. 104-113, 2002.
- 115 MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O. M.; THEORET, C. L. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **Am J Vet Res**, v. 70, n. 2, p. 277-282, 2009.
- 116 MOLINA-MIÑANO, F. et al. The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. **Int Wound J**, v. 6, n. 2, p. 145-148, 2009.
- 117 KIMURA, A. et al. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. **J Dermatol Sci**, v. 40, n. 3, p. 205-8, Dec 2005. ISSN 0923-1811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16321720> >.
- 118 DANIELSEN, P. L.; AGREN, M. S.; JORGENSEN, L. N. Platelet-rich fibrin versus albumin in surgical wound repair: a randomized trial with paired design. **Ann Surg**, v. 251, n. 5, p. 825-31, May 2010. ISSN 1528-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395860> >.
- 119 CAMACHO-ALONSO, F. et al. Wound healing with PRGF infiltration in CO₂ laser lesions of the tongue: an animal study. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 3, p. 487-91, Jun 2009. ISSN 1557-8550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19405818> >.
- 120 PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 9, p. 966-72, Sep 2005. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104961> >.
- 121 RANLY, D. M. et al. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 9, p. 2052-64, Sep 2005. ISSN 0021-9355. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140821> >.
- 122 CHOI, B. H. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 33, n. 1, p. 56-9, Jan 2004. ISSN 0901-5027. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14690660> >.

- 123 AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 60, n. 10, p. 1176-81, Oct 2002. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12378494> >.
- 124 _____. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004 Jan-Feb 2004. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982356> >.
- 125 GRAGEDA, E. et al. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. **J Oral Implantol**, v. 31, n. 1, p. 2-17, 2005. ISSN 0160-6972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15751383> >.
- 126 VICK, V. L. et al. Use of autologous platelet concentrate in blepharoplasty surgery. **Ophthal Plast Reconstr Surg**, v. 22, n. 2, p. 102-4, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0740-9303. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550052> >.
- 127 CARREON, L. Y. et al. Platelet gel (AGF) fails to increase fusion rates in instrumented posterolateral fusions. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 30, n. 9, p. 243-6, May 2005. ISSN 1528-1159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864142> >.
- 128 MARTINEZ-ZAPATA, M. J. et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. **Cochrane Database of Systematic Reviews.**, n. 3, 2013.
- 129 FROUM, S. J. et al. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 22, n. 1, p. 45-53, Feb 2002. ISSN 0198-7569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922217> >.
- 130 DANIELSEN, P. et al. Effect of topical autologous platelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial. **Plast Reconstr Surg**, v. 122, n. 5, p. 1431-40, Nov 2008. ISSN 1529-4242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971727> >.
- 131 PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. **J Periodontol**, v. 76, n. 8, p. 1287-92, Aug 2005. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101360> >.
- 132 SCHEPULL, T. et al. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures. **Am J Sports Med**, v. 20, n. 10, p. 1-10, 2010.

- 133 PISKIN, A. et al. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. **Microsurgery**, v. 29, n. 2, p. 144-53, 2009. ISSN 1098-2752. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19031394> >.
- 134 DE JONGE, S. et al. One-year follow-up of platelet-rich plasma treatment in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Am J Sports Med**, v. 39, n. 8, p. 1623-9, Aug 2011. ISSN 1552-3365. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602565> >.
- 135 FREYMILLER, E. G.; AGHALOO, T. L. Platelet-rich plasma: ready or not? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 4, p. 484-8, Apr 2004. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085518> >.
- 136 CHIGNON-SICARD, B. et al. Efficacy of leukocyte and platelet-rich fibrin in wound healing: a randomized controlled clinical trial. **Plast Reconstr Surg**, v. 130, n. 6, p. 819-829, Dec 2012. ISSN 1529-4242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190833> >.
- 137 LUNDQUIST, R.; DZIEGIEL, M. H.; AGREN, M. S. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 3, p. 356-63, 2008 May-Jun 2008. ISSN 1524-475X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282265> >.
- 138 HE, L. et al. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 5, p. 707-13, Nov 2009. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836723> >.
- 139 KEYHAN, S. O. et al. Use of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in combination with fat graft: which is more effective during facial liposuction? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 3, p. 610-21, Mar 2013. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883321> >.
- 140 SUZUKI, S.; MORIMOTO, N.; IKADA, Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. **J Biomater Appl**, Feb 2013. ISSN 1530-8022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23413231> >.
- 141 JORGENSEN, L. N. et al. Dose-dependent impairment of collagen deposition by topical granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human experimental wounds. **Ann Surg**, v. 236, n. 5, p. 684-92, Nov 2002. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409676> >.
- 142 BORZINI, P.; MAZZUCCO, I. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point? **ISBT Science Series.**, v. 2, p. 272-281, 2007.

APÊNDICE A

1 DESCRIÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS (COLORAÇÃO HE)

Descrição das lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina, quanto à presença ou ausência de crosta, reepitelização e angiogênese.

Os grupos foram divididos, para a descrição, conforme o tratamento e tempo de pós-operatório. As lâminas, numeradas de 1 a 40, corresponderam a uma sequência do número dos animais, sendo a lâmina A, do Grupo Tratamento e a B, do Grupo Controle.

1.1 Grupo PRP e Grupo Controle do PRP com 7 dias de pós-operatório

Lâmina 1A

Lesão ulcerada com formação de crosta e reação inflamatória acentuada em suas bordas. Grau acentuado de angiogênese e infiltrado inflamatório moderado composto, predominantemente, por polimorfonucleares. Observou-se, também, no leito da lesão, tecido de granulação com conjuntivo frouxo e angiogênese acentuada.

Lâmina 1B

Lesão ulcerada que atingia derme, com crosta. No fundo da úlcera, observou-se tecido de granulação com angiogênese acentuada. As bordas do ferimento apresentaram reepitelização e reação inflamatória moderada composta, principalmente, por polimorfonucleares e alguns mononucleares. Nessa lesão, observou-se provável corpo estranho.

Lâmina 2A

Observou-se lesão extensa, com crosta, recobrimdo a área de tecido de granulação, com matriz colágena depositada e angiogênese moderada. As bordas da lesão apresentavam reepitelização incipiente.

Lâmina 2B

Observou-se, igualmente, lesão crostosa, com tecido de granulação e angiogênese intensa, em comparação à lâmina anterior. Observaram-se, também, áreas mais extensas de colagenização, quando comparadas à lâmina anterior.

Lâmina 3A

Lesão extensa, com supuração na sua superfície; uma camada supurativa leve e extensa área de tecido de granulação com angiogênese acentuada e infiltrado inflamatório intenso, predominantemente, polimorfonuclear. A lesão atingia toda a camada dérmica, estendendo-se até o equivalente hipodérmico.

Lâmina 3B

Lesão extensa, com formação de crosta e área de reepitelização em suas bordas cirúrgicas. Provável presença de corpos estranhos em ambas as margens da lesão. Seu leito era composto por tecido de granulação com proliferação de colágeno acentuada e angiogênese, igualmente, acentuada. A superfície do tecido de granulação mostrou infiltrado moderado, predominantemente, polimorfonuclear.

Lâmina 4A

Lesão extensa com cerca de 6 mm. Reepitelização parcial das bordas da ferida e extenso tecido de granulação em seu leito, com crosta na superfície. Nesse tecido de granulação, observou-se angiogênese acentuada e infiltrado polimorfonuclear moderado. Havia presença de células gigantes de corpo estranho nas bordas da lesão, granulomas de corpo estranho.

Lâmina 4B

Observaram-se corpos estranhos nas bordas do ferimento, com células gigantes, granulomas de corpo estranho. Presença de crosta na superfície e leito com tecido de granulação incipiente, relacionado às bordas da ferida. O centro da lesão mostrou micrólise intensa. Na área de granulação, observou-se infiltrado polimorfonuclear moderado, além da angiogênese intensa. Esse caso nos pareceu ter apresentado um efeito menos favorável.

Lâmina 5A

Lesão crostosa, intensa, com reepitelização completa sob ela e tecido de granulação maduro, com ordenamento de fibroblastos, deposição de colágeno e angiogênese discreta. Era uma lesão bastante avançada, com reepitelização total.

Lâmina 5B

Observou-se extensa crosta, sem reepitelização. A reepitelização ficava limitada às bordas das feridas operatórias. Intensa angiogênese e tecido de granulação inicial. Ficou muito evidente que a lâmina anterior apresentava reepitelização completa e estava em fase bastante avançada de reparo, quando comparada a esta.

Lâmina 6A

Mostrou lesão, igualmente crostosa, com angiogênese acentuada e tecido de reparo exuberante em área ulcerada. Ocorreu reepitelização apenas nas bordas da ferida operatória.

Lâmina 6B

Mostrou uma lesão crostosa, com reepitelização um pouco mais pronunciada, em comparação com a lâmina anterior. Tecido de granulação exuberante e angiogênese moderada. Comparando-se as duas lâminas, essa apresentava um pouco mais de reepitelização.

Lâmina 7A

Nessa lâmina, observou-se lesão com cerca de 4 mm, recoberta por crosta e exibindo extenso tecido de granulação na base da lesão. Angiogênese moderada e infiltrado inflamatório acentuado, predominantemente, polimorfonuclear, na zona do tecido de granulação. Observou-se, também, reepitelização incipiente das bordas da ferida.

Lâmina 7B

Nessa lâmina, observou-se lesão extensa, com cerca de 4 mm, recoberta com crosta que se estendeu, inclusive, pelo tecido epitelial íntegro, além da borda da

ferida. A base da ferida exibiu tecido de granulação abaixo da crosta. Angiogênese marcada e infiltrado inflamatório moderado, predominantemente, polimorfonuclear.

Lâmina 8A

Mostrou uma lesão também crostosa, sob o tecido de granulação bastante avançado, bastante maduro. Embora ainda não se observasse reordenamento de fibroblastos, havia uma reação inflamatória por polimorfonucleares e angiogênese moderada. A reepitelização se restringia às bordas da ferida operatória.

Lâmina 8B

Lesão crostosa, com reepitelização incipiente nas suas bordas. Tecido de granulação bem desenvolvido, com discreto realinhamento de fibroblastos. Angiogênese moderada a acentuada. Aparentemente, o tecido de granulação tinha características mais maduras, se comparado à lâmina A.

Lâmina 9A

Observou-se reepitelização extensa, embora incompleta. Por baixo da crosta, tecido de granulação bastante maduro e angiogênese discreta. Essa lâmina mostrou uma reepitelização significativa da lesão.

Lâmina 9B

Lesão crostosa, com reepitelização não tão marcada como na lâmina anterior. Tecido de granulação também parecia mais frouxo, com menos ordenação de colágeno e angiogênese mais intensa, se comparada com a lâmina anterior, mostrando que a lâmina 9B tinha um processo mais inicial.

Lâmina 10A

Nessa lâmina, observou-se a presença de crosta extensa, com reepitelização incipiente das bordas da ferida e tecido de granulação. Angiogênese acentuada e infiltrado inflamatório, predominantemente, polimorfonuclear, com eusínófilos de intensidade moderada.

Lâmina 10B

Lesão estimada em 3 mm, recoberta por crosta, exibindo ainda, na parte abaixo da crosta, infiltrado inflamatório, com provável conteúdo seroso. Houve reepitelização das bordas do ferimento e, na área de reepitelização, observou-se proliferação intensa de colágeno. Na base da úlcera, extensa área de tecido de granulação, com angiogênese muito acentuada e infiltrado inflamatório, predominantemente, polimorfonuclear, com raros eosinófilos. Essa lâmina chamou atenção pela presença de provável líquido seroso junto a uma das bordas da ferida.

1.2 Grupo PRP e Grupo Controle do PRP com 14 dias de pós-operatório**Lâmina 11A**

Observou-se cicatrização bastante avançada, com manutenção de anexos cutâneos. É chamativa, nesse caso, a presença de angiogênese marcada, se comparada à lâmina 11B. A impressão, subjetiva, foi de que a lâmina 11B tinha um processo de reparo mais avançado.

Lâmina 11B

Observamos cicatriz completa, com reepitelização total. Tecido de granulação inexistente. Deposição de colágeno bastante pronunciada, pouquíssima reação inflamatória e uma área de microcalcificação, chamativa, dentro de vaso. A cicatrização aqui pode ser considerada completa.

Lâmina 12A

Nesse caso, viu-se reepitelização completa, embora se mantenha ainda uma área crostosa por sobre a cicatriz. Angiogênese muito discreta e áreas e microcalcificação abaixo da lesão.

Lâmina 12B

Observou-se, igualmente, reepitelização completa. Tecido conjuntivo fibroso bastante bem reconstituído, angiogênese discreta e novamente áreas de calcificação em vasos.

Lâmina 13A

Mostrou deposição de colágeno extensa, angiogênese muito discreta e reepitelização da ferida. Evidenciou-se um processo, significativamente, avançado de cicatrização.

Lâmina 13B

Nessa lâmina, a área de lesão já se encontrava reduzida, provavelmente, por contração da cicatriz, e chamava a atenção a reepitelização, a presença de deposição de colágeno e a proliferação de fibroblastos. Angiogênese leve a moderada. Também se caracterizava por um processo avançado de reparo.

Lâmina 14A

Mostrou uma crosta sobre a lesão. A reepitelização não era completa e, por debaixo da crosta, via-se um tecido de granulação com extensa deposição de colágeno e angiogênese leve a moderada. Chamou a atenção, nesse caso, que o epitélio ainda não havia se reconstituído e o tecido de granulação era mais ativo, quando comparado à lâmina 14B. A reação inflamatória era composta, predominantemente, por mononucleares, na área do tecido de granulação.

Lâmina 14B

Observou-se reepitelização completa e tecido de granulação, praticamente, com deposição completa de colágeno. Grande número de fibroblastos e angiogênese discreta. A reação inflamatória no local estava bastante diminuída. Concluiu-se, na comparação das duas lâminas, que essa tinha um processo de cicatrização bem mais acelerado do que a 14A.

Lâmina 15A

Mostrou corpos estranhos nas bordas das feridas; em uma das bordas, reepitelização parcial, com uma pequena crosta. Observou-se, abaixo dessa região e por toda a área de cicatrização, uma angiogênese moderada, com proliferação fibroblástica acentuada e uma deposição mais amadurecida de colágeno. A reação inflamatória era muito discreta, predominando mononucleares. No entanto, chamava a atenção o fato de haver, ainda, áreas sem epitelização, com crosta sobreposta.

Lâmina 15B

Observamos ainda, de forma bastante contrastante, a presença de crosta, mas já com reepitelização completa, e uma deposição de colágeno bastante intensa. Angiogênese moderada e reação inflamatória ainda discreta a moderada, mas com predomínio, na verdade, de uma população mista de polimorfonucleares e mononucleares. Chamou a atenção a reepitelização bastante avançada do caso e a acentuada deposição de colágeno. Comparada à lâmina 15A, foi evidente a aceleração do processo de cicatrização.

Lâmina 16A

Observou-se reepitelização completa e, abaixo da área de reepitelização, deposição de colágeno acentuada, com angiogênese muito discreta. Presença de fibroblastos com colágeno maduro e discreto infiltrado inflamatório, predominantemente, mononuclear. Denotava-se um processo bastante acentuado de cicatrização.

Lâmina 16B

Mostrava, igualmente, reepitelização completa da lesão; deposição de colágeno bastante maduro, reação inflamatória mononuclear, de discreta a moderada e angiogênese bastante diminuída. Evidenciava-se processo de reparo bastante avançado. Observaram-se, nesse caso, algumas células gigantes, provavelmente, células de corpo estranho, com presença de reação nas bordas da lesão.

Lâmina 17A

Mostrou crosta, reepitelização parcial e proliferação fibroblástica no tecido de granulação, com angiogênese moderada a acentuada. Deposição de colágeno bastante significativa. Reação inflamatória com padrão misto, polimorfonuclear e mononuclear. Chamou atenção, nesse caso, a ausência de reepitelização completa.

Lâmina 17B

Nesse caso, também houve formação de crosta, com reepitelização incompleta, porém, o tecido de granulação era bem mais avançado, com deposição de colágeno bastante pronunciada. Presença de fibroblastos bem organizados e

angiogênese discreta. A lesão mostrava, na área da crosta, infiltração por polimorfonuclear e, na área do tecido de granulação, predomínio de mononucleares. Em comparação à lâmina 17A, evidenciou-se um processo de cicatrização mais avançado, porém, ainda com reepitelização incompleta.

Lâmina 18A

Observou-se tecido de granulação, com angiogênese moderada e extensas áreas de calcificação em matriz extracelular. A reepitelização ainda não era completa.

Lâmina 18B

Observou-se reepitelização completa da lesão, com tecido conjuntivo bem constituído. Angiogênese muito discreta. A impressão foi de que esse processo de reparo estava, discretamente, mais avançado em comparação com a lâmina 18A.

Lâmina 19A

Observou-se, nessa lâmina, reepitelização completa da lesão, sem área de calcificação no tecido examinado. Deposição de colágeno bastante maduro, bem marcado. Mínima angiogênese e deposição de colágeno jovem, no epicentro da lesão.

Lâmina 19B

Essa lâmina mostrou reepitelização completa. Área de calcificação nas bordas do ferimento operatório. Angiogênese discreta e tecido de granulação com colágeno depositado e organização de fibroblastos. Em comparação com a lâmina 19A, o processo cicatricial, nessa lâmina, foi bem menos avançado.

Lâmina 20A

Reepitelização completa, com deposição de colágeno maduro, mostrando uma cicatriz bastante avançada, um processo de reparo muito avançado.

Lâmina 20B

Observou-se, igualmente, tecido bastante maduro, embora, ainda existisse uma pequena área de lesão, sem epitelização, uma lesão ulcerada discreta, muito

pequena, na superfície. Comparando-se, na lâmina 20A, houve um processo muito mais avançado do que na 20B.

1.3 Grupo PRF e Grupo Controle do PRF com 7 dias de pós-operatório

Lâmina 21A

Essa lâmina mostrou crosta, com extenso tecido de granulação, ocupando toda a camada dérmica, estendendo-se até a hipoderma. Tecido de granulação composto por angiogênese acentuada, fibroblastos e infiltrado inflamatório intenso, predominantemente, polimorfonuclear. Observou-se a epitelização parcial das bordas e a ferida mostrou uma intensidade bastante acentuada de colágeno, em comparação ao outro grupo.

Lâmina 21B

Crosta recobrindo a lesão e extenso tecido de granulação, com fibrose já acentuada e reepitelização das bordas. O tecido de granulação continha, ainda, angiogênese acentuada e infiltrado inflamatório, predominantemente, polimorfonuclear, que se estendia até o equivalente hipodérmico.

Lâmina 22A

Presença de crosta sobre a lesão que, aparentemente, reduziu seu diâmetro. Observou-se a presença de tecido de granulação, com intensa proliferação de fibroblastos, e deposição de colágeno e angiogênese mais moderadas. Também, infiltrado inflamatório moderado, predominantemente, polimorfonuclear e reepitelização já mais completa das bordas cirúrgicas.

Lâmina 22B

Evidente reepitelização acentuada e crosta recobrindo a área da lesão. Abaixo da crosta, viu-se tecido de granulação, com deposição extensa de colágeno e grande proliferação de fibroblastos. Angiogênese mais moderada e infiltrado inflamatório leve, predominantemente, polimorfonuclear, comparado aos outros casos, mostrando um processo já mais avançado do reparo.

Lâmina 23A

Essa lâmina mostrou uma lesão recoberta, igualmente, por crosta, com reepitelização parcial, pouco pronunciada, das bordas da ferida. No entanto, o tecido de granulação, recoberto pela crosta, mostrava extensa proliferação fibroblástica, com angiogênese moderada e infiltrado inflamatório polimorfonuclear intenso.

Lâmina 23B

Observou-se uma lesão em torno de 2 a 3 mm, recoberta por crosta pouco espessa. Mostrava reepitelização, razoável, a partir das bordas da ferida, e extenso tecido de granulação, com angiogênese leve à moderada e grande proliferação fibroblástica, com deposição de colágeno. Essa lâmina, 23B, estava melhor do que a lâmina 23A.

Lâmina 24A

Mostrou extensa lesão crostosa, com mínima reepitelização. Tecido de granulação bastante maduro, com reordenação parcial de fibroblastos, angiogênese acentuada e a formação de uma bolha junto à crosta.

Lâmina 24B

Lesão crostosa, de extensão bastante menor, com reepitelização completa e tecido de granulação maduro, se comparado com a lâmina anterior. Comparando-se as lâminas, observou-se uma discreta diferença em relação à lâmina 24A, que parecia ter um processo menos avançado.

Lâmina 25A

Essa lâmina mostrou crosta intensa. Abaixo dessa crosta, observou-se tecido necrótico e, abaixo dessa área de tecido necrótico, um tecido de granulação bem formado, com extensa deposição de colágeno e com grande proliferação de fibroblastos. Angiogênese leve a moderada. Chamou a atenção, nesse caso, a reepitelização parcial muito deficiente, a partir das bordas e, igualmente, a presença de extensa reação inflamatória, abaixo da crosta, que se estendia, inclusive, além da ferida operatória.

Lâmina 25B

Observou-se uma lesão extensa. Não havia presença de crosta, porém, existia extensa proliferação de tecido fibroblástico, deposição de colágeno e angiogênese discreta. Esse tecido mostrou infiltrado inflamatório leve a moderado, predominantemente, polimorfonuclear, mas já exibindo mononucleares. A reepitelização das bordas era parcial; parecia um pouco melhor que a lâmina A.

Lâmina 26A

Mostrou reepitelização parcial das bordas e extenso tecido de granulação, com reordenação de colágeno e angiogênese bastante acentuada.

Lâmina 26B

Área extensa de lesão, com reepitelização parcial das bordas. Angiogênese moderada, deposição marcada de colágeno e algumas estruturas do tipo corpo estranho, nas bordas do ferimento. Em comparação com a lâmina anterior, o aspecto é rigorosamente o mesmo, não há diferença.

Lâmina 27A

Nessa lâmina, observou-se extensa formação crostosa sobre a lesão, recobrando a área de provável necrose e extensa reação inflamatória, predominantemente, polimorfonuclear. Presença de corpos estranhos e, abaixo, uma área de provável abscesso ou bolha. Observou-se, ainda, proliferação fibroblástica, com deposição de colágeno e angiogênese leve a moderada. Nessa área, o infiltrado inflamatório consistia de uma população mista de polimorfonucleares e mononucleares, mostrando um caráter, provavelmente, mais avançado do processo de reparo e da formação do tecido de granulação. A reepitelização era incipiente.

Lâmina 27B

Observou-se a formação de uma crosta extensa, com tecido de granulação abaixo da lesão. A angiogênese era leve a moderada, com extenso infiltrado inflamatório, já de características mononucleares, com alguns polimorfonucleares. A lesão tinha reepitelização incipiente, mas chamava à atenção a característica do tecido de granulação, que mostrava predomínio de mononucleares, indicando um processo de granulação mais avançado. No entanto, a parte superficial da lâmina

mostrava extensa reação inflamatória, polimorfonucleares, indicando um processo agudo, com necrose.

Lâmina 28A

Extensa lesão crostosa, com reepitelização apenas parcial das bordas do ferimento, tecido de granulação bem estabelecido com angiogênese moderada e deposição incipiente de colágeno, com reordenamento parcial dos fibroblastos.

Lâmina 28B

Mostrou, também, lesão crostosa, com reepitelização parcial das bordas. Formação de uma bolha, abaixo da crosta e, igualmente, angiogênese avançada com deposição de colágeno ordenada e fibroblastos organizados. Embora muito sutil, a impressão foi de que havia diferença, a favor da lâmina B, em relação à lâmina A.

Lâmina 29A

Observou-se crosta, com reepitelização parcial e tecido de granulação com transição de tecido mais imaturo para tecido de granulação bastante maduro, com deposição de colágeno. Reação inflamatória mínima e pouquíssima angiogênese, mostrando um processo de amadurecimento do reparo.

Lâmina 29B

Mostrou, igualmente, uma crosta extensa, por sob o tecido de granulação, também, bastante maduro, sendo chamativa a presença de alguns corpos estranhos. No entanto, a angiogênese mostrou-se mais marcada em comparação com a lâmina anterior e o processo de reparo não parecia tão bem consolidado como na lâmina 29A.

Lâmina 30A

Lesão crostosa, embora pequena, com fechamento bem avançado da lesão. Angiogênese moderada, tecido de granulação bem consolidado e um processo de reepitelização já bastante marcado, apesar de incompleto.

Lâmina 30B

Observou-se extensa ulceração, com reepitelização das bordas. Extenso tecido de granulação, com angiogênese, que variou de moderada a acentuada, e infiltrado inflamatório, predominantemente, mononuclear, com vários polimorfonucleares de permeio. A lesão tinha um processo de reparo não muito avançado.

1.4 Grupo PRF e Grupo Controle do PRF com 14 dias de pós-operatório**Lâmina 31A**

Observou-se reepitelização completa, com calcificação nas bordas da ferida, porém, já com deposição de colágeno maduro e angiogênese mínima, mostrando um processo bastante avançado de cicatrização.

Lâmina 31B

Observou-se o mesmo aspecto, com reepitelização completa, deposição de colágeno e áreas extensas de calcificação. No entanto, comparando-se as duas lâminas, observou-se que o processo encontrava-se, rigorosamente, no mesmo estágio, não havendo diferença entre elas.

Lâmina 32A

Essa lâmina exibia área bastante avançada de reepitelização, com colágeno maduro, sem outras características marcantes. A angiogênese não era chamativa. O processo cicatricial, bastante avançado. Chama atenção a manutenção dos anexos cutâneos.

Lâmina 32B

Mostrava-nos o mesmo aspecto da lâmina anterior, ainda com bastante tecido proliferativo, um número bastante marcado de fibroblastos, mas com reepitelização completa. A impressão era de que as duas lâminas estavam em estágios idênticos no processo de cicatrização.

Lâmina 33A

Chamou atenção a presença de corpos estranhos com células gigantes, formação de granuloma. Nas bordas da lesão, reepitelização completa e deposição de colágeno com fibroblastos bem organizados. Angiogênese e reação inflamatória, predominantemente, polimorfomononuclear, muito discretas. Evidenciou-se uma cicatriz bem estabelecida.

Lâmina 33B

Mostrou o colágeno muito organizado, reepitelização completa e atividade angiogênica muito discreta. Comparada ao caso 33A, a impressão que tivemos foi que o processo estava mais avançado.

Lâmina 34A

Mostrou uma discreta área em que havia deposição de colágeno, sendo que o restante da área de lesão já estava completamente preenchido por colágeno maduro e o tecido reepitelizado. Era uma área de cicatrização muito avançada.

Lâmina 34B

Mostrou uma área ainda com lesão crostosa, com ulceração bem pequena, superficial. Tecido de granulação ainda existente, angiogênese discreta e deposição de colágeno, além de calcificação. Comparando-se as duas lâminas, observou-se que a 34B estava em um estágio muito anterior de reparo.

Lâmina 35A

Mostrou-nos reepitelização completa da lesão, com atividade angiogênica discreta, presença de fibroblastos organizados, deposição de colágeno marcado, infiltrado inflamatório composto, predominantemente, por mononucleares, denotando um processo avançado de reparo.

Lâmina 35B

Mostrou uma crosta com angiogênese muito acentuada e reação inflamatória polimorfonuclear na superfície, com extensa deposição de colágeno. No infiltrado inflamatório, houve predomínio de polimorfonucleares. Essa lâmina mostrou um

processo avançado de reparo, no entanto, ainda exibia crosta e reepitelização incompleta.

Lâmina 36A

Reepitelização parcial, com formação de crosta recobrindo a área de tecido de granulação muito amadurecido, com extensa formação de colágeno, fibroblastos maduros, e discreto infiltrado inflamatório, predominantemente, polimorfonuclear. Atividade angiogênica discreta a moderada. Chamou atenção, no caso, a presença de crosta com reepitelização incompleta.

Lâmina 36B

Tinha como característica a reepitelização completa, com tecido de granulação muito amadurecido. Extensa deposição de colágeno, bastante maduro, e atividade angiogênica discreta a moderada. Observou-se, também, célula gigante de corpo estranho, pelo menos 3 a 4 células no leito da lesão. Comparado com a lâmina anterior, era evidente que o processo de cicatrização estava muito mais avançado.

Lâmina 37A

Mostrou reepitelização quase completa, com uma pequena crosta e presença de colágeno maduro. Proliferação fibroblástica marcada, reação inflamatória muito discreta, predominantemente, mononuclear. Chamou atenção, nesse caso, a presença de uma área focal muito pequena, com crosta, mostrando reepitelização incipiente.

Lâmina 37B

Também mostrou crosta em pequena área, sem reepitelização completa, recobrindo uma área de extensa deposição de colágeno. Atividade angiogênica muito marcada e infiltrado inflamatório moderado a acentuado, predominantemente, mononuclear. A atividade inflamatória, nesse caso, era maior, e a angiogênese, certamente, mais marcada, em comparação com o caso anterior. Comparando-se a lâmina 37A com a B, nesse caso, observou-se que a A teve uma resposta melhor.

Lâmina 38A

Observou-se uma área de cicatriz pequena, já bem madura, com colágeno bem depositado, reepitelização completa, e reorganização de anexos cutâneos, mostrando um processo bastante avançado de reparo.

Lâmina 38B

Mostrou reepitelização completa, deposição de colágeno marcada, com proliferação fibroblástica e atividade angiogênica moderada. Observou-se, ainda, infiltrado, predominantemente, mononuclear, mostrando uma cicatrização avançada. Observaram-se, também, áreas focais com células gigantes de corpos estranhos.

Lâmina 39A

Observou-se reepitelização completa, com deposição de colágeno por fibroblastos jovens, restrita à camada superficial, sendo o restante da lesão preenchida por colágeno bastante maduro. Um processo de cicatrização bastante avançado.

Lâmina 39B

Mostrou o mesmo processo, com a impressão, subjetiva, de apresentar um estágio ainda mais avançado de cicatrização, pois se observou deposição de colágeno bem maduro, na maior parte da área cicatricial. Também demonstrou um processo bastante avançado de reparo.

Lâmina 40A

Mostrou uma lesão crostosa ainda com angiogênese intensa. Fibroblastos jovens, mostrando um processo inflamatório ainda bastante ativo.

Lâmina 40B

Mostrou, na área de lesão, reepitelização completa, com deposição de fibroblastos. Angiogênese mínima no terço superficial, junto à derme papilar. A metade inferior da lesão também mostrou deposição de colágeno. Se comparada à lâmina anterior, essa era uma cicatriz bastante avançada.

2 DESCRIÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS (COLORAÇÃO PICROSÍRIUS)

Descrição das lâminas histológicas, coradas com picrosírius, quanto à deposição de colágeno nas feridas. Da mesma forma que na coloração HE, os grupos foram divididos, para a descrição, de acordo com o tratamento e tempo de pós-operatório. Novamente, as lâminas numeradas de 1 a 40, corresponderam a uma sequência do número dos animais, sendo a lâmina A do Grupo Tratamento e a B, do Grupo Controle.

2.1 Grupo PRP e Grupo Controle do PRP com 7 dias de pós-operatório

Lâmina 1A

Observou-se deposição muito incipiente de colágeno, com crosta intensa.

Lâmina 1B

Observou-se, igualmente, deposição muito incipiente de colágeno. Praticamente não havia diferença entre a lâmina 1A e 1B.

Lâmina 2A

Observou-se colagenização bastante delicada, com crostas sobrepostas.

Lâmina 2B

Colagenização incipiente, recoberta por crosta.

Lâmina 3A

Deposição muito incipiente de colágeno, com tramas delgadas.

Lâmina 3B

Observou-se deposição, igualmente, incipiente de colágeno. Não havia diferença entre a lâmina A e B.

Lâmina 4A

Deposição de colágeno muito inicial.

Lâmina 4B

Observou-se, igualmente, colagenização muito incipiente. Sem diferenças entre a A e a B.

Lâmina 5A

Observou-se colagenização muito incipiente, com colágeno bastante discreto.

Lâmina 5B

Colagenização incipiente, com tramas delicadas, no leito da lesão.

Lâmina 6A

Nessa lâmina, observou-se colagenização já mais marcada, com lesão crostosa sob a área de colagenização.

Lâmina 6B

Observou-se deposição incipiente de colágeno, com tramas delgadas.

Lâmina 7A

Deposição muito incipiente de colágeno, muito delgada, colágeno bastante delicado.

Lâmina 7B

Observou-se, igualmente, colagenização incipiente, muito sutil, inicial. Não apresentava diferença em comparação a lâmina 7A.

Lâmina 8A

Mostrou colagenização moderada na base da lesão.

Lâmina 8B

Colagenização marcada na base da lesão.

Lâmina 9A

Colagenização incipiente, com tramas delgadas.

Lâmina 9B

Observou-se, igualmente, colagenização incipiente.

Lâmina 10A

Deposição muito delicada de colágeno.

Lâmina 10B

Deposição, igualmente, muito incipiente de colágeno, com uma impressão subjetiva de que havia uma deposição menor, nessa lâmina, quando comparada à lâmina 10A.

2.2 Grupo PRP e Grupo Controle do PRP com 14 dias de pós-operatório**Lâmina 11A**

Observou-se colagenização acentuada.

Lâmina 11B

Colagenização, igualmente, acentuada, com fibras mais grossas de colágeno.

Lâmina 12A

Deposição de colágeno com fibras mais organizadas, bastante acentuadas.

Lâmina 12B

Colagenização, igualmente, acentuada.

Lâmina 13A

Observou-se colagenização do leito da ferida, bastante intensa. Foi interessante notar que não havia epiderme recobrindo a lesão ou crosta.

Lâmina 13B

Mostrou epiderme com deposição de colágeno moderada no centro da lesão. Na área da lesão, observou-se, também, perda da camada muscular, que,

provavelmente, foi atingida no momento da confecção da lesão, mas foi evidente a deposição de colágeno, mais espesso, em contraste com as bordas do ferimento.

Lâmina 14A

Mostrou cicatriz com crosta ainda evidente, e tecido conjuntivo com deposição de colágeno. Colágeno ainda pouco denso, em comparação ao colágeno além da borda da ferida operatória, demonstrando um ferimento em etapa mais precoce de reparo.

Lâmina 14B

Observou-se deposição bastante acentuada de colágeno, nas zonas de cicatriz, com reepitelização. Esse colágeno era muito denso, mostrando uma etapa bastante avançada do reparo.

Lâmina 15A

Área de cicatriz com crosta. Chama atenção a colagenização precoce, com uma deposição muito fina de colágeno, em comparação com o tecido após a margem da ferida.

Lâmina 15B

Colagenização intensa na área do ferimento, chamando atenção também para um padrão de colágeno, em geral, mais espesso, se comparado à lâmina 15 A.

Lâmina 16A

Mostrou uma cicatriz com deposição de colágeno intermediária, com reepitelização quase completa.

Lâmina 16B

Mostrou área de deposição muito menos densa de colágeno, quando comparada com a lâmina A.

Lâmina 17A

Observou-se crosta e intensa angiogênese; deposição intermediária de colágeno, ou seja, com fibras intermediárias, se comparadas com o colágeno após a margem da lesão.

Lâmina 17B

Lesão com crosta e deposição de colágeno mais intensa, se comparada à lâmina A.

Lâmina 18A

Colagenização bastante intensa no ferimento, já em retração.

Lâmina 18B

Observou-se, igualmente, colagenização acentuada do leito da lesão, com reepitelização completa, visível.

Lâmina 19A

Observou-se, também, colagenização bastante acentuada, com áreas de colágeno muito maduro.

Lâmina 19B

Observou-se, deposição de colágeno acentuada, com fibras mais grossas e com orientação espacial mais organizada.

Lâmina 20A

Colagenização ainda intermediária, marcada. Chama a atenção a reepitelização completa da lesão.

Lâmina 20B

Colagenização acentuada, embora não tão organizada quanto à 20A.

2.3 Grupo PRF e Grupo Controle do PRF com 7 dias de pós-operatório

Lâmina 21A

Observou-se muita angiogênese e crosta superficial, sem reepitelização, colágeno ainda em fase inicial.

Lâmina 21B

Mostrou deposição de colágeno um pouco mais intensa, em comparação com a lâmina A, porém, ainda com tramas delicadas.

Lâmina 22A

Nessa lâmina, observou-se, deposição incipiente de colágeno, porém, ainda existia crosta e, seguramente, reação inflamatória, e bastante angiogênese.

Lâmina 22B

Mostrou, exatamente, o mesmo aspecto, com deposição de colágeno incipiente. Não se percebeu diferença evidente, em expressão microscópica, entre as lâminas 22A e 22B.

Lâmina 23A

Observou-se, nessa lâmina, crosta intensa, reação inflamatória e também deposição incipiente de colágeno.

Lâmina 23B

Observou-se, também, deposição muito incipiente de colágeno. Subjetivamente, a lâmina 23B parecia ter menor deposição de colágeno, comparada à lâmina A.

Lâmina 24A

Observou-se, nessa lâmina, colagenização moderada.

Lâmina 24B

Deposição de colágeno mais espessa, com distribuição espacial pouco organizada.

Lâmina 25A

Colagenização incipiente, crosta muito evidente e reação inflamatória.

Lâmina 25B

Colagenização igualmente incipiente, porém, já mais intensa, se comparada à lâmina A.

Lâmina 26A

Observou-se colagenização moderada.

Lâmina 26B

Deposição incipiente de colágeno.

Lâmina 27A

Observou-se deposição de colágeno um pouco mais intensa, comparada ao caso anterior.

Lâmina 27B

Chamou atenção uma deposição mais intensa de colágeno por debaixo da crosta. Essa lâmina apresentou um processo de reparo, definitivamente, mais avançado, quando comparada às anteriores.

Lâmina 28A

Observou-se colagenização incipiente a moderada.

Lâmina 28B

Colagenização moderada.

Lâmina 29A

Deposição de colágeno moderada.

Lâmina 29B

Colagenização moderada, com distribuição espacial pouco organizada.

Lâmina 30A

Observou-se colagenização moderada.

Lâmina 30B

Colagenização bem menos acentuada.

2.4 Grupo PRF e Grupo Controle do PRF com 14 dias de pós-operatório**Lâmina 31A**

Observou-se deposição de colágeno com fibras mais grossas.

Lâmina 31B

Colagenização moderada a acentuada, com deposição de colágeno maduro nas bordas.

Lâmina 32A

Observou-se colagenização acentuada, fibras colágenas bem organizadas.

Lâmina 32B

Colagenização acentuada, com reepitelização completa.

Lâmina 33A

Observou-se deposição de colágeno e reepitelização completa, sendo que esse colágeno já mostrava amadurecimento maior.

Lâmina 33B

Observou-se, nessa lâmina, igualmente, a deposição de colágeno mais denso e reepitelização completa da lesão.

Lâmina 34A

Colagenização acentuada, com orientação espacial mais organizada.

Lâmina 34B

Colagenização, igualmente, bastante acentuada, com fibras grossas.

Lâmina 35A

Observou-se deposição de colágeno, no entanto, essa deposição ainda foi de fibras finas, com angiogênese acentuada, mas já se observou reepitelização.

Lâmina 35B

Essa lâmina mostrou deposição mais densa de colágeno, sendo essas fibras de densidade média. Ao comparar-se a lâmina 35A com a B, a lâmina B mostrou muito mais deposição de colágeno.

Lâmina 36A

Mostrou lesão ainda com crosta, mas já com deposição intermediária de colágeno. O colágeno ainda era fino e, relativamente, pouco definido, se comparado à lâmina B.

Lâmina 36B

Lesão totalmente reepitelizada, nessa lâmina 36B, com uma deposição de colágeno moderada, porém, mais intensa, se comparada à lâmina 36 A.

Lâmina 37A

Mostrou reepitelização, com intensa deposição de colágeno, sendo o colágeno bastante espesso.

Lâmina 37B

Exibiu colagenização, igualmente, marcada, mas não tão intensa como na lâmina 37A. Colágeno menos espesso e organizado. A lesão ainda apresentou crosta.

Lâmina 38A

Colagenização acentuada.

Lâmina 38B

Deposição de colágeno moderada, com reepitelização completa.

Lâmina 39A

Observou-se deposição de colágeno maduro, com reepitelização completa.

Lâmina 39B

Deposição de colágeno maduro, reepitelização completa, porém, menos intensa que a 39A.

Lâmina 40A

Deposição de colágeno maduro, bastante evidente. Chamou a atenção, em contraste com o caso anterior, que os anexos não se reorganizaram de maneira tão chamativa, o que seria esperado nesse período do processo de reparo.

Lâmina 40B

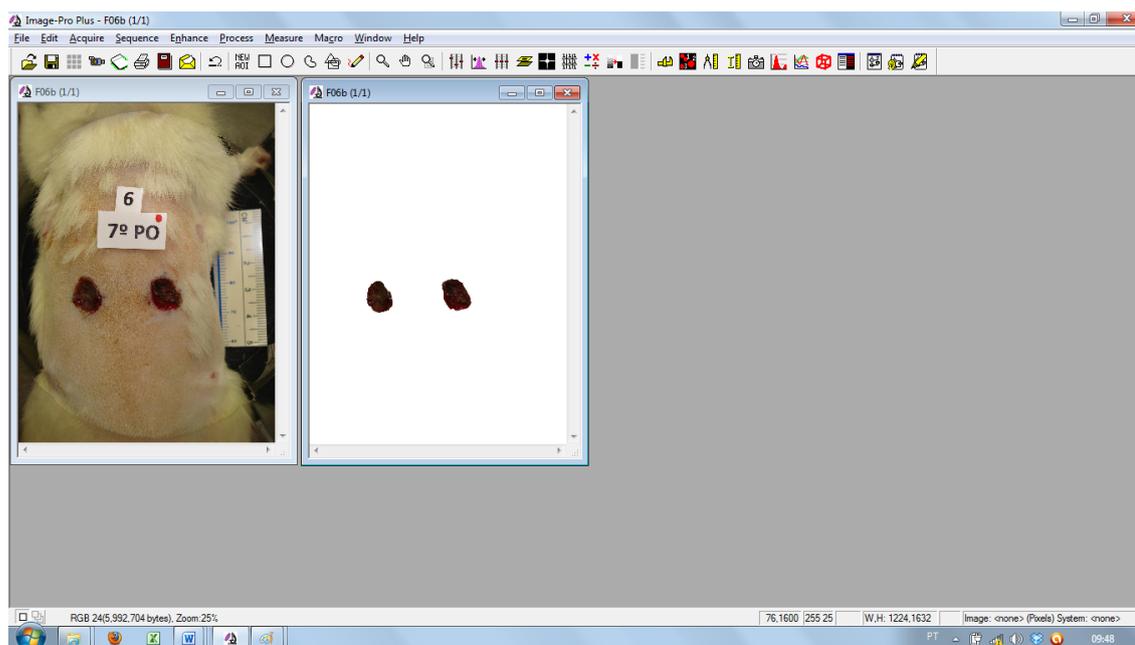
Colagenização acentuada.

APÊNDICE B

1 PROCEDIMENTO PADRÃO PARA MENSURAÇÃO DAS ÁREAS DAS FERIDAS CUTÂNEAS DOS RATOS

1.1 Abrir ambas as imagens, foto do rato com as feridas e foto das feridas individualizadas no software Image-Pro[®] Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.). A individualização das feridas foi realizada com o programa Adobe[®] Photoshop[®] CS5 Extended, versão 12.0x32 (Adobe Systems Incorporated, EUA), (Figura 1). File > Open... ou arrastar as imagens para a área de trabalho do programa ou utilizar o ícone .

Figuras 1 – Início do processo de mensuração das feridas



Ambas as imagens, foto do rato com as feridas cutâneas e foto das feridas individualizadas, abertas na área de trabalho do software Image-Pro[®] Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.).

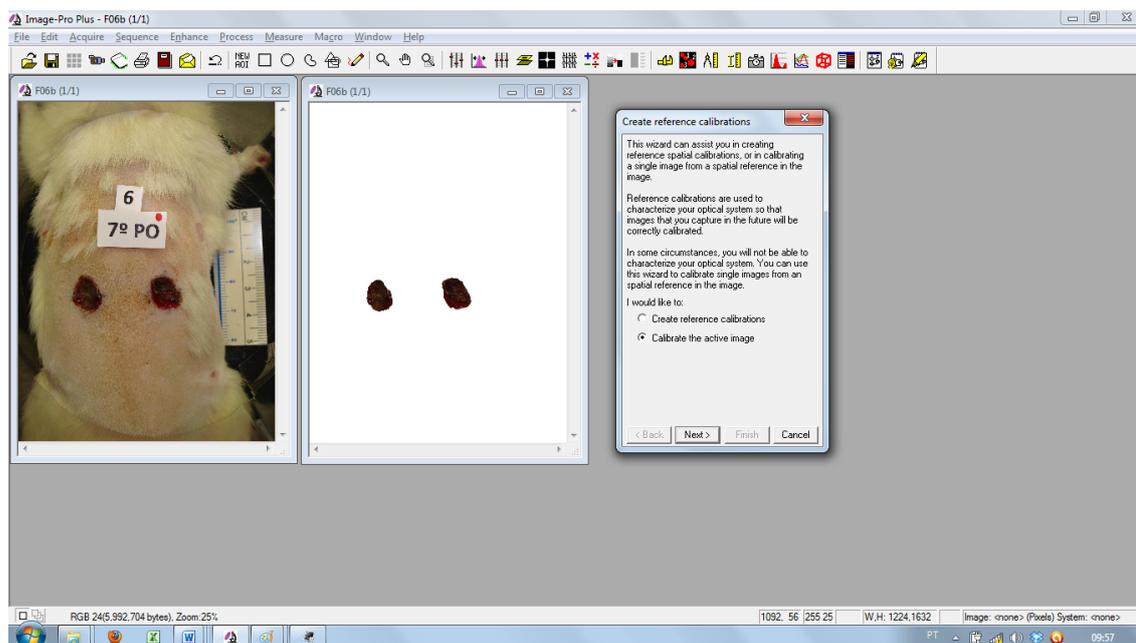
A imagem do rato será usada para calibrar a imagem das feridas individualizadas (utilizando a régua justaposta ao animal).

1.2 Calibração da imagem das feridas individualizadas

1.2.1 Measure > Calibration ► > Spatial Calibration Wizard...

A caixa *Create reference calibrations* abrirá (Figura 2).

Figuras 2 – Criação da calibração



Início da utilização do *Spatial Calibration Wizard*.

1.2.2 Selecionar a imagem do rato (clikando sobre ela), escolher a opção “*Calibrate the active image*” e clicar em [Next >].

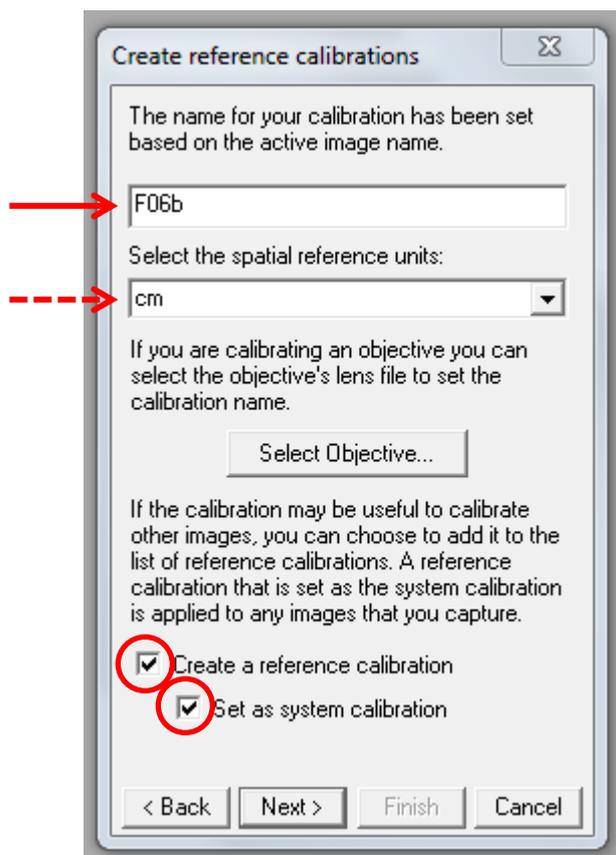
1.2.3 Como configuração padrão, o nome da calibração de referência será o nome da imagem (é importante que nesta etapa as fotos estejam devidamente identificadas).

1.2.4 Na opção *select the spatial reference units*:, selecionar **cm** (Figura 3).

1.2.5 Certificar-se de marcar ambas as opções finais: *Create a reference calibration* e *Set as system calibration*.

1.2.6 Prosseguir clicando em [Next >].

Figura 3 – Create Reference Wizard



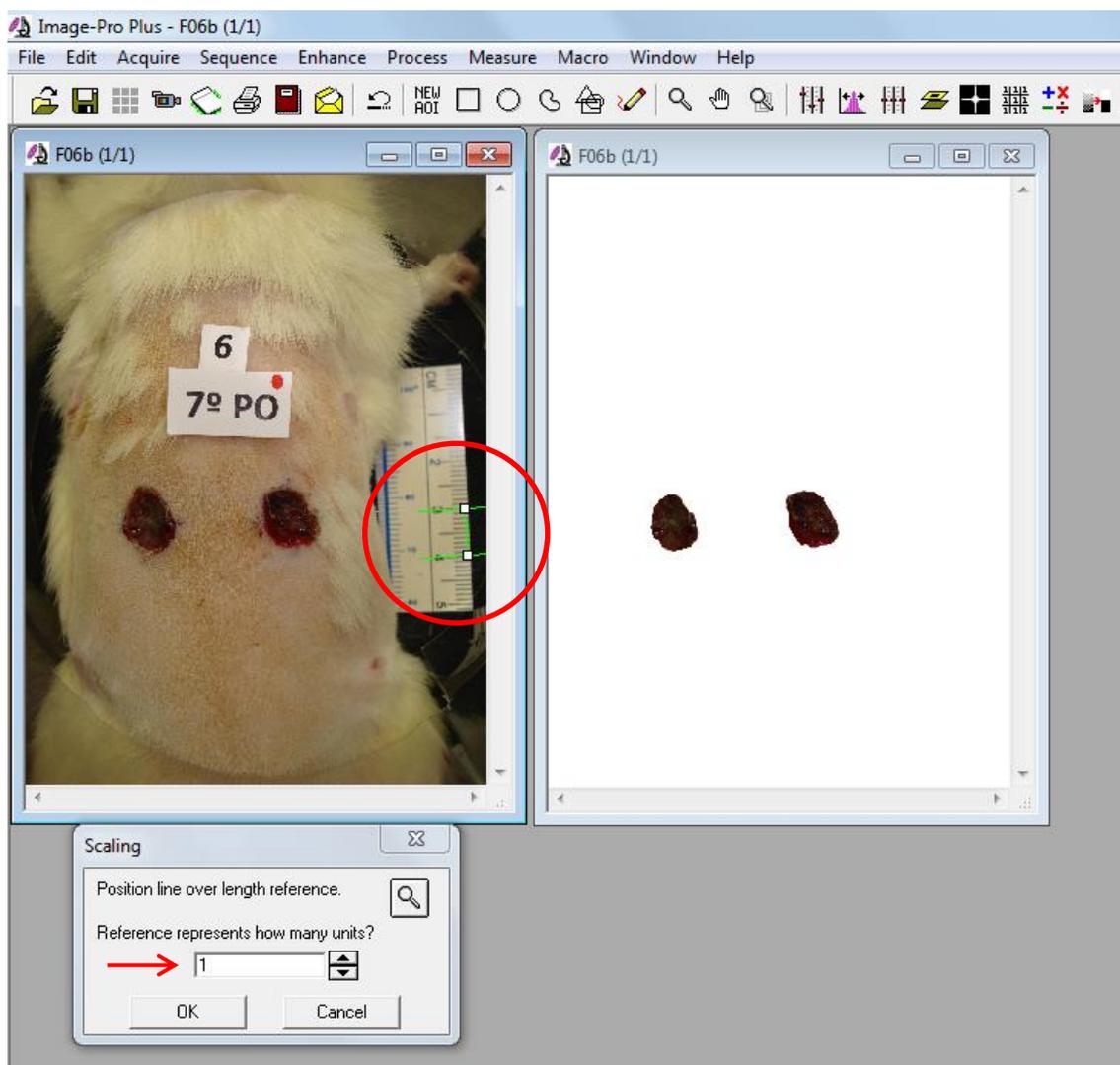
Nome da calibração de referência (→); unidade da calibração (-----→).

1.2.7 Selecionar a opção *Draw Reference Line*. A caixa *Scaling* se abrirá e a linha de referência (verde-limão, padrão do software) aparecerá sobre a imagem (Figura 4). Caso a linha verde apareça sobre a imagem das feridas individualizadas, voltar para o passo 1.2.2 e certificar-se de que a imagem do rato é a imagem ativa.

1.2.8 Na caixa *Scaling*, alterar a unidade de representação para 1 (normalmente o padrão do software apresenta 10 como unidade).

1.2.9 Arrastar a linha de referência (verde-limão, padrão do software) sobre a régua na imagem do rato. Manipular a linha para que ela se mantenha sobre 1 cm da régua. Esse passo definirá quantos pixels da imagem representarão 1 cm na mensuração, posteriormente. Clicar em [OK].

Figura 4 – Referência de calibração



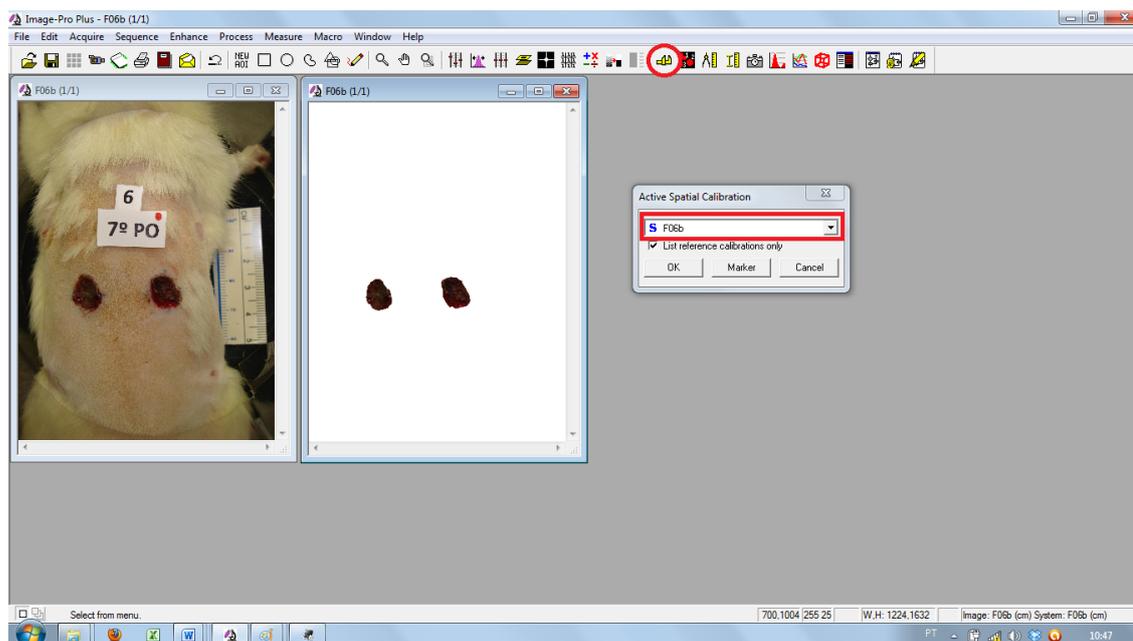
Seleção da unidade de representação (→); manipulação da linha de referência sobre a régua para ajuste de 1 cm (circulado na figura).

1.2.10 A caixa *Create reference calibrations* reaparecerá. Avançar e terminar em [Next>] e [Finish].

1.2.11 Selecionar a imagem das feridas individualizadas (clitando sobre ela) e utilizar a ferramenta *Spatial calibration*.( ícone da barra de ferramentas). A caixa *Active Spatial Calibration* abrirá.

1.2.12 Selecionar a calibração de referência criada nos passos 1.2.2 a 1.2.10 (o nome deve ser o mesmo da foto do rato, cuja ferida individualizada está sendo calibrada, padrão do software, Figura 5). Clicar em [OK]. Confirmar a calibração no canto inferior direito da área de trabalho.

Figura 5 – Escolha da calibração criada



Utilização da calibração, criada através da ferramenta *Spatial Calibration*. A calibração, pelo padrão do software, deverá ter o mesmo nome da foto do rato cuja ferida está sendo calibrada.

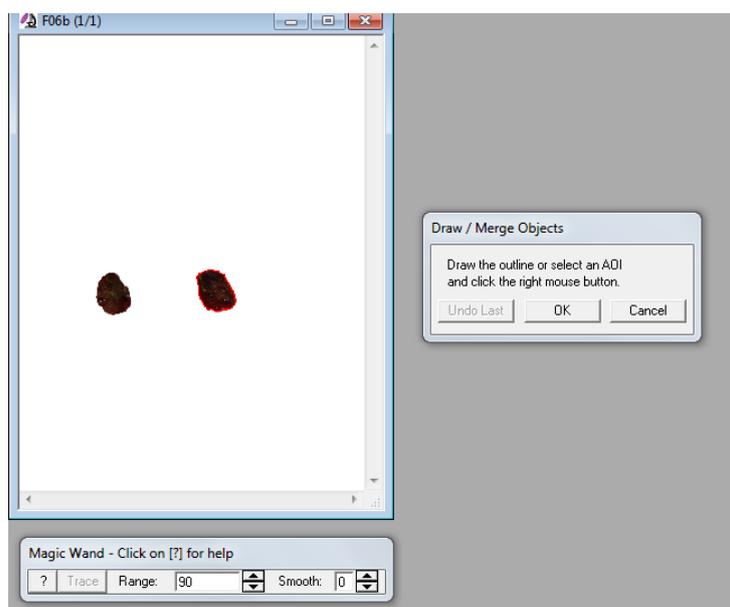
1.3 Mensuração das lesões individualizadas

1.3.1 Com a calibração estabelecida, utilizar a ferramenta *Count and measure objects* (ícone  da barra de ferramentas). No menu da ferramenta (caixa *Count/Size*) selecionar *Edit > Draw/Merge Objects*. Duas caixas abrirão: a caixa *Draw/Merge Objects* e uma segunda, que será a caixa *Trace* ou a caixa *Wand*. Caso a caixa *Trace* apareça, clicar no botão [Wand] contido nela.

1.3.2 O ponteiro do mouse deverá ter a forma de uma varinha (caso não tenha essa forma, revisar o passo 1.3.1).

1.3.3 Clicar com o botão esquerdo do mouse sobre uma das feridas, ela deverá ser contornada por uma linha vermelha. Em geral, a ferida inteira ganha o contorno corretamente. Caso isso não ocorra, continuar clicando com o botão esquerdo do mouse em partes não contornadas da ferida, até que ela fique como na Figura 6 (abaixo). Caso, erroneamente, o fundo branco da imagem seja contornado, utilizar o botão [Undo Last] para desfazer a última ação.

Figura 6 – Ferramenta de contorno

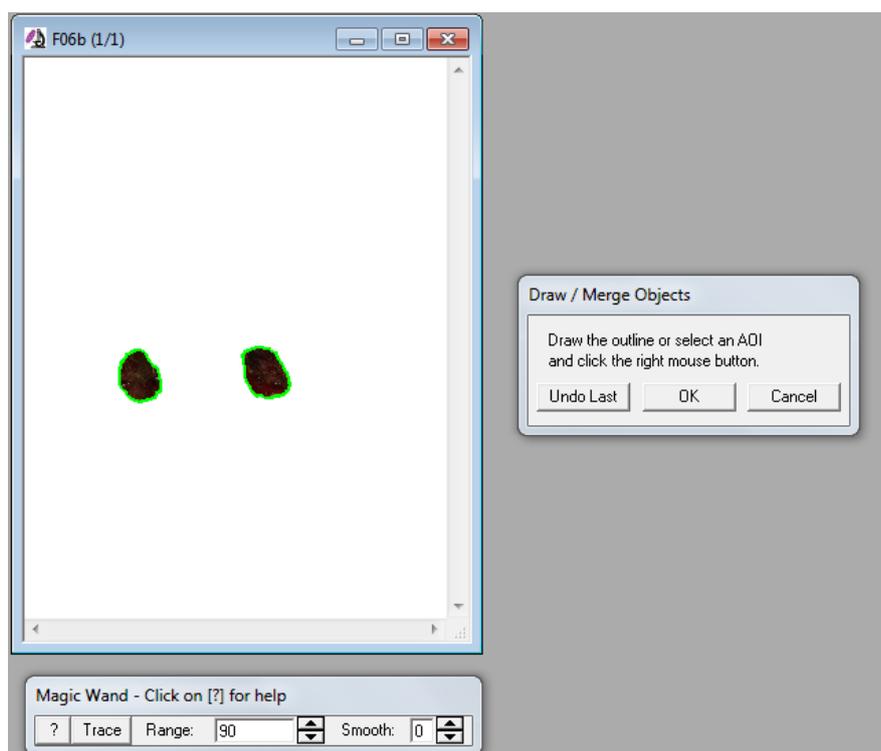


Utilização da ferramenta *Draw/Merge Objects*. Com a *MagicWand* a ferida foi totalmente selecionada (contorno vermelho em torno de toda a ferida).

1.3.4 Clicar com o botão direito do mouse em qualquer lugar para finalizar a seleção dessa ferida. O contorno vermelho deverá se tornar verde-limão (veja Figura 7).

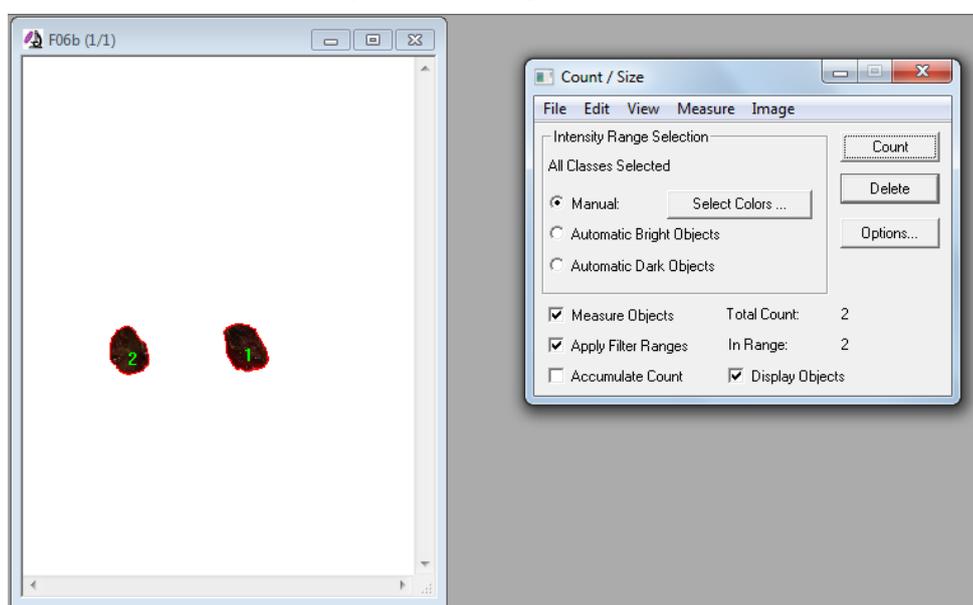
1.3.5 Repetir os passos 1.3.3 e 1.3.4, na outra ferida. As duas feridas deverão estar completamente contornadas com uma linha verde-limão nesse ponto. Clicar em [OK] na caixa *Draw/Merge Objects*. A caixa *Count/Size* deverá reaparecer.

Figura 7 – Confirmação do contorno



Fim do processo de seleção das feridas. A ferida ganha um contorno verde-limão que a caracteriza como um objeto a ser medido.

Figura 8 – Contagem de objetos



Após o passo 1.3.5 a caixa *Count/Size* reaparece e cada objeto (ferida) ganha um número correspondente. O objeto 1 sempre será o objeto mais superior e esquerdo.

Nessa etapa, cada ferida estará marcada com um número (Figura 8). É importante prestar atenção porque, nem sempre, a primeira ferida (a da esquerda) será a número 1.

APÊNDICE C

1 PROCEDIMENTO PADRÃO PARA CAPTURA DAS IMAGENS (FOTOS) DAS LÂMINAS

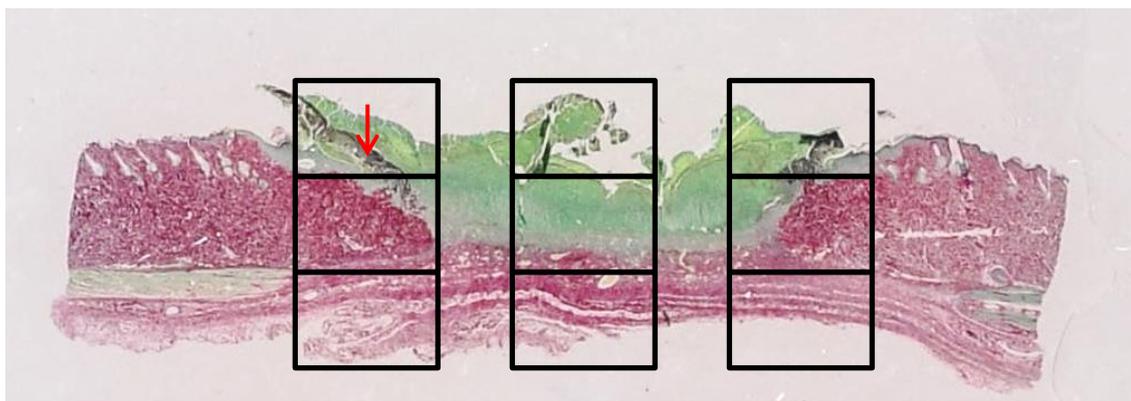
1.1 Ligar o microscópio (microscópio óptico Zeiss Axioskop 40), ajustar a luz, verificar que a objetiva de 5x esteja posicionada e que ambos os polarizadores, superior e inferior, estejam em posição.

1.2 Abrir o software Image-Pro[®] Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.), com o kit CoolSNAP[™]-Pro *cf* acoplado/instalado a ele. Clique no botão  para iniciar o *preview* da captura. Caso ele não inicie automaticamente, clicar em [Preview].

1.3 Antes de iniciar a captura, escolher uma amostra de ferida da lâmina, que facilite a determinação do centro e as transições entre tecido reepitelizado e tecido lesado (direita e esquerda). Feridas com formato de “U” e que estejam dispostas horizontais em relação à lâmina são preferidas (ver Figura 1 e 2).

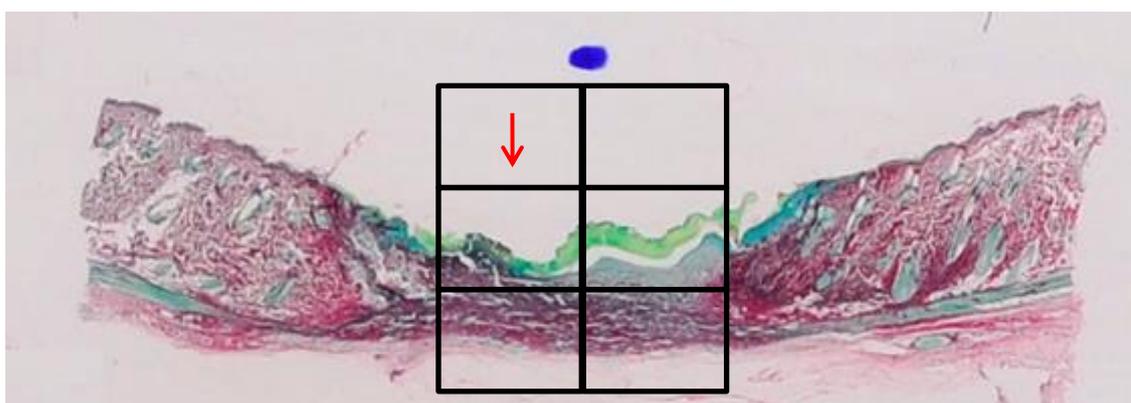
1.4 Serão realizadas capturas das transições entre tecido reepitelizado e tecido lesado, da direita e da esquerda, bem como a captura das imagens do centro da ferida, para as lâminas do 7º P.O., coradas com picrosírius. Nas lâminas do 14º P.O., devido as feridas estarem bastante reepitelizadas e consideravelmente menores, optou-se por realizar uma captura a partir do centro, com uma amostragem de 2 fotos de largura (o que assegurou a captura da transição entre tecido reepitelizado e tecido lesado, tal qual as imagens de 7º P.O.). O número de fotos verticais foi determinado pelo tamanho vertical da ferida. Certificar-se de que toda a extensão da pele esteja contemplada no conjunto de fotos daquele ponto da ferida (centro, direita ou esquerda). As figuras 1 e 2 representam um esquema da disposição das fotos em relação à ferida, macroscopicamente.

Figura 1 – Representação da captura no 7º P.O.



Representação (fora de escala) da captura de fotos nas lâminas com feridas no 7º P.O. Cada quadrado (□) representa uma captura, ou seja, uma foto. A referência para as fotos da direita e da esquerda é a transição entre tecido reepitelizado e crosta/ferida (→).

Figura 2 – Representação da captura no 14º P.O.



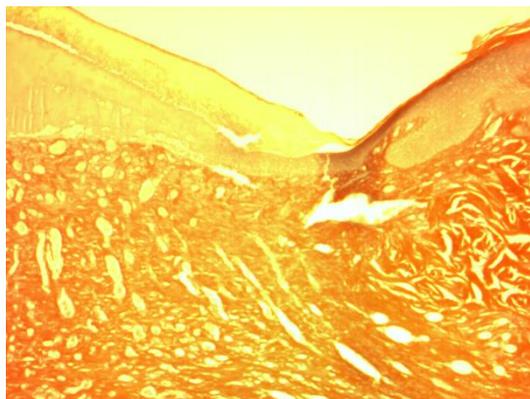
Representação (fora de escala) da captura de fotos nas lâminas com feridas no 14º P.O. Cada retângulo (□) representa uma captura, ou seja, uma foto. A referência para as fotos é o centro da ferida (→).

1.5 Feridas do 7º P.O. (para feridas do 14º P.O. vá para página 131)

1.5.1 Captura das imagens da transição entre tecido normal e tecido lesado (direita e esquerda)

1.5.1.1 Posicionar a lâmina no microscópio. Com apenas um dos polarizadores inseridos, no aumento 5x, procurar pela junção entre tecido reepitelizado e crosta/tecido lesado. Posicionar essa transição no centro de captura da foto (ver Figura 3). É útil utilizar o *preview* do software Image-Pro® Plus para prever como será a captura final.

Figura 3 – Zona de transição não polarizada



Transição entre tecido reepitelizado (direita da imagem) e tecido lesado (esquerda da imagem). Captura sem luz polarizada.

1.5.1.2 Inserir o segundo polarizador, de maneira a bloquear a luz e permitir a visualização do picrosírius corando o colágeno (ver Figura 4). Perceber se não houve movimentação do microscópio entre os passos 1.5.1.1 e 1.5.1.2, garantindo que a transição entre os tecidos manteve-se centralizada na foto. Pressionar [Snap] para capturar a imagem.

Figura 4 – Zona de transição polarizada



Transição entre tecido reepitelizado (direita da imagem) e tecido lesado (esquerda da imagem). Captura com luz polarizada.

1.5.1.3 Mover o microscópio verticalmente, para baixo, a fim de capturar a próxima foto nesse ponto da ferida. Esse passo deve ser feito com extrema cautela, a fim de que não haja sobreposição de imagens ou um “gap” de captura entre fotos adjacentes. A melhor maneira de garantir essa perfeita transição entre fotos é fixar um dos pontos inferiores da imagem anterior e girar o charriot do microscópio até que esse desapareça. É muito importante não mover o charriot de maneira a

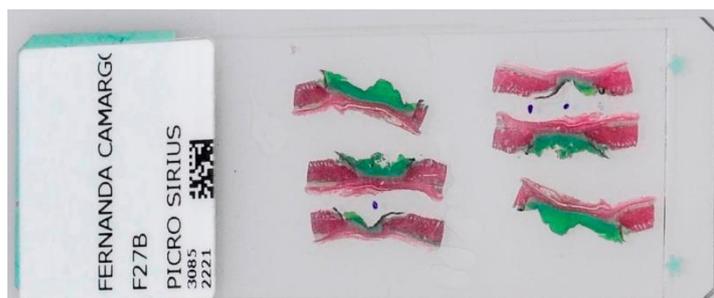
deslocar o eixo horizontal de captura. Esse processo é repetido até que toda a extensão vertical da ferida esteja capturada (normalmente 3 a 4 fotos). Pressionar [Snap] para captura.

1.5.1.4 Os passos 1.5.1.1 a 1.5.1.3 devem ser repetidos no ponto de transição do tecido reepitelizado e tecido lesado, do lado oposto (lesão em "U").

1.5.2 Captura de imagem do centro da ferida

1.5.2.1 Para identificar corretamente o centro da ferida, macroscopicamente, marque a transição entre os tecidos na lâmina com uma caneta. O ponto médio entre as duas marcações representa o centro da ferida (ver Figura 5).

Figura 5 – Marcação do centro da ferida no 7º P.O.



Exemplo do uso de marcas macroscópicas, feitas com o auxílio de régua, para determinar a captura da imagem do centro da ferida.

1.5.2.2 Posicionar a lâmina no microscópio. Com apenas um dos polarizadores inseridos, no aumento 5x, procurar pela marca de caneta que indica o centro da ferida. Posicionar a marca no centro de captura da foto.

1.5.2.3 Inserir o segundo polarizador de maneira a bloquear a luz e permitir a visualização do picrosírius corando o colágeno. Perceber se não houve movimentação do microscópio entre os passos 1.5.2.2 e 1.5.2.3, garantindo que o centro da ferida manteve-se centralizado na foto. Pressionar [Snap] para capturar a imagem.

1.5.2.4 Repetir o passo 1.5.1.3.

Observação: cada ferida no 7º P.O. terá três conjuntos de fotos, um do centro e um para cada transição entre tecido reepitelizado e lesado (direita e esquerda). Cada conjunto é formado de 2 a 5 fotos adjacentes. É importante nomear essas fotos de maneira sistemática, de modo que elas não se misturem no momento da análise histomorfométrica.

1.6 Lesões do 14º P.O. (para lesões do 7º P.O. vá para a página 128)

1.6.1 Marcar o centro da ferida

Para identificar corretamente o centro da ferida, medir com uma régua macroscopicamente. O ponto médio deve ser marcado com uma caneta (ver Figura 6).

Figura 6 – Marcação do centro da ferida no 14º P.O.

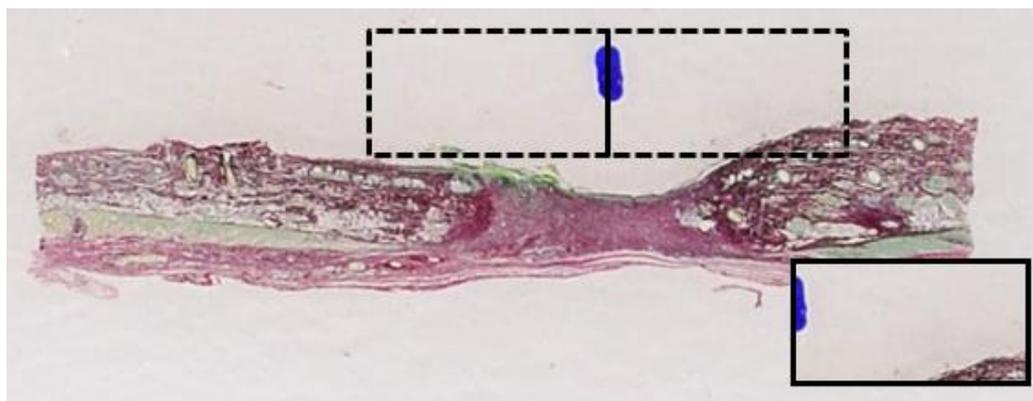


Exemplo do uso de marcas macroscópicas, feitas com o auxílio de régua, para determinar o centro da ferida.

1.6.2 Capturar as imagens

1.6.2.1 Posicionar a lâmina no microscópio. Com apenas um dos polarizadores inseridos, com objetiva de 5x, procurar pela marca de caneta indicando o centro da ferida. Posicionar o *preview* do software Image-Pro® Plus, de maneira que a marca de caneta fique no meio de duas fotos adjacentes, uma à direita e outra à esquerda (ver Figura 7).

Figura 7 – Posicionamento da primeira captura no 14º P.O.

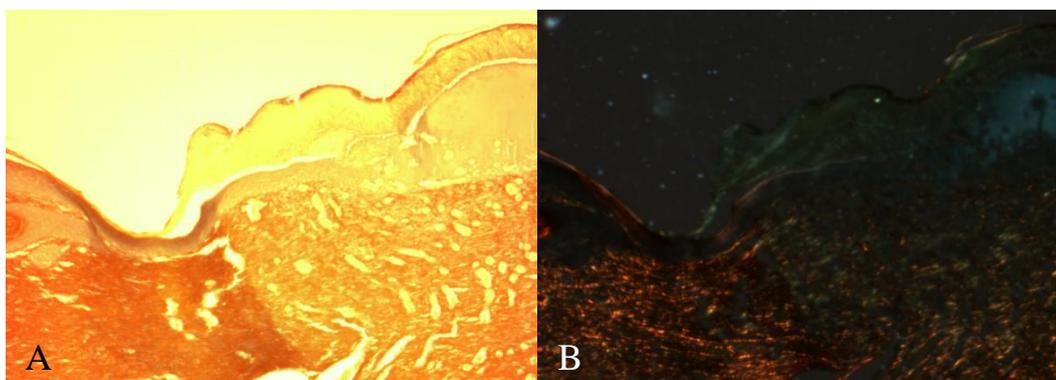


Esquema do posicionamento inicial, para captura das imagens da ferida do 14º P.O. A marcação do centro da ferida deve ser dividida entre as duas imagens adjacentes. No canto inferior direito da imagem há um exemplo do que deve ser visto no *preview* do software Image-Pro® Plus.

1.6.2.2 Inserir o segundo polarizador de maneira a bloquear a luz e permitir a visualização do picrosírius corando o colágeno.

1.6.2.3 Perceber se não houve movimentação do microscópio entre os passos 1.6.2.1 e 1.6.2.2 (ver Figura 8). Pressionar [Snap] para capturar a imagem.

Figura 8 – Captura no 14º P.O. com e sem polarização



Ferida do 14º P.O. A) Captura sem polarização. B) Captura com polarização.

1.6.2.4 Após capturar um dos lados das duas imagens centrais da ferida, repetir os passos 1.6.2.1 a 1.6.2.3.

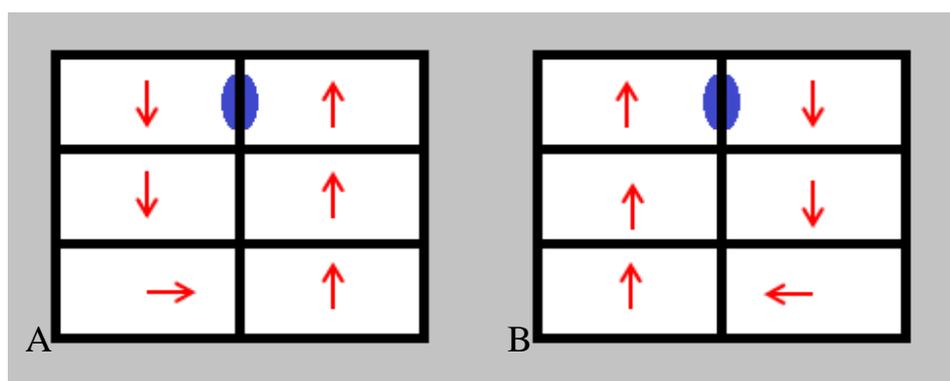
1.6.2.5 Quando toda a extensão vertical da ferida estiver contemplada nas fotos, passar para o outro lado do centro (da direita para a esquerda ou vice-versa). A

partir da última imagem, fixar um dos pontos laterais (adjacente à próxima foto). Mover o charriot apenas horizontalmente dessa vez.

1.6.2.6 Repetir o passo 1.6.2.4 de maneira invertida, para esse lado da ferida agora. No caso, de baixo para cima, até que toda a extensão vertical esteja capturada (normalmente de 2 a 4 fotos). É muito importante não mover o charriot de maneira a deslocar o eixo horizontal de captura.

Observação 1: Caso a captura se inicie pelo lado direito da marca do centro da ferida, o processo de captura terá sentido anti-horário. Caso o processo inicie pelo lado esquerdo, o processo de captura terá sentido horário. Veja o esquema na Figura 9.

Figura 9 – Esquema da sequência de captura



Esquema do sentido de captura das imagens das lesões do 14º P.O. A) Início da captura à esquerda da marcação do centro da ferida: (●) captura no sentido horário (→). B) Início da captura à direita da marcação do centro da ferida: captura no sentido anti-horário.

Observação 2: Cada ferida do 14º P.O. terá dois conjuntos de fotos, um à direita do centro, e outro à esquerda do centro. Cada conjunto é formado por 2 a 4 fotos adjacentes. É importante nomear essas fotos de maneira sistemática, de modo que elas não se misturem, no momento da análise histomorfométrica.

APÊNDICE D

1 PROCEDIMENTO PADRÃO PARA SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO CORADO COM PICROSÍRIUS E EXPORTAÇÃO DE DADOS PARA O MICROSOFT EXCEL

1.1 Abrir a imagem no software Image-Pro[®] Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.) (Figura 1). File > Open... ou arrastar a imagem para a área de trabalho do programa ou utilizar o ícone  .

Figura 1 – Início do processo de contagem de colágeno

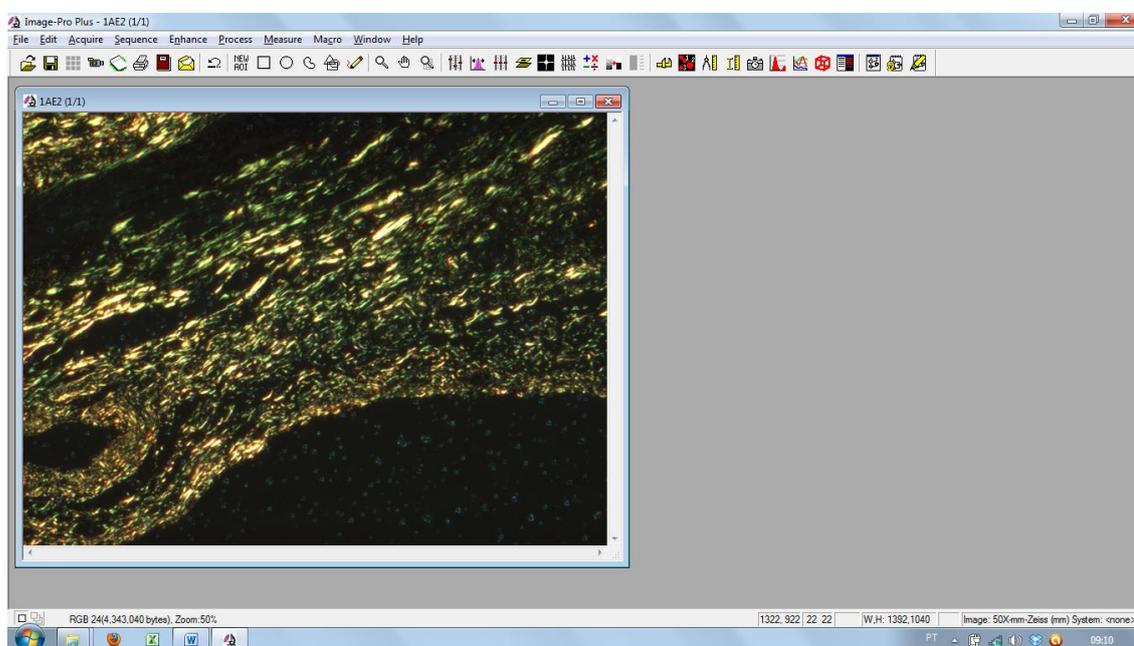
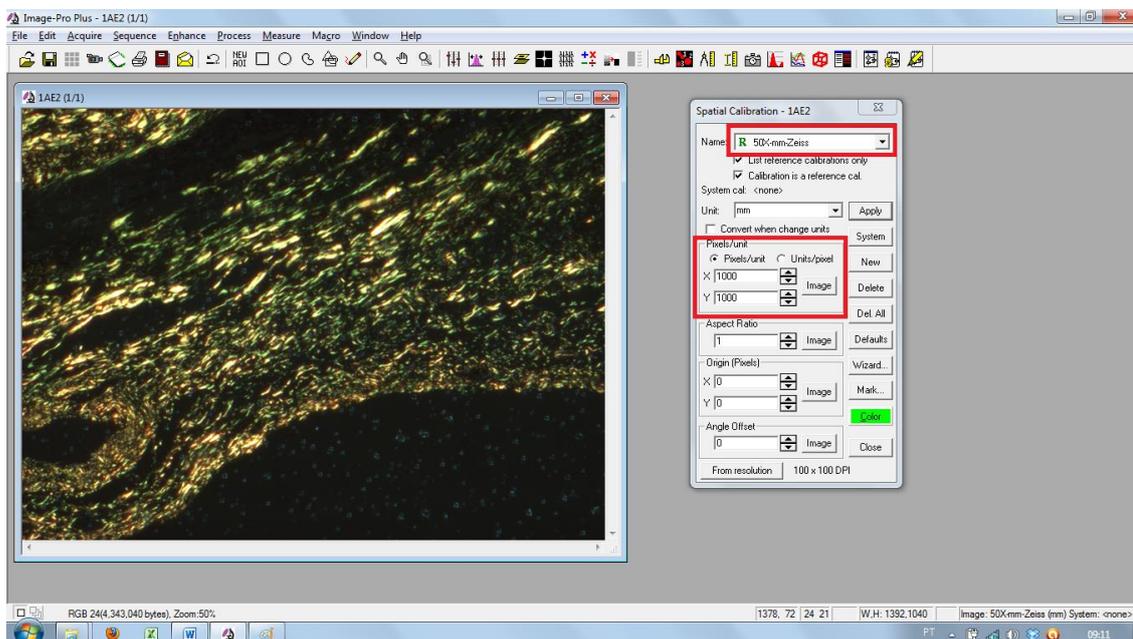


Imagem aberta na área de trabalho do software Image-Pro[®] Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc.).

1.2 Certificar-se de que a calibração padrão do software esteja selecionada: 50x-Zeiss, com 1000 pixels lidos pelo software, representando 1 unidade (mm) (Figura 2).

Measure > Calibration ►>Spatial...

Figura 2 – Escolha da calibração para contagem



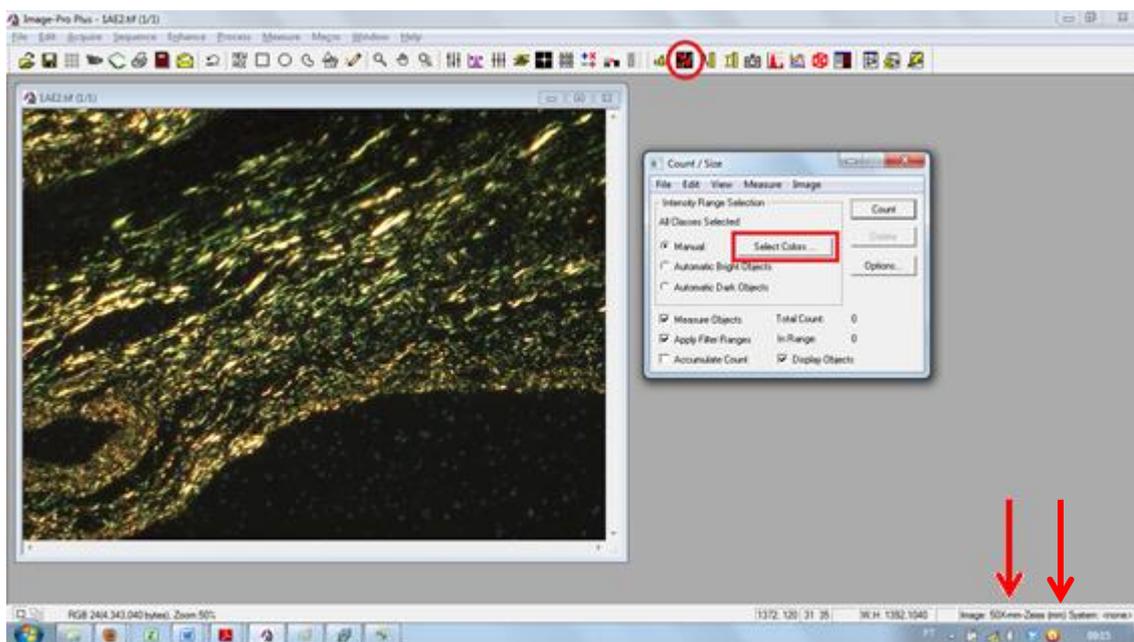
Ferramenta *Spatial Calibration* aberta na área de trabalho do programa. A calibração (50x-Zeiss) e a unidade (1000pixels/unit) estão em destaque.

Essa etapa é importante, pois verifica que a unidade de medida é uniforme para todas as contagens realizadas e exportadas para o documento do Microsoft Excel.

1.3 Seleção de colágeno para contagem

Utilizar a ferramenta *Count and measure objects* (ícone  da barra de ferramentas). No menu da ferramenta, selecionar a opção *Manual* e utilizar o botão *Select Colors* (Figura 3).

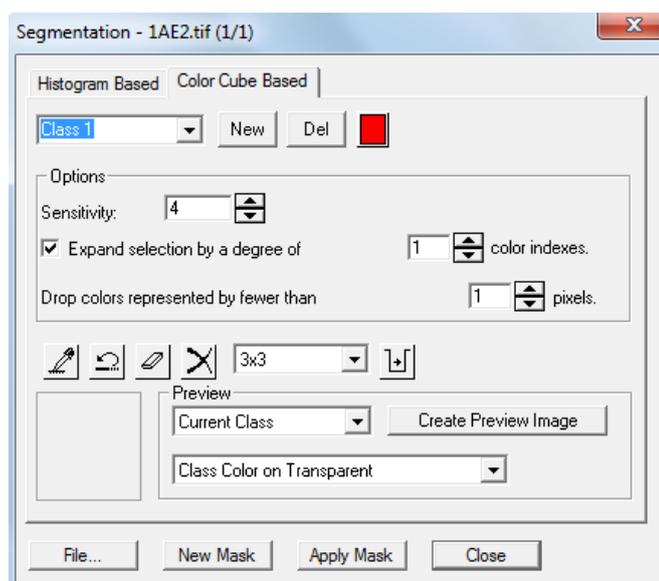
Figura 3 – Confirmação da calibragem para contagem



Destaque para o ícone *Count and measure objects* e, na caixa *Count/Size*, o botão *Select Colors* – acesso à caixa *Segmentation* (ver Figura 4).

A caixa *Segmentation* abrirá. Na aba *Color Cube Based* estão as ferramentas para realizar a marcação do colágeno.

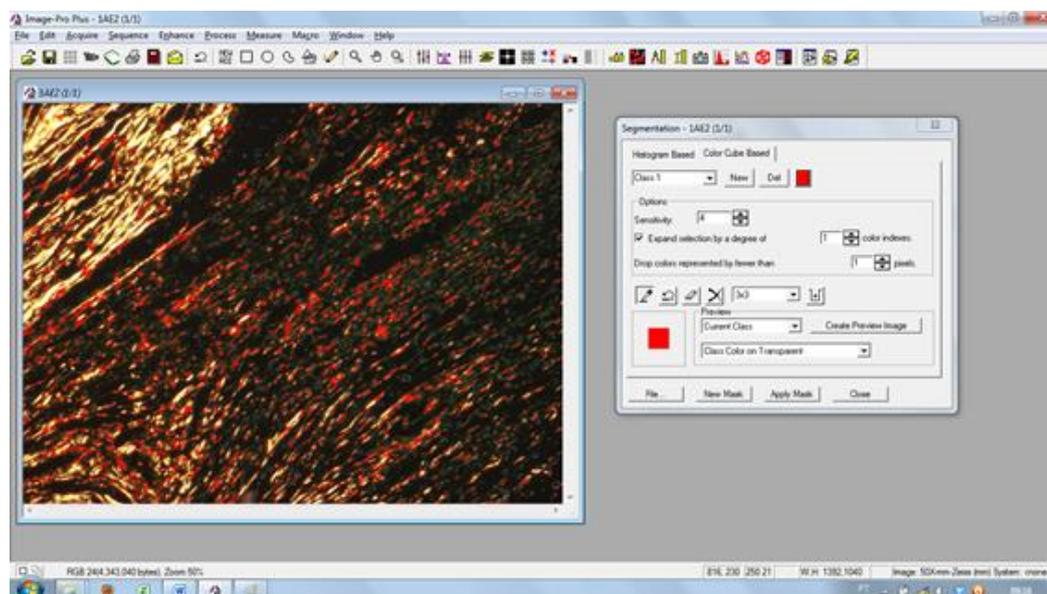
Figura 4 – Caixa Segmentation



A ferramenta  seleciona manualmente o pixel na imagem e inclui a cor desse pixel na contagem (marcado pela cor vermelha – padrão do sistema). É possível marcar pixels em um alcance de 3x3 pixels ou pixels únicos (1x1) (Figura

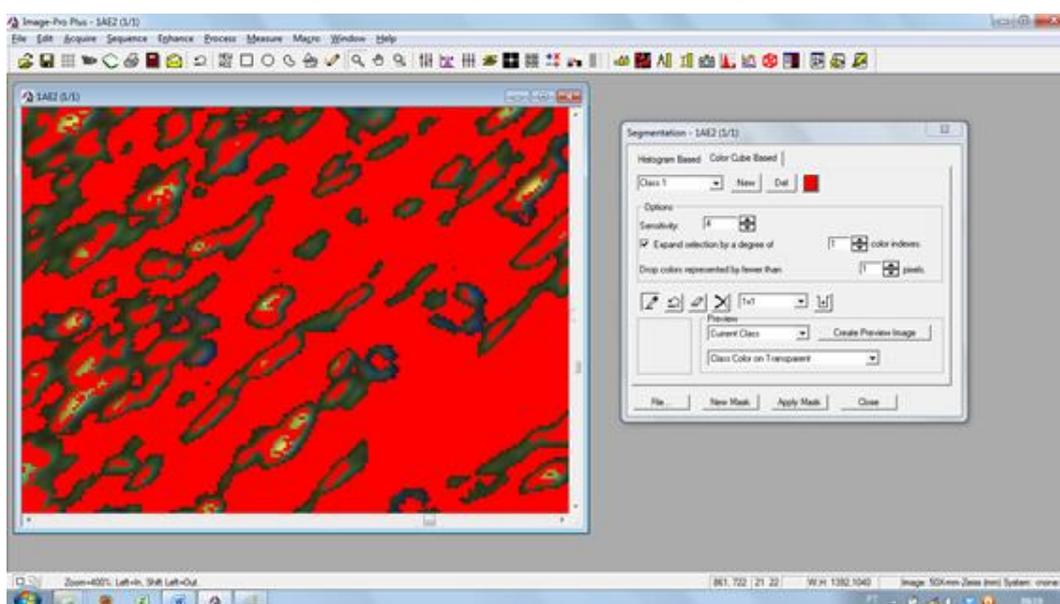
4). Essa última, com o auxílio da ferramenta **zoom** (ícone  da barra de ferramentas) é essencial para a acurada quantificação de colágeno corado com picrossírius (Figura 5, 6 e 7).

Figura 5 – Seleção inicial do colágeno



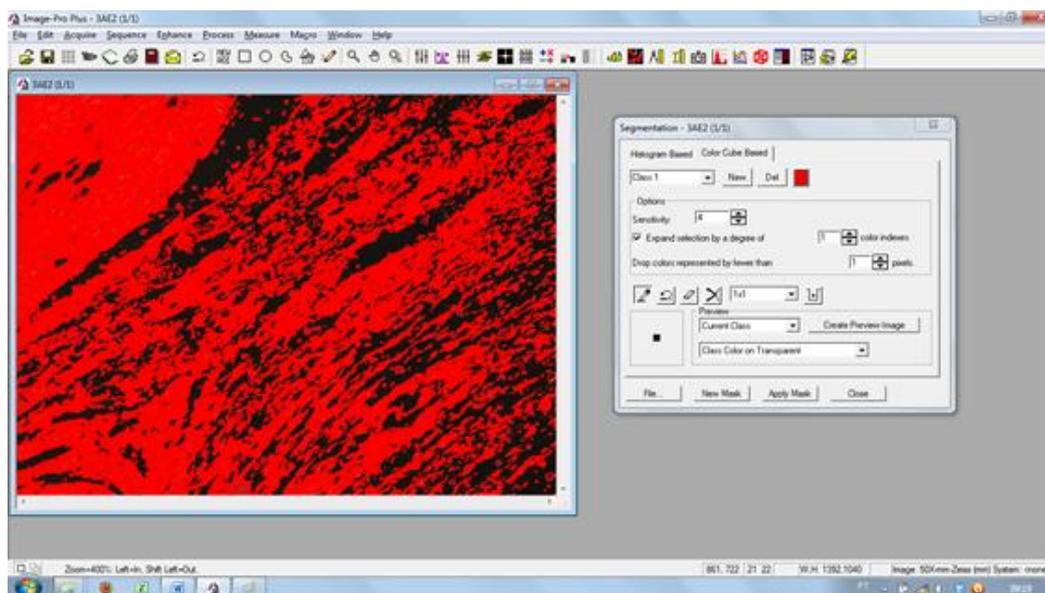
Contagem “grosseira” do colágeno. Pixels são selecionados de 3x3 e depois 1x1 até que a maioria do colágeno torne-se vermelho (significando que o sistema irá incluí-lo na contagem). Para contagem “fina”, ver Figura 6.

Figura 6 – Seleção minuciosa do colágeno



Zoom em porção da imagem. Com o auxílio da ferramenta **zoom**, pequenas áreas de colágeno que seriam excluídas da contagem são selecionadas (em geral no alcance 1x1) até que todo o colágeno presente na imagem esteja selecionado (ver Figura 7).

Figura 7 – Seleção completa para contagem

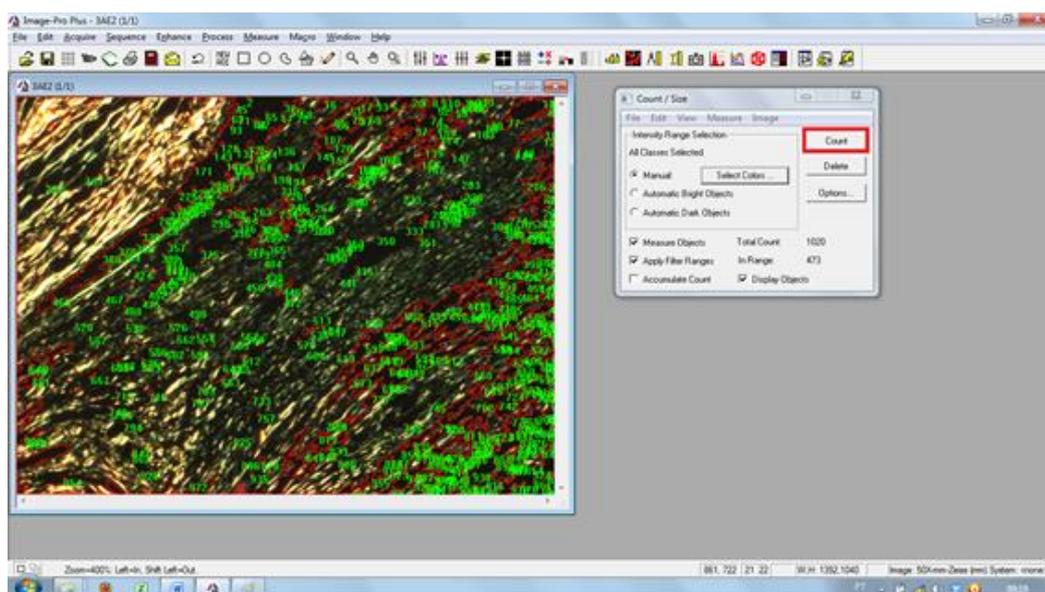


Seleção completa do colágeno da imagem. Terminada a seleção, pode-se fechar a caixa *Segmentation* (botão **Close**) e iniciar a próxima etapa: a contagem.

1.4 Contagem do colágeno marcado

Ainda na caixa *Count/Size*, depois de realizada a seleção do colágeno e fechada a caixa *Segmentation*, usar o botão *Count* (Figura 8).

Figura 8 – Contagem de colágeno



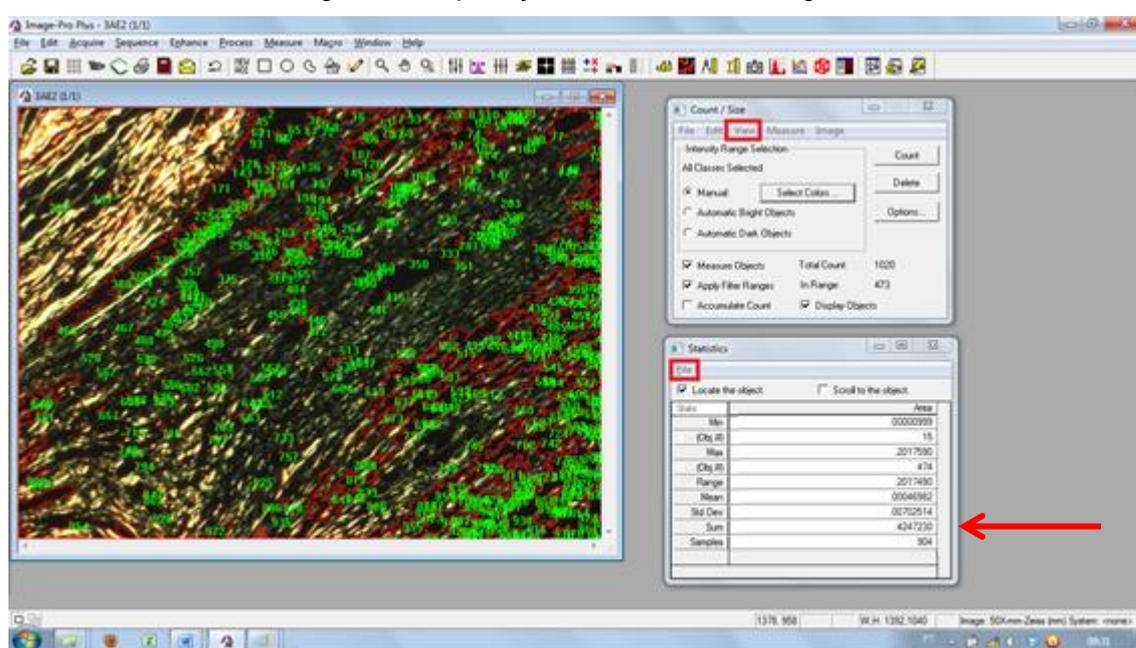
Contagem da seleção. O programa transforma toda a seleção vermelha contínua em um objeto. Na figura, eles aparecem com um contorno vermelho e o número do objeto correspondente em verde.

1.5 Exportação dos dados para o Microsoft Excel

Antes de realizar esse processo, certificar-se de que um documento do Microsoft Excel esteja aberto. O processo de exportação ocorre automaticamente do software Image-Pro[®] Plus para a primeira planilha aberta do Microsoft Excel.

Na caixa *Count/Size*, selecionar a opção *View > Statistics* para abrir a caixa *Statistics*. Nessa caixa, selecionar *File > Export Data* (Figura 9).

Figura 9 – Exportação dos dados da contagem

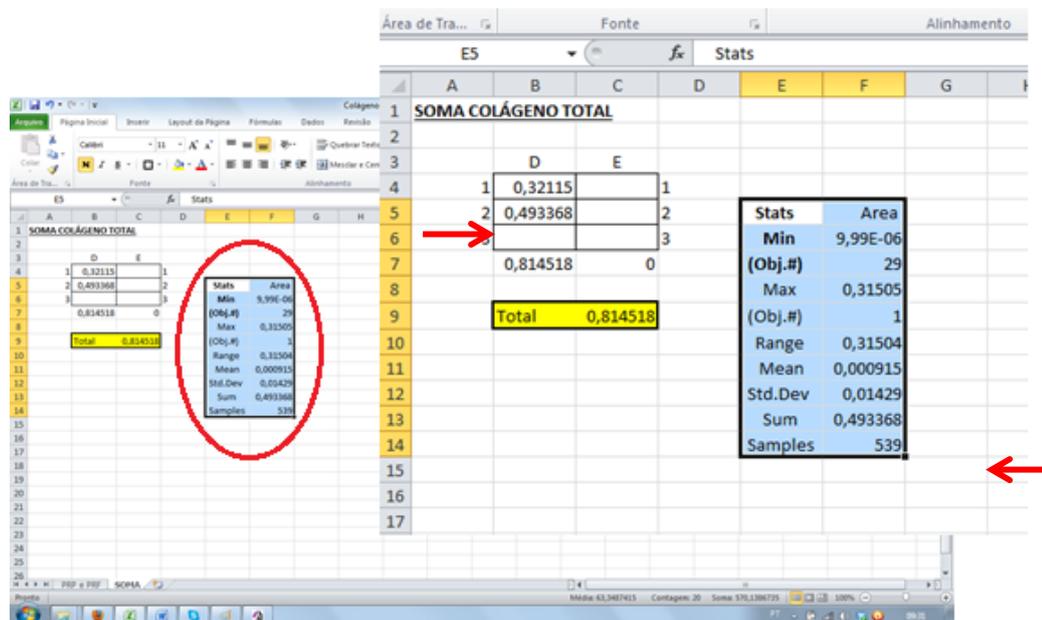


Caixa *Statistics*. Dentre os dados apresentados nesta caixa, destaca-se (flecha) a soma da área de todos os objetos selecionados e contados na imagem (mm²). Este dado representa a quantidade de colágeno desta imagem em mm², em um aumento de 50x.

1.6 Construção da Tabela no Microsoft Excel

Com a exportação dos dados do Software Image-Pro[®] Plus para o Microsoft Excel, completada com sucesso, é necessário somar a quantidade de colágeno de cada uma das fotos de uma determinada ferida, a fim de gerar o “Total de Colágeno” da ferida. A soma de cada foto individual é transferida para a sua posição correspondente na tabela de soma (Figura 10).

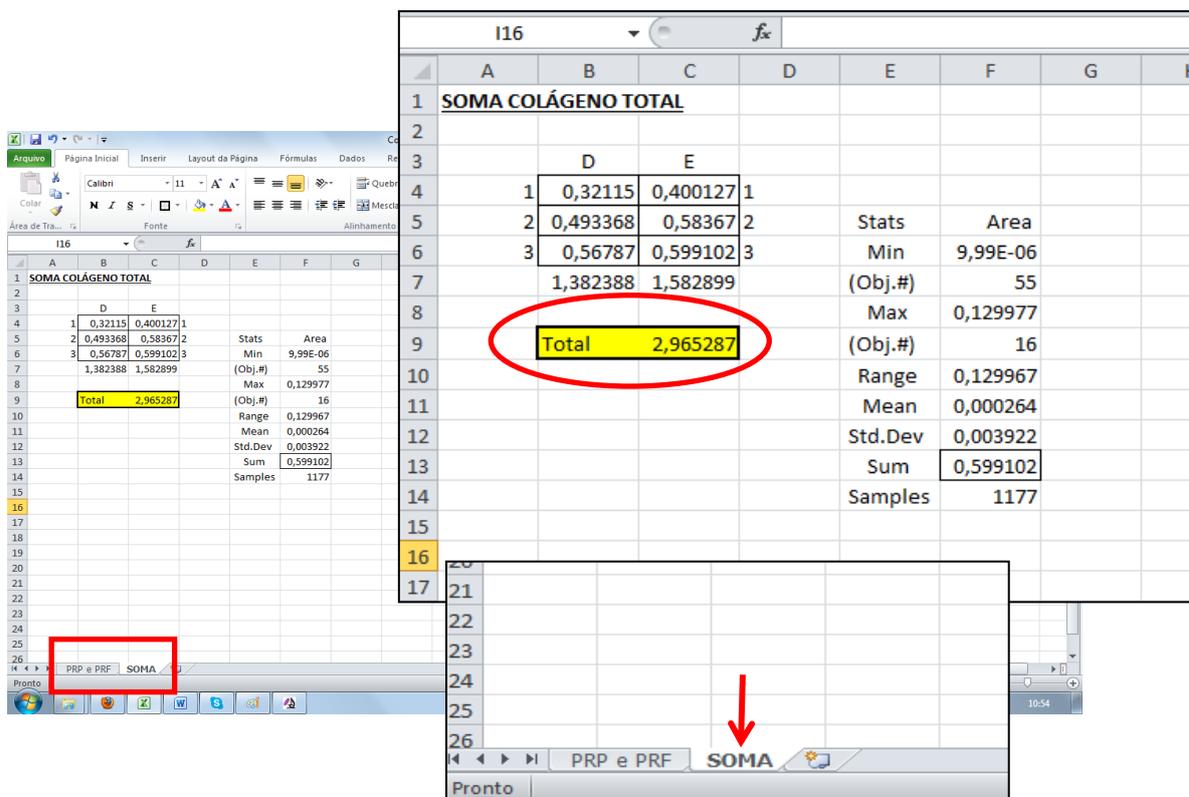
Figura 10 – Construção da tabela no Excel



Nos dados exportados, a soma (*Sum*) da quantidade de colágeno da foto específica é copiada para sua devida posição (→). Esse processo é repetido até que todas as fotos da determinada ferida tenham sido computadas e somadas.

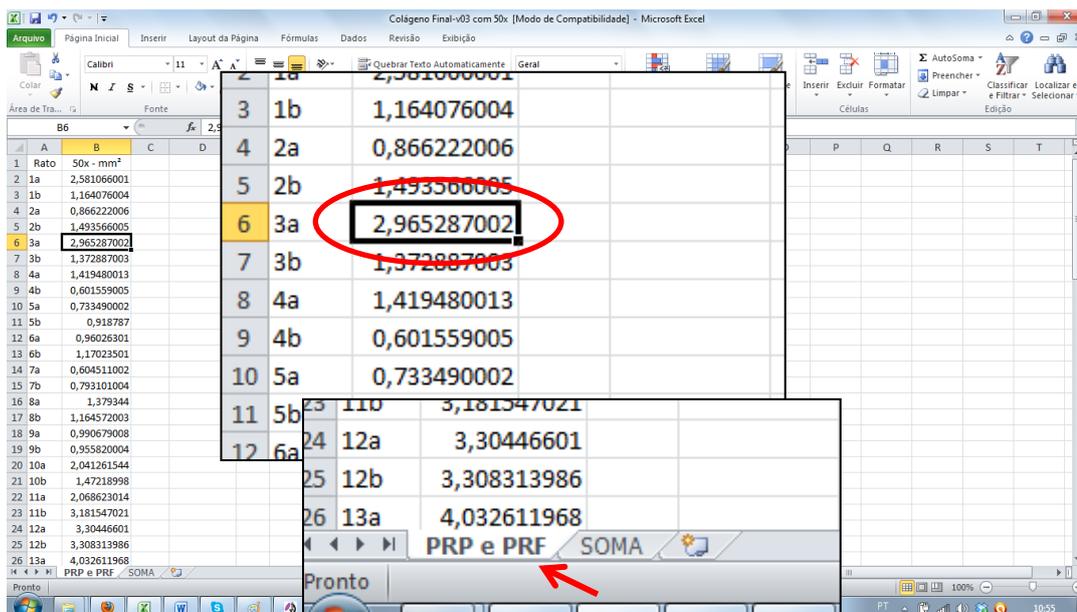
Quando todas as fotos individuais forem computadas e a soma das quantidades do colágeno de todas elas for realizada (através de simples fórmulas contidas no software Microsoft Excel), esse total deve ser copiado para a tabela final (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – Soma para construção da tabela com dados da contagem



Transferência da soma de colágeno para a tabela final - planilha de soma. Após o programa ter computado a soma da quantidade de colágeno das fotos individuais, esta deve ser copiada para a tabela final. Atente que este processo de somatório é realizado em uma planilha diferente da planilha final (→).

Figura 12 – Construção da tabela com dados da contagem



Transferência da soma de colágeno para a tabela final - planilha da tabela final. A soma total de colágeno é copiada para a tabela final, correspondendo ao rato ao qual a ferida pertence. Atente que a tabela final está em outra planilha, que não a do somatório da quantidade de colágeno das fotos individuais (→).

APÊNDICE E - ARTIGO EM PORTUGUÊS

PLASMA RICO EM PLAQUETAS VS. FIBRINA RICA EM PLAQUETAS: COMPARAÇÃO DOS EFEITOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS

Fernanda Ferreira de Camargo,¹ Thiago Bozzi de Araújo,² Vinicius Duval da Silva,¹
MD, PhD, Jefferson Luis Braga da Silva,¹ MD, PhD

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Faculdade de
Medicina, Porto Alegre, Brasil.

² Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto
Alegre, Brasil.

Os autores declaram não terem conflito de interesses.

Correspondência:

Fernanda Ferreira de Camargo
Rua Padre Chagas 185/603
90570-080 Porto Alegre, RS - Brasil
+55-51-3222.3453/3012.3453
E-mail: plastica@fernandacamargo.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) e da fibrina rica em plaquetas (PRF) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, comparando os tratamentos entre si e com seus respectivos grupos controle.

Material e Métodos: Foram utilizados 48 ratos Wistar. Duas feridas, de 1,0 cm de diâmetro, de espessura total da pele, foram excisadas no dorso dos animais e tratadas com PRP ou PRF e soro fisiológico (modelo emparelhado). As feridas foram avaliadas no pós-operatório (P.O.) imediato e depois de 7 e 14 dias, de forma macroscópica (fotografias) e microscópica (histologia). As fotografias forneceram medidas da área das feridas, permitindo analisar sua contração (análise morfométrica). As imagens histológicas permitiram calcular a concentração de colágeno (análise histomorfométrica).

Resultados: Quanto à análise morfométrica, o efeito do tempo ($P < 0,001$) e dos grupos ($P = 0,022$), ao longo do período de observação, foi estatisticamente significativo, sendo o tratamento com PRF superior ao tratamento com PRP ($P = 0,030$). Na análise histomorfométrica, a média da concentração de colágeno, nas imagens dos grupos experimentais, apresentou um aumento do 7º para o 14º dia, considerado significativo ($P < 0,001$). Houve grande variação percentual na concentração de colágeno: 129% para a PRF contra 22% para o PRP, porém sem significância estatística ($P = 0,380$). Os grupos de tratamento, PRP e PRF, não foram estatisticamente superiores aos seus grupos controle quanto às variáveis estudadas.

Conclusão: Os dados do presente estudo sugerem que a PRF foi superior ao PRP na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

Palavras-Chave: Cicatrização. Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Fibrina Rica em Plaquetas (PRF). Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas. Pele. Fatores de Crescimento. Medicina Regenerativa. Modelos Animais. Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

O conhecimento acerca do processo da cicatrização de feridas, e dos diversos fatores que nele podem interferir, é uma questão essencial para a cirurgia plástica na atualidade. Nesse contexto, a busca por terapias que acelerem o reparo do tecido e diminuam a ocorrência de alterações cicatriciais (1) levou, entre outras opções, ao desenvolvimento e testagem de tecnologias de concentrados plaquetários. Essas tecnologias partem do pressuposto de que o tratamento de feridas com concentrados autólogos de plaquetas, contendo fatores de crescimento, poderia estimular os tecidos, promovendo sua regeneração e diminuindo os processos inflamatórios (2, 3). Os fatores de crescimento plaquetários estimulam a angiogênese, promovem crescimento vascular, ativam a proliferação de fibroblastos, com consequente aumento da síntese de colágeno (4, 5), e, dessa forma, contribuem para a cicatrização de feridas.

Dois tipos de concentrados têm sido testados em animais e humanos: o plasma rico em plaquetas (PRP) e a fibrina rica em plaquetas (PRF) (6-8). Embora esses concentrados tenham em comum uma alta concentração de plaquetas, diferem entre si quanto à forma de preparo – o PRP exige ativação por cloreto de cálcio e trombina, enquanto a PRF exige apenas a centrifugação do sangue – e quanto à sua estrutura física – a PRF tem uma arquitetura natural que poderia proteger os fatores de crescimento contra a proteólise, estendendo o tempo de ação do concentrado (1, 3).

O uso de concentrados plaquetários tem sido relatado em diversas áreas (7, 9-12). Contudo, as evidências acerca de sua eficácia nas feridas cutâneas ainda são limitadas. Também são pouco numerosos os artigos comparando PRP e PRF na cicatrização dessas feridas. Ademais, questões éticas, e até mesmo estéticas, muitas vezes dificultam a realização de biópsias de pele para fins estritamente experimentais em seres humanos.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do PRP e da PRF na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

MÉTODOS

Protocolo

O presente estudo experimental, controlado, com cegamento, foi realizado com 48 ratos Wistar (*rattus norvegicus albinus*) adultos (> 60 dias), com massa corporal média de 254 g, selecionados aleatoriamente do vivário do Laboratório de Habilidades Médicas da PUCRS. Os animais, nascidos e criados no local, não necessitaram de aclimatação. Durante a fase experimental, todos receberam ração padronizada para roedores e água *ad libitum*. Foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, autoclaváveis, em ambiente ventilado, com temperatura de 22°C e umidade controlada (55+ou-15%). O ciclo claro-escuro de 12h foi obedecido.

Utilizou-se um modelo emparelhado. Duas lesões cutâneas foram realizadas, cirurgicamente, no dorso de cada um dos ratos (Figura 1). Em cada animal, uma das feridas foi tratada com PRP ou PRF (Figuras 2 e 3); a outra ferida foi tratada com soro fisiológico (SF) 0,9%, servindo como controle. A análise morfométrica (fotografias), para avaliar a contração das feridas com base na variação da sua área, foi realizada no pós-operatório (P.O.) imediato, 7º e 14º P.O. A análise histomorfométrica (microscopia), para quantificar a concentração de colágeno nas feridas, foi realizada aos 7 e 14 dias de P.O., após coleta das amostras de pele e processamento histológico.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob o número de registro CEUA 10/00205.

Grupos experimentais

Dos 48 animais, 8 foram utilizados como doadores para a coleta de sangue, sendo 4 para a obtenção do PRP e 4 para PRF. Quarenta animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: 1) animais tratados com PRP e SF e avaliados aos 7 dias de P.O.; 2) animais tratados com PRP e SF e avaliados aos 14 dias de P.O.; 3) animais tratados com PRF e SF e avaliados aos 7 dias de P.O.; e 4) animais tratados com PRF e SF e avaliados aos 14 dias de P.O.

Procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos foram executados pela mesma cirurgiã (FFC). Os ratos, após a pesagem, foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (60-80 mg/kg) e cloridrato de clorpromazina (1,6-2,0 mg/kg), conforme normas e diretrizes éticas para pesquisa com animais (Resolução 879/2008, Conselho Federal de Medicina Veterinária).

Foram demarcadas, no dorso dos animais, com um carimbo, duas circunferências, com 1 cm de diâmetro cada uma, que corresponderam à área de pele a ser retirada. As feridas foram feitas com *punch* cutâneo, e a distância entre elas foi de, no mínimo, 1,5 cm. Antes da retirada da pele, foi realizada uma tatuagem com azul de metileno e agulha de 18G (1,20 x 40 mm) nas 0 – 3 – 6 e 9 horas da circunferência. A tatuagem serviu como parâmetro, para demarcação do diâmetro da ferida, após completa reepitelização (Figura 4).

Nas feridas do lado esquerdo foram aplicados 100 µL de PRP ou PRF. Nas feridas do lado direito (feridas controle), foram adicionados 100 µL de SF a 0,9%. As lesões cutâneas foram cobertas com uma película de poliuretano, transparente e estéril (Tegaderm™ Film, 3M Health Care, St Paul, EUA) (Figura 5), com o objetivo de evitar a perda do produto (13). Os animais foram mantidos em caixas individuais. Caso não houvesse queda espontânea da película, a mesma era retirada após 48 horas.

Os animais foram submetidos à eutanásia após 7 ou 14 dias de P.O. com sobredose dos mesmos medicamentos utilizados para anestesia. Nos 8 animais doadores, a eutanásia foi pela técnica de exsanguinação.

Obtenção do plasma rico em plaquetas e da fibrina rica em plaquetas

Foram coletados 6 mL de sangue, por punção cardíaca, de cada um dos 8 ratos doadores, após anestesia com o mesmo protocolo descrito para o procedimento cirúrgico.

Para o PRP, 6 mL de sangue foram colocados em um tubo contendo o anticoagulante ácido citrato dextrose A (ACD-A) (20% do volume de sangue coletado) que passou por dupla centrifugação, conforme protocolo modificado (2). Após a primeira centrifugação, o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas ou PPP), juntamente com a zona de névoa (onde as plaquetas estavam concentradas)

e algumas células vermelhas, foram coletados por micropipeta e transferidos para um novo tubo para mais uma centrifugação, dessa vez a 3.600 rpm (1.000 g), por 10 minutos (14). A camada superior, constituída por PPP, correspondendo a aproximadamente 2/3 do volume total, foi aspirada e colocada em outro tubo Falcon para posterior utilização na calibração plaquetária.

O PRP (10% do volume de sangue total coletado) correspondeu ao material precipitado. Posteriormente, para as cirurgias, foi calibrado na concentração de 1.000.000 de plaquetas/ μ L. A ativação do PRP foi realizada com cloreto de cálcio e trombina combinados (1.000 U/mL de trombina/100 mg de cloreto de cálcio), na proporção de 1:1, e resultou em um gel, como descrito na literatura (15, 16).

Cada ferida cutânea recebeu 100 μ L de uma combinação contendo 50 μ L de PRP e 50 de cloreto de cálcio e trombina. A contagem de plaquetas foi realizada em duas amostras de 100 μ L cada, uma de sangue total e outra de PRP – obtidas, portanto, antes da primeira e após a última centrifugação.

Para a PRF, 6 mL de sangue foram colocados em um tubo Falcon, sem anticoagulante ou trombina, e centrifugados a 3.000 rpm (400 g), durante 10 minutos. Houve separação em 3 camadas: superior (PPP); intermediária (coágulo de PRF); e inferior (células vermelhas). O coágulo, ou membrana, de PRF foi retirado do tubo (Figura 6) e separado dos remanescentes sanguíneos para divisão em pequenos pedaços e aplicação diretamente na ferida.

A contagem de plaquetas foi realizada em uma amostra de sangue total e em outra de PRF. O Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS foi utilizado para a contagem plaquetária, feita através do contador automatizado de células sanguíneas CELM (modelo CC530) (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, Brasil).

Análise morfológica

Imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia zero), e também aos 7 e 14 dias de P.O., com os animais anestesiados, as feridas foram fotografadas com câmera digital Sony DSC W7 (7 megapixels) (Sony Corporation, Tóquio, Japão), com flash, a uma distância padronizada de 15 cm. Todas as imagens foram obtidas com calibração manual de branco e gravadas em formato JPEG, 3072 x 2304 pixels, cores de 24 bits.

As imagens foram submetidas ao programa Adobe® Photoshop® CS5 Extended, versão 12.0 x32 (Adobe Systems Incorporated, EUA) para a confecção do desenho da área das feridas e, posteriormente, transferidas para o programa de morfometria digital. Essa etapa foi realizada pelo mesmo examinador (TBA), que não tinha conhecimento da identificação das feridas e respectivos tratamentos. A análise e a medida da área das feridas (mm²) foram realizadas pelo programa Image-Pro® Plus versão 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, EUA).

Análise histomorfométrica

A leitura das lâminas para a análise histomorfométrica, que permitiu a quantificação de colágeno das feridas, foi realizada em microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com magnificação de 50x. As imagens das lâminas foram capturadas por uma câmera CoolSNAP™-Pro cf (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, EUA), com calibração manual de branco e níveis de cinza, sob iluminação de intensidade fixa, acoplada ao microscópio e este a um computador. Todas as imagens foram gravadas em formato TIFF sem compressão, com a resolução de 1.392 x 1.040 pixels e cores de 24 bits. Para a quantificação de colágeno, as lâminas foram fotografadas na coloração picrossírius, sendo que cada imagem foi capturada sob luz normal e luz polarizada.

Nas lâminas de 7 dias de P.O. foram selecionados 9 campos por ferida, de forma padronizada, sendo 3 da parte central, 3 da borda lateral direita e 3 da borda lateral esquerda, sempre de cima para baixo. Nas lâminas de 14 dias, por apresentarem uma área menor, 4 a 6 campos foram selecionados, a partir do centro da ferida, 2 ou 3 para cada lado, de cima para baixo (Figura 7). Todas as imagens capturadas nessa coloração foram analisadas pelo software Image-Pro® Plus.

A microscopia de luz polarizada permitiu a quantificação de colágeno, em cada área capturada da ferida, demonstrada com coloração branco-esverdeada. As imagens foram analisadas por especialista cegado em relação aos grupos de tratamento (TBA) (Figura 8).

Análise estatística

O tamanho de amostra para este estudo foi estabelecido partindo-se de nível de significância (α) de 5% e poder estatístico de 90% para detectar uma diferença de médias padronizada maior ou igual 1,5 unidades de desvio padrão entre grupos ($E/S \geq 1,5$). Assim, o tamanho de amostra foi estabelecido em 10 animais por grupo, com duas feridas emparelhadas por animal. Para comparar a contração da área das feridas (análise morfométrica) entre os grupos, ao longo do período de observação, utilizamos um modelo linear misto (MLM) para medidas repetidas com localização de diferenças pelo teste *post-hoc* de Sidak. Previamente à utilização do MLM, os dados receberam transformação logarítmica. Adicionalmente, para expressar a redução da ferida operatória, apresentamos taxas percentuais de contração ($\Delta\%$).

Para avaliar a concentração de colágeno (análise histomorfométrica) utilizamos análise de variância de medidas repetidas. O nível de significância adotado no estudo foi de $\alpha=0,05$. Os dados foram processados e analisados com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 21.0.

RESULTADOS

Aos 14 dias de P.O., a avaliação clínica mostrou que as feridas estavam quase inteiramente cicatrizadas. Não houve complicações associadas ao procedimento, como infecção de feridas ou mesmo perda de animais.

Contagem das plaquetas

Nos ratos doadores de PRP, a média de plaquetas no sangue total foi de 612.000 ± 118.000 plaquetas/ μL . Após as centrifugações, a média foi de $3.826.000 \pm 937.000$ plaquetas/ μL , ou seja, 6,2 vezes mais plaquetas do que no sangue total. Nos doadores de PRF, a média de plaquetas foi de 376.000 ± 112.000 plaquetas/ μL no sangue total e 38.000 ± 21.000 plaquetas/ μL após a preparação do PRF.

Análise morfométrica

Os grupos experimentais não apresentaram diferença quanto à média da área das feridas no momento inicial (tempo zero) ($P=0,911$). A tabela 1 descreve a contração das feridas após 7 e 14 dias de P.O. A contração foi adequada em todos os grupos ($P<0,001$ vs. tempo zero), e atingiu uma taxa global de -98,6% no 14º P.O. (Figura 9). A contração das feridas foi significativamente maior no grupo PRF em comparação ao PRP ($P=0,030$). Contudo, não houve significância na comparação dos grupos PRP e PRF com seus grupos controle ($P>0,999$ e $P=0,731$, respectivamente).

Análise histomorfométrica

A concentração média de colágeno aumentou significativamente intra-grupo do 7º até o 14º dia de P.O. ($P<0,001$) (Tabela 2). Não houve diferenças significativas na concentração de colágeno das feridas, ao longo do período de observação, entre os grupos PRP e PRF, quando comparados com seus respectivos grupos controle ($P=0,717$).

A concentração média de colágeno no grupo PRF aumentou 129%, do 7º ao 14º dia de P.O., contra apenas 22% no grupo PRP. No entanto, apesar da diferença de 107 pontos percentuais, a comparação não foi estatisticamente significativa ($P=0,380$) (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O presente estudo descreve um modelo, em ratos, de cicatrização de feridas cutâneas com PRP e PRF. As feridas foram analisadas no P.O. imediato e novamente depois de 7 e 14 dias. Em geral, o comportamento das feridas tratadas e das feridas controle foi semelhante, ao longo de período de observação, quanto à contração da área e concentração de colágeno. A análise morfométrica sugere que o tratamento com PRF foi mais eficaz, na aceleração da cicatrização, do que o tratamento com PRP. Entretanto, não houve diferença entre os grupos quanto a parâmetros histomorfométricos, apesar da maior deposição de colágeno no grupo PRF, ao longo do período de observação.

A reparação de tecidos é um desafio constante na área da medicina regenerativa. A utilização do PRP e da PRF tem sido proposta como forma de aperfeiçoar e acelerar o processo de reparo de tecidos moles e ósseos, em lesões crônicas e agudas (17-22). A adição de plaquetas a uma ferida, e a liberação dos fatores de crescimento, promove a proliferação, diferenciação e a quimiotaxia, induzindo a migração de variadas células para o local lesionado (23). Esses mediadores celulares contribuem para todo o processo de reparo (6, 18, 24, 25).

A aplicação clínica do PRP e da PRF tem sido descrita na odontologia (6, 7), cirurgia bucomaxilofacial (5, 25, 26), traumatologia e ortopedia (6, 11) e cirurgia plástica (12). Na cirurgia plástica, estética e reparadora, os concentrados plaquetários são utilizados, principalmente, para a restauração de tecidos moles (7), com evidências de diminuição do tempo cirúrgico, dor pós-operatória e edema (27-29). Também foram relatadas melhora da sobrevivência de retalhos e enxertos, aceleração da reepitelização de tecidos e redução da incidência de infecções e perda de sangue em cirurgias (27, 30). Conforme Cieslik-Bielecka et al. (1), situações clínicas complexas, como feridas de difícil cicatrização, se beneficiam dessas propriedades antimicrobianas dos concentrados de plaquetas.

Em relação aos resultados obtidos em nossa análise morfométrica, a área das feridas diminuiu significativamente ($P < 0.001$), com ambos os tratamentos, em relação ao tempo zero, de forma consistente com um processo de cicatrização normal (31). Os resultados mostraram maior contração da área da ferida com PRF em relação ao PRP ($P = 0.030$). Entretanto, o fato de não ter sido registrada diferença entre a contração das feridas tratadas com PRP e PRF, em relação às feridas controle, levanta a possibilidade de um efeito sistêmico resultante do modelo utilizado (emparelhado), devido à proximidade das feridas.

Danielsen et al. (32) também utilizaram um modelo emparelhado para estudar o efeito da PRF na reepitelização de feridas e, em consonância com os nossos achados, não obtiveram resultados superiores quando compararam tratamento e controle. Referiram, ainda, não terem considerado a possibilidade de um efeito sistêmico ao idealizarem o estudo. Por sua vez, Jorgensen et al. (33) relataram um efeito dose-dependente da aplicação tópica do fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (uma potente citocina) na resposta de um tecido conectivo, usando um modelo experimental de reparo. A administração de uma dose acima de 4 μg desse fator em um braço influenciou a concentração de colágeno encontrada

no outro braço (controle) do mesmo paciente, indicando um efeito sistêmico no reparo dos tecidos (33). Nesse caso, questiona-se a ocorrência desse efeito no presente estudo – um aspecto que merece investigação em outras pesquisas. Outra explicação para a ausência de diferenças, entre os grupos PRP e PRF e as feridas controle, pode estar relacionada aos achados de Choi et al. (34) e Weibrich et al. (35). Choi et al. (34) mostraram um efeito dose-dependente do PRP sobre a osteogênese, segundo o qual a proliferação de células ósseas é suprimida com altas concentrações e estimulada com baixas concentrações. Weibrich et al. (35) observaram que o PRP em concentrações acima de 1 milhão de plaquetas/ μ L poderia ter um efeito paradoxal sobre a regeneração óssea. Entretanto, não há evidências desse tipo de efeito na pele, nem tampouco para PRF.

Apesar de muitos estudos clínicos e experimentais demonstrarem resultados positivos com o uso de PRP e PRF na cicatrização cutânea (36-39), algumas pesquisas evidenciam resultados contraditórios, ou mesmo não comprovam sua eficácia (40-42). Isso pode ser atribuído aos diversos modelos experimentais empregados, a variações na técnica de preparo dos concentrados de plaquetas e a diferenças nos tipos de lesão cutânea estudados. Cieslik-Bielecka¹ (1) estimou a influência do PRP no processo cicatricial de 64 ratos submetidos a ressecções retangulares de pele, no dorso. Análises histológicas e imuno-histoquímicas mostraram melhora da cicatrização no grupo tratado com PRP em comparação ao grupo controle, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Os autores concluíram que o PRP não acelera o processo cicatricial de feridas cutâneas, semelhantemente ao nosso estudo. Camacho-Alonso et al. (43) descreveram o efeito da infiltração de plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) na cicatrização de lesões de língua, causadas por laser de CO₂, em ratos. Não foram observadas diferenças significativas entre os 2 grupos (o grupo controle não recebeu tratamento) em relação à reepitelização das lesões. Além disso, o grupo controle mostrou uma resolução mais significativa do processo inflamatório, após 14 dias.

¹ CIESLIK-BIELECKA, Agata. **Estimation of an influence of the autogenous growth factors on postoperative wound healing processes in animals and patients with double mandibular fracture, and patients with chronic wounds.** Habilitation work. Medical University of Silesia, 2010 apud CIESLIK-BIELECKA, et al. **L-PRP/L-PRF in Esthetic Plastic Surgery, Regenerative Medicine of the Skin and Chronik Wounds.** Curr Pharm Biotechnol, v. 13, n. 7, p. 1266-77, 2012.

Molina-Miñano et al. (41) estudaram o uso do PRP na cicatrização da pele de coelhos utilizando um modelo experimental emparelhado, semelhante ao utilizado em nosso trabalho. Após 7 dias de P.O., a reepitelização das lesões foi melhor naquelas que receberam PRP, assim como a resolução do processo inflamatório. No entanto, após 28 dias, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre PRP e controle, nas 2 variáveis estudadas. Em contraste às observações de Molina-Miñano et al. (41), Kimura et al. (42) relataram resultados favoráveis com PRP quanto à força tênsil das cicatrizes, após 14 dias, em um modelo de ferida incisional, suturada, em ratos.

Um aspecto crucial do tratamento com PRF e PRP é a definição rigorosa do que constitui esses concentrados e de suas diferenças. Cieslik-Bielecka et al. (1) afirmam que a principal diferença entre PRP e PRF é a arquitetura da fibrina, na PRF. De acordo com esses autores, é essa estrutura peculiar da matriz de PRF, mais do que simplesmente o seu conteúdo de plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento, que explica, em grande parte, os resultados terapêuticos desse concentrado (44). He et al. (3) concluíram que a estrutura da matriz de fibrina possibilita uma liberação mais lenta das moléculas solúveis nela presas, o que resulta em um efeito mais controlado e duradouro. Em nosso estudo, o concentrado de PRF foi preparado com rigor técnico, tendo-se obtido resultados positivos em termos de morfometria e de concentração de colágeno (129% versus 22 %) em relação ao tratamento com PRP.

A PRF é a segunda geração dos concentrados plaquetários (10, 44-47). Dados clínicos revelam que esse biomaterial pode favorecer uma cicatrização sem excesso inflamatório (44). Como a inflamação é inerente aos procedimentos cirúrgicos, a adição da PRF poderia diminuir efeitos prejudiciais, corrigindo excessos destrutivos durante a cicatrização dos tecidos lesados. Outra vantagem da PRF é a segurança da preparação, sem manipulação bioquímica do sangue, eliminando reações imunogênicas e transmissão de doenças, uma vez que a trombina não é necessária para a sua ativação (48). Alguns trabalhos apontam, ainda, a contribuição dos leucócitos nesse biomaterial, tanto pela sua ação anti-infecciosa, quanto pela ação de regulação imune (47).

He et al. (3) compararam a PRF com o PRP quanto a proliferação e diferenciação de osteoblastos de ratos, em estudo *in vitro*. Os autores concluíram que a PRF expressou efeitos mais fortes e duradouros do que o PRP na proliferação

e diferenciação de osteoblastos. Suzuki et al. (49) compararam a PRF com o PRP, adicionados a um gel de gelatina, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. A conclusão foi que o gel de gelatina foi um carreador efetivo de fatores de crescimento, e que o gel que continha PRF foi superior ao que continha PRP, na cicatrização de feridas, apoiando nossos achados.

Na ausência de um preparo padronizado, a variabilidade de produtos obtidos pode resultar em diferentes efeitos biológicos e, conseqüentemente, influenciar a capacidade de regeneração dos tecidos (50). Portanto, como já foi sugerido (50-52), é essencial o desenvolvimento e testagem de protocolos padronizados. O estabelecimento de um banco de dados clínicos também poderia contribuir para que mais estudos prospectivos, randomizados e controlados, pudessem ser adequadamente executados (23, 50, 53).

O presente estudo possui limitações que devem ser mencionadas: o modelo emparelhado e o tamanho amostral, que podem ter influenciado a falta de significância estatística das comparações. Além disso, os tempos experimentais de 7 e 14 dias de P.O., privilegiaram a observação da fase de fibroplasia da cicatrização, sendo que outros achados poderiam ter sido obtidos com um tempo maior, de 21 ou 30 dias, por exemplo. Acreditamos, contudo, que o estudo trouxe contribuições importantes em relação ao processo de cicatrização cutânea com PRP e PRF que poderão ser aplicados para o desenvolvimento de estudos futuros.

Em conclusão, embora existam grandes disparidades nos resultados encontrados em diferentes estudos, e nem todos os mecanismos de ação dos concentrados plaquetários estejam claramente elucidados, o uso de biomateriais terapêuticos tem sido proposto como uma estratégia para potencializar e melhorar a qualidade da regeneração tecidual. Apesar do presente estudo não ter detectado diferenças significativas entre as feridas tratadas com PRP e PRF e as feridas controle, os achados sugerem uma resposta superior da PRF, em relação ao PRP, na aceleração da cicatrização. Entretanto, novos estudos são necessários para que se possa otimizar a aplicação clínica desses concentrados e elucidar diferentes aspectos, como a possibilidade de efeitos dose-dependentes, dentre outros.

REFERÊNCIAS

1. Cieslik-Bielecka A, Choukroun J, Odin G, Dohan Ehrenfest DM. L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:1266-1277.
2. Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng*. 2007;13:147-158.
3. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108:707-713.
4. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:489-496.
5. Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1997;5:12-17.
6. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10:225-228.
7. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85:638-646.
8. Gandhi A, Dumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*. 2006;38:540-546.
9. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2001;13:487-493; quiz 487-493.
10. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:299-303.
11. Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2007;9:227-238.
12. Sclafani AP. Safety, efficacy, and utility of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Arch Facial Plast Surg*. 2011;13:247-251.

13. Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg*. 1995;48:189-197.
14. de Obarrio JJ, Arauz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000;20:486-497.
15. Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol*. 2003;74:1498-1507.
16. Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res*. 2005;84:434-439.
17. Saad Setta H, Elshahat A, Elsherbiny K, Massoud K, Safe I. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. *Int Wound J*. 2011;8:307-312.
18. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27:158-167.
19. Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. *Eur Cell Mater*. 2010;20:13-23.
20. Hom DB, Linzie BM, Huang TC. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg*. 2007;9:174-183.
21. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:555-558.
22. Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2001;24:483-488.
23. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent*. 2009;18:303-310.
24. Lorenz HP, Longaker MT. Wound healing: repair Biology and wound and scar treatment. In Mathes SJ ed. *Plastic Surgery*, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006:209-230.
25. Everts PA, Knape JT, Weibrich G, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006;38:174-187.

26. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55:1294-1299.
27. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107:229-237; discussion 238-229.
28. Powell DM, Chang E, Farrow EH. Recovery from deep-plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel: a pilot study. *Arch Facial Plast Surg.* 2001;3:245-250.
29. Sclafani AP. Applications of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2009;25:270-276.
30. Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Galli A. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. *Int J Artif Organs.* 2002;25:334-338.
31. Van Winkle W, Jr. Wound contraction. *Surg Gynecol Obstet.* 1967;125:131-142.
32. Danielsen P, Jorgensen B, Karlsmark T, Jorgensen LN, Agren MS. Effect of topical autologous platelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122:1431-1440.
33. Jorgensen LN, Agren MS, Madsen SM, et al. Dose-dependent impairment of collagen deposition by topical granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human experimental wounds. *Ann Surg.* 2002;236:684-692.
34. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34:420-424.
35. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34:665-671.
36. Sell SA, Ericksen JJ, Reis TW, Droste LR, Bhuiyan MB, Gater DR. A case report on the use of sustained release platelet-rich plasma for the treatment of chronic pressure ulcers. *J Spinal Cord Med.* 2011;34:122-127.

37. Cervelli V, Nicoli F, Spallone D, et al. Treatment of traumatic scars using fat grafts mixed with platelet-rich plasma, and resurfacing of skin with the 1540 nm nonablative laser. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37:55-61.
38. Nakamura S, Ishihara M, Takikawa M, et al. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats. *Ann Plast Surg*. 2010;65:101-106.
39. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114:1502-1508.
40. Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res*. 2009;70:277-282.
41. Molina-Minano F, Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Vicente-Ortega V. The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *Int Wound J*. 2009;6:145-148.
42. Kimura A, Ogata H, Yazawa M, Watanabe N, Mori T, Nakajima T. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. *J Dermatol Sci*. 2005;40:205-208.
43. Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P, Jimenez-Torres MJ, Orduna-Domingo A. Wound healing with PRGF infiltration in CO(2) laser lesions of the tongue: an animal study. *Photomed Laser Surg*. 2009;27:487-491.
44. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:e56-60.
45. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:e37-44.
46. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:e45-50.
47. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:e51-55.

48. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res.* 2008;19:42-46.
49. Suzuki S, Morimoto N, Ikada Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *J Biomater Appl.* 2013.
50. Borzini P, Mazzucco I. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point? *ISBT Science Series.* 2007;2:272-281.
51. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:93-103.
52. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:118-123.
53. Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med.* 2010;83:1-9.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 – Modelo experimental.

Figura 2 – Aplicação do PRP.

Figura 3 – Aplicação da PRF.

Figura 4 – Ferida cutânea aos A) 7 e B) 14 dias de P.O. Os pontos cinzentos no entorno da ferida referem-se à tatuagem para demarcação da área original.

Figura 5 – Curativo com Tegaderm™ Film.

Figura 6 – Detalhe da membrana de PRF.

Figura 7 – Representação dos campos selecionados em cada ferida no A) 7º e B) 14º dias de P.O. para a captura das imagens.

Figura 8 – Progressão do processo de contagem de colágeno de ferida cutânea usando o Image-Pro® Plus. A) Captura da imagem sem polarização. B) Captura com polarização. C) Seleção do colágeno da imagem. D) Contagem do colágeno a partir da seleção realizada na imagem.

Figura 9 – Fotografias do A) P.O. imediato, B) 7º e C) 14º dias de P.O.

Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4

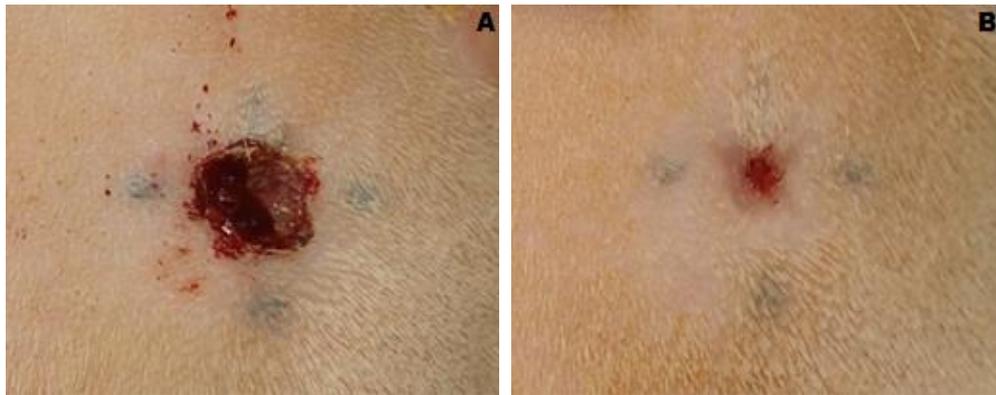


Figura 5



Figura 6



Figura 7

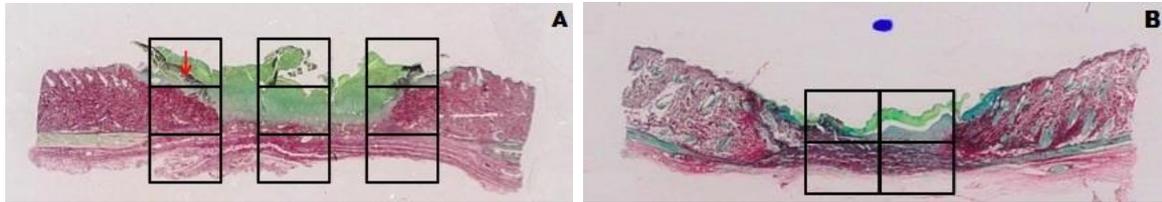


Figura 8

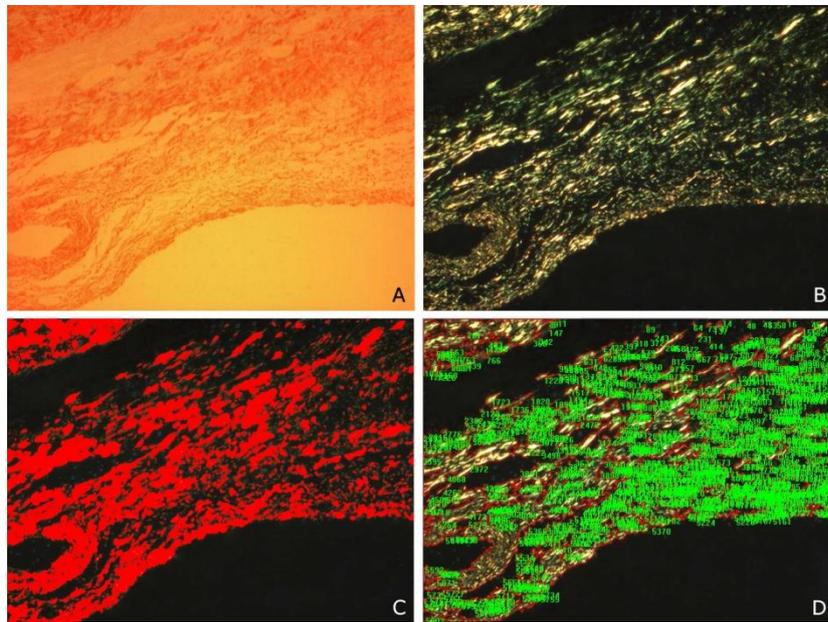


Figura 9



Tabela 1 – Médias geométricas (mínimo-máximo) para as áreas das feridas (análise morfométrica) com suas respectivas taxas percentuais de contração

Tratamento	Tempo de Pós-Operatório (dias)					
	0		7		14	
	área, mm ²		área, mm ²	Δ%	área, mm ²	Δ%
PRP	177,8 (96,4 -243,8)		59,6 (21,1 -111,9)	-66,5	3,3 (0,1 - 24,1)	-98,1
C-PRP	172,3 (92,6 -255,3)		59,9 (19,7 -126,4)	-65,2	3,0 (0,6 -9,2)	-98,3
PRF	171,9 (64,8 -270,8)		35,0 (2,4 -130,0)	-79,6	1,1 (0,1 -7,5)	-99,2
C-PRF	166,5 (66,6 -283,0)		39,4 (4,1 -116,4)	-76,3	1,6 (0,1 -12,4)	-98,9

Δ%: taxa percentual de contração; PRP: plasma rico em plaquetas, C-PRP: controle do PRP, PRF: fibrina rica em plaquetas, C-PRF: controle da PRF; P[tempo]<0,001 e P[tratamento x tempo]=0,022 obtido em modelo linear misto

Tabela 2 – Medidas descritivas para a concentração de colágeno nas áreas (mm²) das feridas cutâneas (análise histomorfométrica) segundo tratamento e tempo

Tempo (dias)	PRP	C-PRP	PRF	C-PRF
7	1,54±1,02	1,11±0,29	0,97±0,34	1,19±0,79
14	1,88±1,04	2,16±1,06	2,22±1,08	2,44±0,99
Δ%	22%	95%	129%	105%

Os dados são apresentados como média±desvio-padrão; Δ%: variação percentual; PRP: plasma rico em plaquetas, C-PRP: controle do PRP, PRF: fibrina rica em plaquetas, C-PRF: controle da PRF; P[tempo]<0,001 e P[tratamento x tempo]=0,380 obtidos em análise de variância de medidas repetidas.

APÊNDICE F – SUBMISSÃO DO ARTIGO

De: "Plastic and Reconstructive Surgery" <prs@plasticsurgery.org> **Enviado:** Ter 25/06/13 14:12
Para: "Fernanda Ferreira de Camargo" <fefecamargo@terra.com.br> **Prioridade:** Normal
Assunto: PRS/PRS-GO Submission Confirmation for PLATELET-RICH PLASMA VS. PLATELET-RICH FIBFIN: COMPARISON OF EFFECTS ON CUTANEOUS WOUND HEALING IN RATS

Dear Dr. Ferreira de Camargo,

Your submission entitled "PLATELET-RICH PLASMA VS. PLATELET-RICH FIBFIN: COMPARISON OF EFFECTS ON CUTANEOUS WOUND HEALING IN RATS" has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to PRS' Enkwell as an author.

<http://prs.edmgr.com/>

username: fernandacamargo
password: ferreirade4334

YOUR MANUSCRIPT WILL BE GIVEN A REFERENCE NUMBER ONCE AN EDITOR HAS BEEN ASSIGNED.

Thank you for submitting your work to this journal. We will notify you as soon as it is reviewed.

Kind Regards,

Rod J. Rohrich, M.D.
Editor-in-Chief
** Plastic and Reconstructive Surgery*
** Plastic and Reconstructive Surgery-Global Open*

APÊNDICE G - ARTIGO EM INGLÊS**PLATELET-RICH PLASMA VS. PLATELET-RICH FIBFIN: COMPARISON OF EFFECTS ON CUTANEOUS WOUND HEALING IN RATS**

Fernanda Ferreira de Camargo,¹ Thiago Bozzi de Araújo,² Vinicius Duval da Silva,¹
MD, PhD, Jefferson Luis Braga da Silva,¹ MD, PhD

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), School of Medicine, Porto Alegre, Brazil.

² Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

The authors have no conflicts of interest to declare.

Corresponding author:

Fernanda Ferreira de Camargo
Rua Padre Chagas 185/603
90570-080 Porto Alegre, RS - Brazil
+55-51-3222.3453/3012.3453
E-mail: plastica@fernandacamargo.com.br

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) on cutaneous wound healing in rats by comparing treated and control wounds.

Methods: Forty-eight Wistar rats were used in the study. Two wounds with 1-cm diameter, of total skin thickness, were excised from the back of the animals and treated with either PRP or PRF and saline (paired model). The wounds were evaluated immediately after the procedure and after 7 and 14 days using macroscopic (photographs) and microscopic (histology) methods. The photographs were used to measure the area of wounds in order to analyse contraction (morphometric analysis). Histological data were used to determine collagen concentration (histomorphometric analysis).

Results: Morphometric analysis revealed statistically significant time effect ($P < 0.001$) and treatment group effect ($p = 0.022$) over the observation period. The rate of wound contraction was higher in PRF-treated wounds than in PRP-treated ($p = 0.030$). In the histomorphometric analysis, mean collagen concentration, on the images of the experimental groups, increased significantly ($p < 0.001$) from day 7 to day 14. There was wide variation in the percentage of collagen concentration: 129% in the PRF group vs. 22% in the PRP group. However, the comparison was not statistically significant ($p = 0.380$). No statistical differences were observed between the PRP and PRF groups and their controls in any of the studied variables.

Conclusion: The present results suggest that PRF was superior to PRP for cutaneous wound healing in rats.

Key Words: Wound Healing. Platelet-Rich Plasma (PRP). Platelet-Rich Fibrin (PRF). Platelet-Derived Growth Factor. Skin. Growth Factors. Regenerative Medicine. Animal Models. Wistar Rats.

INTRODUCTION

Knowledge concerning wound and scar healing and the many factors that impact this process are a major concern in plastic and reconstructive surgery. In that context, the search for therapies that accelerate tissue healing and decrease edema and scarring (1) has led, among other options, to the development and testing of platelet concentrate technologies. Such technologies are based on the rationale that wound treatment with growth factor containing autologous platelet concentrates may stimulate tissues, promoting repair and modulating inflammation (2, 3). Platelet growth factors are capable of inducing angiogenesis, activating vascular growth and fibroblast proliferation, with consequent increase in collagen synthesis (4, 5), thus contributing to wound healing.

Two types of concentrates have been tested in humans and animal models: platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) (6-8). Despite having in common a high concentration of platelets, these two concentrates differ in the manner of preparation (PRP requires platelet activation by calcium chloride and thrombin, whereas PRF requires only centrifugation of blood samples) and physical structure, with PRF featuring a natural architecture that is thought to protect growth factors against proteolysis, prolonging the therapeutic action (1, 3).

The use of platelet concentrates has been reported in several fields (7, 9-12). However, only limited evidence is available on the efficacy of concentrates for cutaneous wound healing. Also limited is the number of articles comparing PRP and PRF in this scenario. Finally, ethical, and even esthetic, concerns often prevent the performance of skin biopsy for strictly experimental purposes in human beings.

Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of PRP and PRF on cutaneous wound healing in a rat model.

METHODS

Protocol

This investigator-blinded, controlled experimental study was carried out with 48 adult (>60 days) Wistar rats (*rattus norvegicus albinus*), with mean body mass of 254 g selected at random from the animal facility at the Medical Training Laboratory

at the Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil. Because the animals were born and raised in the facility, no acclimation period was required. During the experimental stage, all animals received standardized rat chow and water *ad libitum*. They were kept in individual autoclavable polypropylene boxes in a ventilated environment, with temperature of 22°C and controlled humidity (55±15%) in a 12-hour dark/light cycle.

A paired model was used. Cutaneous wounds were surgically produced in the dorsal region of the rats (Figure 1). In each animal, one of the wounds was treated with PRP or PRF (Figures 2 and 3). The other wound was treated with 0.9% saline and served as control for the treated wound. Morphometric analysis (photographs) to evaluate wound contraction based on the change in wound area was performed on days 0, 7, and 14. Histomorphometric analysis (microscopy) to quantify collagen concentration in the wound was performed on days 7 and 14, following the harvesting of skin samples and histological processing.

The protocol was approved by the Animal Research Ethics Committee at PUCRS (CEUA 10/00205).

Experimental groups

Of the 48 animals, 8 were used as blood donors: 4 for PRP and 4 for PRF extraction. Forty animals were randomly distributed into four groups: 1) treated with PRP and saline and evaluated on day 7; 2) treated with PRP and saline and evaluated on day 14; 3) treated with PRF and saline and evaluated on day 7; and 4) treated with PRF and saline and evaluated on day 14.

Surgical procedure

All procedures were performed by the same surgeon (FCC). After being weighted, the animals were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (60-80 mg/kg) and chlorpromazine hydrochloride (1.6-2.0 mg/kg), following Brazilian guidelines for animal research (Resolution 879/2008) issued by the Federal Council of Veterinary Medicine.

A 1-cm circle was stamped on the back of animals to determine the area of the wounds. The wounds were made using a punch instrument and set at least 1.5 cm apart. Prior to removal of the skin, four spots were tattooed with methylene blue using

an 18G (1.20 x 40 mm) needle at positions 0 – 3 – 6 and 9 hours in relation to the stamped circle. The tattoo served as a parameter of the original wound area after complete re-epithelization (Figure 4).

PRP or PRF were applied on left side wounds and 100 μ L of 0.9% saline were applied on the right side (control wounds). The wounds were then covered with clear, sterile polyurethane film (Tegaderm Film™, 3M Health Care, St. Paul, USA) to prevent loss of PRP or PRF (Figure 5) (13). The animals were kept in individual containers. The film fell spontaneously or was removed after 48 hours.

The animals were euthanized after 7 or 14 days with overdose of the same drugs used for anesthesia. The eight donor animals were euthanized by exsanguination.

Preparation of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin

Blood aliquots (6 mL) were obtained by cardiac puncture in donor rats following anesthesia as described for the surgical procedure.

For PRP, a 6 mL blood aliquot was placed in a Falcon tube containing citrate dextrose-A solution (20% of total blood volume) to prevent coagulation and centrifuged twice (2). After the first centrifugation at 1,800 rpm (250 g) for 10 min, blood was separated into a supernatant (platelet-poor plasma or PPP), platelet-rich buffy coat, and red cells. The supernatant (PPP), buffy coat (platelet concentrate), and some red cells were collected using a micropipette and transferred into a tube for a second centrifugation at 3,600 rpm (1,000 g) for 10 minutes (14). The resulting supernatant containing PPP (approximately two thirds of the total volume) was aspirated and placed in a Falcon tube for further use in platelet calibration.

The precipitate (10% of the total blood volume) at the bottom of the centrifuge tube corresponded to PRP. For the surgical procedures, PRP was calibrated at a concentration of 1,000,000 platelets/ μ L. For PRP activation, a solution containing 1,000 U/mL of thrombin and 100 mg calcium chloride was added (1:1) yielding a gel as described in the literature (15, 16).

A mixture containing 50 μ L PRP and 50 μ L of the calcium chloride-thrombin solution was applied to the wounds. Platelet count was performed before and after the last centrifugation in 100 μ L of whole blood and 100 μ L of PRP.

For PRF, a 6 mL aliquot of blood was placed in a Falcon tube without anticoagulant or thrombin, and centrifuged at 3,000 rpm (400 g) for 10 minutes. Three layers were obtained, with PRF found in the intermediate layer. The resulting PRF clot was removed from the tube (Figure 6) and separated from the remaining blood, to be applied directly to the lesion.

Platelet count was performed on a whole blood sample and in a PRF sample at the Veterinary Analysis Laboratory at UFRGS, using an automated blood cell counter (CELM, model CC530) (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos Barueri, Brazil).

Morphometric analysis

Immediately after the surgical procedure (day zero), and also on the 7th or 14th postoperative days the animals were anesthetized and wounds were photographed using a digital Sony DSC W7 camera (7 megapixels) (Sony Corporation, Tokyo, Japan). Flash was used in all photographs, which were taken at a distance of 15 cm. Images were obtained with manual white balance and saved as JPEG files, 3,072 x 2,304 pixels, 24 bit color.

Using Adobe® Photoshop® CS5 Extended, v. 12.0x32 (Adobe Systems Incorporated, USA), drawings of each image were obtained and transferred to a digital morphometry software. The same examiner (TBA) performed all analyses and was blinded to wound group (treatment or control). The analysis and measurements of wound area (mm²) were performed using Image-Pro® Plus software v. 4.5.1 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA).

Histomorphometric analysis

Histological slides were analyzed using an optic Zeiss Axioskop 40 microscope with magnification of 50x. A camera (CoolSNAP™-Pro cf, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA) was coupled to the microscope and to a computer to capture the images. The photographs were taken with manual white and gray balance, under fixed-intensity light. All images were recorded in uncompressed TIFF format, with resolution of 1,392 x 1,040 pixels and 24-bit color. Picrosirius-stained slides were photographed for quantification of collagen. For that purpose, normal light and polarized light photographs were obtained from each slide.

For 7-day histological slides, 9 fields were selected per wound: 3 from the central portion, 3 from the right border and 3 from the left border (from top to bottom). Because the wound area was smaller in 14-day slides, 4 to 6 fields were selected starting from the center of the wound (2 or 3 to the left and 2 or 3 to the right, from top to bottom) (Figure 7). All the images were analyzed using Image-Pro[®] Plus.

Polarized-light microscopy allowed collagen quantification in each photograph taken from sections of the wound (white-green areas). Photographs taken from the histological slides were analyzed by a specialist (TBA) blinded to lesion group (treatment or control) (Figure 8).

Statistical analysis

Sample size was calculated taking into account a significance level (α) of 5% and 90% power to detect a difference between standardized group means ≥ 1.5 standard deviation ($E/S \geq 1.5$). For these parameters, 10 animals were required per group, with two paired wounds per animal. Comparison of the groups concerning wound contraction (morphometric analysis) was performed with a mixed linear model (MLM) for repeated measures and post-hoc Sidak test. Data were log-transformed prior to this test. The results were expressed as percent contraction rates ($\Delta\%$).

For collagen concentration (histomorphometric analysis), analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used. Significance was set at $\alpha=0.05$. Data were processed and analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 21.0.

RESULTS

At 14 days, clinical evaluation revealed that the wounds were almost completely healed. There were no complications and no deaths resulting from the procedure. No signs of infection were observed.

Platelet count

The mean number of platelets in whole blood of PRP-donor rats was $612,000 \pm 118,000$ platelets/ μL . After PRP preparation, platelet count was $3,826,000 \pm 937,000/\mu\text{L}$, that is, a 6.2 time increase in relation to whole blood. In PRF-

donor rats, whole blood platelet count was $376,000 \pm 112,000$ platelets/ μL . Mean platelet count following PRF preparation was $38,000 \pm 21,000$ platelets/ μL .

Morphometric analysis

Baseline wound area (day zero) was similar in the four wound groups ($P=0.911$). Table 1 describes wound contraction after 7 and 14 days. Contraction was adequate in all groups (intragroup $P<0.001$ vs. day zero), with an overall contraction rate of -98.6% on day 14 (Figure 9). Wound contraction was significantly higher in the PRF group vs. the PRP group ($P=0.030$). Nevertheless, no differences were observed in wound contraction when PRP and PRF wounds were compared to control wounds ($P>0.999$ and $P=0.731$ respectively).

Histomorphometric analysis

Mean collagen concentration increased significantly in the four groups between postoperative day 7 and 14 ($P<0.001$) as shown in Table 2. However, no differences were observed in collagen concentration between the PRP and PRF groups vs. their controls ($P=0.717$).

Mean collagen concentration increased 129% in the PRF group vs. 22% in the PRP group. Nevertheless, this difference did not achieve statistical significance ($P=0.380$) (Table 2).

DISCUSSION

The present experimental study describes a rat model of cutaneous wound healing with PRP and PRF analyzed at zero, 7, and 14 days postoperatively. The behavior of wounds was similar in the treatment and control groups after 7 and 14 days regarding wound contraction and collagen deposition. Morphometric analysis indicated that PRF was more favorable than PRP treatment, in acceleration of wound healing. However, there were no differences between groups in histomorphometric parameters, despite a greater amount of collagen found in the PRF group at the end of 14 days.

Tissue repair is a challenge in the field of regenerative medicine, and use of PRP and PRF has been proposed as a way to improve and accelerate the healing

process of soft tissues and bone in chronic and acute injuries (17-22). The application of platelets to a wound, and the ensuing release of growth factors, promotes proliferation, differentiation, and chemotaxis, inducing the migration of various cells to the injured site (23). These cellular mediators contribute to the entire repair process (6, 18, 24, 25).

Clinical applications of PRP and PRF have been described in the literature, in dentistry (6, 7), oral and maxillofacial surgery (5, 25, 26), traumatology and orthopedics (6, 11), and plastic surgery (12). In cosmetic and reconstructive plastic surgery, platelet concentrates are used especially to restore soft tissue (7), with evidence of reduced surgical time and postoperative pain and edema (27-29). Improved survival of grafts and flaps, with acceleration of tissue re-epithelization and reduced incidence of infection and blood loss has also been reported (27, 30). As stated by Cieslik-Bielecka et al. (1), complex clinical situations, such as poorly healing wounds, benefit from the antimicrobial properties of platelet concentrates.

Regarding the results obtained in our morphometric analysis, wound area decreased significantly ($P < 0.001$) with both treatments as compared to time zero, consistently with a normal healing process (31). There was no delay in tissue healing. The results showed greater collagen concentration in the wound with PRF vs. PRP ($P = 0.030$). However, the fact that no difference was noted between collagen concentration in treated vs. control wounds suggests the possibility of a systemic effect associated with the paired model, resulting from the proximity between treated and control wounds.

Danielsen et al. (32) also used a paired model to study the effect of PRF on epithelization of wounds. Like us, they did not observe improved results with PRF compared to controls. The authors note that they did not foresee the possibility of a systemic effect, when the study was planned. Jorgensen et al. (33) studied a dose-dependent effect of topical application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (a potent cytokine) on the response of connective tissue, using an experimental model of repair. The administration of a dose $>4 \mu\text{g}$ of this factor on one arm influenced the concentration of collagen found in the control arm in the same patient, signaling an effect on systemic tissue repair (33). The occurrence of such an effect should be considered in the present study – an aspect that deserves further investigation. Another explanation for the lack of difference between our PRP and PRF wounds and their controls might be related to the findings of Choi et al. (34) and

Weibrich et al. (35). Choi et al. (34) showed a dose-dependent effect of PRP on osteogenesis, according to which proliferation of bone cells is suppressed in high concentrations and stimulated at low concentrations. Weibrich et al. (35) found that PRP at concentrations above 1 million platelets/uL might have a paradoxical effect on bone regeneration. Nevertheless, no evidence of this kind is available for skin or PRF treatment.

Although many clinical and experimental studies describe positive results with the use of PRP and PRF in cutaneous wound healing (36-39), some investigators report contradictory results or else absence of efficacy (40-42). This might be explained by the numerous experimental models used, technical variations in the preparation of platelet concentrates, and by differences in the types of skin lesions studied. Cieslik-Bielecka¹ (1) estimated the influence of PRP on wound healing in 64 rats submitted to dorsal skin resections. In that study, histological and immunohistochemical studies showed improved healing in the PRP-treated group compared to the control group; however, the difference was not significant. Like us, the authors concluded that PRP does not accelerate the healing process of cutaneous wounds. Camacho-Alonso et al. (43) investigated the effect of plasma-rich growth factor infiltration on the healing of CO₂ lesions on the tongue of rats. No significant differences were observed in relation to an untreated control group regarding re-epithelization of lesions. Moreover, resolution of the inflammatory process was better in the control group after the first 14 days.

Molina-Miñano et al. (41) studied PRP applied to cutaneous wounds in a paired rabbit model similar to that employed by us. They reported improved re-epithelization and resolution of inflammation after 7 days. However, after 28 days, the behavior of the experimental and control groups were similar regarding the two variables. In contrast to the observations made by Molina-Miñano et al. (41), Kimura et al. (42) reported improvement in tensile scar strength with PRP after 14 days in a rat model of cutaneous incisional wounds.

A crucial aspect of PRF and PRP treatment is a thorough definition of what these concentrates are and of their differences. Cieslik-Bielecka et al. (1) state that

¹ CIESLIK-BIELECKA, Agata. **Estimation of an influence of the autogenous growth factors on postoperative wound healing processes in animals and patients with double mandibular fracture, and patients with chronic wounds.** Habilitation work. Medical University of Silesia, 2010 apud CIESLIK-BIELECKA, et al. **L-PRP/L-PRF in Esthetic Plastic Surgery, Regenerative Medicine of the Skin and Chronik Wounds.** *Curr Pharm Biotechnol*, v. 13, n. 7, p. 1266-77, 2012.

the main difference between PRF and PRP is the fibrin architecture. According to those authors, it is the characteristic structure of the PRF matrix, rather than solely the platelet, leukocyte, and growth factor contents that is largely responsible for the therapeutic results of this concentrate (44). He et al. (3) propose that the fibrin matrix architecture allows a slower release of the soluble molecules that it contains, producing a more controlled and lasting effect (36). In our study, the PRF concentrate was strictly prepared, yielding better morphometric results and a higher amount of collagen as compared to PRP (129% versus 22%).

PRF is a second generation of platelet concentrates (10, 44-47). Clinical data show that this biomaterial might help scar healing without excess inflammation (44). Because inflammation is inherent to surgical procedures, the addition of PRF can reduce harmful excess during the healing of injured tissues. Another advantage of PRF is its simplified processing, with no need for blood handling, eliminating the risk of immunogenic reactions and disease transmission, since thrombin is not required for PRF activation (48). Some works have also pointed out a role of the leukocytes found in this biomaterial, which are associated with anti-infectious or immune regulatory action (47).

He et al. (3) compared PRF vs. PRP regarding the proliferation and differentiation of rat osteoblasts *in vitro*. The authors concluded that PRF produced more lasting and stronger effects on proliferation and differentiation of osteoblasts than PRP. Suzuki et al. (49) compared PRF and PRP added to a gelatin gel for cutaneous wound healing in rats. The conclusion was that the gelatin gel is an effective carrier of growth factors, and that the gel containing PRF was superior to that containing PRP.

In the absence of standardized preparation, the variability of products obtained may produce heterogeneous biological effects, with an impact on tissue regeneration capacity (50). Thus, as already suggested (50-52), it is essential that standardized protocols be created and tested. The establishment of a clinical database could also contribute to the planning of additional prospective, randomized, controlled trials to produce reliable results (23, 50, 53).

The present study has limitations that should be addressed: the paired model and the sample size, which might have played a role in the lack of significance for the comparisons, as well as the experimental periods of 7 and 14 days, which emphasize the proliferative phase of healing. Different findings might have been obtained after

longer periods, for example 21 or 30 days. We believe, however, that useful insights were produced in the present study regarding the process of cutaneous wound healing with PRP and PRF, which can be applied to develop future studies.

In conclusion, despite the great disparity in the results reported by different studies and the need to further elucidate the mechanisms of action of platelet-rich concentrates, the use of these biomaterials has been proposed as a strategy to enhance and improve the quality of tissue regeneration. Even though we did not detect significant differences between PRP and PRF-treated wounds and control wounds, our findings suggest a superior response with PRF as compared to PRP. Nevertheless, new studies are needed to optimize the clinical applicability of these concentrates and explain aspects such as the possibility of dose-dependent effects, among others.

REFERENCES

1. Cieslik-Bielecka A, Choukroun J, Odin G, Dohan Ehrenfest DM. L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:1266-1277.
2. Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng*. 2007;13:147-158.
3. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108:707-713.
4. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:489-496.
5. Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1997;5:12-17.
6. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10:225-228.
7. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85:638-646.

8. Gandhi A, Doumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*. 2006;38:540-546.
9. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2001;13:487-493; quiz 487-493.
10. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:299-303.
11. Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2007;9:227-238.
12. Sclafani AP. Safety, efficacy, and utility of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Arch Facial Plast Surg*. 2011;13:247-251.
13. Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg*. 1995;48:189-197.
14. de Obarrio JJ, Arauz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000;20:486-497.
15. Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol*. 2003;74:1498-1507.
16. Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res*. 2005;84:434-439.
17. Saad Setta H, Elshahat A, Elsherbiny K, Massoud K, Safe I. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. *Int Wound J*. 2011;8:307-312.
18. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27:158-167.
19. Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, et al. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. *Eur Cell Mater*. 2010;20:13-23.
20. Hom DB, Linzie BM, Huang TC. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg*. 2007;9:174-183.

21. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:555-558.
22. Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2001;24:483-488.
23. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent.* 2009;18:303-310.
24. Lorenz HP, Longaker MT. Wound healing: repair Biology and wound and scar treatment. In Mathes SJ ed. *Plastic Surgery*, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006:209-230.
25. Everts PA, Knape JT, Weibrich G, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006;38:174-187.
26. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55:1294-1299.
27. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107:229-237; discussion 238-229.
28. Powell DM, Chang E, Farrior EH. Recovery from deep-plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel: a pilot study. *Arch Facial Plast Surg.* 2001;3:245-250.
29. Sclafani AP. Applications of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2009;25:270-276.
30. Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Galli A. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. *Int J Artif Organs.* 2002;25:334-338.
31. Van Winkle W, Jr. Wound contraction. *Surg Gynecol Obstet.* 1967;125:131-142.
32. Danielsen P, Jorgensen B, Karlsmark T, Jorgensen LN, Agren MS. Effect of topical autologous platelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122:1431-1440.

33. Jorgensen LN, Agren MS, Madsen SM, et al. Dose-dependent impairment of collagen deposition by topical granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human experimental wounds. *Ann Surg.* 2002;236:684-692.
34. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34:420-424.
35. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34:665-671.
36. Sell SA, Ericksen JJ, Reis TW, Droste LR, Bhuiyan MB, Gater DR. A case report on the use of sustained release platelet-rich plasma for the treatment of chronic pressure ulcers. *J Spinal Cord Med.* 2011;34:122-127.
37. Cervelli V, Nicoli F, Spallone D, et al. Treatment of traumatic scars using fat grafts mixed with platelet-rich plasma, and resurfacing of skin with the 1540 nm nonablative laser. *Clin Exp Dermatol.* 2012;37:55-61.
38. Nakamura S, Ishihara M, Takikawa M, et al. Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats. *Ann Plast Surg.* 2010;65:101-106.
39. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114:1502-1508.
40. Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res.* 2009;70:277-282.
41. Molina-Minano F, Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Vicente-Ortega V. The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *Int Wound J.* 2009;6:145-148.
42. Kimura A, Ogata H, Yazawa M, Watanabe N, Mori T, Nakajima T. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. *J Dermatol Sci.* 2005;40:205-208.
43. Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P, Jimenez-Torres MJ, Orduna-Domingo A. Wound healing with PRGF infiltration in CO(2) laser lesions of the tongue: an animal study. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:487-491.

44. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:e56-60.
45. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:e37-44.
46. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:e45-50.
47. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:e51-55.
48. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res.* 2008;19:42-46.
49. Suzuki S, Morimoto N, Ikada Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *J Biomater Appl.* 2013.
50. Borzini P, Mazzucco I. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point? *ISBT Science Series.* 2007;2:272-281.
51. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:93-103.
52. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:118-123.
53. Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med.* 2010;83:1-9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Experimental model.

Figure 2 – Administration of PRP.

Figure 3 – Administration of PRF.

Figure 4 – Cutaneous wound at a) 7 and b) 14 days. The gray spots around the wound were tattooed to serve as reference for the original wound area.

Figure 5 – Tegaderm™ Film dressing.

Figure 6 – PRF clot.

Figure 7 – Representation of fields selected in A) 7-day and B) 14-day histological slides for capture of images submitted to histomorphometric analysis.

Figure 8 – Collagen quantification in cutaneous wounds using ImagePro® Plus software. A) Image taken without polarized light. B) Image with polarized light. C) Software selection of collagen in polarized light image. D) Collagen count based on selection.

Figure 9 – Wound photographed in A) immediate postoperative period (day zero), B) day 7, and C) day 14.

Figure 1



Figure 2



Figure 3



Figure 4

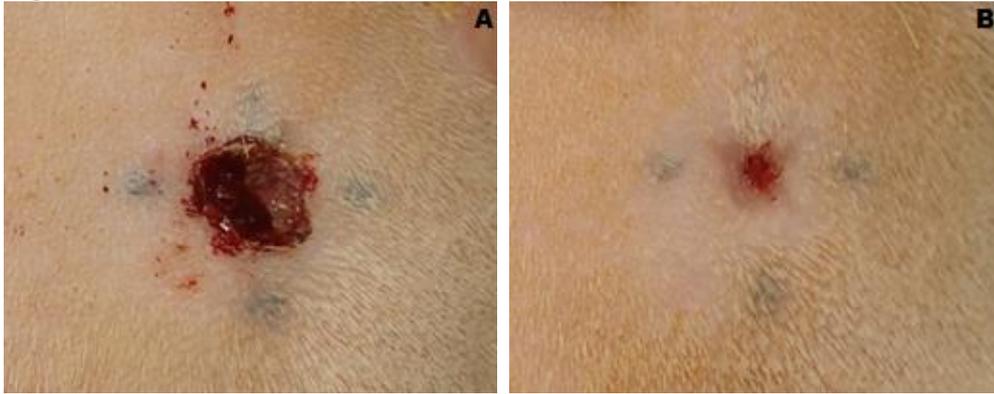


Figure 5



Figure 6



Figure 7

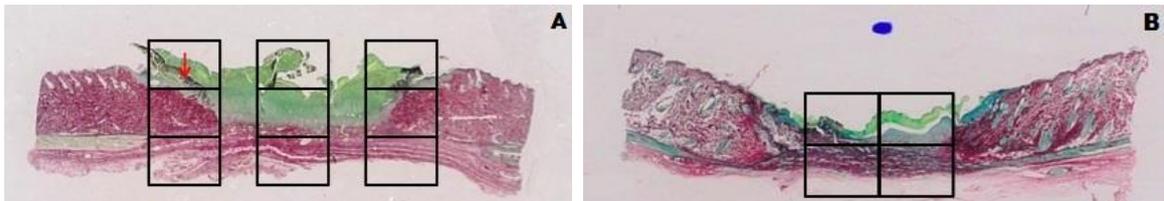


Figure 8

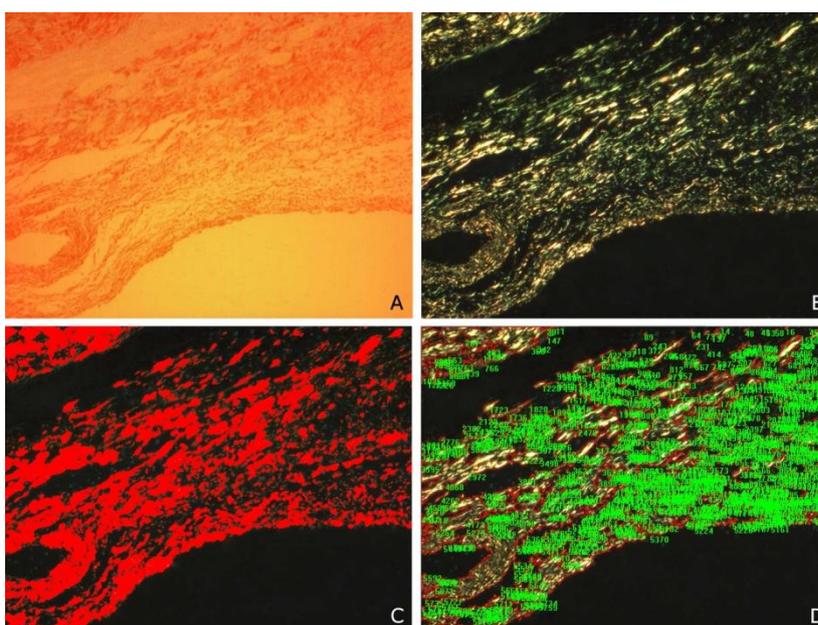


Figure 9

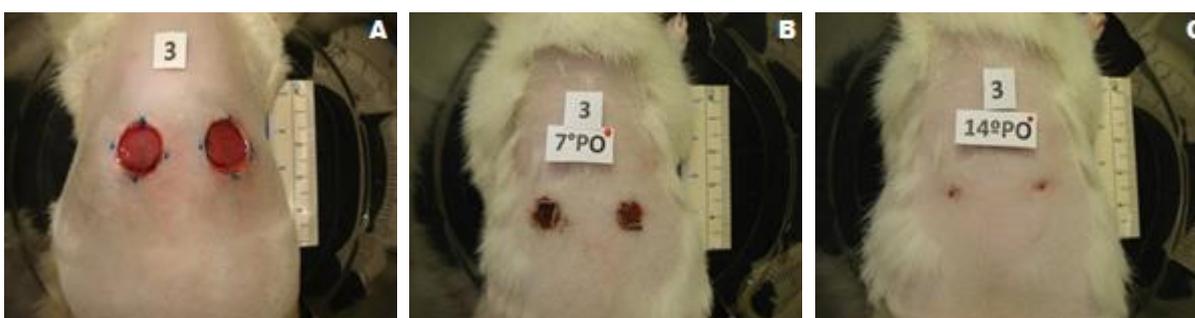


Table 1 – Geometric means (minimum-maximum) for wound area with percent contraction rates

Treatment	Postoperative time (days)				
	0	7		14	
	Area (mm ²)	Area (mm ²)	Δ%	Area (mm ²)	Δ%
PRP	177.8 (96.4-243.8)	59.6 (21.1-111.9)	-66.5	3.3 (0.1-24.1)	-98.1
C-PRP	172.3 (92.6-255.3)	59.9 (19.7-126.4)	-65.2	3.0 (0.6-9.2)	-98.3
PRF	171.9 (64.8-270.8)	35.0 (2.4-130.0)	-79.6	1.1 (0.1-7.5)	-99.2
C-PRF	166.5 (66.6-283.0)	39.4 (4.1-116.4)	-76.3	1.6 (0.1-12.4)	-98.9

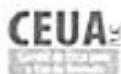
Δ%: percent variation in contraction; PRP: platelet-rich plasma, C-PRP: platelet-rich plasma control wounds; PRF: platelet-rich fibrin, C-PRF: platelet-rich fibrin control wounds; P[time]<0.001 and P[treatment vs. time]=0.022 obtained with a mixed linear model. Negative contraction rates indicate positive healing response

Table 2 – Descriptive measures for quantification of collagen (mm²) in cutaneous wounds according to treatment and time

Time (days)	PRP	C-PRP	PRF	C-PRF
7	1.54±1.02	1.11±0.29	0.97±0.34	1.19±0.79
14	1.88±1.04	2.16±1.06	2.22±1.08	2.44±0.99
Δ%	22%	95%	129%	105%

Data are presented as means±standard deviation; Δ%: percent variation; PRP: platelet-rich plasma; C-PRP: platelet-rich plasma control wounds, PRF: platelet-rich fibrin; C-PRF: platelet-rich fibrin control wounds; P[time]<0.001 and P[treatment vs. time]=0.380 obtained by analysis of variance for repeated measures

ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP DA PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 035/11 – CEUA

Porto Alegre, 10 de março de 2011.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00205, intitulado: **"Efeito do plasma rico em plaquetas e da fibrina rica em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas em ratos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora do CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jefferson Braga da Silva
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br