

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

RODRIGO SUPRANZETTI DE REZENDE

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA, HISTOLÓGICA E DE COLÁGENO
EM FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS TRATADAS E NÃO
TRATADAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINO**

DOUTORADO

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL

2018

RODRIGO SUPRANZETTI DE REZENDE

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA, HISTOLÓGICA E DE COLÁGENO
EM FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS TRATADAS E NÃO
TRATADAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Saúde animal), da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde animal

Orientador: Prof. Dr. Duvaldo Eurides

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL

Agosto, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R467a Rezende, Rodrigo Supranzetti de, 1976-
2018 Análise morfométrica, histológica e de colágeno em feridas cutâneas de coelhos tratadas e não tratadas com plasma rico em plaquetas de equino [recurso eletrônico] / Rodrigo Supranzetti de Rezende. - 2018.

Orientador: Duvaldo Eurides.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.798>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Cicatrização. 3. Colágeno. 4. Microscopia eletrônica de transmissão. I. Eurides, Duvaldo, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de **TESE DE DOUTORADO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa d/e: **TESE DE DOUTORADO N° PPGCV/018/2018**

Data: 30/08/2018

Discente: **Rodrigo Supranzetti de Rezende** – Matrícula – 11613VET016

Título da Tese: **ANÁLISE MORFOMÉTRICA, HISTOLÓGICA E DE COLÁGENO EM FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS TRATADAS E NÃO TRATADAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINO.**

Linha de pesquisa: **CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA**

Projeto de Pesquisa de vinculação: **MÉTODOS DIAGNÓSTICOS, ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES**

Aos 30 dias do mês de Agosto do ano de 2018 às 08:00 horas na sala 2D54 - Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: **Marcelo Emílio Beletti** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Francisco Cláudio Dantas Mota** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Humberto Eustáquio Coelho** – UNIVERSIDADE DE UBERABA; **Luiz Augusto de Souza** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS e **Duvaldo Eurides** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Duvaldo Eurides concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) Aprovado.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 12 horas e 00 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 30 de Agosto de 2018.


Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho
UNIVERSIDADE DE UBERABA


Prof. Dr. Luiz Augusto de Souza
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS


Prof. Dr. Duvaldo Eurides
ORIENTADOR

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO SUPRANZETTI DE REZENDE- nascido em 03 de abril de 1976, possui graduação em Medicina Veterinária (2000) e mestrado em Ciências Veterinárias (2008) pela Universidade Federal de Uberlândia. Iniciou sua carreira profissional no ano de 2000, atuando na área de clínica médica de pequenos animais no hospital veterinário de Uberaba da Universidade de Uberaba (UNIUBE). Onde desde o ano de 2005 é professor titular do curso de medicina veterinária, ministrando os componentes curriculares de clínica médica e terapêutica de animais de pequeno porte e prática hospitalar em Medicina Veterinária. Foi diretor clínico do hospital veterinário, da Universidade de Uberaba (UNIUBE) durante cinco anos (2012 a 2016). Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Clínica Médica de Pequenos Animais.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Dedico este trabalho a minha esposa Daniela e aos meus amados filhos, Artur e Júlia, pois com muita compreensão e carinho me ajudaram a vencer esta longa etapa. Sem eles este esforço não teria valido a pena.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado, me iluminando e guiando.

Aos meus pais, Valdemir e Maria Angélica, dos quais me orgulho muito e são exemplos de vida.

À minha esposa, Daniela, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado me dando forças para continuar meu caminho profissional.

Aos meus filhos, Artur e Júlia, os quais são minha força e para os quais toda esta caminhada faz sentido.

Ao meu orientador, Professor Duvaldo, que confiou em meu trabalho e me honrou com sua amizade.

À Uniube, que me propiciou crescimento profissional e me confiou seu bem mais precioso, os alunos.

Ao HVU, minha casa, que permitiu que utilizasse sua infraestrutura e equipamentos para que este experimento pudesse ser realizado.

Ao Professor Eustáquio, meu irmão na vida maçônica, diretor do curso de Medicina Veterinária que foi um apoiador e incentivador para que pudesse concluir esta etapa profissional.

Ao meu amigo e eterno mestre Professor Humberto Eustáquio Coelho, que com sua simplicidade e alegria de viver me estimulou a prosseguir nesta jornada.

OBRIGADO

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1. Introdução.....	15
2. Revisão de literatura.....	16
2.1. Cicatrização de feridas	16
2.2. Plasma rico em plaqueta	17
2.3. Fatores de crescimento plaquetário	19
2.4. Processo de obtenção do plasma rico em plaqueta	21
2.5. Avaliação histológica da cicatrização de feridas cutâneas	22
2.6. Avaliação das fibrilas de colágeno por microscopia eletrônica de transmissão.....	24
Referências	25
 CAPÍTULO 2- Avaliação morfométrica e histológica de feridas em pele de coelhos tratadas e não tratadas com plasma rico em plaquetas de equino.....	31
 CAPÍTULO 3- Análise ultraestrutural do colágeno de feridas cutâneas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas de equino.....	49
 APÊNDICE A- Normas da revista: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, referente aos capítulos 2 e 3.....	64
 APÊNDICE B- Ofício número 034/2016, do comitê de ética em experimentação animal (CEEa) da Universidade de Uberaba.....	73

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Escores e médias das observações morfométricas das feridas cutâneas de coelhos, controles e tratadas com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação.....38

Tabela 2 Escores das observações histológicas das feridas cutâneas de coelhos, controles e tratadas com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação.....40

Tabela 3 Correlação linear entre as variáveis morfométricas e histológicas das feridas cutâneas de coelhos, controles e tratadas com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação.....42

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Média da porcentagem, diâmetro e densidade da fibrila de colágeno das feridas cutâneas de coelhos, controle e tratada com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação.....56

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2

Figura 1. Figura 1. Pranchas com as características morfológicas e histológicas das feridas cutâneas de coelhos dos grupos de observação. G I, grupo decorridos três dias de pós-operatório. Observar a semelhança macroscópica entre a ferida tratada com PRP e pomada de gentamicina (A) e controle (C) a fotomicrografia do grupo I decorridos três dias de pós-operatório com presença de crosta na ferida tratada (B) e controle (D). G II, grupo decorridos sete dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (E) em comparação com a ferida controle (G) a fotomicrografia do grupo II decorridos sete dias de pós-operatório com ausência de crosta da ferida tratada (F) e ausência de crosta e presença de edema da ferida controle (H). G III, grupo decorridos 14 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (I) em comparação com a ferida controle (K) a fotomicrografia do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório com reepitelização com maior intensidade na ferida tratada (J) do que na ferida controle (L). G IV, grupo decorridos 21 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (M) em comparação com a ferida controle (O) a fotomicrografia do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório, com reepitelização com maior intensidade na ferida tratada (N) do que na ferida controle (P). Coloração HE, escala 20 μ m.....43

CAPÍTULO 3

Figura 1. Feridas cutâneas de coelhos do grupo I decorridos três dias de pós-operatório. Observar a semelhança macroscópica entre a ferida tratada (A) e controle (B), a fotomicrografia do grupo I decorridos três dias de pós-operatório, com presença de crosta e semelhança na quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) e controle (D), (seta), (Coloração picosirius, aumento 5vezes e escala de 100 μ m).56

- Figura 2.** Eletromicrografia do grupo I decorridos três dias de pós-operatório. Verificar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação a controle (B), (Aumento 40.000 vezes)57
- Figura 3.** Feridas cutâneas de coelhos do grupo II decorridos sete dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (A) em comparação com a controle (B), a fotomicrografia do grupo II decorridos sete dias de pós-operatório, com presença de crosta e semelhança na quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) e controle (D), (seta), (Coloração picrosirius, aumento 5vezes e escala de 100µm)57
- Figura 4.** Eletromicrografia do grupo II decorridos sete dias de pós-operatório. Observar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação a controle (B), (Aumento 40.000 vezes)57
- Figura 5.** Feridas cutâneas de coelhos do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (A) em comparação com a controle (B), a fotomicrografia do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório, com a diminuição da crosta e semelhança na quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) e controle (D), (seta), (Coloração picrosirius, aumento 5vezes e escala de 100µm)58
- Figura 6.** Eletromicrografia do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório. Notar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação a controle (B). Em ambas as feridas é notado fibrilas de elastina, (setas), (Aumento 40.000 vezes).59
- Figura 7.** Feridas cutâneas de coelhos do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (A) em comparação com a controle (B), a fotomicrografia do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório, com a reepitelização e maior quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) em comparação com a controle (D), (seta), (Coloração picrosirius, aumento 5vezes e escala de 100µm).59
- Figura 8.** Eletromicrografia do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório. Constatar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação ao grupo controle (B). Presença de fibrilas de elastina na ferida tratada (A), (seta), (Aumento 40.000 vezes).59

ANÁLISE MORFOMÉTRICA, HISTOLÓGICA E DE COLÁGENO EM FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS TRATADAS E NÃO TRATADAS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE EQUINO

RESUMO - O plasma rico em plaquetas autólogo é importante no processo cicatricial de cirurgias reconstrutivas, auxilia na estimulação da angiogênese, no entanto, o plasma heterólogo também se mostrou eficaz. O colágeno é sintetizado e segregado no espaço extracelular e organizados em fibrilas estriadas de acordo com o tipo de tecido. Com o objetivo de avaliar os aspectos macroscópicos, histológicos e a porcentagem de colágeno de feridas cutâneas de coelhos tratadas e não tratadas com plasma rico em plaquetas de equinos, utilizou-se 24 coelhos da raça Nova Zelândia, com idade de 12 meses e de aproximadamente 3,0Kg de peso corporal. Os animais foram separados em quatro grupos de igual número e submetidos a remoção de pele na linha média dorsal torácica (ferida tratada) e lombar (ferida controle). Nas tratadas foi aplicado plasma rico em plaqueta de equino e pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, e nas do grupo controle somente pomada. Os do grupo I foi feita a colheita de tecido cutâneo para a avaliação histológica com três dias de pós-operatório, os do grupo II com sete dias, os do grupo III com 14 dias e os do grupo IV com 21 dias. Decorrido o período de avaliação de cada grupo foi retirado fragmento de pele para avaliação histológica, da porcentagem de colágeno e do diâmetro e densidade da fibrila de colágeno por microscopia eletrônica de transmissão. O uso associado do plasma rico em plaquetas heterólogo de equino com a pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, em feridas de pele induzidas cirurgicamente mostrou-se eficaz na maturação das fibrilas colágenas e na antecipação do processo cicatricial.

Palavras-chave: cicatrização, colágeno, fatores de crescimento, microscopia eletrônica de transmissão, pele, plaquetas

MORPHOMETRIC, HISTOLOGICAL AND COLLAGEN ANALYSIS IN A RABBIT DERMAL WOUND TREATED AND UNTREATED WITH EQUINE PLATELET-RICH PLASMA

ABSTRACT - Autologous platelet-rich plasma is important in the cicatricial process of reconstructive surgeries, aiding in the stimulation of angiogenesis. However, heterologous plasma has been shown to be more effective. Collagen is synthesized and secreted into the extracellular space and organized into striated fibrils according to the type of tissue. The objective was to evaluate the macroscopic and histological aspects of two dermal wounds on rabbits, one of which was treated with equine platelet-rich plasma. Additionally, we evaluated the percentage of collagen in these wounds. In order to achieve this, we used 24 New Zealand rabbits that were 12 months old and had a body weight of approximately 3.0 kg. The animals were separated into four groups of equal numbers and were subjected to skin removal on the thoracic dorsal midline (treated wound) and the lumbar region (control wound). To the wound receiving treatment, equine platelet-rich plasma and ointment containing gentamicin, sulfanilamide, sulfadiazine, urea, and vitamin A were applied. To the control wound, only the ointment was applied. Samples from group I were collected from the dermal tissue for histological evaluation three days postoperatively, from group II after seven days, from group III after 14 days and from group IV after 21 days. After the evaluation period of each group, a dermal fragment was collected for histological evaluation. The percentage of collagen and the diameter and density of the collagen fibril were assessed by transmission electron microscopy. The associated use of equine heterologous platelet-rich plasma with the ointment containing gentamicin, sulfanilamide, sulfadiazine, urea, and vitamin A in surgically induced dermal wounds, proved to be effective for the maturation of collagen fibrils and anticipation of the cicatricial process.

Keywords: healing, collagen, growth factors, transmission electron microscopy, dermis, platelets

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1- INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um complexo e organizado processo que se desenvolve em uma sequência de eventos celulares e moleculares. Cada fase da cicatrização envolve substâncias biologicamente ativas, substâncias celulares e intercelulares como as citocinas e fatores de crescimento (FC), que possuem atividades sinalizadoras, supressoras e estimuladoras no processo (DE SOUSA et al., 2015).

O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente, é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo. A cicatrização de feridas consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para a reconstituição tecidual (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A lesão tecidual é o estímulo inicial para o processo de cicatrização, que deposita elementos sanguíneos em contato com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, provoca degranulação de plaquetas e ativação das cascatas de coagulação e do complemento. Com isso, há liberação de vários mediadores vasoativos e quimiotáticos que conduzem o processo cicatricial mediante atração de células inflamatórias para a região da ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos, anucleados, de forma discoide encontrados na corrente sanguínea que se originam a partir de megacariócitos presentes na medula óssea (DA FONTOURA PEREIRA et al., 2013).

O plasma rico em plaquetas (PRP) pode ser definido como uma fração de um volume de plasma com maior concentração de plaquetas do que no sangue periférico. A concentração de plaquetas e a quantidade de fatores de crescimento no PRP dependem da técnica utilizada, mas, em média, o PRP tem de três a cinco vezes mais fatores de crescimento do que o sangue periférico (MARQUES et al., 2014).

Embora a maioria dos resultados positivos relatados, não há evidência conclusiva do efeito do PRP na cicatrização de tecidos sendo que um dos motivos podem ser a falta de conhecimento das características básicas do PRP, como o número de

plaquetas necessárias e a necessidade de ativação dessas plaquetas (MARQUES et al., 2014).

Estudos sobre o PRP estão voltados à avaliação de seus fatores de crescimento, os quais são importantes no reparo das feridas e que são liberados a partir da degranulação plaquetária. A secreção ativa destes fatores tem início 10 minutos após a coagulação plaquetária, onde mais de 95% são secretados dentro de uma hora (MARQUES et al., 2014). Quando em contato com seus receptores de membrana respectivos estimulam a angiogênese, replicação dos tecidos, cicatrização e crescimento de novas estruturas orgânicas (CARVALHO; SILVA; UETANABARA, 2009).

Objetivou-se verificar a viabilidade do plasma rico em plaquetas heterólogo, em feridas induzidas experimentalmente em coelhos por meio de avaliações morfométricas, histológicas e por microscopia eletrônica de transmissão. Verificando-se assim, a característica cicatricial das lesões tratadas em relação as não tratadas com PRP no período de avaliação.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cicatrização de feridas

É um processo biológico complexo que envolve respostas celulares e moleculares com o intuito de reorganizar inicialmente os componentes da matriz extracelular, para o fechamento rápido da ferida bem como obter uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória (HILMI et al., 2013; REBOLLA et al., 2013).

A lesão do subendotélio vascular expõe o colágeno que libera ativadores de plaquetas, resultando-se na agregação e formação do tampão plaquetário. Em contato com o colágeno a trombina e a fibronectina promovem a degranulação das plaquetas, liberando o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), da transformação de crescimento alfa e beta (TGF α e TGF β), do crescimento epidérmico (EGF) e do de crescimento dos fibroblastos (FGF). Além disso, as plaquetas ativam a via intrínseca

das proteínas responsáveis pela formação do coágulo (DE SOUSA et al., 2015; HOUDEK et al., 2016). O coágulo atua como matriz de colonização para as células inflamatórias (neutrófilos, monócitos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais), que são estimuladas por fatores quimiotáticos, iniciados por ação das prostaglandinas, seguidas pelos PDGF e TGF α (DE SOUSA et al., 2015).

Durante o processo inflamatório ocorre predomínio dos polimorfonucleares, seguidos por macrófagos e linfócitos. Os macrófagos apresentam a função antimicrobiana e de fagocitose, desbridamento da ferida, regulação da matriz extracelular, ativação da angiogênese e liberação do fator de crescimento de fibroblastos e metaloproteinases. Os linfócitos são ativados pelos macrófagos e liberam citocinas, TGF β , interleucina 2 (IL2) e interferon gama (INF γ), (DE SOUSA et al., 2015).

Na fase de formação tecidual, fibroblastos e células epiteliais proliferam, sendo os fibroblastos responsáveis pela síntese de colágeno e contração da ferida. Já as células epiteliais passam pelo processo de diferenciação e maturação, constituindo a epiderme neoformada. A remodelagem da epiderme ocorre na matriz extracelular pelas metaloproteínas, com o depósito de proteoglicanas e colágeno (DE SOUSA et al., 2015).

A finalidade da cicatrização é reparar a lesão tissular e vascular para garantir a integridade do epitélio e evitar a agressão de microrganismos patogênicos. A precocidade do processo cicatricial é fundamental para a manutenção do estado de higidez do indivíduo (DE SOUSA et al., 2015).

2.2 Plasma rico em plaqueta

O plasma rico em plaquetas é um concentrado de plaquetas, para a obtenção de altas concentrações de fatores de crescimento (VENDRUSCOLO et al., 2012). É uma preparação multimolecular composta de plasma e plaquetas com uma contagem de plaquetas acima do sangue periférico e leucócitos opcionais (RUBIO-AZPEITIA et al., 2017).

O PRP também foi demonstrado como possível alternativa promissora mais eficiente que o enxerto, já que reúne os FCs liberados pelas plaquetas, acelerando processos reparadores em muitas áreas. Na odontologia, estudos comprovaram sua eficácia em promover uma osteogênese mais rápida, com maior qualidade do trabeculado no reparo do osso alveolar (BRANDÃO, 2005).

Para uso terapêutico, o PRP deve conter de três a cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos (KEVY; JACOBSON, 2004). Concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L são suficientes para o preparo do PRP (ANITUA et al., 2006) que, quando em contato com seus receptores nucleares, estimulam a angiogênese e a replicação dos tecidos e, como anti-inflamatório, induz a cicatrização e o crescimento de novas estruturas orgânicas (LEME, 2002; EURIDES et al., 2015).

Para apresentar propriedades regenerativas e efeitos terapêuticos, a concentração do PRP deve ser superior a 300.000 plaquetas/ μ L. Entretanto, para obter uma melhor eficácia a concentração deve ser aproximadamente de 1.000.000 de plaquetas/ μ L, ou seja, cerca de cinco vezes acima da concentração basal (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; MÉNDEZ-BOLAINA; TREJO-BAHENA, 2012; VANAT et al., 2012).

As fontes de PRP podem ser autólogas, homólogas ou heterólogas. A autóloga possui a vantagem de diminuir a transmissão de doenças infecto contagiosas e reações imunológicas por rejeição. No entanto, uma possível desvantagem do uso de fontes heterólogas ou homólogas seria a impossibilidade das plaquetas secretarem de forma adequada todos os fatores de crescimento, além de conter fatores de antigenicidade (EURIDES et al., 2010; VANAT et al., 2012).

A obtenção do PRP é simples e o procedimento pode ser adaptado para a maioria das situações clínicas com infraestrutura mínima, mantendo boa relação custo benefício, sendo que a sua aplicação pode resultar em uma melhor qualidade de vida ao paciente por acelerar o processo de cicatrização e reduzir o custo do tratamento (CARVALHO; SILVA; UETANABARA, 2009; SHAN et al., 2013). A obtenção do plasma rico em plaquetas pelo método manual é uma técnica simples e de baixo custo que consiste da coleta de sangue em tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante. No processamento pode-se realizar uma ou duas centrifugações do sangue total (DA FONTOURA PEREIRA et al., 2013), quando o produto final resulta em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e fatores de

crescimentos (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010). Sua utilização é documentada na literatura médica e odontológica, cirurgias plásticas, bem como ortopédicas (MARQUES et al., 2014).

A escolha da fonte celular é decisiva na concepção de uma estratégia de regeneração cutânea. A eficácia clínica envolve o uso de PRP ativado que, na formação de fibrina e na coagulação, vai limitar as células ao local da aplicação. No entanto, o sucesso das terapias clínicas também pode ser dificultado porque estas células podem encontrar um ambiente que dificulta sua diferenciação e potencial regenerativo (RUBIO-AZPEITIA et al., 2017).

Nos tratamentos, uma fonte complexa de fatores de crescimento essenciais para o reparo natural de ferida e promoção de tecido deve ser liberada no tempo e nível requeridos, imitando o processo fisiológico de cicatrização de feridas (ANITUA et al., 2006).

2.3 Fatores de crescimento plaquetário

Um dos contribuintes para a ativação plaquetária é um lipídeo (FAP) que se acumula no tecido após a lesão, favorece a síntese de precursores da reação inflamatória e a cicatrização. O FAP induz a produção de fosfolipase A₂ e de prostaglandinas associadas à reação inflamatória. Além disso, ativa a expressão de genes envolvidos na remodelação da matriz tecidual e proteínas mitogênicas auxiliando, dessa forma, na reparação dos tecidos (MA; BAZAN, 2000).

Existem inúmeros fatores de crescimento plaquetário no sangue denominado citocinas que pertencem a um grupo de polipeptídios secretados por várias moléculas reguladoras no organismo. Atuam como mediadoras na maturação celular e são responsáveis pelos processos de reparação tecidual (STENN; PAUS, 2001). Possuem ação angiogênica, ativam a microcirculação local e intensificam vários grupos celulares na integração e vitalidade de tecidos (VICK et al., 2006; EURIDES et al., 2010).

Os fatores de crescimento (FC) provenientes dos α - grânulos plaquetários estimulam a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, síntese de colágeno,

neovascularização e deposição de matriz extracelular (DA FONTOURA PEREIRA et al., 2013). É referido que pelo menos sete FC derivados dos α - grânulos plaquetários como o de transformação beta (TGF- β), de derivados de plaquetas (PDGF), semelhante a insulina I (IGF-I), fibroblástico (FGF), epidermal (EGF), vascular endotelial (VEGF) e do tecido conjuntivo (CTGF), (DA FONTOURA PEREIRA et al., 2013; HOUDEK et al., 2016). Devido a estas propriedades, o PRP se tornou um produto com intenso potencial na integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de gordura, bem como estimulante na cicatrização de feridas (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010).

A ação conjunta desses fatores resulta na sinalização para que células mesenquimais e epiteliais migrem para o local lesado, sofram divisão mitótica, estimulem a síntese de matriz e colágeno, resultando em cicatrização mais rápida e eficiente. Além disso, outras proteínas das plaquetas como fibrina, fibronectina e vitronectina, atuam como moléculas de adesão celular (MARX et al., 1998).

Como os fatores de crescimento são instáveis e não permanecem em estado livre na corrente sanguínea, o PRP é a condução adequado para aumentar sua concentração nos tecidos lesados (KOBIAISHI WILSON; BARBIERI; MAZZER, 2006). A secreção dos fatores de crescimento inicia-se 10 minutos após a formação do PRP, e mais de 95% dos fatores de crescimento pré-sintetizados são secretados durante a primeira hora. Após a liberação inicial dos fatores, as plaquetas sintetizam e secretam fatores de crescimento adicionais durante sete dias (NIKOLIDAKIS; JANSEN, 2008).

A concentração dos fatores de crescimento (FCs) no gel de plaquetas é significativamente alta, resultando em 10 a 25 vezes mais PDGF e TGF- β do que em um processo fisiológico sem adição de PRP. Sua aplicação clínica tem potencial para aumentar a cicatrização tecidual (FLORYAN; BERGHOFF, 2004; BARBOSA et al., 2014).

2.4 Processo de obtenção do plasma rico em plaquetas

O PRP pode ser obtido por meio de diferentes protocolos necessitando de equipamentos de alto custo (DE OBARRIO et al., 2000; MARX et al., 1998), como também por técnicas simples de baixo custo como a centrífuga laboratorial comum (SOUZA et al., 2014). O sangue a ser utilizado deve ser colhido em tubos contendo preferencialmente citrato de sódio como anticoagulante, por não alterar os receptores de membrana das plaquetas (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010; CAMARGO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

A manipulação do sangue durante a centrifugação deve ser realizada de forma cuidadosa e asséptica, e processada em rotação adequada para assegurar a separação das células plaquetárias das demais presentes no sangue, e também para evitar alterações na membrana. A centrifugação pode ser realizada de maneira única ou repetida em duas etapas (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010; SOUZA et al., 2014), e sua preparação demora, em média, 45 minutos, após a coleta do sangue (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2010).

O protocolo de dupla centrifugação é necessário para que possa concentrar as plaquetas durante o preparo de PRP. Não só o número de centrifugações é importante no preparo do PRP, assim como a força de rotação selecionada. O aumento da rotação pode garantir maior concentração plaquetárias (MARX et al., 1998).

Para ser considerado como PRP, a concentração mínima deve ser de 500.000 a 1.000.000 de plaquetas por μL (MARX et al., 1998; DE OBARRIO et al., 2000; ANITUA et al., 2006; SILVA et al., 2009), ou, ainda, possuir aumento de 300 a 400% de plaquetas em relação à quantidade presente no sangue periférico para que possa acelerar a reparação tecidual (WEIBRICH et al., 2004; KIM et al., 2014). Quanto maior o número de plaquetas no sangue total, mais concentrado em plaquetas será o PRP (MESSORA et al., 2009; SILVA et al., 2009; BARBOSA et al., 2014).

Não apenas o número de plaquetas das preparações deve ser observado, mas também os aspectos qualitativos, ou seja, a função das plaquetas. Um número considerável de plaquetas, porém com viabilidade comprometida, não proporcionará

o efeito desejado, já que os fatores de crescimento essenciais podem ser eliminados em consequência de procedimentos inadequados (DUSSE et al., 2008).

A avaliação da atividade biológica dos fatores de crescimento derivados das plaquetas é complexa, de modo que não há como avaliar previamente a qualidade do gel produzido (LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000).

Após a extração do PRP, com o auxílio de uma pipeta, deve se adicionar o gluconato ou cloreto de cálcio 10% para induzir a coagulação, formação de um gel e promover ativação das plaquetas. Uma vez coagulado está pronto para ser utilizado. Sua consistência gelatinosa e adesiva facilita o manejo cirúrgico e curativo (KOBAYASHI WILSON; BARBIERI; MAZZER, 2006; SOUZA et al., 2014).

2.5 Avaliação histológica do tecido cicatricial

A histologia tem sido utilizada para quantificação celular nos enxertos de tecidos, além de qualificar a estrutura tecidual e angiogênese precoce uma vez que a avaliação morfológica demonstra de forma indireta a cicatrização. Além disso é um método cujos achados demoram a ser visualizados (MARX et al., 1998; KOBAYASHI WILSON; BARBIERI; MAZZER, 2006; SOUZA et al., 2014).

Devido à vida curta dos fatores de crescimento no tecido lesado a avaliação invasiva por meio de histologia é a mais indicada para a identificação dos mesmos (SOUZA et al., 2014).

A microscopia ótica é método de avaliação do processo de cicatrização muito utilizada em estudos clínicos e experimentais, no entanto, a sua importância é, de certo modo, questionada pela subjetividade na estimativa (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; HOEDEK et al., 2016). Porém, quando realizada por patologistas experientes e imparciais, pode fornecer dados passíveis de quantificação que são fundamentais na análise e comparação de processos cicatriciais (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

O processo de reparação pode ser avaliado mediante técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE), utilizando diversos indicadores, como exsudato neutrofílico, edema intersticial, necrose de mucosa, necrose transmural, deposição de fibrina,

congestão vascular, infiltrado monomorfonuclear, atividade regenerativa da mucosa, proliferação fibroblástica, neoformação vascular, processo granulomatoso e fibrose intersticial (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; MINAMIMURA et al., 2014; HOUDEK et al., 2016).

Outro método histológico de utilidade, principalmente na avaliação e diferenciação de tipos de colágeno, é o da polarização com picrosirius. Quando o corante sirius red F3AB, reage com o colágeno, sua birrefringência normal é aumentada devido ao fato de suas moléculas serem ligadas às fibrilas de colágeno de maneira que elas fiquem paralelas (HOUDEK et al., 2016). O estudo comparativo de órgãos de animais vertebrados por este método identificou estreita correlação entre a localização de diferentes cores e a intensidade de birrefringência com a distribuição bioquímica dos tipos I, II e III de colágeno, criando a possibilidade de sua diferenciação tecidual (KOBIAISHI WILSON; BARBIERI; MAZZER, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

O colágeno tipo I aparece como fibras espessas, fortemente birrefringentes, de coloração amarelo ou vermelho, já o do tipo III possui o aspecto de fibras finas, fracamente birrefringentes e de coloração esverdeada (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; HOUDEK et al., 2016). O cálculo da porcentagem das fibras, classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração, permite avaliação qualitativa de fibras colágenas, podendo ser utilizado em estudos de cicatrização (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Para verificar a influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes, idealizou o índice de maturação do colágeno (IMaC), que foi definido como a razão entre as percentagens de colágeno tipo I e tipo III (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; HOUDEK et al., 2016; CHANG et al., 2017). Este índice tem sido amplamente utilizado por ser de fácil reprodutibilidade e facilitar a interpretação dos resultados, onde valores acima de um representam predominância de colágeno tipo I e os abaixo de um representam predomínio de colágeno tipo III (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

2.6 Avaliação das fibrilas de colágeno por microscopia eletrônica de transmissão

O colágeno é o elemento estrutural primário na matriz extracelular (ECM), onde é organizado em fibras insolúveis de resistência à tração significativa. As fibras transmitem forças, dissipam energia e evitam falhas mecânicas prematuras em tecidos normais. Além disso, eles fornecem sugestões biológicas para células adjacentes que regulam uma variedade de respostas funcionais (HUANG; APKARIAN; CHAIKOF, 2001).

As moléculas de colágeno são sintetizadas, segregadas no espaço extracelular e organizadas em fibrilas estriadas com uma organização específica de tecido (BIRK et al., 1990). Verificou-se que uma variedade de fatores influencia a fibrilogenesia de colágeno e que foram referidos como importantes na regulação da arquitetura das fibrilas (BIRK et al., 1990; APKARIAN; CHAIKOF, 2001; HOUDEK et al., 2016; HUANG). Estes incluem a interação com proteoglicanos, a sequência e a extensão do processamento de pró colágeno, o tipo de colágeno presente e a interação de diferentes tipos de colágeno (BIRK et al., 1990).

Os tipos de colágeno podem ser importantes na determinação da arquitetura das fibrilas. Foi referido que o colágeno in vitro de tipo I forma fibrilas mais espessas do que o colágeno tipo III, enquanto que as fibrilas de colágeno tipo II geralmente possuem os diâmetros menores (BIRK et al., 1990; HUANG; APKARIAN; CHAIKOF, 2001). Estudos recentemente, foi referido que diferentes tipos de colágeno demonstraram formar fibrilas heterotípicas em uma variedade de tecidos. Por exemplo, os tipos de colágeno I e V são co-ensaiados no estroma corneano secundário, tipos I e II no estroma corneano primário, tipos II, IX e XI em cartilagem e tipos I e III num número o tecidos incluindo derme e tendão (STARBORG et al., 2013).

As fibrilas de colágeno variam em diâmetro de 12 a 500 nm em função do tecido e da idade, e são os elementos de tensão primário dos tecidos, como tendões, ligamentos, pele, cartilagem, osso, fáscia, cápsulas articulares, vasos sanguíneos e outros órgãos cavitários. A estrutura dos genes de colágeno fibrilar, nas questões

fundamentais, permanecem sem resposta sobre a montagem e organização das fibrilas (STARBORG et al., 2013).

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é uma técnica para estudar fibrilas de colágeno em que o diâmetro é o parâmetro mais comumente medido (HUANG; APKARIAN; CHAIKOF, 2001). No entanto, as funções das células e dos tecidos dependem não apenas das distribuições do diâmetro da fibrila do colágeno, mas também do número de fibrila do colágeno, da organização 3D, da fração do volume de fibrilas (FVF) e do comprimento das fibras (STARBORG et al., 2013).

As fibrilas de colágeno individuais em tecidos embrionários tem de 12 a 50 nm de diâmetro e são embaladas de forma muito curta em feixes curvilíneos e, portanto, não são prontamente detectáveis por microscopia óptica (STARBORG et al., 2013). As fibras em tecidos mais antigos podem ter um diâmetro de 500 nm, mas mesmo estas estão no limite da resolução da maioria dos microscópios de luz (BIRK et al., 1990; HUANG; APKARIAN; CHAIKOF, 2001; STARBORG et al., 2013).

REFERÊNCIAS

ANITUA, E. et al. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. **Journal of biomedical materials research part A**, v. 77, n. 2, p. 285–293, 2006.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30585>

BARBOSA, A. L. T. et al. Mononuclear stem cells associated with platelet-rich plasma in the consolidation of bone defects in dogs. A pilot study. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1718–1726, 2014.

<https://doi.org/10.1590/1678-6425>

BIRK, D. E. et al. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. **Journal of cell science**, v. 95, n. 4, p. 649–657, 1990.

BRANDÃO, G. Estudo comparativo entre a eficácia clínica de enxertos ósseos (autógenos, alógenos, aloplásticos) com ou sem utilização de plasma rico em plaquetas. 2005. **Capturado em**, v. 12, 2005.

CAMARGO, M. C. et al. Applicability of crystalline cellulose membrane in the treatment of skin wounds induced in Wistar rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 29, n. 7, p. 429–437, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S0102-86502014000700004>

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivo brasileiro de cirurgia digestivo**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CARVALHO, L. R.; SILVA, M. F.; UETANABARA, R. Plasma rico em plaqueta (PRP): alternativa para regeneração de defeitos ósseos periodontais. **Revista da associação brasileira de odontologia**, v. 16, n. 6, p. 359–63, 2009.

CHANG, P. et al. A bioartificial dermal regeneration template promotes skin cell proliferation in vitro and enhances large skin wound healing in vivo. **Oncotarget**, v. 8, n. 15, p. 25226, 2017.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16005>

DA FONTOURA PEREIRA, R. C. et al. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. **Ciência rural**, v. 43, n. 6, p. 1122–1127, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000052>

DE OBARRIO, J. J. et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology—case reports. **International journal of periodontics & restorative dentistry**, v. 20, n. 5, 2000.

DE OLIVEIRA-FILHO, M. A.; NUNES, P. A. Plasma rico em plaquetas de coelhos: introdução a um modelo animal experimental. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva (São Paulo)**, v. 21, 2008.

DE SOUSA, S. M. T. et al. POTENCIAL DE CICATRIZAÇÃO DO LÁTEX DE SYNADENIUM UMBELLATUM EM FERIDAS DORSAIS DE RATOS. **Estudos**, v. 42, n. 4, p. 481–491, 2015.

DONATTI, C. et al. Uso do plasma rico em plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 809–818, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000300029>

DUSSE, L. M. S. et al. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 40, n. 3, p. 193–197, 2008.

EURIDES, D. et al. Efeito de concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**, v. 105, p. 39–43, 2010.

EURIDES, D. et al. Plasma rico em plaquetas autólogas na cicatrização do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v. 52, n. 1, p. 48–56, 2015.

<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v52i1p48-56>

FLORYAN, K. M.; BERGHOFF, W. J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. **Association of perioperative registered nurses journal**, v. 80, n. 4, p. 667–674, 2004.

HILMI, M. et al. Chitosan dermal substitute and chitosan skin substitute contribute to accelerated full-thickness wound healing in irradiated rats. **Biomed research international**, v. 2013, 2013.

HOUDEK, M. T. et al. Collagen and fractionated platelet-rich plasma scaffold for dermal regeneration. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 137, n. 5, p. 1498–1506, 2016.

<https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002094>

HUANG, L.; APKARIAN, R. P.; CHAIKOF, E. L. High-resolution analysis of engineered type I collagen nanofibers by electron microscopy. **Scanning**, v. 23, n. 6, p. 372–375, 2001.

<https://doi.org/10.1002/sca.4950230603>

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **Journal of dental education**, v. 65, n. 5, p. 456–462, 2001.

KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **Journal of extracorporeal technology**, v. 36, n. 1, p. 28–35, 2004.

KIM, M. Y. et al. Augmentation of tendon healing with an injectable tendon hydrogel in a rat Achilles tendon model. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 133, n. 5, p. 645e–653e, 2014.

<https://doi.org/10.1097/PRS.000000000000106>

KOBAIASHI WILSON, E. M.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. estudo experimental em coelhos. **Acta ortopédica brasileira**, v. 14, n. 4, 2006.

LANDESBURG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 58, n. 3, p. 297–300, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(00\)90058-2](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(00)90058-2)

LEME, J. J. Análise do potencial osteogênico do plasma rico em plaquetas no reparo de cavidades ósseas-Estudo histológico em cães. 2002.

MA, X.; BAZAN, H. E. Increased platelet-activating factor receptor gene expression by corneal epithelial wound healing. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 41, n. 7, p. 1696–1702, 2000.

MARQUES, F. P. et al. A manual method to obtain platelet rich plasma. **Acta ortopedica brasileira**, v. 22, n. 2, p. 75–77, 2014.

<https://doi.org/10.1590/1413-78522014220200798>

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology**, v. 85, n. 6, p. 638–646, 1998.

MESSORA, M. R. et al. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP): estudo em coelhos. **Revista sul brasileira de odontologia**, p. 135–141, 2009.

MINAMIMURA, A. et al. Comparison of collagen matrix treatment impregnated with platelet rich plasma vs bone marrow. **Journal of plastic surgery and hand surgery**, v. 48, n. 1, p. 15–20, 2014.

<https://doi.org/10.3109/2000656X.2013.793193>

NIKOLIDAKIS, D.; JANSEN, J. A. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. **Tissue engineering part B: reviews**, v. 14, n. 3, p. 249–258, 2008.

<https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0062>

REBOLLA, A. et al. Effect of Brassica oleracea in rats skin wound healing. **Acta cirurgica brasileira**, v. 28, n. 9, p. 664–669, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0102-86502013000900007>

RUBIO-AZPEITIA, E. et al. Adult Cells Combined With Platelet-Rich Plasma for Tendon Healing: Cell Source Options. **Orthopaedic journal of sports medicine**, v. 5, n. 2, p. 2325967117690846, 2017.

<https://doi.org/10.1177/2325967117690846>

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, D. J.; MÉNDEZ-BOLAINA, E.; TREJO-BAHENA, N. I. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. **International journal of peptides**, v. 2012, 2012.

SHAN, G.-Q. et al. Evaluation of the effects of homologous platelet gel on healing lower extremity wounds in patients with diabetes. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 12, n. 1, p. 22–29, 2013.

<https://doi.org/10.1177/1534734613477113>

SILVA, P. S. A. et al. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência rural**, v. 39, n. 1, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000100020>

SOUZA, M. V. DE et al. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa veterinária. brasileira**, p. 599–612, 2014.

STARBORG, T. et al. Using transmission electron microscopy and 3View to determine collagen fibril size and three-dimensional organization. **Nature protocols**, v. 8, n. 7, p. 1433, 2013.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.086>

STENN, K. S.; PAUS, R. Controls of hair follicle cycling. **Physiological reviews**, v. 81, n. 1, p. 449–494, 2001.

<https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.449>

VANAT, N. et al. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semana: ciências agrárias**, v. 33, n. 1, 2012.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Revista brasileira de cirurgia. plástica**, v. 25, n. 4, p. 589–594, 2010.

VENDRUSCOLO, C. P. et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 32, n. 2, p. 106–110, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200002>

VICK, V. L. et al. Use of autologous platelet concentrate in blepharoplasty surgery. **Ophthalmic plastic & reconstructive surgery**, v. 22, n. 2, p. 102–104, 2006.

<https://doi.org/10.1097/01.iop.0000202092.73888.4c>

WEIBRICH, G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, v. 34, n. 4, p. 665–671, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010>

CAPÍTULO 2- Avaliação morfométrica e histológica de feridas em pele de coelhos tratadas e não tratadas com plasma rico em plaquetas de equino

Morphometric and histological evaluation of rabbits skin wounds treated and not treated with equine platelet-rich plasma

(Artigo submetido no periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**)

Avaliação morfométrica e histológica de feridas em pele de coelhos tratadas
e não tratadas com plasma rico em plaquetas de equino

Morphometric and histological evaluation of rabbits skin wounds treated
and not treated with equine platelet-rich plasma

R.S. Rezende¹, D. Eurides², H.E. Coelho³, E.G.L. Alves³, G.C. Venturini³, R.L. Felipe¹

¹Aluno de pós-graduação. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG

²Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG

³Universidade de Uberaba. Uberaba, MG

RESUMO

O plasma rico em plaquetas autólogo é importante no processo cicatricial de cirurgias reconstrutivas, auxilia na estimulação da angiogênese, no entanto o plasma heterólogo mostrou-se mais eficaz. Utilizou-se 24 coelhos da raça Nova Zelândia, com idade de 12 meses, com peso corporal cerca de 3,0Kg. Os animais foram separados em quatro grupos de igual número e submetidos a remoção de pele na linha média dorsal torácica (ferida tratada) e lombar (ferida controle). Nas tratadas foi aplicado plasma rico em plaqueta de equino e pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, e nas do grupo controle somente com a pomada. Os do grupo I foi coletado tecido cutâneo para a avaliação histológica com três dias de pós-operatório, os do grupo II com sete dias, os do grupo III com 14 dias e os do grupo IV com 21 dias. Decorrido o período de avaliação de cada grupo foi coletado fragmento de pele para avaliação histológica. O uso associado do plasma rico em plaquetas heterólogo de equino com a pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, estimula o processo cicatricial em feridas cutâneas de coelhos induzidas experimentalmente.

Palavras-chave: cicatrização, pele, fatores de crescimento, plaquetas

ABSTRACT

Autologous platelet-rich plasma is beneficial in the healing process of reconstructive surgeries, contributing to the stimulation of angiogenesis, however heterologous plasma has been shown to be more effective. This study used 24 white New Zealand rabbits, aged

12 months, with a body weight of approximately 3 kg. The animals were separated into four equal groups and underwent skin removal in the thoracic (study wound) and lumbar (control wound) dorsal midline. Study wounds were treated with equine platelet-rich plasma and an ointment containing gentamicin, sulfanilamide, sulfadiazine, urea, and vitamin A. Control wounds were treated only with the ointment. Group I underwent histological evaluation three days after the skin removal procedure, group II after seven days, group III after 14 days, and group IV after 21 days. A skin fragment was collected for histological evaluation from each animal. The use of heterologous equine platelet-rich plasma along with gentamicin, sulfanilamide, sulfadiazine, urea, and vitamin A accelerated the healing process in surgically induced skin wounds.

Keywords: healing, skin, growth factors, platelets

INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo que restaura a integridade física externa das estruturas corporais e envolve integrações complexas entre células e vários outros fatores (De Masi *et al.*, 2016). É um processo dinâmico e complexo, composto pelas fases de inflamação do tecido, proliferação e remodelação (Campos *et al.*, 2007; De Masi *et al.*, 2016). O processo de cicatrização compreende a matriz extracelular, citocinas, células sanguíneas e fatores de crescimento (Campos *et al.*, 2007; Abegão *et al.*, 2015a; De Masi *et al.*, 2016).

Fatores de crescimento são proteínas que estimulam e ativam a proliferação celular por ativação da angiogênese, mielogênese e genetranscrição, entre outras reações, que ativam, e aceleram o processo de cicatrização (De Masi *et al.*, 2016). Entre os fatores de crescimento, os mais importantes para a cicatrização de feridas incluem o de crescimento epitelial (*EGF*), de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF*), crescimento transformador beta (*TGF- β*) e de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), (Ma e Bazan, 2000).

O processo de reparação pode ser avaliado microscopicamente mediante técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE), utiliza diversos indicadores, como exsudato neutrofílico, edema intersticial, necrose, deposição de fibrina, congestão vascular, infiltrado monomorfonuclear, atividade regenerativa, proliferação fibroblástica, neoformação vascular, processo granulomatoso e fibrose intersticial (Campos *et al.*, 2007; Minamimura *et al.*, 2014; Houdek *et al.*, 2016).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar os aspectos macroscópicos e histológicos de feridas cutâneas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas de equino.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade de Uberaba, ofício CEEA nº 034/2016, para utilização de 24 coelhos brancos da raça Nova Zelândia, machos hígidos, com idade média de 12 meses e peso corporal de 3,0Kg. Os animais foram separados em quatro grupos de igual número (n=6), e considerados hígidos após avaliações clínicas, exames laboratoriais de hemograma e coproparasitológico direto.

Os coelhos foram submetidos a remoção de pele na região da linha média dorsal torácica e lombar, desta forma foram induzidas em cada coelho duas feridas, sendo a torácica considerada a ferida tratada (FT) e a lombar a ferida controle (FC). As feridas torácicas foram tratadas com plasma rico em plaquetas de equino e pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A. As lombares foram tratadas apenas com a mesma pomada. Dos animais do grupo I foi coletado tecido cutâneo para a avaliação histológica com três dias de pós-operatório (PO), os do grupo II com sete dias, os do grupo III com 14 dias e os do grupo IV com 21 dias de PO, totalizando para cada grupo de observação seis feridas tratadas e seis feridas controles. Os coelhos foram mantidos durante todo o período do experimento em gaiolas individuais com ração e água potável à vontade.

Para a produção do plasma rico em plaquetas foi utilizado um equino macho, da raça quarto de milha, hígido, pesando 550Kg e com idade aproximada de 12 anos. O equino foi considerado saudável após avaliações clínicas, exame laboratorial de hemograma e contagem de ovos por grama de fezes (OPG), permaneceu alojado em piquete com gramínea de tifton 85 (*Cynodon spp*) com água potável e suplementação mineral à vontade.

Para obtenção do plasma rico em plaquetas coletou-se, diariamente, 40mL de sangue da veia jugular externa de um equino. O sangue era distribuído em tubos de 4,0mL contendo citrato de sódio a 3,2%. O material foi centrifugado, em centrífuga celm série 4161, durante 20 minutos a 2.220rpm (400G), para a separação celular por meio de

gradiente de concentração. Foi pipetada a fração de plasma e plaquetas contidas na parte superior do tubo e armazenada em recipiente sem anticoagulante. A porção retirada foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 2.220rpm (400G). Dois terços do componente superior do soro foi removido por se tratar do plasma pobre em plaquetas e um terço restante, no fundo do frasco, foi considerado o plasma rico em plaquetas. Antes da ativação do PRP com cloreto de cálcio a 5%, o plasma foi avaliado, para verificar a viabilidade plaquetária e a contagem total de células. A contagem manual das plaquetas foi efetuada em câmara de Neubauer e para ser ativado e considerado PRP a contagem foi superior a quatro vezes a contagem plaquetária inicial, portanto, para cada 0,5mL do PRP foi adicionado 0,25mL de cloreto de cálcio a 5%. A solução foi homogeneizada e mantida em repouso em caixa térmica com gelo, por aproximadamente 10 minutos, para transporte até o local onde os curativos foram realizados (Eurides *et al.*, 2010).

Os coelhos foram anestesiados com cetamina (35mg/Kg, IM) e xilazina (5,0mg/Kg, IM) e submetidos a tricotomia da linha média dorsal torácica ao longo da região interescapular e ilíaca. Após antissepsia tópica do campo cirúrgico com clorexidina degermante 2% e clorexidina alcoólica 0,5%, foram realizadas na linha média dorsal torácica duas incisões de pele em formato circular, com um molde circular de metal com 3,0cm de diâmetro, equidistantes uma da outra em aproximadamente 10,0cm. Formando-se as feridas torácica (tratada) e lombar (controle). Para controle da dor os coelhos foram medicados com tramadol (0,5mg/Kg, IM), duas vezes ao dia durante três dias.

Diariamente, o primeiro curativo era realizado as oito horas, sendo que ambas as feridas foram irrigadas com solução de cloreto de sódio a 0,9% e posteriormente higienizadas com gaze. Em seguida foi aplicado nas feridas tratadas 0,2mL de concentrado de plasma rico em plaquetas de equino em concentração média de 1.578.750 plaquetas/mm³ (\pm 202.723), produzidas no mesmo dia e ativadas com cloreto de cálcio a 5% no momento do procedimento. Nas feridas controles, foi aplicado 1,5g de Vetaglós (gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, Vetnil, Brasil). O segundo curativo foi realizado as 20 horas, aplicando em ambas as feridas, após irrigadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%, 1,5g de Vetaglós.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, e durante o primeiro curativo as oito horas as feridas foram avaliadas atribuindo escores, para coloração (1-hemorrágica, 2-rósea, 3-pálida, 4-cianótica, 5-vermelha), presença de exsudato (0-ausente, 1-seroso, 2-

sanguinolento, 3-purulento), granulação (0-ausente, 1-presente), crosta (0-ausente, 1-presente), hiperemia (0-ausente, 1-presente) e edema (0-ausente, 1-presente) (Pazzini *et al.*, 2016).

As feridas foram mensuradas com paquímetro digital 150mm (modelo Mtx 316119), nos sentidos crânio-caudal e látero-lateral para determinação da área (cm²) e do potencial de contração da ferida (%). Os dados obtidos foram registrados em planilha individual para cada animal. Para cálculo da área das feridas utilizou-se a fórmula: $A = \pi \times R \times r$, (A= área, $\pi = 3,14$, R= raio maior e r = raio menor da ferida). Para o potencial de contração da ferida empregou-se a fórmula: $PC = (Af - Ai) \times 100 / Ai$, onde PC= potencial de contração, Af= área final e Ai= área inicial da ferida.

Decorridos os períodos de observação dos grupos, os coelhos foram submetidos a eutanásia para remoção de cerca de 3,0cm das bordas e do leito das feridas. As amostras foram fixadas durante 48 horas em formol 10%, desidratadas em solução de concentrações crescentes de etanol e incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo Leika, modelo 2145, com 6,0µm de espessura para ser confeccionado as lâminas histológicas.

Os cortes de pele foram corados pela hematoxilina e eosina e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética e avaliadas em microscopia óptica (microscópio Nikon eclipse, modelo E200), foram atribuídos escores para a epiderme para alterações como necrose, reepitelização e hiperemia ativa e para a derme em relação a edema, hemorragia, neovascularização, fibrose e infiltrado inflamatório. Para cada região histológica avaliada, os escores foram atribuídos após exame de nove campos microscópicos, sendo considerado escore zero na ausência da alteração, 1 alteração leve (repetição da alteração de um a três campos microscópicos), 2 alterações moderadas (repetição da alteração de quatro a seis campos microscópicos) e escore 3 alterações acentuadas (repetição da alteração de sete a nove campos microscópicos), (Pazzini *et al.*, 2016).

A comparação entre os grupos (GI, GII, GIII e GIV) em relação as variáveis morfológicas (cor, granulação, crosta, hiperemia, edema, exsudato) e variáveis histológicas (necrose, reepitelização, hiperemia ativa, edema, hemorragia, neovascularização, fibrose e infiltrado inflamatório), foi realizada mediante o teste de Wilcoxon (dados não paramétricos), sendo que para os valores de “P” iguais ou inferiores a 0,05 as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas. Para a comparação

entre os grupos em relação a área e potencial de contração cicatricial (dados paramétricos), utilizou-se o teste Tukey, onde valores de “P” iguais ou menores a 0,05 foram considerados significativos. Também foi realizada análise de correlação linear entre as variáveis morfológicas e histológicas das feridas controle e tratada nos diferentes grupos de observação considerando nível de significância de 5%. Para todas as análises foi utilizado programa estatístico R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de plaquetas após a obtenção do PRP, apresentou-se maior que quando comparada com a contagem inicial, que apresentou média de 1.578.750 plaquetas/mm³ (\pm 202.723). Resultados semelhantes com média de 1.176.933 plaquetas/mm³ foram observados por Pazzini *et al.* (2016) e referido por Silva *et al.* (2009) onde a contagem plaquetária deve apresentar valores superiores a 1.000.000 de plaquetas/mm³, no entanto, Lima *et al.* (2015) obtiveram resposta terapêutica em concentrações superiores a 300.000 plaquetas/mm³. Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados por Pazzini *et al.* (2016), uma vez que em plasma com concentração plaquetária superior a 1.500.000 plaquetas/mm³ alcançou os efeitos terapêuticos desejados.

A avaliação macroscópica das feridas de pele induzidas experimentalmente e tratadas com plasma rico em plaquetas heterólogo de equino, associado à pomada de gentamicina, apresentou características morfométricas distintas em relação às feridas controle (Tab. 1). Na comparação das variáveis morfológicas, pôde-se notar em todos os grupos, uma diferença significativa entre as feridas controle e tratada ($P < 0,05$) em relação a presença do exsudato de característica serosa, com maior escore para a ferida tratada. Entretanto, esta observação não foi referida por Barrionuevo *et al.* (2015) na cicatrização de feridas, em que o PRP autólogo foi utilizado como método terapêutico. O fato pode ser justificado devido a reação tecidual mediante ao uso de um plasma heterólogo, provocando assim uma resposta imunológica mais intensa.

Tabela 1. Escores e médias das observações morfométricas das feridas cutâneas de coelhos, controles e tratadas com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação.

Morfologia	GI (3 dias)		GII (7 dias)		GIII (14 dias)		GIV (21 dias)	
	FC	FT	FC	FT	FC	FT	FC	FT
Cor	1,00B	1,00B	2,17A	2,38A	1,93A	2,20A	2,03A	2,19A
Granulação	0,04D	0,00D	0,60B	0,52C	0,77AB	0,79AB	0,83A	0,84A
Crosta	0,12CD	0,04D	0,60ABC	0,40B	0,67A	0,68A	0,80A	0,82A
Hiperemia	0,12BCD	0,12BCD	0,19AC	0,25AB	0,37A	0,22AB	0,008D	0,04CD
Edema	0,67AB	0,50AB	1,00A	0,17B	0,00B	0,00B	0,00B	0,17B
Exsudato	0,00D	0,58A	0,00D	0,38AB	0,12C	0,00D	0,00D	0,17B
Área (cm ²)	12,70B	13,72AB	13,22B	16,47A	14,70AB	9,41C	10,86C	7,20D
PC (%)	-10,09C	-8,30C	-11,16C	-12,20C	-16,80C	-28,40B	-37,00B	-46,50A

FC: Ferida controle, FT: Ferida tratada, PC: Potencial de contração cicatricial. Médias das características, área e potencial de contração (PC) seguidas por letra diferente dentro do grupo diferem pelo teste Tukey ($P<0,05$). Escores das características categóricas (cor, granulação, crosta, hiperemia, edema, exsudato) seguidas de letras diferentes dentro do grupo diferem pelo teste de Wilcoxon ($P<0,05$).

No grupo II, sete dias de pós-operatório a presença de granulação e edema foi observado com maiores escores nas feridas controles ($P<0,05$), (Tab. 1). Em trabalhos semelhantes, nos grupos de pós-operatório mais precoce, na fase inicial do processo inflamatório foram observados edemas discretos ao redor das feridas tratadas com gel de PRP heterólogo, com total desaparecimento nas avaliações subsequentes (Abegão *et al.*, 2015a). O edema inflamatório da ferida controle, observado no grupo II, pode ser justificada pelo processo traumático pós-operatório e devido ao não uso do PRP, que tem características anti-inflamatórias, uma vez que esta variável foi observada com maior frequência nas feridas controles do que nas tratadas.

Na comparação das variáveis morfométrica entre os diferentes grupos, a cor da ferida controle e da ferida tratada do grupo I se diferem dos demais grupos de observação ($P<0,05$), apresentando coloração hemorrágica nas feridas do grupo I e rósea nos demais grupos (Tab. 1). Em trabalhos semelhantes esta característica também foi relatada, permanecendo de coloração rósea durante todo o período do experimento (Floryan e Berghoff, 2004; Weibrich *et al.*, 2004; Abegão *et al.*, 2015a; Pazzini *et al.*, 2016). Esta variação pode ser atribuída ao PRP, uma vez que este é capaz de favorecer a

microcirculação local, este achado também corrobora com as evidências de Pazzini *et al.* (2016), que relatam o uso de PRP em enxertos cutâneos em membro pélvico de humano sendo capaz de reduzir o tamanho da lesão, produção de maior quantidade de tecido de granulação e apresenta aspecto rosado da pele quando comparado com pacientes que não receberam o produto.

O comportamento do parâmetro crosta não diferiu entre as feridas controles ($P>0,05$), (Fig. 1-D). Já nas feridas tratadas (Fig. 1-B) diferiram entre os grupos I e II e os grupos II e III ($P<0,05$). Confirmando que o uso do PRP induziu de forma mais precoce a formação destes elementos nas feridas tratadas em comparação com as do grupo controle (Tab. 1). Foi referido por Abegão *et al.* (2015a) o aparecimento de crosta e granulação mais precocemente nas feridas controles do que nas tratadas com o PRP, iniciando em médias 10 dias após o procedimento cirúrgico. Desta forma pode-se presumir que a utilização do PRP resultou em melhor cicatrização, resultados que podem ser observados na Tab. 3, que evidencia uma intensa correlação linear positiva e significativa ($P<0,01$) entre as variáveis granulação e crosta ($r=0,83$).

Na avaliação da área e do potencial de contração cicatricial notou-se uma correlação linear negativa e significativa ($P<0,05$) entre estas duas variáveis ($r=-0,12$), como pode ser visualizado na Tab. 3. Em todos os grupos avaliados houve redução da área e do potencial de contração cicatricial com diferença significativa ($P<0,05$) em relação às feridas controle e tratada (Fig. 1- E, G, I, K, M, O), exceto as feridas do grupo I (Fig. 1- A, C). Para a ferida controle a redução da área foi mais expressiva a partir do grupo III, enquanto que para a ferida tratada foi mais precoce, sendo observada já a partir do grupo II (Tab. 1). O mesmo comportamento foi observado para o potencial de contração cicatricial, uma vez que existiu uma correção linear negativa entre as duas variáveis morfológicas (Tab. 3). Foi verificado por Ito *et al.* (2013); Abegão *et al.* (2015a); Chang *et al.* (2017), decréscimo significativo tanto nas feridas tratadas quanto nas feridas controles ao longo do período de observação, no entanto, a comparação entre as feridas não evidenciou o efeito do gel de PRP heterólogo na redução da área com relação ao tratamento feito com soro fisiológico. A diferença nos resultados pode estar relacionada a área onde a lesão foi induzida, uma vez que regiões menos vascularizadas podem apresentar retardo do processo cicatricial, além da qualidade e da viabilidade do PRP produzido.

Tabela 2. Escores das observações histológicas das feridas cutâneas de coelhos, controles e tratadas com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação.

Características histológicas	GI (3 dias)		GII (7 dias)		GIII (14 dias)		GIV (21 dias)	
	FC	FT	FC	FT	FC	FT	FC	FT
Necrose	1,83A	1,83A	0,83AB	0,83AB	0,67AB	0,83AB	0,00B	0,00B
Reepitelização	0,00C	0,00C	0,00C	0,00C	1,00C	1,83C	2,00B	2,67A
Hiperemia ativa	1,50A	1,20A	0,70A	0,83A	0,33A	0,83A	0,70A	0,70A
Edema	0,70AB	0,50AB	1,00A	0,20AB	0,00B	0,00B	0,00B	0,20AB
Hemorragia	1,20A	1,50A	0,20B	0,33B	0,00B	0,00B	0,33B	0,20B
Neovascularização	0,00C	0,00C	1,00B	1,33B	1,33B	2,00AB	1,70B	2,50A
Fibrose	0,00C	0,00C	0,70C	1,50B	1,70B	2,33AB	2,00B	3,00A
Infiltrado	1,00AB	0,83AB	1,83AB	1,33AB	1,33AB	1,33AB	1,50A	0,83B

FC: Ferida controle, FT: Ferida tratada. Escores das características categóricas seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Neste estudo foi verificadas características de necrose tecidual, com maior escore nas feridas do grupo I, no entanto, sem diferença significativa entre as feridas controles e tratadas nos quatro grupos ($P > 0,05$), (Tab. 2). A mesma observação foi encontrada em experimentos de reconstituição tecidual a partir de enxertos cutâneos associados ao gel de PRP, no entanto, esta observação foi significativamente maior nas feridas controles em comparação com as tratadas (Brandão, 2005; Kushida *et al.*, 2013; De Souza *et al.*, 2014; Pazzini *et al.*, 2016). As variáveis referentes a viabilidade de enxertos cutâneos se encontram relacionadas ao leito vascular do receptor e não somente ao uso do PRP o que não é observado no presente estudo, onde a necrose ocorreu em todos os grupos independente do uso do PRP.

A reepitelização tecidual foi observada a partir do grupo III (Fig. 1- J, L), no entanto, sem diferença significativa entre as feridas tratadas e controles. Somente no grupo IV a diferença de reepitelização foi significativa entre as feridas ($P < 0,05$), sendo a ferida tratada (Fig. 1-N) a que mais reepitelizou (Tab. 2). Em outros estudos que compararam fontes diferentes de PRP a presença de reepitelização ocorreu independente do uso do plasma (Anitua *et al.*, 2006; Plate *et al.*, 2014; Abegão *et al.*, 2015b; Barrionuevo *et al.*, 2015). No entanto, é importante avaliar outros fatores que podem estar relacionados aos resultados não significativos, como o número de plaquetas por microlitro de sangue e o período decorrido da ativação do PRP e a sua administração na ferida.

A hiperemia ativa foi observada em todos os grupos, assim como o edema (Fig. 1- H) e a hemorragia, no entanto, estas variáveis tiveram maior escore no grupo I, não existiu diferença entre as feridas controle e tratada ($P>0,05$), (Tab. 2). Outros estudos demonstram que o PRP aumenta significativamente os sinais da inflamação e contribui para a cicatrização tecidual (Guszczyński *et al.*, 2017), o que não foi observado neste estudo, possivelmente devido ao efeito anti-inflamatório verificado no PRP.

A neovascularização tecidual iniciou a partir do grupo II, no entanto somente no grupo IV se observou diferença significativa ($P<0,05$) entre as feridas controle e tratada. O mesmo comportamento foi observado para a fibrose, que iniciou em ambas as feridas a partir do grupo II, mas com um maior escore em todas as observações para a ferida tratada, principalmente no grupo III e no grupo IV, no qual ocorreu diferença significativa ($P<0,05$), (Tab. 2). Pôde também se observar correlação linear positiva e significativa ($P<0,01$) entre a neovascularização e a fibrose ($r=0,57$) e neovascularização e inflamação ($r=0,32$). A mesma correlação positiva e significativa ($P<0,01$) também pode ser observada na comparação entre reepitelização e neovascularização ($r=0,40$) e reepitelização e fibrose ($r=0,33$), (Tab. 3). A intensa proliferação vascular presente nas feridas tratadas com PRP pode-se correlacionar com os fatores de crescimento presentes nas plaquetas, responsáveis em atuar na fase inicial da cicatrização como o fator de crescimento de endotélio vascular e fator de crescimento epitelial, que estimula a angiogênese, mitogênese e a permeabilidade vascular e induzem o crescimento do tecido epitelial (Pazzini *et al.*, 2016). Os resultados encontrados neste estudo indicaram que a proliferação vascular ocorreu principalmente pelos fatores presentes nas plaquetas, que promove o suprimento de oxigênio e nutrição da ferida e favorece o processo cicatricial.

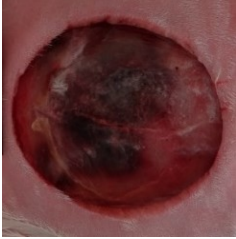
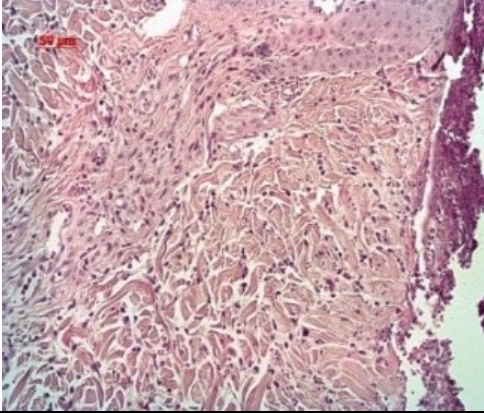
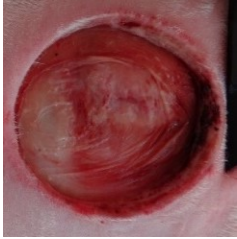
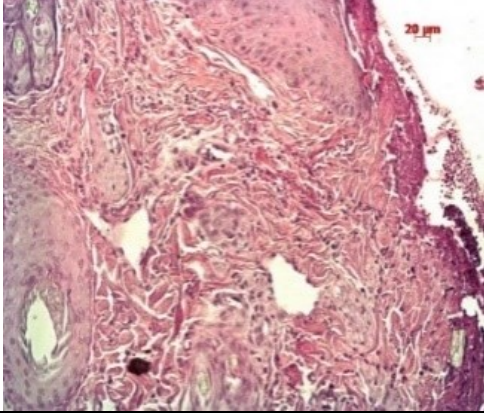

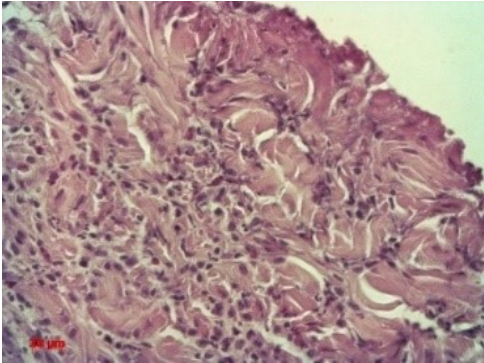
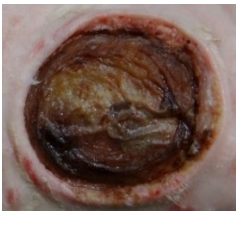
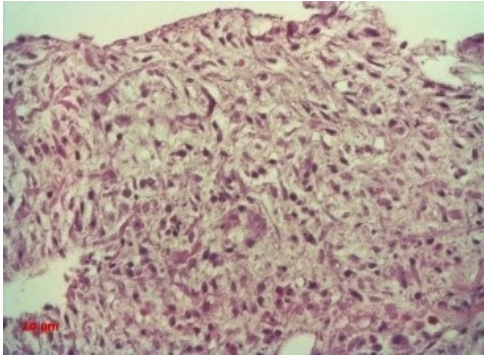
O infiltrado inflamatório predominante em todos os grupos de observação deste experimento foi neutrofílico, sendo o maior escore presente nas feridas controles do que nas feridas tratadas, no entanto com diferença significativa apenas no grupo IV ($P<0,05$), (Tab. 2). Outros trabalhos relatam presença de infiltrado com células mononucleares e polimorfonucleares, porém sem diferenças significativas entre os grupos experimentais (Neves *et al.*, 2013; Pazzini *et al.*, 2016). Este fato pode ser explicado pelo tempo de evolução da ferida, correlacionando este achado a fase da inflamação, onde é recrutado polimorfonucleares para decomposição de tecido necrótico e bacteriano, o que potencializa a reparação tecidual.

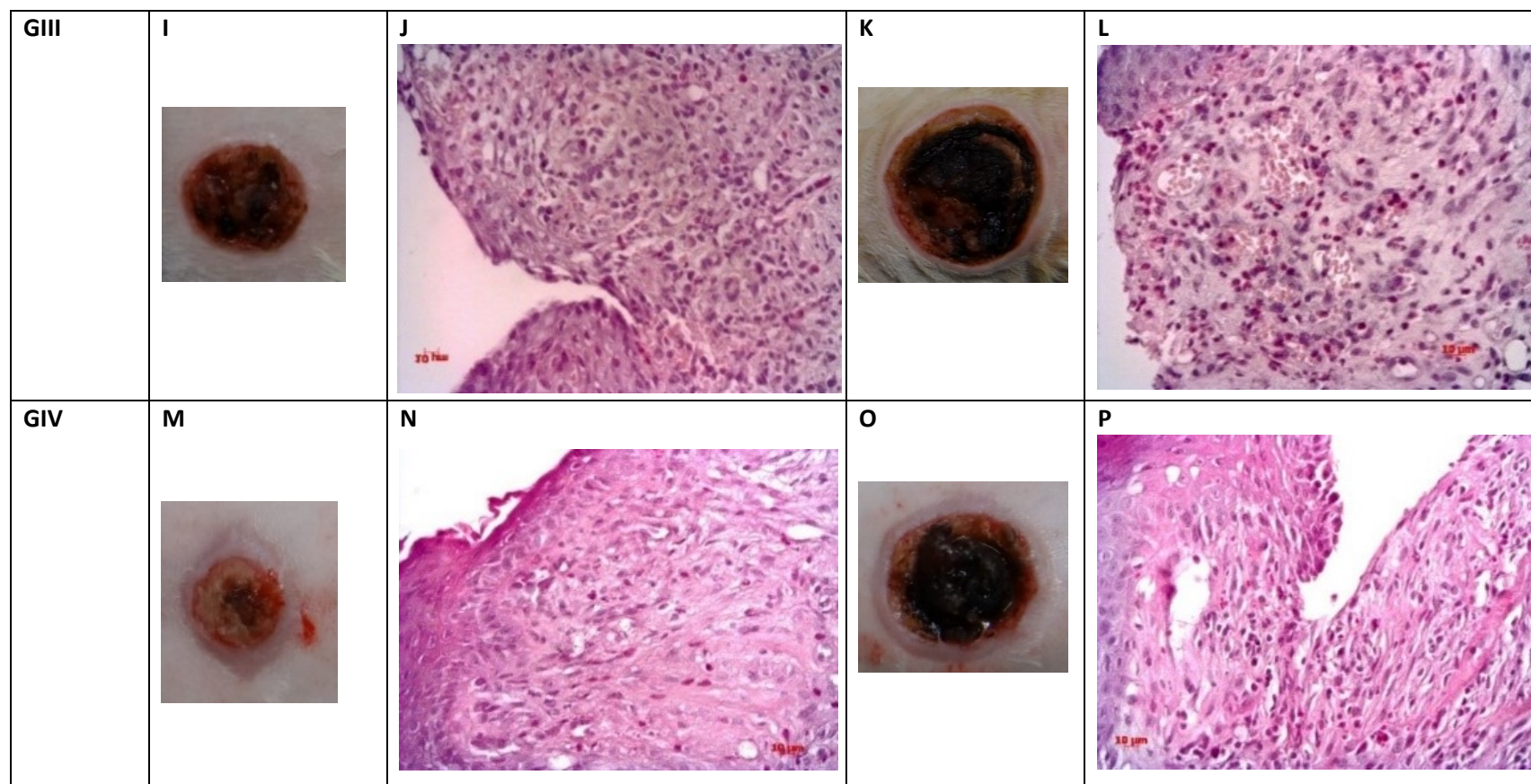
Também foi observada uma correlação linear negativa significativa ($P < 0,05$) entre a inflamação e a presença de fibrose ($r = -0,14$), (Tab. 3), fato não observado em trabalhos com metodologia semelhantes (Correia *et al.*, 2014; Farghali *et al.*, 2017; Rubio-Azpeitia *et al.*, 2017), portanto, este experimento demonstrou que o PRP estimula a angiogênese e a reepitelização, no entanto, sem gerar um processo inflamatório intenso, que poderia prejudicar a cicatrização pela intensa liberação de citocinas.

Tabela 3. Correlação linear entre as variáveis morfométricas e histológicas das feridas cutâneas de coelhos, controles e tratadas com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação

	Potencial de contração	Crosta	Neovascularização	Fibrose	Inflamação
Área (cm ²)	-0,12 ($<0,05$)	-0,18 ($<0,01$)			
Pc (%)		-0,58 ($<0,01$)	-0,13 ($<0,05$)	-0,24 ($<0,01$)	
Granulação		0,83 ($<0,01$)	0,31 ($<0,01$)	0,36 ($<0,01$)	
Crosta			0,19 ($<0,01$)	0,26 ($<0,01$)	
Reepitelização			0,40 ($<0,01$)	0,33 ($<0,01$)	
Neovascularização				0,57 ($<0,01$)	0,32 ($<0,01$)
Fibrose					-0,14 ($<0,05$)

Pc: Potencial de contração cicatricial.

	FT		FC	
	MACROSCÓPICO	MICROSCÓPICO	MACROSCÓPICO	MICROSCÓPICO
GI	A 	B 	C 	D 
GII	E 	F 	G 	H 



330 Figura 1. Pranchas com as características morfológicas e histológicas das feridas cutâneas de coelhos dos grupos de observação. G I, grupo decorridos
 331 três dias de pós-operatório. Observar a semelhança macroscópica entre a ferida tratada com PRP e pomada de gentamicina (A) e controle (C) a
 332 fotomicrografia do grupo I decorridos três dias de pós-operatório com presença de crosta na ferida tratada (B), e controle (D). G II, grupo decorridos sete
 333 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (E) em comparação com a ferida controle (G) a fotomicrografia do grupo II decorridos
 334 sete dias de pós-operatório com ausência de crosta da ferida tratada (F), e ausência de crosta e presença de edema da ferida controle (H).

G III, grupo decorridos 14 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (I) em comparação com a ferida controle (K) a fotomicrografia do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório com reepitelização com maior intensidade na ferida tratada (J), do que na ferida controle (L). G IV, grupo decorridos 21 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (M) em comparação com a ferida controle (O) a fotomicrografia do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório, com reepitelização com maior intensidade na ferida tratada (N), do que na ferida controle (P). Coloração HE, escala 20 µm.

CONCLUSÕES

A associação do plasma rico em plaquetas heterólogo de equino com a pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, em feridas cutâneas em coelhos, estimula o processo cicatricial.

O PRP heterólogo associado a pomada diminuiu o edema na fase inicial do processo cicatricial e promove ação anti-inflamatória.

Aos 21 dias de PO nas feridas tratadas com PRP associado a pomada, ocorre aumento da neovascularização e da fibrose com diminuição da inflamação.

REFERÊNCIAS

ABEGÃO, K.G.B.; BRACALE, B.N.; DELFIN, I.G. *et al.* Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cir.Bras.*, v.30, n.3, p.209-215, 2015a.

<https://doi.org/10.1590/S0102-8650201500300000008>

ABEGÃO, K.G.B.; BRACALE, B.N.; DELFIN, I.G. *et al.* Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cir. Bras.*, v.30, n.3, p.209-215, 2015b.

<https://doi.org/10.1590/S0102-8650201500300000008>

ANDRADE, M.; RODRIGUES, G.M.; LIMA, D.P. *et al.* Use of plasma rich in platelets of rabbits with few leukocytes and erythrocytes to consolidate bones. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.68, n.2, p.276-282, 2016.

<https://doi.org/10.1590/1678-4162-8304>

- ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; NURDEN, A.T. *et al.* Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J. Biom. Mat. Res. Part A*, v.77, n.2, p.285-293, 2006.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30585>
- BARRIONUEVO, D.V.; LAPOSY, C.B.; ABEGÃO, K.G.B *et al.* Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Lab. Anim.*, v.49, n.3, p.209-214, 2015.
- BRANDÃO, G. *Estudo comparativo entre a eficácia clínica de enxertos ósseos (autógenos, alógenos, aloplásticos) com ou sem utilização de plasma rico em plaquetas.* 2005. Disponível em: <http://www.medcenter.com>. Acessado em: 04 jun. 2018.
- CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. *Arq. Bras. Cir. Dig.*, v.20, n.1, p.51-58, 2007.
<https://doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>
- CHANG, P.; GUO, B.; HUI, Q. *et al.* A bioartificial dermal regeneration template promotes skin cell proliferation in vitro and enhances large skin wound healing in vivo. *Oncotarget*, v.8, n.15, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28423680>. Acessado em: 04 jun. 2018.
- CORREIA, S.I.; PEREIRA, H.; SILVA-CORREIA, J. *et al.* Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. *J. Roy. Soc. Int.*, v.11, n.92, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3899856/>. Acessado em: 04 jun. 2018.
- DE MASI, E.C.D.J.; CAMPOS, A.C.L.; DE MAIS, F.D.J. *et al.* The influence of growth factors on skin wound healing in rats. *Braz. J. Otorh.*, v.82, n.5, p.512-521, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.09.011>
- DE SOUZA, M.V.; PINTO, J.O.; DA COSTA, M.M. *et al.* Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34, n.6, p.599-612, 2014.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000600016>
- EURIDES, D.; MANTOVANI, M.M.; MENEZES G.F. *et al.* Efeito de concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos. *RPCV*, v.105, p.39-43, 2010.
- FARGHALI, H.A.; ABDELKADER, N.A.; KHATTAB, M.S.; ABUBAKR, H.O. Evaluation of subcutaneous infiltration of autologous platelet-rich plasma on skin-wound

398 healing in dogs. *Biosc. Rep.*, v.37, n.2, 2017. Disponível em:
 399 <http://www.bioscirep.org/content/37/2/BSR20160503>. Acessado em: 04 jun. 2018.

400 FLORYAN, K.M.; BERGHOFF, W.J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and
 401 platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J.*, v.80, n.4, p.667-674,
 402 2004.
 403 [https://doi.org/10.1016/S0001-2092\(06\)61320-3](https://doi.org/10.1016/S0001-2092(06)61320-3)

404 GUSZCZYN, T.; SURAZYNSKI, A.; ZAREBA, I. *et al.* Differential effect of platelet-
 405 rich plasma fractions on β 1-integrin signaling, collagen biosynthesis, and prolidase
 406 activity in human skin fibroblasts. *Drug. Design., Develop. Therap.*, v.11, p.1849, 2017.

407 HOUDEK, M.T.; WYLES, C.C.; STALBOER, P.G.S *et al.* Collagen and fractionated
 408 platelet-rich plasma scaffold for dermal regeneration. *Plas. Reconst. Surg.*, v.137, n.5,
 409 p.1498-1506, 2016.

410 ITO, R.; MORIMOTO, N.; PHAM, L.H. *et al.* Efficacy of the controlled release of
 411 concentrated platelet lysate from a collagen/gelatin scaffold for dermis-like tissue
 412 regeneration. *Tis. Eng. Part A*, v.19, n.11-12, p.1398-1405, 2013.
 413 <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0375>

414 KUSHIDA, S.; KAKUDO, N.; SUZUKI, K. *et al.* Effects of platelet-rich plasma on
 415 proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. *Annals*
 416 *Plast. Surg.*, v.71, n.2, p. 219-224, 2013.
 417 <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31823cd7a4>

418 LEHMANN, P.; SHENG, P.; LAVKER, R.; KLIGMAN, A. Corticosteroid atrophy in
 419 human skin. A study by light, scanning, and transmission electron microscopy. *J. Inv.*
 420 *Derm.*, v.81, n.2, p.169-176, 1983.
 421 <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12543603>

422 LIMA, A.C.; MANO, J.F.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C. Fast and mild
 423 strategy, using superhydrophobic surfaces, to produce collagen/platelet lysate gel beads
 424 for skin regeneration. *St. C. Ver. Rep.*, v.11, n.1, p.161-179, 2015.
 425 <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9548-6>

426 MA, X.; BAZAN, H.E. Increased platelet-activating factor receptor gene expression by
 427 corneal epithelial wound healing. *Invest. Opht. Vis. Sci.*, v.41, n.7, p.1696-1702, 2000.

- 428 MINAMIMURA, A., ICHIOKA, S.; SANO, H.; SEKIYA, N. Comparison of collagen
 429 matrix treatment impregnated with platelet rich plasma vs bone marrow. *J. Plast. Surg.*
 430 *Hand Surg.*, v.48, n.1, p.15-20, 2014.
 431 <https://doi.org/10.3109/2000656X.2013.793193>
- 432 NEVES, P.C.F.; ABIB, S.; NEVES, R.F. *et al.* Effect of hyperbaric oxygen therapy
 433 combined with autologous platelet concentrate applied in rabbit fibula fracture healing.
 434 *Clinics*, v.68, n.9, p.1239-1246, 2013.
- 435 PAZZINI, J.M.; DE NARDI, A.B.; HUPPES, R.R. *et al.* Utilização de plasma rico em
 436 plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em
 437 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Pesq. Vet. Bras.*, v.36, n.2, p.108-118, 2016.
 438 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000200008>
- 439 PLATE, J.F.; BROWN, P.J.; WALTERS, J. *et al.* Advanced age diminishes tendon-to-
 440 bone healing in a rat model of rotator cuff repair. *The Amer. J. Sport. Med.*, v.42, n.4,
 441 p.859-868, 2014.
 442 <https://doi.org/10.1177/0363546513518418>
- 443 RUBIO-AZPEITIA, E.; SANCHEZ, P.; DELGADO, D.; ANDIA, I. Adult cells
 444 combined with platelet-rich plasma for tendon healing: cell source options. *Orth. J. Sport.*
 445 *Med.*, v.5, n.2, 2017. Disponível em:
 446 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5347436/>. Acessado em: 04 jun. 2018.
- 447 SILVA, P.S.A.; DEL CARLO, R.; SERAKIDES, R. *et al.* Plasma rico em plaquetas
 448 associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais.
 449 *Ciência Rural*, v.39, n.1, 2009.
 450 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000100020>
- 451 WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W. *et al.* Effect of platelet concentration in
 452 platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, v.34, n.4, p.665-671, 2004.
 453 <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010>

CAPÍTULO 3- Análise ultraestrutural do colágeno de feridas cutâneas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas de equino

Ultrastructural analysis of the collagen of rabbit skin wounds treated with platelet-rich equine plasma

(Artigo submetido no periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**)

Análise ultraestrutural do colágeno de feridas cutâneas de coelhos tratadas
com plasma rico em plaquetas de equino

Ultrastructural analysis of the collagen of rabbit skin wounds treated with platelet-rich
equine plasma

R.S. Rezende¹, D. Eurides², E.G.L. Alves³, G.C. Venturini³, R.N. Alves², R.L. Felipe¹

¹Aluno de pós-graduação- Universidade Federal de Uberlândia- Uberlândia, MG

²Universidade Federal de Uberlândia- Uberlândia, MG

³Universidade de Uberaba- Uberaba-MG

RESUMO

O colágeno é sintetizado e segregado no espaço extracelular e organizados em fibrilas estriadas de acordo com o tipo de tecido. Utilizou-se 24 coelhos brancos da raça Nova Zelândia, com idade de 12 meses e com 3,0Kg de peso corporal, para avaliar a porcentagem de colágeno das feridas cutâneas tratadas com plasma rico em plaquetas de equino e pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A. Os animais foram separados em quadro grupos de igual número e submetidos a remoção de pele na região na linha média dorsal torácica (ferida tratada) e lombar (ferida controle). As feridas torácicas foram tratadas com plasma rico em plaqueta de equino e pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, e as do grupo controle somente com a pomada. Nos do grupo I foi colido tecido cutâneo para a avaliação histológica e ultraestrutural com três dias de pós-operatório, os do grupo II com sete dias, os do grupo III com 14 dias e os do grupo IV com 21 dias. Decorrido o período de avaliação de cada grupo foi coletado fragmento de pele para avaliação da porcentagem de colágeno e avaliação do diâmetro e densidade da fibrila de colágeno por microscopia eletrônica de transmissão. As feridas tratadas com PRP de equino associado a aplicação tópica da pomada, mostrou-se eficaz na maturação das fibrilas colágenas e na antecipando o processo cicatricial.

Palavras-chave: fibrila, colágeno, picrosirius, transmissão

ABSTRACT

Collagen is synthesized and secreted into the extracellular space and organized into striated fibrils according to the tissue type. This study evaluated the concentration of collagen in rabbit skin wounds treated with equine platelet-rich plasma (PRP) and ointment containing gentamicin, sulfanilamide, sulfadiazine, urea, and vitamin A. Twenty-four New Zealand white rabbits aged 2 to 12 months and weighing 3.0kg were included. The animals were allocated equally into four groups and the skin was removed from the thoracic dorsal midline (treated wound) and lumbar (control wound) regions. The thoracic wounds were treated with equine PRP and ointment containing gentamicin, sulfanilamide, sulfadiazine, urea, and vitamin A, and the control group was treated with the ointment alone. For histological and ultrastructural assessment, cutaneous tissue was collected at postoperative days 3 (group I), 7 (group II), 14 (group III), and 21 (group IV). After the evaluation period, in each group, a skin fragment was collected for analysis of the collagen concentration, as well as the collagen fibril diameter and density by transmission electron microscopy. The results indicated that treatment with equine PRP combined with topical application of the ointment was effective in facilitating the maturation of collagen fibrils and the wound healing process.

Keywords: fibrils, collagen, picrosirius, transmission

INTRODUÇÃO

As moléculas de colágeno são polimerizadas e segregadas no espaço extracelular e organizadas em fibrilas estriadas com uma organização específica para cada tipo de tecido (Birk *et al.*, 1990). Os tipos de colágeno podem ser importantes na determinação da arquitetura de fibrilas. Nos estudos de remontagem, o colágeno *in vitro* de tipo I forma fibrilas mais espessas do que o colágeno tipo III, enquanto que as fibrilas de colágeno tipo II geralmente apresentam os diâmetros menores (Birk *et al.*, 1990; Tonniges *et al.*, 2016). As fibras transmitem forças, dissipam energia e evitam falhas mecânicas prematuras em tecidos normais. Além disso, fornecem sugestões biológicas para células adjacentes que regulam uma variedade de respostas funcionais (Huang *et al.*, 2001).

Diferentes tipos de colágeno demonstraram formar fibrilas heterotípicas em uma variedade de tecidos. Assim como os tipos de colágeno I e V no estroma corneano

secundário, tipos I e II no estroma corneano primário, tipos II, IX e XI em cartilagem e tipos I e III em derme e tendão (Birk *et al.*, 1990; Houdek *et al.*, 2016).

As fibrilas variam em diâmetro de 12 a 500nm em função do tecido e da idade, e são o elemento de tensão primário dos tecidos, como tendões, ligamentos, pele, cartilagem, osso, fáscia, cápsulas articulares, vasos sanguíneos e outros órgãos ocos. Muito se sabe sobre a estrutura dos genes de colágeno fibrilar, entretanto, questões fundamentais permanecem sem resposta sobre a montagem e organização das fibrilas (Starborg *et al.*, 2013).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é importante para avaliar fibrilas de colágeno em que o diâmetro é o parâmetro mais comumente medido. No entanto, as funções das células e dos tecidos dependem não apenas das distribuições do diâmetro da fibrila do colágeno, mas também do número, da porcentagem, da fração do volume (FVF) e do comprimento das fibras (Birk *et al.*, 1990; Starborg *et al.*, 2013).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a ultraestrutura e a concentração do colágeno das feridas cutâneas de coelhos tratadas e não tratadas com plasma rico em plaquetas heterólogo de equino.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade de Uberaba, ofício CEEA nº 034/2016, para utilização de 24 coelhos brancos da raça Nova Zelândia, machos hígidos, com idade média de 12 meses e aproximadamente 3,0Kg peso corporal. Os animais foram separados em quatro grupos de igual número (n=6), e considerados hígidos após submetidos a avaliações clínicas e exame laboratorial de hemograma e coproparasitológico direto.

Os coelhos foram submetidos a remoção de pele na região da linha média dorsal torácica e lombar, sendo a torácica considerada a ferida tratada (FT) e a lombar a ferida controle (FC). As torácicas foram tratadas com plasma rico em plaquetas de equino e pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A. As lombares tratadas com a mesma pomada. Dos animais do grupo I foi coletado tecido cutâneo para a avaliação histológica com três dias de pós-operatório (PO), os do grupo II com sete dias, os do grupo III com 14 dias e os do grupo IV com 21 dias de PO. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água potável à vontade.

Para a produção do plasma rico em plaquetas foi utilizado um equino macho, da raça quarto de milha, com 550Kg de peso corporal e com idade aproximada de 12 anos. O equino foi considerado saldável após avaliações clínicas, exame laboratorial de hemograma e contagem de ovos por grama de fezes (OPG), permanecendo alojado em piquete com gramínea de tifton 85 (*Cynodon spp*) com água potável e suplementação mineral à vontade.

Diariamente, foi obtido 40mL de sangue da veia jugular externa de um equino. O sangue foi distribuído em tubos de 4,0mL contendo citrato de sódio a 3,2%. O material foi centrifugado, em centrífuga celm série 4161, durante 20 minutos a 2.220rpm (400G), para a separação celular através de gradiente de concentração. Foi pipetada a fração de plasma e plaquetas contidas na parte superior do tubo e armazenada em recipiente sem anticoagulante. A porção retirada foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 2.220rpm (400G). Dois terços do componente superior do soro foi removido por se tratar do plasma pobre em plaquetas e um terço restante, no fundo do frasco, foi considerado o plasma rico em plaquetas. Antes da ativação do PRP com cloreto de cálcio a 5%, o plasma foi avaliado, para verificar a viabilidade plaquetária e a contagem total de células. A contagem manual das plaquetas foi efetuada em câmara de Neubauer e para ser ativado e considerado PRP a contagem foi superior a quatro vezes a contagem plaquetária inicial, portanto, para cada 0,5mL do PRP foi adicionado 0,25mL de cloreto de cálcio a 5%. A solução foi homogeneizada e mantida em repouso em caixa térmica com gelo, por aproximadamente 10 minutos, para transporte até o local onde os curativos foram realizados (Eurides *et al.*, 2015).

Os animais foram submetidos a jejum hídrico e de alimentos sólidos por seis horas e anestesiados com cetamina (35mg/Kg, IM) e xilazina (5,0mg/Kg, IM) e submetidos a tricotomia da linha média dorsal torácica ao longo da região interescapular e ilíaca. Após antisepsia tópica do campo cirúrgico com clorexidina degermante 2% e clorexidina alcoólica 0,5%, foram realizadas na linha média dorsal torácica duas incisões de pele em formato circular, com um molde circular de metal com 3,0cm de diâmetro, equidistantes uma da outra em aproximadamente 10,0cm. Formando-se as feridas torácica (tratada) e lombar (controle). Para controle da dor os coelhos foram medicados com tramadol (0,5mg/Kg, IM), duas vezes ao dia durante três dias.

Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais com colar elisabetano e diariamente, o primeiro curativo foi realizado as oito horas, sendo que ambas as feridas foram irrigadas com solução salina a 0,9% e posteriormente higienizadas com gaze. Em seguida foi aplicado nas feridas tratadas 0,2mL de concentrado de plasma rico em plaquetas de equino em concentração média de $1.578.750 \text{ plaquetas/mm}^3 (\pm 202.723)$, produzidas no mesmo dia e ativadas com cloreto de cálcio a 5% no momento do procedimento. Nas feridas controles, foi aplicado 1,5g de uma pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, (Vetaglós, Vetnil, Brasil). O segundo curativo foi realizado as 20 horas, aplicando em ambas as feridas, após irrigadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%, 1,5g de Vetaglós.

Decorridos os períodos de observação dos grupos, os coelhos foram eutanasiados para remoção de cerca de 3,0cm das bordas e do leito das feridas. As amostras foram fixadas durante 48 horas em formol 10%, desidratadas em solução de concentrações crescentes de etanol e incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo Leika, modelo 2145, com $6,0\mu\text{m}$ de espessura para ser confeccionado as lâminas histológicas. Os cortes foram corados pelo picrosirius red e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética e avaliadas em microscopia óptica (microscópio Nikon eclipse, modelo E200). Após fotografadas as lâminas foram analisadas com o programa imageJ para calcular a área e a porcentagem de colágeno presente em cada ferida.

Para a avaliação em microscopia eletrônica de transmissão Hitachi High-Tech modelo HT7700, com aumento de 40.000 vezes, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% durante 24 horas. Em seguida foram acondicionadas em recipiente de vidro contendo solução tampão de PBS com pH de 7,2 a 7,4, tampados e refrigeradas em geladeira a seis graus. Foram coletadas cinco amostras de cada ferida e a solução de PBS foi trocada a cada sete dias até o processamento. O material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 2% por uma hora. Adicionou-se ferrocianeto de potássio 1,25% à solução, durante 30 minutos. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool a 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% e 100% permanecendo cinco minutos nos cinco primeiros banhos e 10 minutos nos três últimos. Em seguida as amostras foram mantidas em óxido de propileno a 100% por 10 minutos, sendo o processo repetido por três vezes. Posteriormente, o material foi colocado em solução de óxido de propileno e resina Epon 2:1, por 12 horas. Após esse período, a solução foi substituída

por outra de proporção de 1:1, sendo uma parte de óxido de propileno e uma de resina Epon, por mais 12 horas. Decorrida as 12 horas os frascos foram colocados na estufa a 37°C por 12 a 24 horas. Depois da evaporação de todo óxido de propileno os blocos foram embebidos em resina pura e mantidos durante duas horas em estufa a 37°C. Após este período, as amostras foram acondicionadas em formas com resina Epon, identificadas e mantidas em estufa à 60°C por dois dias. Posteriormente obteve-se cortes ultrafinos no ultramicrotomo que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Bozzola e Russell, 2006).

A comparação entre os grupos (GI, GII, GIII e GIV) em relação a porcentagem de colágeno, diâmetro da fibrila de colágeno e densidade de fibrila de colágeno por μm^2 utilizou-se o teste Tukey, sendo que para os valores de “P” iguais ou inferiores a 0,05 as diferenças das médias entre os grupos foram consideradas significativas. Também foi realizada análise de correlação linear entre estas variáveis, nas feridas controle e tratada nos diferentes grupos de observação, considerando nível de significância de 5%. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se precocidade na reepitelização das bordas das feridas tratadas com plasma rico em plaquetas de equino associado a aplicação tópica da pomada contendo gentamicina, em relação às não tratadas com o plasma (Fig. 3, 5 e 7). Entretanto, não ocorreu diferença significativa entre as feridas ($P>0,05$), quanto a porcentagem de colágeno, nos diferentes grupos de observação (Tab. 1). Em camundongos a porcentagem de colágeno se mostrou significativamente maior nas feridas tratadas com PRP, no terceiro dia após a lesão em relação as feridas do grupo controle (De Souza *et al.*, 2014; De Sousa *et al.*, 2015; Mori *et al.*, 2014). As divergências dos resultados podem ser justificadas pelas diferenças de metodologias, como as espécies de animais avaliadas, e a coloração picrosirius empregada, uma vez que estes fatores podem alterar a sensibilidade da leitura do programa imageJ para a avaliação da porcentagem de colágeno.

Tabela 1. Média da porcentagem, diâmetro e densidade da fibrila de colágeno das feridas cutâneas de coelhos, controle e tratada com PRP e pomada de gentamicina, nos diferentes grupos de observação.

Características	GI (3 dias)		GII (7 dias)		GIII (14 dias)		GIV (21 dias)	
	FC	FT	FC	FT	FC	FT	FC	FT
Colágeno	41,50 A	47,41 A	46,99 A	47,76 A	44,30 A	43,79 A	34,42 A	38,64 A
Diâmetro	95,33 C	129,95AB	104,98BC	138,23A	31,40 D	97,99 C	43,95 D	97,24 C
Densidade	34,00 C	75,00 AB	29,00 BC	75,00 A	45,00 D	109,00C	60,00 D	117,00 C

FC: ferida controle, FT: ferida tratada. Médias das características colágeno (%), diâmetro (nm) e densidade (fibrilas/ μm^2) seguidos por letras diferentes diferem pelo teste Tukey ($P<0,05$).

Para analisar a regeneração da derme das feridas, utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão para revelar os padrões de formação do colágeno, o diâmetro individual da fibrila de colágeno e a densidade das fibrilas no local da ferida. Notou-se que o diâmetro e a densidade da fibrila de colágeno foram diferentes entre as feridas tratadas e controles em todos os grupos de observação (Fig. 2, 4, 6 e 8). Também verificado o predomínio de maior diâmetro e de maior densidade de fibrila para as feridas tratadas com PRP heterólogo, associado à pomada em relação as feridas controles ($P<0,05$), (Tab. 1). O mesmo padrão foi observado em camundongos por Mori *et al.* (2014), os quais referiram que as diferenças de montagem de densidade de colágeno entre as feridas tratada e controle desempenham importante função na reepitelização na fase de maturação das feridas.

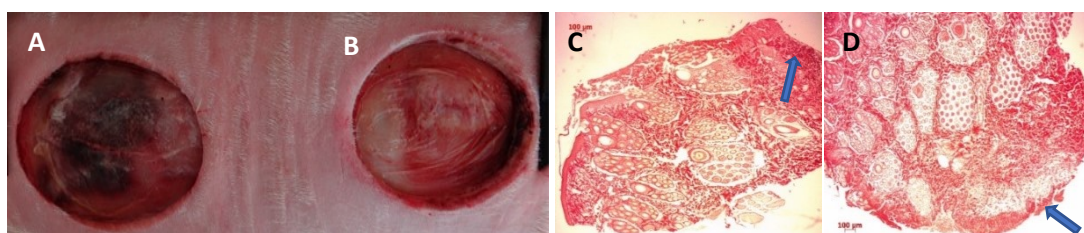


Figura 1. Feridas cutâneas de coelhos do grupo I decorridos três dias de pós-operatório. Observar a semelhança macroscópica entre a ferida tratada (A) e controle (B), a fotomicrografia do grupo I decorridos três dias de pós-operatório, com presença de crosta e semelhança na quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) e controle (D), (seta), (Coloração picrosirius, aumento 5vezes e escala de 100 μm).

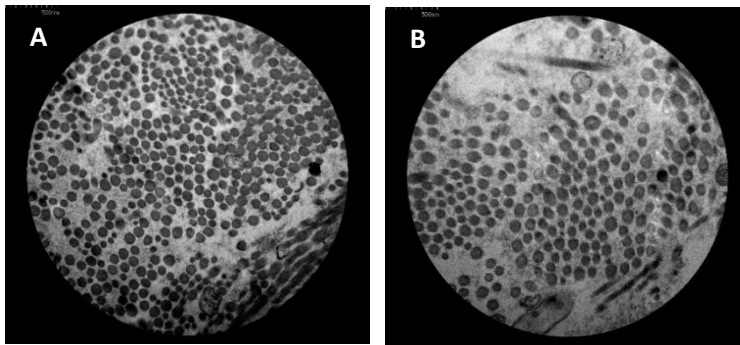


Figura 2. Eletromicrografia do grupo I decorridos três dias de pós-operatório. Verificar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação a controle (B), (Aumento 40.000 vezes).

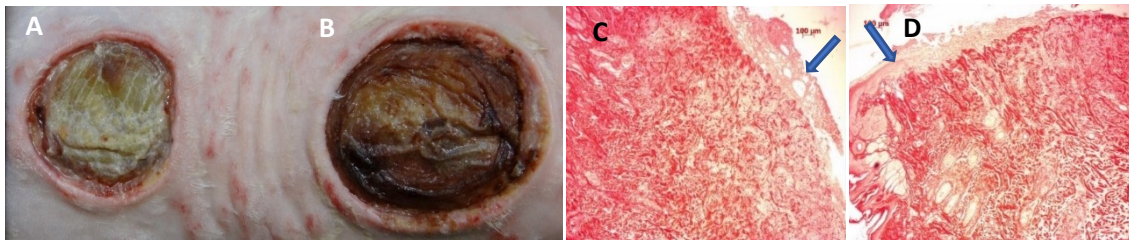


Figura 3. Feridas cutâneas de coelhos do grupo II decorridos sete dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (A) em comparação com a controle (B), a fotomicrografia do grupo II decorridos sete dias de pós-operatório, com presença de crosta e semelhança na quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) e controle (D), (seta), (Coloração picrosirius, aumento 5 vezes e escala de 100µm).

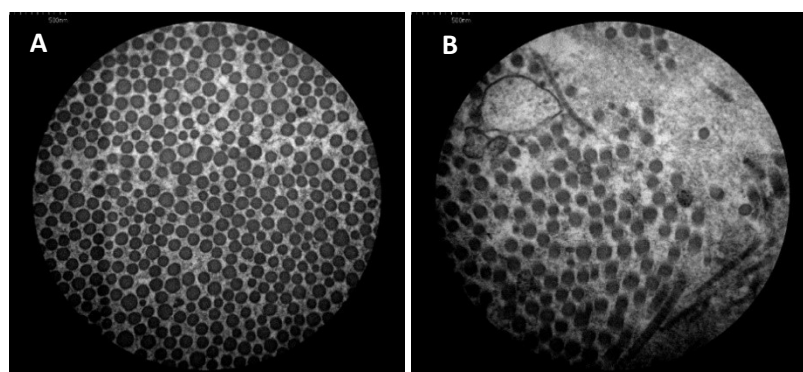


Figura 4. Eletromicrografia do grupo II decorridos sete dias de pós-operatório. Observar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação a controle (B), (Aumento 40.000 vezes).

As fibrilas de colágeno em feridas recentes são de 12 a 50nm de diâmetro e são embaladas de forma muito curta em feixes curvilíneos e, portanto, não são prontamente detectáveis por microscopia óptica. As fibras em feridas antigas podem apresentar um diâmetro de até 500nm, mas se encontram no limite da resolução da maioria dos microscópios de luz (Starborg *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2016). Observação não coincidentes como verificado neste experimento, uma vez que foi notado um diâmetro maior nas feridas com três e sete dias de pós-operatório (Fig. 2 e 4), do que nas feridas com 14 e 21 dias de indução (Fig. 6 e 8). Sendo que as tratadas com PRP apresentavam um diâmetro de fibrilas de colágeno significativamente maiores do que as do controle, assim como a densidade de fibrila colágena por μm^2 ($P<0,05$), (Tab. 1). Apesar da avaliação da porcentagem de colágeno, nos cortes histológicos corados com picrosirius, não terem revelado diferenças entre as feridas nos diferentes grupos (Fig. 1, 3, 5 e 7), a microscopia eletrônica mostrou-se sensível na diferença de maturação entre as fibrilas de colágeno, tanto nas feridas controle como nas tratadas.

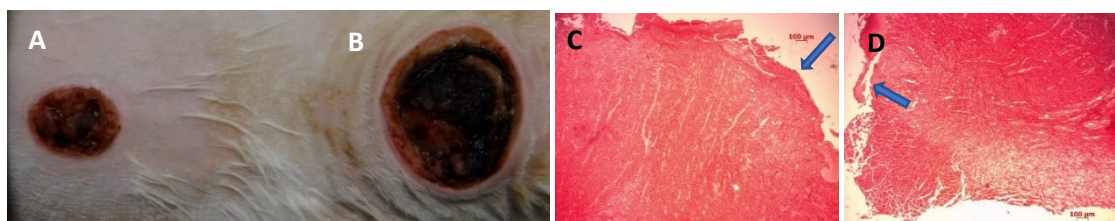


Figura 5. Feridas cutâneas de coelhos do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (A) em comparação com a controle (B), a fotomicrografia do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório, com a diminuição da crosta e semelhança na quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) e controle (D), (seta), (Coloração picrosirius, aumento 5vezes e escala de 100 μm).

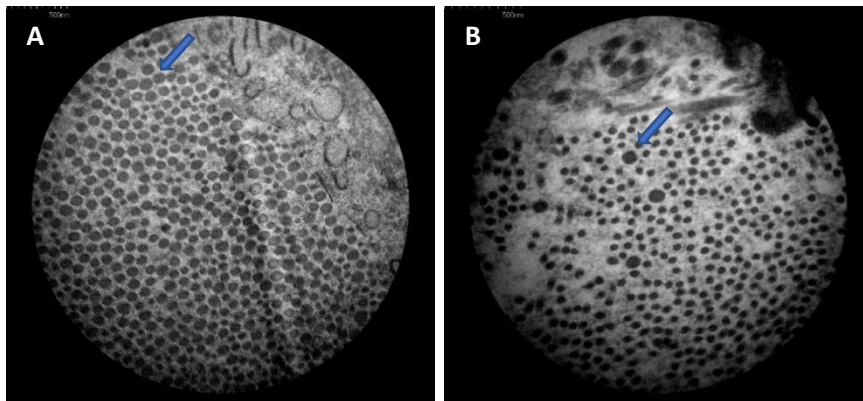


Figura 6. Eletromicrografia do grupo III decorridos 14 dias de pós-operatório. Notar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação a controle (B). Em ambas as feridas é notado fibrilas de elastina, (setas), (Aumento 40.000 vezes).

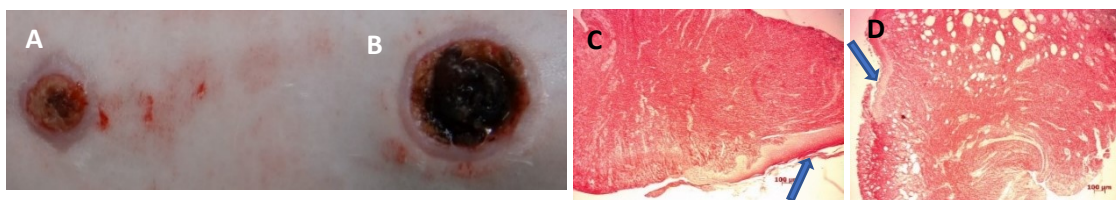


Figura 7. Feridas cutâneas de coelhos do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório. Observar a redução de área da ferida tratada (A) em comparação com a controle (B), a fotomicrografia do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório, com a reepitelização e maior quantidade de colágeno na ferida tratada (C), (seta) em comparação com a controle (D), (seta), (Coloração picrosirius, aumento 5vezes e escala de 100 μ m).

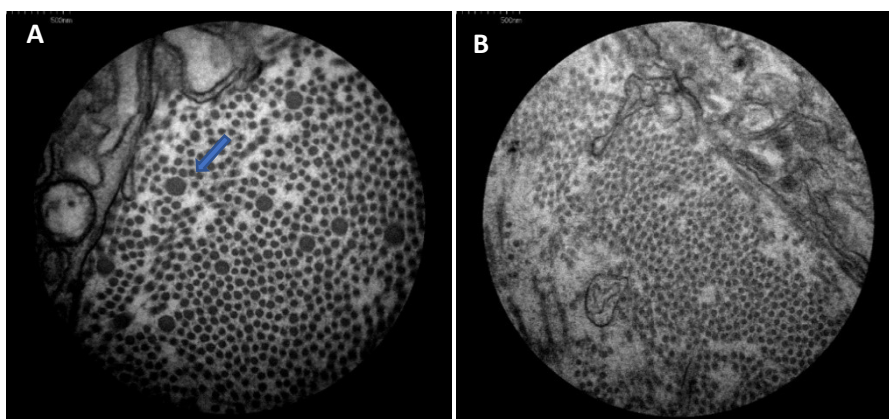


Figura 8. Eletromicrografia do grupo IV decorridos 21 dias de pós-operatório. Constatar o maior diâmetro e a maior densidade por campo das fibrilas colágenas na ferida tratada (A) em relação

ao grupo controle (B). Presença de fibrilas de elastina na ferida tratada (A), (seta), (Aumento 40.000 vezes).

Foi observada, em ambas as feridas, uma correlação linear negativa significativa ($P < 0,05$) entre o diâmetro (nm) e a densidade da fibrila por μm^2 ($r = -0,14$) e uma correlação negativa significativa ($P < 0,01$) entre o diâmetro da fibrila e a porcentagem de colágeno ($r = -0,16$). Observadas nas avaliações histológicas realizadas por meio da coloração picrosirius. Notou-se que quanto maior o diâmetro da fibrila de colágeno menor é a sua densidade por μm^2 e, portanto, menor a sua porcentagem no tecido lesado. No entanto, não foi percebida, pela coloração picrosirius, diferença significativa na porcentagem de colágeno nas feridas durante os tratamentos ($P > 0,05$), uma vez que a avaliação histológica se demonstrou pouco sensível. Característica verificada com maior frequência nas feridas com três e sete dias pós indução, ou seja, no grupo I e no grupo II, respectivamente. Durante a fibronogênese podem existir a interação de dois ou mais tipos de colágeno dentro de uma fibrila ou a sua interação com a matriz interfibrilar, determinando assim o seu diâmetro (Birk *et al.*, 1990; Aleixo *et al.*, 2011; Hermeto *et al.*, 2012; Minamimura *et al.*, 2014). Experimentos realizados com tecido corneano, tratados com plasma rico em plaquetas, observou-se ampla gama de diâmetros, os quais diminuíram progressivamente ao longo do período após indução (10%, $144 \pm 39\text{nm}$, 20%, $101 \pm 30\text{nm}$, 30%, $85 \pm 21\text{nm}$), (Birk *et al.*, 1990; Arora *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2017).

Apesar das características distintas entre os tipos de colágeno I, presente na córnea e colágeno tipo III na pele, verificou-se o padrão semelhante ao observado neste estudo, onde o diâmetro da fibrila colágena diminui à medida que o período decorrido pós lesão progride. Demonstrando assim, desiguais graus de maturidade da fibrila de colágeno nos diferentes grupos de observação.

CONCLUSÕES

A aplicação tópica do plasma rico em plaquetas de equino associada com a pomada contendo gentamicina, sulfanilamida, sulfadiazina, ureia e vitamina A, em feridas de pele em coelhos, é eficaz na maturação mais precoce das fibrilas colágenas, antecipando o processo cicatricial.

A coloração picrosirius não foi sensível para a avaliação das fibras colágenas nos diferentes grupos, enquanto que a microscopia eletrônica de transmissão foi o melhor método de avaliação.

A maturação da fibrila colágena é determinada pelo diâmetro e pela densidade da fibrila colágena por área, ou seja, quanto menor o diâmetro da fibrila maior será sua densidade por área e maior o seu grau de maturação.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, G. A.; ZACARIAS, T. F.; MAIA, F. C. *et al.* Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.63, n.3, p.567-573, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000300005>

ANDRADE, M.; RODRIGUES, G. M.; LIMA, D. P. *et al.* Use of plasma rich in platelets of rabbits with few leukocytes and erythrocytes to consolidate bones. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.68, n.2, p.276-282, 2016.

<https://doi.org/10.1590/1678-4162-8304>

ARORA, S.; DODA, V.; KOTWAL, U.; DOGRA, M. Quantification of platelets and platelet derived growth factors from platelet-rich-plasma (PRP) prepared at different centrifugal force (g) and time. *Transf. Aph. Scie.*, v.54, n.1, p.103-110, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.01.028>

BIRK, D. E.; FITCH J. M.; BABIARZ, J. P. *et al.* Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J. C. Scie.*, v.95, n.4, p.649-657, 1990.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists 1999. *Sudbury, Mass.[ua]: Jones and Bartlett*. 2.ED. BOSTON: JONES AND BARTLETT, 2006.

CHANG, P.; GUO, B.; HUI, Q. *et al.* A bioartificial dermal regeneration template promotes skin cell proliferation in vitro and enhances large skin wound healing in vivo. *Oncotarget*, v.8, n.15, p.25226-25241, 2017.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16005>

DE SOUSA, S. M. T.; DA SILVA, C. B.; DA SILVA, N. J. *et al.* POTENCIAL DE CICATRIZAÇÃO DO LÁTEX DE SYNADENIUM UMBELLATUM EM FERIDAS DORSAIS DE RATOS. *Estudos*, v.42, n.4, p.481-491, 2015.

DE SOUZA, M. V.; PINTO, J. O.; DA COSTA, M. *et al.* Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34, n.6, p.599-612, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000600016>

EURIDES, D.; MANTOVANI, M. M.; MENEZES, G. F. *et al.* Plasma rico em plaquetas autólogas na cicatrização do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Scie.*, v.52, n.1, p.48-56, 2015.

<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v52i1p48-56>

HERMETO, L. C.; ROSSI, R.; PÁDUA, S. B. *et al.* Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. *Acta cir. bras.*, v.27, n.11, p.789-794, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0102-86502012001100008>

HOUDEK, M. T.; WYLES, C. C.; STALBOERGER, P. G. *et al.* Collagen and fractionated platelet-rich plasma scaffold for dermal regeneration. *Plast. Reconst. Surg.*, v.137, n.5, p.1498-1506, 2016.

<https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002094>

HUANG, L.; APKARIAN, R. P.; CHAIKOF, E. L. High-resolution analysis of engineered type I collagen nanofibers by electron microscopy. *Scanning*, v.23, n.6, p.372-375, 2001.

<https://doi.org/10.1002/sca.4950230603>

MINAMIMURA, A.; ICHIOKA, S.; SANO, H.; SEKIYA, N. Comparison of collagen matrix treatment impregnated with platelet rich plasma vs bone marrow. *J. Plast. Surg. H. Surg.*, v.48, n.1, p.15-20, 2014.

<https://doi.org/10.3109/2000656X.2013.793193>

MORI, R.; TANAKA, K.; DE KERCKHOVE, M. *et al.* Reduced FOXO1 expression accelerates skin wound healing and attenuates scarring. *The Ameri. J. Path.*, v.184, n.9, p.2465-2479, 2014.

STARBORG, T.; KALSON, N. S.; LU, Y. *et al.* Using transmission electron microscopy and 3View to determine collagen fibril size and three-dimensional organization. *Nat. Prot.*, v.8, n.7, p.1433, 2013.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.086>

406 TONNIGES, J. R.; ALBERT, B.; CALOMENI, E. P. *et al.* Collagen Fibril Ultrastructure
407 in Mice Lacking Discoidin Domain Receptor 1. *Microsc. Microa.*, v.22, n.03, p. 599-611,
408 2016.
409 <https://doi.org/10.1017/S1431927616000787>

APÊNDICE A- Normas da Revista: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, referentes aos capítulos 2 e 3

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Conmitee" (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo". O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto:

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. **Periódicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. **Publicação avulsa** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. **Documentos eletrônicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.
OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be in the invoice issuance.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

APÊNDICE B- Ofício número 034/2016, do comitê de ética em experimentação animal (CEEa) da Universidade de Uberaba



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-034/2016

Uberaba, 8 de junho de 2016

Ilmo. Prof.

Rodrigo Supranzetti de Rezende

Assunto: Encaminha processo nº 003/2016, sobre o protocolo de pesquisa "*Avaliação histomorfométrica e imunohistoquímica de feridas induzidas experimentalmente em coelhos tratados plasma rico em plaquetas heterólogo*".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido avaliação do CEEA-UNIUBE, na reunião do dia 02/06/2016, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

Prof. Jucely F. Aguiar de Brito

Coordenadora do CEEA-UNIUBE