ROSILÉIA DE AZEVEDO CAMPOS

**Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado na
regeneração de pele em ratos.**

São Paulo

2018

ROSILÉIA DE AZEVEDO CAMPOS

Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado na regeneração de pele em ratos.

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador:

Prof. Dr. Ana Cláudia Oliveira Carreira
Nishiyama

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3627
FMVZ

Campos, Rosiléia de Azevedo
Efeitos do plasma rico em plaquetas (PRP) fresco e liofilizado na regeneração de pele em ratos. / Rosiléia de Azevedo Campos. -- 2018.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama.

1. Plasma rico em plaquetas. 2. Regeneração tecidual. 3. Cicatrização. 4. Feridas.
5. Fatores de crescimento. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 31 de janeiro de 2018
CEUA N 5290110216

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama (orientador)

Título da proposta: "Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado na regeneração de pele em ratos.".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 05/janeiro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Contextualização da mudança: Pedimos alteração no projeto da aluna devido à dificuldade de executar a pigmentação no modelo proposto. Entretanto, a mesma linhagem de ratos nude Rowett será utilizada nesta nova proposta pois o material utilizado a ser aplicado é de origem humana. Os mesmos cuidados de manutenção e manipulação com os animais, apresentados anteriormente e aprovados neste CEUA, serão mantidos. A aluna fará a aplicação do Plasma rico em plaquetas, preparado fresco e liofilizado, utilizando como controle positivo o rhPDGF-BB preparado em nosso laboratório, para avaliar a cicatrização em dorso de ratos nudes. A metodologia para execução das feridas já está estabelecida em nosso laboratório em modelo de camundongos, e foi aprovada no CEUA no. 8941120916, (Projeto: Papel das células tronco mesenquimais e seu secretoma na regeneração tecidual) e será a mesma utilizada nesta nova proposta. Resumo: O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um produto derivado de células sanguíneas obtido por centrifugação o qual contém uma alta concentração de fatores de crescimento em um pequeno volume de plasma. Este procedimento é utilizado desde a década de 1950 e vem crescendo amplamente para aplicação em diversas áreas como na Ortopedia, Odontologia, Estética para uso no reparo de feridas crônicas, especialmente em pacientes diabéticos ou com complicações venosas, feridas em mucosas, tecidos conjuntivos, patologias do sistema músculo-esquelético, superfície de fratura, enxerto ósseo entre outros. Em cicatrizações e tecidos deficitários observa-se um comprometimento dos níveis ideais de fatores de crescimento nas fases de cicatrização, por esse motivo vê-se a importância de manter os níveis adequados dos fatores de crescimento, mas diferentes fases do reparo tecidual. A preparação do PRP é um procedimento variável e que pode ser demorado causando um certo desconforto ao paciente, por ser necessário mais de uma coleta de sangue para cada aplicação. O preparo de PRP por não ser padronizado pode comprometer a eficácia do tratamento, pois diferentes número de células pode ser isolado e a quantidade dos fatores de crescimento necessários podem ser variáveis. As coletas de sangue são invasivas para o paciente, sendo dispendiosas em tempo e mão-de-obra ao procedimento operacional, implicando no aumento do custo. O preparo antecipado do PRP com possibilidade de armazenamento para o uso nas aplicações durante o tratamento pode ser uma solução importante para acelerar a regeneração tecidual e evitar o desconforto dos pacientes, que muitas vezes já não tem uma boa qualidade de vida. Portanto, o presente estudo visa comparar a diferença entre os tratamentos com o fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) com o PRP obtido a fresco e armazenado por liofilização na regeneração tecidual em um modelo de lesão no dorso de rato nude visando obter uma cicatrização mais eficiente a fim de oferecer um tratamento de maior qualidade para o paciente. Justificativa da Proposta: O PRP já vem sendo utilizado a diversas décadas em diferentes situações sendo utilizado na forma líquida ou em forma de gel. Normalmente, são realizadas mais de uma aplicação para que ocorra o equilíbrio no nível dos fatores de crescimento no local que se deseja o resultado. O PRP geralmente é preparado e aplicado imediatamente no paciente, tornando-se simultaneamente um procedimento demorado e dispendioso sob a visão de mão-de-obra para o procedimento operacional, além de causar desconforto ao paciente por ser um processo invasivo na coleta de material biológico. Portanto, armazenar o PRP para ser aplicado nas sessões futuras seria de grande importância para o paciente e para os cofres públicos. Vê-se necessário analisar as características do plasma autólogo rico em plaquetas após o armazenamento comparando a eficácia com PRP fresco na regeneração tecidual. ".

Comentário da CEUA: **.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: CAMPOS, Rosiléia de Azevedo

Título: Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado na regeneração de pele em ratos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente às minhas preciosidade que são meus filhos, Erick e Thales, e a minha família que estão sempre presentes me apoiando e me incentivando.

AGRADECIMENTOS

Expressar a gratidão a todos que me auxiliaram de uma forma direta ou indireta, não é tão simples assim.

Tive a felicidade de encontrar pessoas maravilhosas nesses anos, que me estimularam a aprender cada vez mais, buscando maior aprimoramento e busca de novos conhecimentos.

Agradeço muito a minha orientadora Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama, vinculada ao NUCEL -Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), de grande atuação nesse Centro de Pesquisa Translacional na área de Saúde (humana e animal), e que me proporcionou grandes conhecimentos e incentivos na área de Terapia Celular.

Agradeço à doutoranda Bruna Andrade Aguiar, por todo auxílio nos trabalhos laboratoriais, sempre me orientando e me incentivando.

Agradeço ao coordenador e professor Dr. José Roberto Kfoury, aos técnicos e funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Rose Eli Ricci, Ronaldo Agostinho, Daura Vaz, aos professores e colegas de turma, em especial ao Antônio Lisboa Neto por toda colaboração e incentivo.

Agradeço ao Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF-IQ/USP) por todo treinamento realizado com os animais utilizados.

Aos funcionários e professores do Comitê de Ética da FMVZ/USP agradeço por toda orientação, e por estarem atuantes e dispostos a resolver todos os problemas durante o projeto.

Agradeço muito ao CNPq pela oportunidade de auxílio financeiro, e à CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Agradeço muito à professora Naira Cusma Pelógia pela participação neste trabalho, e agradeço também, aos grandes esforços e incentivos que tive do amigo Alberto Santos, a quem agradeço pelas orientações e pela visão de determinação.

E um especial agradecimento à minha família pela compreensão e incentivo. Aos meus maravilhosos filhos, Erick e Thales, aos meus pais, Zito Miranda (*in memorian*) e Dorinha, aos meus irmãos Francisco, Otávio e Mariléia; aos meus sobrinhos e cunhados(as), e às minhas tias Dilce e Laura.

Obrigada a todos e vamos para o próximo desafio !

“Todos os nossos sonhos podem se tornar realidade, se tivermos coragem de segui-los”

(Walt Disney)

RESUMO

CAMPOS, RA. **Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado no modelo de regeneração de pele em ratos.** [Effects of Platelet Rich Plasma (PRP) fresh and lyophilized on skin regeneration model in rats]. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um produto derivado de células sanguíneas obtido por centrifugação, o qual contém uma alta concentração de fatores de crescimento em um pequeno volume de plasma. Este procedimento é utilizado desde a década de 1950 e vem crescendo amplamente para aplicação em diversas áreas como na Ortopedia, Odontologia, Cardiologia, Oftalmologia, Dermatologia, e para uso no reparo de feridas crônicas, especialmente em pacientes diabéticos ou com complicações venosas, feridas em mucosas, tecidos conjuntivos, patologias do sistema músculo-esquelético, superfície de fratura, enxerto ósseo entre outros. Nessas situações, observa-se um comprometimento dos níveis ideais de fatores de crescimento nas fases de cicatrização, por esse motivo vê-se a importância de manter os níveis adequados dos fatores de crescimento nas diferentes fases do reparo tecidual. O preparo de PRP por não ser padronizado pode comprometer a eficácia do tratamento, pois o número de células pode variar em cada paciente e a cada isolamento, e por consequência, a quantidade dos fatores de crescimento podem ser variáveis. As coletas de sangue são invasivas para o paciente, sendo dispendiosas em tempo e mão-de-obra ao procedimento operacional, implicando no aumento do custo. O preparo antecipado do PRP com possibilidade de armazenamento para o uso nas aplicações durante o tratamento pode ser uma solução importante para acelerar a regeneração tecidual e evitar o desconforto do paciente, que muitas vezes já não tem uma boa qualidade de vida. Portanto, o presente estudo visou comparar a diferença no processo de cicatrização durante sete dias em um modelo de lesão no dorso de rato nude com a aplicação de PRP humano obtido a fresco e PRP armazenado por liofilização e estocado a temperatura ambiente durante 18 dias, preparados a partir de dois diferentes doadores, comparados à aplicação do fator de crescimento derivado de plaquetas BB humano recombinante (rhPDGF-BB), um dos fatores de crescimento mais abundante no PRP. Os resultados mostraram eficácias comparadas nos tratamentos das feridas com rhPDGF-BB (controle

positivo) e com os PRPs fresco ou armazenado a temperatura ambiente, de ambos os doadores, indicando a possibilidade de coleta de sangue do paciente apenas uma única vez e estocagem do mesmo até a reconstituição do produto no dia da aplicação, possibilitando o oferecimento de um tratamento de maior qualidade e menor invasividade ao paciente. Não houve diferença estatística significativa nos tratamentos das feridas com os PRPs fresco ou armazenado obtidos dos dois doadores, indicando que os valores de plaquetas dos doadores (189.000 e 216.000/mm³) foram adequados para o processo de regeneração tecidual. Este trabalho mostra a possibilidade do estoque do PRP, preparado a partir do sangue do paciente, em diversas alíquotas liofilizadas e estéreis a temperatura ambiente, o que poderá facilitar a aplicação do produto, possibilitando seu uso até mesmo em domicílio, e, conseqüentemente, uma melhora na qualidade de vida deste paciente. Também aponta para um protocolo de preparo rápido e efetivo para pacientes com até 189.000 plaquetas/ mm³, com atividade biológica testada *in vivo*, visando a preparação de PRP.

Palavras chave: Plasma Rico em Plaquetas. Regeneração tecidual. Cicatrização. Feridas. Fatores de Crescimento.

ABSTRACT

CAMPOS, RA. **Efeitos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) fresco e liofilizado no modelo de regeneração de pele em ratos** [Effects of Platelet Rich Plasma (PRP) fresh and lyophilized on skin regeneration model in rats] 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Platelet Rich Plasma (PRP) is a blood cell derived product obtained by centrifugation, which contains a high concentration of growth factors in a small volume of plasma. This procedure has been used since the 1950s and has been widely used in various areas such as Orthopedics, Dentistry, Cardiology, Ophthalmology, Dermatology for use in chronic wound repair, especially in diabetic patients or patients with venous complications, mucosal wounds, connective tissues, pathologies of the musculoskeletal system, fracture surface, bone graft, among others. In scarring and deficient tissues, there is an impairment of the ideal levels of growth factors in the wound healing phases. Therefore, it is important to maintain adequate levels of growth factors in all the different stages of tissue repair. The preparation of PRP is a non-standard procedure, with variable results being observed in the literature, being able to be involved with the amount of growth factors and methods of preparation. Usually, more than one PRP application is required involving a new blood collection for each application in order to accelerate tissue regeneration. The blood collections are invasive for the patient, being expensive in time and labor in the operational procedure, implying in the increase of the cost. The early preparation of PRP with possibility of storage for use in future applications during treatment could be an important solution to avoid the discomfort of patients, who often no longer have a good quality of life. Therefore, the present study aimed to compare the difference in the healing process for seven days in a nude rat dorsal lesion model, treated with human fresh PRP or stored PRP (prepared by lyophilization and stored at room temperature for 15 days, from two different donors, and compared to the application of recombinant human BB platelet-derived growth factor (rhPDGF-BB), one of the most abundant growth factors in PRP. The results showed comparative efficacies in the treatments of wounds with rhPDGF-BB (positive control) and with fresh PRPs or room temperature stored PRP of both donors, indicating the possibility of collecting blood from the patient only once and storing the same until the reconstitution of the product on the day of application, allowing the offer of a

treatment of higher quality and less invasiveness to the patient. There was no statistically significant difference in wound treatments with fresh or stored PRPs obtained from the two donors, indicating that donor platelet values (189,000 and 216,000/mm³) were adequate for the tissue regeneration process. This work shows the possibility of PRP stock, prepared from the patient's blood, in several sterile freeze-dried aliquots at room temperature, which may facilitate the application of the product, allowing its use even at home, and, consequently, an improvement in the quality of life of this patient. It also points to a fast and effective preparation protocol for patients with up to 189,000 platelets/mm³, with biological activity tested *in vivo*, aiming at the preparation of PRP.

Keywords: Plasma Rich in Platelets. Tissue Regeneration. Healing. Wounds. Growth Factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem da derme mostrando tecido conjuntivo denso não modelado.....	22
Figura 2 - Desenho esquemático de plaquetas em estado ativado e não ativado.....	24
Figura 3 - Desenho esquemático dos grupos experimentais.....	39
Figura 4 - Hemograma dos dois doadores de sangue para preparação do PRP.....	40
Figura 5 - Frações do sangue durante a preparação do PRP.....	41
Figura 6 - Imagem do dorso do rato com as áreas das feridas demarcadas para retirada de pele.....	43
Figura 7 - Imagem do dorso do animal com as quatro incisões para aplicação da solução fisiológica, do rhPDGF-BB, do PRP Fresco e do PRP Armazenado.....	44
Figura 8 - Imagens fotodocumentadas dos dorsos dos animais tratados com PRP fresco e armazenado obtidos do doador A (Grupo 1) ao longo do processo de cicatrização e esquema do tratamento.....	46
Figura 9 - Imagens fotodocumentadas dos dorsos dos animais tratados com PRP fresco e armazenado obtidos do doador B (Grupo 2) ao longo do processo de cicatrização e esquema do tratamento.....	47
Figura 10 - Histologia de pele de rato sem tratamento.....	50
Figura 11 - Imagem fotográfica da evolução da regeneração e histologia de pele de todas as feridas tratadas dos animais do Grupo 1.....	51
Figura 12 - Imagem fotográfica da evolução da regeneração e histologia de pele de todas as feridas tratadas dos animais do Grupo 2.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média da área das feridas no dia 7 do processo de regeneração tecidual em pele de dorso de ratos nudes.....	48
Gráfico 2 - Mediana da área das feridas no dia 7 do processo de regeneração tecidual em pele de dorso de ratos nudes.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitros
µm	Micrômetro
ADSC	Células-tronco derivadas do tecido adiposo
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto básico
C	Colágeno
citocina CXC	Citocina Cisteína-X-Cisteína
DC	Colágeno desorganizado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FP	Folículos pilosos
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
GSNO	S-Nitrosoglutathione
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócito
M	Migração celular
mL	Mililitros
mm ²	Milímetro quadrado
NIH	<i>National Institute of Health</i>
OX	Óxido nítrico
PDGF	Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas
PDGF-AB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas AB
PDGF-BB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas BB
PFA	Paraformaldeído
PRP	Plasma Rico em Plaquetas

PRP-A	Plasma Rico em Plaquetas Armazenado/Liofilizado
PRP-F	Plasma Rico em Plaquetas Fresco
Q	Queratina
rhPDGF-BB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas BB humano recombinante
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TE	Tecido epitelial
TG	Tecido de granulação
TGF- β	Fator de Crescimento transformante β
TGF- β 1	Fator de Crescimento transformante β 1
TGF- β 3	Fator de Crescimento transformante β 3
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
β -TCP	Fosfato Tricálcico do tipo β

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO	20
2.1 O processo de reparo tecidual	21
2.1.1 A Derme	21
2.1.2 As fases do processo de reparação tecidual	23
2.1.3 Angiogênese	27
2.2 Plaquetas: estruturas e suas funções	28
2.3 O Plasma Rico em Plaquetas	29
2.3.1 Eficácia e segurança do Plasma Rico em Plaquetas	29
2.4 Modelo animal em estudo para regeneração tecidual	35
3 OBJETIVO	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivo Específico	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Critério de seleção dos doadores de sangue para preparação do Plasma Rico em Plaquetas	40
4.2 Preparação do Plasma rico em plaquetas	40
4.3 Delineamento Experimental	42
4.4 Análise da Cicatrização	44
4.5 ELISA para Fator de Crescimento PDGF-BB	45
4.6 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Modelo de Cicatrização em dorso de ratos tratados com rhPDGF-BB e PRP Fresco e PRP Armazenado	46
5.2 Análise dos Tratamentos com rhPDGF-BB e PRP-F e PRP-A	47
5.3 ELISA para Fatores de Crescimento PDGF-BB	49
5.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DOS TECIDOS DE RATOS	49
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	57
8 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas crônicas é um problema comum e de grande incidência em todo mundo causando incapacidades de locomoção, dores constantes, inflamações e contaminações. Úlceras por problemas vasculares, em casos de trombose, má irrigação sanguínea dos membros inferiores, hipertensão arterial, anemia falciforme, doenças autoimunes (como a esclerodermia), úlceras no pés de diabéticos, tumores de pele, escaras em pessoas acamadas por longos períodos e em pacientes paraplégicos ou tetraplégicos ou ainda, deficiência física de várias classes são casos propensos a feridas que não se cicatrizam, levando o paciente a uma sobrecarga emocional, fazendo com que se afaste do trabalho trazendo não só má qualidade de vida, como grandes custos à saúde pública, com grande demanda tanto em recursos materiais, como em recursos humanos.

Com o avanço da Medicina no combate a enfermidades e conhecimento das condições de vida adequadas levou-se ao crescimento da população idosa. Com essa longevidade, problemas inerentes à população idosa estão associados a hipertensão, doenças vasculares, insuficiência venosa e diabetes mellitus(VIEIRA et al., 2017)

No Brasil, a prevalência de diabetes *mellitus* identificada na Pesquisa Nacional de Saúde em 2013 foi de 6,2% (BRASIL. Ministério da Saúde). Ulcerações e amputações de extremidades são complicações comuns em portadores de diabetes. Nos Estados Unidos e Europa, estima-se que de 1 a 2% da população seja afetada por feridas crônicas gerando um gasto médio de €6.000-10.000 por paciente/ano (PARK; HWANG; YOON, 2017). Em 2017, foi relatado que os custos anuais Estados Unidos relacionados às úlceras venosa e em pés diabético atingem cerca de US\$ 14,9 bilhões(SINGER; TASSIOPOULOS; KIRSNER, 2017).

Uma série de fatores fisiopatológicos estão envolvidos em problemas de cicatrização, incluindo desde a desnutrição, a idade até inflamações, infecções, diabetes, necrose de pressão, maceração de tecido e insuficiência renal (PARK; HWANG; YOON, 2017).

O processo de cicatrização em feridas crônicas pode levar dias, semanas, meses, ou até mesmo anos, gerando uma fase inflamatória extensa, proliferação celular retardada, re-epitelização e remodelação deficitária com angiogênese

precária (PARK; HWANG; YOON, 2017). Observa-se que os fatores de crescimento não permanecem em quantidades adequadas nas fases da cicatrização, e por isso, há a necessidade de mantê-los em níveis fisiológicos para que a cicatrização possa ocorrer (PIETRAMAGGIORI et al., 2006; GUEVARA-ALVAREZ et al., 2014; GONCHAR et al., 2017; PARK; HWANG; YOON, 2017).

A aplicação exógena de fatores de crescimento no local da lesão é uma opção de tratamento e, atualmente, uma das terapias mais promissoras para esta prática é a terapia com Plasma Rico em Plaquetas (PRP), a qual tem demonstrado ser uma terapia efetiva, pois é uma forma autóloga e segura para promover a aceleração da cicatrização, com custos baixos e sem risco de alergias, rejeições ou toxicidade (LAURA A PETERSON, 2014; MASSARA et al., 2015). Entretanto, diversas aplicações sequenciais podem ser necessárias para alcançar e manter os níveis adequados dos fatores de crescimento durante todo processo de regeneração tecidual (GUEVARA-ALVAREZ et al., 2014). Como a terapia de PRP envolve a coleta de sangue do próprio paciente a cada preparação, este procedimento torna-se um processo semi-invasivo com desconforto para algumas pessoas, principalmente para acamados e idosos, trazendo custos e trabalhos para realização do processo. Uma possível alternativa é a preparação e, em sequência, armazenamento do PRP para aplicações futuras durante o tratamento, facilitando para o paciente e amenizando tempos/custos laboratoriais (PIETRAMAGGIORI et al., 2006; PAN et al., 2016; SHIGA et al., 2017).

Diante destes fatores, neste estudo foi avaliado a cicatrização de feridas em dorso de ratos nudes com aplicação do Plasma Rico em Plaquetas recém-preparado (Fresco) e do Plasma Rico em Plaquetas liofilizado e armazenado por um período de 18 dias em temperatura ambiente, isolado de dois diferentes doadores humanos, comparado à aplicação de um dos fatores mais abundantes no PRP, o fator de crescimento derivado de plaquetas humano (rhPDGF-BB), visando avaliar a segurança e eficácia para futuramente, poder ser aplicado na rede pública.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um biomaterial que vem sendo utilizado para terapia desde a década de 1950 (SHAHID e KUNDRA, 2017) e tem sido usada em diferentes áreas da Medicina como Ortopedia, Odontologia, Medicina Esportiva, Medicina Regenerativa, Dermatologia, Cirurgia Plástica, entre outras, devido à alta concentração de um conjunto de proteínas biologicamente ativas, diferentes fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e proteínas adesivas que possuem propriedades mitogênicas e sinalizadoras. Possui capacidade de hemostasia, estimulação da neovascularização, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporcionam o fechamento da ferida de forma mais rápida e eficiente (SEVILLA et al., 2015; VENDRAMIN et al., 2006; ANITUA et al., 2013; PICCIN et al., 2016).

A terapia com o uso do PRP geralmente envolve a coleta do sangue periférico do próprio paciente e, após o processo de centrifugação, seleciona-se a parte enriquecida do plasma contendo a fração de plaquetas. As preparações de PRP podem concentrar plaquetas e seus fatores de crescimento em até oito vezes os níveis basais presentes no sangue total (PIETRAMAGGIORI et al., 2006), e por isso ao aplicar em feridas, espera-se um processo de regeneração mais acelerada.

O PRP geralmente é preparado e aplicado imediatamente no paciente, tornando-se simultaneamente um procedimento demorado e dispendioso, sob a visão de mão-de-obra para o procedimento operacional, além de causar desconforto ao paciente por ser um processo semi-invasivo na coleta de material biológico. Portanto, armazenar o PRP para ser aplicado em sessões futuras seria de grande benefício para o paciente, economizando custos ao Sistema de Saúde, e também poderia garantir um tratamento mais rápido e efetivo (LAURA A PETERSON, 2014).

Atualmente, os bancos de sangue armazenam as plaquetas em temperatura ambiente e as descartam após cinco dias, limitando assim a disponibilidade dessas células para aplicações de cicatrização de feridas recalcitrantes (PIETRAMAGGIORI et al., 2006).

Cada vez mais os Sistemas de Saúde recebem uma grande quantidade de pacientes com problemas de cicatrização por causas diversas, como infecções,

deficiências vasculares, pacientes diabéticos, escaras de decúbito entre outras, tornando uma fonte significativa de morbidade e mortalidade, implicando muitas vezes em hospitalização prolongada, uso de antibióticos por longo prazo, processos dolorosos, e trazendo uma má qualidade de vida para esses pacientes, além de muitos gastos à saúde pública (PATEL et al., 2016; SINGER; TASSIOPOULOS; KIRSNER, 2017). Por estas razões, novos procedimentos nesta área precisam ser melhorados proporcionando rapidez e menores custos com o tratamento (EVANS et al., 2013; PICCIN et al., 2017; SINGER; TASSIOPOULOS; KIRSNER, 2017). O PRP autólogo poderia tornar uma alternativa com baixo custo, minimizando o tempo de tratamento nas unidades de saúde (SINGER; TASSIOPOULOS; KIRSNER, 2017).

Na base de dados do Pubmed existem 9.515 artigos publicados com o termo *Platelet Rich Plasma* dos quais 1.671 artigos são de pesquisas em humanos nos últimos 5 anos (data em 21/12/2017 às 07:18h) e no *ClinicalTrials.gov* existem 328 estudos registrados (data em 11/01/2018) para as mais diversas aplicações.

Apesar de ser uma terapia muito estudada, é uma terapia com diversos protocolos de processamentos, sendo relatada como controversa, devido à diversidade de resultados, nem sempre significativos, o que implica na necessidade de uma padronização no seu processo de preparo.

2.1 O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

2.1.1 A DERME

A derme da pele é composta por um tecido conjuntivo denso não modelado com muitas fibras colágenas estão aleatoriamente orientadas. Os feixes de colágeno são espessos, ondulados e dispostos de forma irregular. Os fibroblastos são separados pelos feixes de colágeno, e seu núcleo oval bem identificados (Figura 1).

Figura 1 - Imagem da derme mostrando tecido conjuntivo denso não modelado. Feixes espessos da derme com fibras colágenas dispostas de forma irregular. Fibroblastos apresentam-se espaçados, separados pelos feixes de colágeno, e identificados pelo núcleo oval.

Fonte: Adaptado de Kierszenbaum; Tres, 2012.

Os fibroblastos são células fusiformes com núcleo elíptico e citoplasma muito delgado geralmente não visível ao microscópio de luz. Em microscopia eletrônica, consegue-se observar o retículo endoplasmático granular e Aparelho Golgi bem desenvolvidos. Glicoproteínas e proteoglicanos maduros são sintetizados pelos fibroblastos, além de moléculas precursoras dos vários tipos de colágeno e elastina. A proteína do colágeno é um componente das fibras colágenas e reticulares, mas as fibras elásticas não contêm colágeno (KIERSENBAUM; TRES, 2012).

Quando a pele é danificada afetando ou rompendo a proteção protetora, mecanismos de reparação sequencial são iniciados para ocorrer a cicatrização. Esse reparo ocorre em quatro estágios: formação de um coágulo de fibrina e plaqueta; recrutamento de leucócitos; proliferação celular e neovascularização; e remodelamento tecidual.

Ao ocorrer uma lesão, a porção aberta é temporariamente coberta com coágulo sanguíneo iniciando o processo de cicatrização. As plaquetas são rapidamente acionadas e aderidas à matriz subendotelial se ligando ao fibrinogênio.

2.1.2 AS FASES DO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

O processo de cicatrização envolve a ruptura na camada epitelial da pele, podendo ter uma profundidade maior atingindo o tecido subcutâneo levando a maiores danos (PICCIN et al.; 2016). Inicialmente, ocorre a fase de hemostasia, prosseguindo-se as fases de inflamação, proliferação e remodelação/reepitelização (FRYKBERG; BANKS, 2015). A hemostasia caracteriza-se pela vasoconstrição pelas células do músculo liso vascular e coagulação do sangue no local da lesão, iniciando a formação da fibrina hemostática, impedindo com isso, a perda de sangue e já favorecendo a migração celular para o reparo provisório (SUN; SIPRASHVILI; KHAVARI, 2014).

As plaquetas possuem um papel importante secretando fatores de crescimento e citocinas para atrair fibroblastos, células endoteliais, células do sistema imunológico para dar o início ao reparo tecidual.

Dentro dos grânulos alfa estão vários fatores de crescimento que são liberados ao serem sinalizados e degradados, processo denominado de ativação das plaquetas (Figura 2). Esta ativação pode ser espontânea ou induzida. Leucócitos chegam ao local da lesão, queratinócitos e células endoteliais expressam a citocina CXC (para Citocina Cisteína-X-Cisteína) e o receptor CXC, recrutando neutrófilos, monócitos e linfócitos. (KIERSZENBAUM, ABRAHAM L.; TRES, 2012)

Figura 2- Desenho esquemático de plaquetas em estado ativado e não ativado. Quando ativadas as plaquetas mudam sua morfologia e desenvolvempseudópodos para permitir a agregação plaquetária e apresentam o sistema canicular aberto para liberação do conteúdo dos grânulos.

Fonte: Adaptado de Everts et al., 2006.(EVERTS et al., 2006)

O estágio inflamatório inicia em poucas horas após a lesão e se estende por cerca de sete dias. Os neutrófilos são os primeiros a chegar matando as bactérias e degradando as proteínas danificadas da matriz (DE SOUZA et al., 2014; FRYKBERG; BANKS, 2015). Espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases liberados pelos neutrófilos impedem a contaminação bacteriana (PARK; HWANG; YOON, 2017). Pelo processo de diapedese, os monócitos chegam do sangue e diferenciam-se em macrófagos nos tecidos, removendo as bactérias e liberando citocinas pró-inflamatórias e vários fatores de crescimento fazendo o recrutamento de células endoteliais, fibroblastos na derme e os queratinócitos na epiderme, e outras células para reparar os vasos sanguíneos danificados (DE SOUZA et al., 2014; FRYKBERG; BANKS, 2015). Neutrófilos e macrófagos vão produzir dois fatores essenciais: TGF- β 1 (fator de crescimento transformador 1) e G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos). Outros fatores, como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β 1 tem

papéis cruciais no recrutamento de fibroblastos na fase proliferativa, na qual também é crítico o papel do fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, o qual é essencial para a formação de vasos sanguíneos (angiogênese). (A. ABDULLAHI, S. AMINI-NIK, 2009; TAMBELLA et al., 2018).

Os macrófagos removem detritos teciduais, destroem os neutrófilos remanescentes preparando o caminho para a angiogênese e a granulação tecidual (PARK; HWANG; YOON, 2017). após três a quatro dias da lesão, o tecido conjuntivo da derme subjacente se contrai aproximando as bordas da lesão. Os fatores de crescimento locais PDGF e TGF- β estimulam os fibroblastos da derme a se proliferarem, infiltrando-se no coágulo sanguíneo e depositando colágeno tipo III e outros componentes de matriz extracelular. Uma semana após a lesão, alguns fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos, que se assemelham às células musculares lisas, e ocorre a contração e ao fechamento da lesão com a formação da cicatriz (KIERSENBAUM; TRES, 2012).

Quando a fase inflamatória diminui, a fase de proliferação se inicia, levando à formação do tecido de granulação e formação de novos vasos sanguíneos e epitelização (DE SOUZA et al., 2014; FRYKBERG; BANKS, 2015). Com a formação do tecido de granulação, observa-se a aparência rosada que é determinada pela formação de numerosos vasos sanguíneos (KIERSENBAUM; TRES, 2012; EVANS et al., 2013; ABDUL LATIF et al., 2015).

Durante a terceira fase do processo, o remodelamento e a proliferação epidermal são mediados por GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e TGF- β 3 (fator de crescimento transformador 3). GM-CSF aumenta a neovascularização e a granulação do tecido em formação, enquanto TGF- β 1 tem um envolvimento direto na cicatrização cutânea, sendo que o fator TGF- β 3 antagoniza este efeito, evitando a cicatrização excessiva, que leva à formação de quelóides (A. ABDULLAHI, S. AMINI-NIK, 2009; KIERSENBAUM, ABRAHAM L.; TRES, 2012).

Nesta última fase do processo de reparo ocorre o fechamento da ferida ocorrendo a remodelação do colágeno, o que pode durar de três semanas a dois anos (DE SOUZA et al., 2014; FRYKBERG; BANKS, 2015; PARK; HWANG; YOON, 2017). Na fase final do reparo da lesão ocorre o estágio de remodelação, onde o colágeno é submetido a reticulação para melhorar sua força e estabilidade. À medida que a remodelação evolui, a matriz extracelular é

reorganizada e os vasos sanguíneos recém-formados continuam a amadurecer e formam redes vasculares funcionais (A. ABDULLAHI, S. AMINI-NIK, 2009). Nessa última etapa do processo, os fatores de crescimento com domínio de ligação à heparina como VEGF e PDGF e os fatores EGF, o fator de crescimento do queratinócito (KGF) e os fatores de crescimento transformante β (TGF- β) e controlam a reepitelialização. Queratinócitos do estrato basal migram para a borda da lesão iniciando a reepitelização. Uma monocamada de tecido epitelial estratificado pavimentoso é formado a partir da margem da lesão para o centro. Hemidesmossomos novos são formados a partir da inativação das metaloproteinases de matriz. Essas proteínas são responsáveis por eliminar fibras não necessárias aumentando a integridade estrutural da formação dérmica, mas também podem ser reguladas pelos TIMPs (Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz) (PARK; HWANG; YOON, 2017).

A pele íntegra é composta predominantemente de colágeno tipo I e III, e o tecido de granulação possui grande quantidade de colágeno tipo III. As fibras de colágeno recém formadas na cicatrização são desorganizadas e vão se organizando aleatoriamente. À medida que a cicatrização evolui, o colágeno tipo III é substituído gradualmente por colágeno tipo I, sendo as fibras de colágeno rearranjadas de uma forma mais organizada, fazendo com que o tecido apresente maior resistência mecânica (PARK; HWANG; YOON, 2017).

Se essas fases não ocorrerem de uma forma organizada e correta, formam-se as feridas crônicas. Essas feridas normalmente param na fase de inflamação, na qual apresentam níveis excessivos de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (ROS), proteases e senescência celular, podendo ocorrer infecção e deficiência de células-tronco funcionais. As proteases podem levar à destruição das matrizes extracelulares e à degradação dos fatores de crescimento atraindo células inflamatórias e causando o aumento do ciclo de inflamação (FRYKBERG; BANKS, 2015; PARK; HWANG; YOON, 2017). Observa-se nas cicatrizações e em tecidos deficitários um comprometimento dos níveis ideais de fatores de crescimento nas fases final de reparo tecidual, e, portanto, equilibrar e manter os níveis adequados dos fatores de crescimento nas diferentes fases do reparo tecidual é de suma importância (PIETRAMAGGIORI et al., 2006; GONCHAR et al., 2017; PARK; HWANG; YOON, 2017).

2.1.3 ANGIOGÊNESE

A angiogênese é um processo importantíssimo para a regeneração tecidual (A. ABDULLAHI, S. AMINI-NIK, 2009). Durante a angiogênese é iniciado a partir de um vaso pré-existente, como um broto capilar; e pode ser observado no embrião e no adulto. No adulto, a angiogênese ocorre durante o período menstrual uterino, atuação plaquetária, cicatrização de feridas e processos inflamatórios. A angiogênese também pode ocorrer de forma (KIERSZENBAUM; TRES, 2012) tumoral, mas é uma forma específica. No desenvolvimento embrionário a vasculogênese ocorre por progenitores endoteliais vasculares, que são denominados angioblastos. Estes, se proliferam e recrutam células periendothelias, reunindo-se em tubos que contém o sangue para a formação dos vasos(KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é liberado por macrófagos ou queratinócitos de forma contínua, e FGF básico (bFGF) também são liberados por macrófagos ou células endoteliais danificadas que possuem a capacidade de induzir a ativação e proliferação de fibroblastos (PARK; HWANG; YOON, 2017).

Na angiogênese, células endoteliais migram, proliferam-se estimuladas por VEGF e pela angiopoetina. Células musculares lisas, pericitos e fibroblastos são células periendothelias que são recrutadas para circundar os tubos endoteliais recém-formados (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

A proliferação de fibroblastos ocorre juntamente com a angiogênese levando nutrientes ao tecido (PARK; HWANG; YOON, 2017).

Moléculas são fundamentais para a morfogênese vascular como os VEGFs produzido pelas células mesenquimais, estão presentes nas células endoteliais se ligam estimuladas pela angiopoetina, formam um tubo endotelial recrutando células periendothelias (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

O receptor Notch atua na sinalização protegendo as células endoteliais da apoptose, facilitando na sobrevivência das células endoteliais pela ativação da expressão de VEGF-R. Papéis importantes também são desempenhados pelos ligantes Delta-simile (DII1, DII3 e DII4) e *Jagged* (*Jagged 1* e *Jagged 2*) na angiogênese normal e tumoral ao regular as ações de VEGF. A ativação da

sinalização ocorre quando o domínio extracelular do receptor Notch interagem com um ligante encontrado na superfície de uma célula próxima. Ocorre então, um mecanismo singular envolvendo a divisão do domínio intracelular de Notch que se desloca para o núcleo e regula a expressão do gene (KIERSENBAUM; TRES, 2012). Um trabalho realizado em 2007 estudou como a sinalização de Notch desempenha papéis importantes na cicatrização de feridas e na reparação de tecidos. Notch mostrou que afeta os comportamentos de queratinócitos, fibroblastos e plaquetas (CHIGURUPATI et al., 2007).

2.2 PLAQUETAS: ESTRUTURA E SUAS FUNÇÕES

As plaquetas são pequenos fragmentos de citoplasma que medem entre dois a quatro μm . São derivados de megacariócitos sendo controlados pela trombopoetina produzida nos rins e fígado. O processo de formação das plaquetas envolve projeções citoplasmáticas dos megacariócitos que ao se desenvolverem se transformam em pró plaquetas, as quais se fragmentam em plaquetas. Esse processo de diferenciação leva aproximadamente de dez a doze dias. As plaquetas ligam-se à trombopoetina e a degradam, sendo responsável pelo mecanismo que regula a produção de plaquetas (KIERSENBAUM; TRES, 2012).

As plaquetas possuem na região central o granulômetro, mitocôndrias, retículo endoplasmático granuloso, aparelho de Golgi e grânulos. Existem quatro tipos de grânulos no citoplasma: grânulos alfa, grânulos com núcleo denso, lisossomos e peroxissomos. A membrana plasmática invagina-se para se conectar a uma rede de canais conhecida como sistema canicular aberto. A periferia da plaqueta, contém microtúbulos e microfilamentos que regulam a forma e o movimento da plaqueta, o hialômero (KIERSENBAUM; TRES, 2012).

As plaquetas possuem um papel importante na regeneração tecidual com mais de 1500 proteínas reguladoras e fatores de crescimento, embora não sejam completamente conhecidos os papéis dessas proteínas e fatores de crescimento, mas já se sabe que possuem efeitos significativos sobre a iniciação e aceleração do processo de cicatrização de lesão tecidual (HOSNUTER et al., 2017), como o

PDGF-BB, o fator de crescimento epidermal (EGF), TGF- β e VEGF (PIETRAMAGGIORI et al., 2006). Os fatores de crescimento têm a capacidade de promover a cura atraindo células não diferenciadas desencadeando a divisão celular (LACCI; DARDIK, 2010).

O tecido conjuntivo representa uma combinação de colágenos, glicoproteínas não colagenosas e proteoglicanos que são as ditas substância fundamental amorfa que circundam as células do tecido conjuntivo, tendo papéis importantes no armazenamento de metabólitos, respostas imunológicas e inflamatórias, também no reparo tecidual (A. ABDULLAHI, S. AMINI-NIK, 2009).

2.3 O PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Na década de 1970 foi desenvolvido o PRP autólogo e, desde então, tem sido aplicado para reverter processos de injúrias teciduais, observando que fatores presentes nas plaquetas podem promover a migração dos queratinócitos dentro da ferida proporcionando efeitos mitogênicos e morfométrico (ANITUA et al.; 2013). O PRP autólogo foi desenvolvido a partir do procedimento de aférese dos componentes sanguíneos, sendo descrito como um poderoso agente adesivo e hemostático. Na década de 1990, foi confirmado como potente fonte autóloga de fatores de crescimento (CASTILLO et al., 2011) e passou a ser aplicado em cirurgias plásticas e buco-maxilofaciais, e difundido em diferentes áreas da medicina ortopedia, medicina do esporte, odontologia, neurocirurgia, oftalmologia, urologia e cicatrização de feridas (SAMPSON; GERHARDT; MANDELBAUM, 2008; HALL et al., 2009; LENZA et al., 2013)

2.3.1 EFICÁCIA E SEGURANÇA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Pelas grandes propriedades inerentes aos fatores de crescimento, a aplicação do PRP é conhecido por promover a angiogênese, estimulando a proliferação de células endoteliais próximas ao local de aplicação, favorecendo a formação de novos capilares. Além disso, possui a capacidade de estimular a migração das células-tronco indiferenciadas para o local da aplicação,

proporcionando maior proliferação dessas células, e levando a segregação dos fatores de crescimento vascular. Com isso, aumenta a proliferação induzida acelerando assim, a regeneração tecidual (SPARTALIS et al., 2017).

Um questionamento relatado refere-se ao meio de cultura ágar de sangue utilizado em laboratórios de microbiologia para cultivar bactérias, com base no efeito de proliferação, desconfia-se que o PRP poderia promover infecções. No entanto, como no coágulo sanguíneo em feridas não ocorre crescimento bacteriano pela ação das células de defesa, no PRP não é diferente (CHOI; MINN; CHANG, 2012). Neutrófilos e macrófagos impedem a contaminação bacteriana (FRYKBERG e BANCOS, 2015).

Um estudo recente publicado em outubro de 2017 avaliou a segurança do PRP na regeneração tecidual em termos de tumorigenicidade analisando a expressão de marcadores de inflamatórios, marcadores de miofibroblastos sendo administrados tanto a longo prazo (duas vezes por semana por quatro semanas) como a curto prazo (uma na quarta semana). Os resultados indicaram que o PRP pode ser usado com segurança tanto com administração a longo prazo quanto a curto prazo, sem preocupação com tumorigênese (OMAR et al., 2017).

O PRP é obtido a partir de uma amostra de sangue venoso autólogo anticoagulada passando por um processo de centrifugação que pode envolver uma ou mais centrifugações para selecionar uma fração plasmática contendo uma maior concentração de plaquetas e menor seleção de eritrócitos (WEHLING et al, 2017). Há diferentes formas para a obtenção do PRP, e o concentrado de plaquetas pode ser classificado em PRP puro (P-PRP), eliminando os leucócitos no isolamento ou em PRP com alta concentração de leucócitos (L-PRP), o qual possui alta concentração de leucócitos (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

O PRP pode ser preparado para armazenamento sob diversas formas como congelamento, criopreservação ou liofilização, podendo ter ou não adição de solução de estabilização (GERSCH et al., 2017; HOSNUTER et al., 2017; PIETRAMAGGIORI et al., 2006; ROFFI et al.; 2014; LEE; KIM; CHO, 2008; SERRANO et al.; 2009; MOORE et al.; 2016).

Um ponto extremamente crítico no preparo do PRP é a quantidade de plaquetas que devem ser observadas antes da terapia ser iniciada, pois relata-se que existe uma relação dose-dependente, pois concentrações maiores ou inferiores a 1,5 milhão de plaquetas/ μ L podem inibir o potencial de angiogênese em células endoteliais em humanos. O ideal seria considerar concentrações entre cinco a dez vezes os níveis médios (GARG; MANCHANDA, 2017).

Em 2008, um estudo realizado na Coreia analisou se o óxido nítrico (NO) poderia inibir a ativação de plaquetas armazenadas em estado frio ou congelado. Utilizou-se quatro grupos para estudo: sem crioprotetores, s-nitrosoglutathione (GSNO), dimetilsulfóxido (DMSO) e GSNO/DMSO. A GSNO inibiu significativamente a ativação de plaquetas congeladas, mas não na presença de DMSO. GSNO pode ser usado como protetor para a criopreservação plaquetária, pois inibiu a ativação de plaquetas congeladas, mas preservou a agregabilidade plaquetária com a alteração da expressão de P-selectina e a ligação de fibrinogênio de plaquetas congeladas (LEE; KIM; CHO, 2008).

Em 2009, um trabalho feito no Canadá, utilizando métodos de preparo e congelamento de PRP 24 horas após a coleta, mostrou que atende aos padrões de qualidade e foram implementado em uso geral no Canadá (SERRANO et al., 2010).

Dentre as diversas utilização do plasma sanguíneo, em 2013, Anitua e colaboradores utilizaram plasma armazenado por três meses a -20°C e a 4°C ou a temperatura ambiente por 24 horas, como colírios oculares. Relatando que a utilização do plasma armazenado a 4°C ou temperatura ambiente, não houve alteração na composição e na atividade biológica *in vitro* das gotas oculares. Não houve qualquer redução dos níveis de vitamina A envolvidas na cicatrização da superfície oculares, e também não houve qualquer redução principais proteínas como os fatores PDGF-AB (Fator de crescimento derivado de plaquetas AB), VEGF, EGF. Enquanto que os valores de fibronectina, TGF- β 1 (Fator de crescimento transformante β 1) e a osmolaridade foram ligeiramente alterados após o congelamento. Com as gotas oculares observou-se que independentemente do tempo e da condição de armazenamento, a proliferação e a migração celular foram melhoradas (ANITUA et al., 2013).

Em 2014, na Itália, investigou-se o efeito do congelamento/descongelamento na liberação de moléculas utilizando PRP e

como seriam seus efeitos no metabolismo sobre condrócitos e sinoviócitos. O PRP foi congelado e descongelado e suplementado com meios de cultura de condrócitos e sinoviócitos com PRP fresco e/ou congelado e, avaliados sete dias após. Foi avaliado a proliferação, expressão gênica e os níveis de proteínas secretadas. Como resultados, observou-se que a liberação de moléculas foi semelhante ou ligeiramente inferior às do PRP fresco. Alguns fatores de crescimento apresentaram-se reduzidos e outros, significativamente aumentados, mas concluiu-se que a criopreservação do PRP é um procedimento que preserva suficientemente a qualidade do PRP, de uma forma segura, sendo capaz de induzir a proliferação e a produção de componentes da matriz extracelular em condrócitos e sinoviócitos (ROFFI et al.; 2014).

Em 2017, um estudo no Japão avaliou a eficácia do PRP liofilizado, em comparação ao PRP fresco para engenharia óssea. O PRP foi liofilizado e, subsequentemente, foi conservado a -20 °C durante um mês, sendo reidratado para aplicação e avaliado pela capacidade de formação de osso cranial a partir de enxerto em camundongo usando grânulos de Fosfato Tricálcido do tipo β (β -TCP) como um suporte. Os resultados sugerem que o PRP fresco pode ser armazenado sem perda funcional por congelação e a concentração de fatores de crescimento aumentou aproximadamente três vezes as concentrações quando comparado com o PRP fresco e induziram formação óssea mais abundante (NAKATANI et al., 2017).

Outro estudo publicado em 2017, na Turquia, avaliou as características de liberação de alguns fatores de crescimento e p-selectina do PRP quando após a preparação foram armazenado a 20 °C e descongelados após 7 e 14 dias (HOSNUTER et al., 2017). A P-selectina é proteína contida na face interna dos grânulos α e funciona como uma molécula de adesão celular nas superfícies das plaquetas. Quando ocorre a ativação, a membrana dos grânulos α se funde com a membrana plaquetária e a P-selectina é rapidamente translocada para a superfície da membrana se tornando expressa, podendo ser identificada. Portanto, a partir da P-selectina é possível quantificar a ativação plaquetária e indiretamente a presença de plaquetas vivas (CHOI; MINN; CHANG, 2012; HOSNUTER et al., 2017). As análises neste estudo de Hosnuter e colaboradores basearam-se além de comparar com a quantificação inicial do dia do preparo do PRP, identificaram a presença de fatores de crescimento. Observaram que a p-

selectina apresentaram-se significativamente inferiores, mas as contagens de trombócitos não foram detectadas, uma vez que seu volume era muito limitado. Neste estudo relata-se que alguns autores acreditam que o aspecto mais importante a se avaliar é o nível de fatores de crescimento, ao invés do número de trombócitos, pois para desencadear as cicatrizações não é necessário hemostasia, e sim a presença dos fatores de crescimento (HOSNUTER et al., 2017). Durante algum tempo, o PRP autólogo foi visto como que quanto mais elevados os níveis de plaquetas, maior seria a eficácia. No entanto, mais tarde estudos mostraram que níveis muito elevados de plaquetas podem não ter efeitos positivos e podem até mesmo introduzir alguns efeitos negativos através da regulação negativa dos receptores (WEIBRICH et al., 2004; CHOI et al., 2005). Autores enfatizaram que o conteúdo de plaquetas varia de paciente para paciente (JOEL, 2004).

Na Filadélfia em 2017, investigou-se o efeito do PRP autólogo fresco não ativado, PRP congelado instantaneamente e o PRP criopreservado sobre o crescimento e a diferenciação de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC). As respostas dos grupos de células que receberam PRP frescos e criopreservados demonstraram redução da adesão celular em comparação aos grupos controle, enquanto os grupos PRP congelados instantaneamente mostraram adesão celular equivalente ou melhor que os controles. Após sete dias de crescimento, o PRP não ativado fresco e o PRP congelado instantaneamente foram significativamente maiores. Os protocolos otimizados de PRP congelado instantâneo mostraram potencial para osteogênese espontânea (GERSCH et al., 2017).

As plaquetas possuem um tempo de vida no organismo, sendo relatadas entre cinco a oito dias para uso clínico (MOORE et al., 2017) ou sete a dez dias (GARG; MANCHANDA, 2017). Um estudo realizado em 2005, verificou a efetividade das plaquetas em 21 dias de armazenamento, e observou que mesmo no vigésimo primeiro dia, as plaquetas conservavam a sua atividade proliferativa, ativando significativamente a proliferação de fibroblastos (CHAN; LIU; LEW, 2005.). Nesse estudo, as plaquetas perderam sua capacidade hemostática, porém permaneceram como reservatório para os fatores de crescimento, justificando a importância no seu armazenamento para atuação na cicatrização de feridas crônicas e recalcitrantes (CHAN; LIU; LEW, 2005.).

Durante o processo de cicatrização tecidual, há o envolvimento de diferentes níveis de fatores de crescimento, e a aplicação de PRP periodicamente poderia reequilibrar e repor o *deficit* de alguns dos fatores envolvidos nas diferentes fases (GUEVARA-ALVAREZ et al., 2014; PARK; HWANG; YOON, 2017). Por esse motivo, o armazenamento de uma forma segura auxiliaria o paciente para uma cicatrização mais rápida e eficiente (PIETRAMAGGIORI et al., 2006).

Processos de armazenamento são estudados para conservação da efetividade das plaquetas a longo prazo, facilitando e possibilitando a utilização em prazos futuros, como já foi observado a na manutenção do equilíbrio de fatores de crescimento em todas as fases da cicatrização (GUEVARA-ALVAREZ et al., 2014). Diversos estudos mostram armazenamentos das plaquetas por processos de congelamento, criopreservação ou liofilização (PIETRAMAGGIORI et al., 2006; LEE; KIM; CHO, 2008; SERRANO et al., 2010; ROFFI et al., 2014; GERSCH et al., 2017; HOSNUTER et al., 2017; MOORE et al., 2017).

Características individuais, doenças sistêmicas ou debilitações, como diabetes, por exemplo, podem trazer prejuízos em cicatrizações de feridas. Estas pessoas podem ser beneficiadas com o uso do PRP pelo aumento dos fatores de crescimento no local onde ele foi aplicado, contornando esse problema. (PIETRAMAGGIORI et al., 2006).

Nos centros de saúde, as plaquetas são armazenadas em recipiente permeável ao oxigênio, com agitação intermitentemente, permanecendo em temperatura ambiente por até cinco dias (HOSNUTER et al., 2017) e a adição de solução tampão acrescidos de alguns aditivos mostram vantagens específicas (RINGWALD; ZIMMERMANN; ECKSTEIN, 2006).

Alguns estudos realizados perante o tempo de vida dentro do organismo para uso clínico e existe relato sobre cinco a oito dias (MOORE et al., 2017). Em plaquetas armazenadas a 0 a 6 °C, a efetividade é relatada para dez dias (NEPSTAD et al., 2014), estando ativas no corpo por dois a três dias apenas (MURPHY, S.; GARDNER, 1969).

Contudo, na literatura estudos relatam que a aplicação deve ser feita rapidamente podendo permanecer estável até oito horas (MARX, 2001). Alguns autores relatam que fatores como a P-selectina, VEGF e PDGF mantêm suas

características até seis horas, mas o ideal seria o uso no prazo de 3 horas após a preparação do PRP (BAUSSET et al., 2012; HOSNUTER et al., 2017).

Observa-se resultados diversos nas análises das plaquetas, mas todos evidenciaram uma efetividade nos resultados mostrando que mesmo perdendo a quantidade, elas não perderam a efetividade, tanto com PRP armazenado por congelamento.

2.4 MODELO ANIMAL EM ESTUDO PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL

A pele é o maior órgão do corpo com funções de barreira separando órgãos internos do corpo para o ambiente externo, protegendo contra microrganismos patogênicos, materiais tóxicos, além das funções de regulação da temperatura, regulação hormonal entre outras a adaptar-se a condições externas e reparar rapidamente em caso de lesão (EVANS et al., 2013).

Nos mamíferos, a pele é composta pela epiderme e pela derme, sendo separados pela membrana basal. A epiderme é composta principalmente por queratinócitos que se dividem continuamente na camada basal sobrepondo as camadas superiores da epiderme, tornando-se anucleados e se desprendendo na camada córnea (MIOT et al., 2009; COSTA, 2012). A derme é composta em grande parte por colágeno tipo I e elastina, que são formados a partir dos fibroblastos que regulam a organização da matriz dérmica fibrilar (EVANS et al., 2013).

Neste trabalho foi utilizado um modelo de lesão em pele do dorso de ratos fêmeas da linhagem nude Rowett, pois independente da espécie, todas as lesões e aberturas na superfície da pele devem ser regeneradas rapidamente, não só para evitar infecções, mas também para evitar a perda de fluidos (EVANS et al., 2013).

Existem vantagens e limitações para estudos em modelos de alguns animais, ao mesmo tempo existe uma grande dificuldade de identificar o modelo de animal ideal para estudo, considerando custo, espaço físico, manutenção, viabilidade para melhores resultados. Em 2014, foi realizado um estudo para

identificar o modelo animal mais adequado para cicatrizações, e ressaltou que o rato apesar de ter epiderme e derme como a pele humana, apresenta diferenças significativas histológicas e fisiológicas. O rato possui epiderme e derme mais finas, e a interfase da epiderme e derme plana enquanto do humano é altamente ondulada. Também evidencia a diferença em relação a pelagem do corpo do animal. O pelo denso sofre um ciclo de crescimento significativamente diferente, o ciclo do cabelo do rato geralmente é de três semanas, onde os ciclos de cabelo humano podem durar vários anos. Com base nesses dados do modelo animal, foi utilizado o PRP fresco e armazenado para avaliar o resultado e eficiência do armazenamento. O PRP já vem sendo utilizado a diversas décadas em diferentes situações sendo utilizado na forma líquida ou em forma de gel. Normalmente, são realizadas mais de uma aplicação para que ocorra o equilíbrio no nível dos fatores de crescimento para que a regeneração ocorra de forma normalizada, mas neste estudo, utilizamos apenas uma aplicação (A. ABDULLAHI, S. AMINI-NIK, 2009).

Em 2006, um trabalho realizado para cicatrizações em ratos diabéticos utilizou plaquetas frescas congeladas e um processo de congelamento e secagem. Foram aplicados três amostras que foram divididas da seguinte forma: 1) PRP fresco adicionando solução tampão específica e armazenados a -80 °C; 2) PRP passando pelo processo de congelamento e secagem adicionando a mesma solução tampão; 3) Utilizou-se o PRP pelo mesmo processo de congelamento e secagem adicionando além da mesma solução tampão, acrescentou-se uma solução bioquímica para estabilização. Os resultados mostraram que em todas as preparações houve a formação do tecido de granulação comparados com feridas não tratadas. Nas feridas nas quais foram aplicados o processo de congelamento e secagem, os níveis proliferativos apresentaram-se mais elevados evidenciando que esse processo pode ser benéfico preservando a integridade da membrana plaquetária por longo prazo (PIETRAMAGGIORI et al., 2006).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a eficácia do Plasma Rico em Plaquetas recém-preparado (fresco) e liofilizado e estocado a temperatura ambiente por 18 dias no modelo de regeneração tecidual dorsal em pele em ratos nudes de dois diferentes doadores, visando o oferecimento de um produto estável, seguro e eficiente na regeneração tecidual.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar em modelo de regeneração de pele em dorso de ratos nudes o Plasma Rico em Plaquetas recém-preparado (fresco) e liofilizado e estocado por 15 dias a temperatura ambiente;
- Analisar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas recém-preparado (fresco) e liofilizado, e estocado por 18 dias a temperatura ambiente, no modelo de regeneração tecidual de pele em dorso de ratos nudes;
- Comparar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas recém-preparado (fresco) e liofilizado e estocado com o rhPDGF-BB;
- Analisar a concentração do rhPDGF-BB presente no Plasma Rico em Plaquetas recém-preparado (fresco) e liofilizado e estocado por ELISA;
- Verificar o tecido novo formado após a aplicação do PRP fresco e liofilizado e do controle positivo rhPDGF-BB por análises histológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para os ensaios de regeneração tecidual em pele no dorso de ratos, foi estabelecido o modelo de ratos nudes (Rowett NIH, NTacFCfiq: NIJ-Whn) para a aplicação do Plasma Rico em Plaquetas de origem humana e o controle positivo PDGF-BB recombinante humano, a fim de evitar qualquer rejeição.

O experimento foi dividido em dois grupos de ratos Rowett para avaliar a evolução da cicatrização de feridas aplicando o PRP Fresco, PRP Armazenado comparando com a evolução da regeneração da pele com a ferida controle negativo que foi utilizado apenas solução fisiológica (0,9% Cloreto de Sódio), e o controle positivo com rhPDGF-BB. Para minimizar o número de animais no experimento, os animais foram divididos em dois grupos com três animais cada (Figura 3) e quatro feridas, para receber o material biológico de um dos doadores.

O grupo 1 recebeu o material do doador A e o grupo 2, do doador B.

A primeira incisão localizada no lado esquerdo superior do animal, foi determinada para ser o controle negativo de cada animal, devido à possível variação individual no processo de cicatrização e foram aplicados 10 µL de solução fisiológica. À segunda incisão, determinada como controle positivo do experimento, localizada no lado direito superior do animal, foram adicionados 5ug de rhPDGF-BB em um volume de 10 µL, pois experimentos prévios do nosso laboratório (dados não publicados) mostraram que a ferida cicatriza rapidamente nesta condição. À terceira incisão, localizada no lado esquerdo inferior, foram adicionados 10 µL de PRP-Fresco. À incisão 4, localizada no lado direito inferior, recebeu 10 µL de PRP-Armazenado (Figura 3).

O PDGF-BB humano foi preparado previamente em nosso laboratório de forma recombinante usando células de mamíferos para expressão heteróloga, purificado por cromatografia de afinidade à heparina no cromatógrafo Akta Purifier (GE Healthcare) e sua atividade biológica foi testada *in vitro* em ensaios de proliferação de incorporação de ³H-tritiada ao DNA em fibroblastos 3T3 clone A31 por (Carreira et al., manuscrito em preparação).

Os ratos foram avaliados quanto a alteração no tamanho da ferida, sendo fotografados a cada dois dias e após uma semana foi realizada a eutanásia e coleta da pele para análises histológicas. Para realização do PRP Fresco e Armazenado foram utilizados o sangue de dois doadores diferentes baseado em um estudo de Park et al., 2017, o qual utilizou sangue de humanos para ser aplicados em ratos nude (PIETRAMAGGIORI et al., 2006; PARK et al., 2017).

Após sete dias de tratamento, e avaliação diária dos animais e fotodocumentação a cada dois dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, com deslocamento cervical para comprovar a eutanásia (conforme recomendado pelo CEUA). Os tecidos foram retirados e submetidos à análise da área cicatrizada, o qual foram avaliados de acordo com o tecido de granulação, através de análises histológicas com Tricômio de Masson e Hematoxilina e Eosina. Análise fotográfica foi acompanhada a cada 2 dias para evolução da cicatrização.

Figura 3: Desenho esquemático dos grupos experimentais. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais nomeados grupo 1 e grupo 2, que receberam PRP do doador A ou doador B, respectivamente. No dorso dos animais de cada grupo foram realizadas quatro incisões de 6mm cada que receberam aplicação de solução fisiológica (controle negativo), rhPDGF-BB, PRP-Fresco ou PRP-Armazenado.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

4.1 CRITÉRIO DE SELEÇÃO DOS DOADORES DE SANGUE PARA PREPARAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

As plaquetas dos doadores deveriam estar entre 150.000 a 400.000 unidades. O doador A, do sexo feminino, apresentou o valor de plaquetas em $216.000/\text{mm}^3$ e o doador B, do sexo masculino, em $189.000/\text{mm}^3$ (Figura 4).

Figura 4 - Hemograma dos dois doadores de sangue para preparação do PRP. À esquerda dados do doador A e à direita do doador B.

Idade.....: 51 Anos	Sexo: F	Unidade....: LAB
Convênio...: PARTICULAR		Cadastro...: 25/09/2017
Médico(a)...: *		Empresa....:

HEMOGRAMA COMPLETO			
E R I T R O G R A M A		Homens	Mulheres
HEMACIAS.....:	4,53	milh/mm3	[4.5 - 6.0] [4.2 - 5.4]
HEMOGLOBINA.....:	13,9	g%	[13.0 - 16.0] [11.0 - 16.0]
PERCENTAGEM NORMAL.....:	86,88	%	
HEMATOCRITO.....:	42,2	%	[40 - 54] [36 - 47]
Hb. CORP. MEDIO... (HCM):	31	pg	[27.0 - 31.0]
VOLUME. CORP. MEDIO... (VCM):	93	u3	[80.0 - 98.0]
CONC. Hb. CORP. MED... (CHCM):	33	%	[32.0 - 36.0]
Observações.....:			
L E U C O G R A M A		[Percentual]	[Total/mm3]
LEUCOCITOS.....:	6.300	/mm3	[4000 - 11000]
METAMIELOCITOS.....:	0,0	0	[0 - 0.0]
BASTONETES.....:	1,0	63	[1.0 - 6.0] [40 - 600]
SEGMENTADOS.....:	49,0	3.087	[50.0 - 68.0] [2000 - 6800]
EOSINÓFILOS.....:	3,0	189	[1.0 - 4.0] [40 - 400]
BASÓFILOS.....:	0,0	0	[0.0 - 1.0] [0 - 100]
LINFÓCITOS.....:	36,0	2.268	[18.0 - 45.0] [720 - 4500]
MONÓCITOS.....:	11,0	693	[2.0 - 10.0] [80 - 700]
Observações.....:			
PLAQUETAS.....:	216.000	/mm3	[150.000 - 400.000]

www.laboratoriosavicente.com.br			
Paciente....:			Protocolo...: 0061415
Idade.....: 30 Anos	Sexo: M	Unidade....: LAB	
Convênio...: PARTICULAR		Cadastro...: 25/09/2017	
Médico(a)...: *		Empresa....:	

HEMOGRAMA COMPLETO			
E R I T R O G R A M A		Homens	Mulheres
HEMACIAS.....:	5,54	milh/mm3	[4.5 - 6.0] [4.2 - 5.4]
HEMOGLOBINA.....:	17,1	g%	[13.0 - 16.0] [11.0 - 16.0]
PERCENTAGEM NORMAL.....:	106,88	%	
HEMATOCRITO.....:	51,6	%	[40 - 54] [36 - 47]
Hb. CORP. MEDIO... (HCM):	31	pg	[27.0 - 31.0]
VOLUME. CORP. MEDIO... (VCM):	93	u3	[80.0 - 98.0]
CONC. Hb. CORP. MED... (CHCM):	33	%	[32.0 - 36.0]
Observações.....:			
L E U C O G R A M A		[Percentual]	[Total/mm3]
LEUCOCITOS.....:	5.200	/mm3	[4000 - 11000]
METAMIELOCITOS.....:	0,0	0	[0 - 0.0]
BASTONETES.....:	1,0	52	[1.0 - 6.0] [40 - 600]
SEGMENTADOS.....:	56,0	2.912	[50.0 - 68.0] [2000 - 6800]
EOSINÓFILOS.....:	5,0	260	[1.0 - 4.0] [40 - 400]
BASÓFILOS.....:	0,0	0	[0.0 - 1.0] [0 - 100]
LINFÓCITOS.....:	30,0	1.560	[18.0 - 45.0] [720 - 4500]
MONÓCITOS.....:	8,0	416	[2.0 - 10.0] [80 - 700]
Observações.....:			
PLAQUETAS.....:	189.000	/mm3	[150.000 - 400.000]

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2017).

4.2 PREPARAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O sangue para produção do PRP foi coletado de dois doadores voluntários saudáveis, um do sexo feminino e outro do sexo masculino, com idade de 51 e 30 anos de idade, respectivamente, após a obtenção do consentimento informado utilizando tubos BD Vacutainer®. Foram coletados cinco tubos de 4,5 mL de sangue em tubos com citrato de sódio e um dos tubos foi encaminhado para a quantificação das plaquetas. Com os demais tubos foi realizado o processo de armazenamento do PRP para ser aplicado 18 dias depois na incisão cirúrgica.

Para realização do PRP os tubos foram centrifugados a 580g durante 8 minutos para a separação do plasma na camada superior, camada leucocitária intermediária e camada inferior da série vermelhas (Figura 5). Os sobrenadantes foram recolhidos por aspiração e transferidos para um tubo Vacuette® (Greiner Bio-One) de 9mL sem aditivos, sendo centrifugados a 1000g durante 10 minutos. Após finalizado a centrifugação, um terço do plasma localizado na camada inferior foi recolhido em frascos de vidro estéreis, para ser liofilizado (Liofilizador modelo L101 LIOTOP) da seguinte forma: congelamento rápido a -80 °C durante 12h e seguido de secagem 10 °C e condensação a -54 °C. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente durante 18 dias (adaptado de NAKATANI et al., 2017).

No momento da aplicação do PRP-Fresco à ferida, as plaquetas de um volume de 250 µL de PRP foram ativadas com a adição de 10% de gluconato de cálcio a 10% (Injectcenter) e deste volume foram aplicados 10µL na ferida.

Em paralelo, o PRP armazenado foi reconstituído em solução fisiológica na mesma proporção do PRP-Fresco (250 µL) e também adicionado de 10% de gluconato de cálcio para ativação das plaquetas. Foram aplicadas nas feridas o mesmo volume de 10µL dessa mistura.

Figura 5 – Frações do sangue durante a preparação do PRP. À esquerda estão identificadas as camadas sanguíneas obtidas após a primeira centrifugação a 580g. O plasma com a camada leucocitária são coletados e transferidos para outro tubo sem aditivos e centrifugados novamente (1000g) para coletar a obtenção do PRP.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos fêmeas da linhagens nude Rowett NIH (NTacFCfiq: NIJ-Whn), com cerca de 12 semanas e 150-180g, para avaliar o reparo tecidual utilizando PRP fresco e PRP liofilizado. Foram realizados dois experimentos independentes com 3 animais em cada grupo.

Os animais fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo foram recebidos e deixados em quarentena de uma semana, na qual foram acondicionados em gaiolas de ratos (três animais por gaiola) com enriquecimento ambiental, mantidos em gaiolas separadas, mantidos em condições constantes de temperatura (20 ± 1 °C) e luz (12 horas - ciclo claro/escuro) com acesso *ad libitum* à ração peletizada e água filtrada e autoclavada. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o no. 5290110216.

Esta linhagem é um modelo imunodeficiente, desenvolvida em 1979-1980 pelo *National Institute of Health* (NIH) através de vários acasalamentos em que foi adicionado o gene nude Rowett e retrocruzadas em oito espécies. Foi produzido pelo laboratório Charles River e adquirida pelo Biotério da FCFIQ/USP em 2001 através da Taconic, Germantown, USA [Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Charles River Laboratories]. O rato nude homozigoto atímico possui deficiência da célula T e diminuição de células dependentes do timo de órgãos linfóides periféricos. Apesar de *deficit* de células T, o rato nude possui um parâmetro normal de células B óssea dependente da medula. Por serem ratos nudes heterozigotos não apresentam deficiência da célula T. Podem ser de cor albina com olhos vermelhos, preta ou preta e branca. A pelagem pode exibir períodos intermitentes de crescimento ou queda de pelos, possuindo uma expectativa de vida útil de cerca de nove meses [Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Charles River Laboratories].

Para o procedimento experimental, cada animal recebeu uma injeção intramuscular de tramal (200 µL) e, por via subcutânea, Ringer (500 µL), ambos

como pré-operatório. Eles foram submetidos, também à anestesia inalatória por isoflurano. A pele do animal foi higienizada com iodopolvidine e álcool 70%. Em seguida, foram feitas quatro feridas de 6mm de diâmetro, com o auxílio de um punch e uma tesoura própria para a cirurgia, sendo duas na área dorsal e duas logo abaixo com uma distância entre elas de aproximadamente 10 mm (Figura 6). Apenas a pele do animal foi retirada para a obtenção da ferida (Figura 7). Alto grau de procedimento asséptico foi mantido durante toda a cirurgia.

Figura 6 - Imagem do dorso do rato com as áreas das feridas demarcadas para retirada de pele. As áreas para retirada de pele foram marcadas com o auxílio de um punch de 6mm e, a seguir, recortadas com uma tesoura.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

Figura 7 – Imagem do dorso do animal com as quatro incisões para aplicação da solução fisiológica, do rhPDGF-BB, do PRP Fresco e do PRP Armazenado.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

4.4 ANÁLISE DA CICATRIZAÇÃO

As feridas foram fotodocumentadas a cada dois dias, e após sete dias de experimento a pele das feridas foram coletadas, fixadas em 4% paraformaldeído (PFA), incluídas em parafina e, então, foram realizados os cortes histológicos e colorações de Tricômio de Masson, Picro-Sirius, Hematoxilina e Eosina para avaliar e comparar o tecido novo formado.

Para quantificar a área de cicatrização das feridas foram realizadas medidas na parte horizontal (largura) e vertical (altura) de cada uma das feridas no dia 7 da coleta das amostras considerando a área mais externa da ferida. Foi utilizada a seguinte fórmula para determinar a área de cicatrização em mm^2 . Para o cálculo foi considerado a área inicial da ferida em 36 mm^2 .

$$\frac{\text{altura X largura}}{\text{área inicial da ferida em mm}^2} \times 100 = \text{Valor mm}^2$$

4.5 ELISA PARA O FATOR DE CRESCIMENTO PDGF-BB

O fator de crescimento humano PDGF-BB foi avaliado nas preparações de PRPs frescos e armazenados utilizando o kit de ELISA DuoSet da R&D.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 6.0, Software Inc, USA. Foi realizado o teste ANOVA e pós-teste de Tukey, para comparação entre os diferentes tratamentos.

Para comparação do tratamento com PRP fresco ou armazenado dos dois diferentes doadores ou com rhPDGF-BB foi realizado teste t-Student par a par. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 CICATRIZAÇÃO EM DORSO DE RATOS TRATADOS COM rhPDGF-BB E PRP FRESCO E PRP ARMAZENADO

Para a análise do processo de cicatrização em modelo de dorso de ratos foram utilizados animais nude devido à aplicação de PDGF-BB e PRPs humanos para evitar uma possível rejeição.

Foi realizado o procedimento cirúrgico no dorso dos animais para retirada da pele e criadas quatro incisões, os quais receberam os seguintes produtos de acordo com a incisão: 1- solução fisiológica (controle negativo), 2- rhPDGF-BB (controle positivo), 3- PRP-Fresco e 4- PRP-Armazenado. As feridas 3 e 4 foram tratadas respectivamente com PRP fresco ou PRP armazenado obtidos do doador A (Grupo 1) (Figura 8) ou B (Grupo 2) (Figura 9).

Figura 8 – Imagens fotodocumentadas dos dorsos dos animais tratados com PRP fresco e armazenado obtidos do doador A (Grupo 1) ao longo do processo de cicatrização e esquema do tratamento. Foram utilizados três animais para o tratamento das feridas com aplicação de 1- solução fisiológica (controle negativo), 2- rhPDGF-BB, 3- PRP-Fresco e 4- PRP-Armazenado de acordo com a ordem apresentada à direita na segunda caixa.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

Figura 9 – Imagens fotodocumentadas dos dorsos dos animais tratados com PRP fresco e armazenado obtidos do doador B (Grupo 2) ao longo do processo de cicatrização e esquema do tratamento. Foram utilizados três animais para o tratamento das feridas com aplicação de 1- solução fisiológica (controle negativo), 2- rhPDGF-BB, 3- PRP-Fresco e 4- PRP-Armazenado de acordo com a ordem apresentada à direita na segunda caixa.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

5.2 ANÁLISE DOS TRATAMENTOS COM rhPDGF-BB e PRP-F e PRP-A

As áreas das feridas foram medidas sete dias após o tratamento e os dados foram calculado conforme descrito no item 4.4 de MATERIAIS E MÉTODOS.

Os gráficos a seguir apresentam os valores obtidos para as médias (Gráfico 1) e medianas (Gráfico 2) das áreas das feridas no sétimo dia do processo de cicatrização nos animais tratados com 10 µL PRPs frescos e armazenados obtidos do doador A e B, em comparação à ferida controle negativo tratada com solução fisiológica ou o controle positivo tratado com 5µg de rhPDGF-

BB. Os dados mostraram diferenças significativas ($p < 0.01$) para o tratamento com rhPDGF-BB, PRP fresco e PRP armazenado/liofilizado em comparação ao grupo controle negativo para o doador A.

Para o grupo tratado com PRP obtido do doador B não foi obtida diferença significativa nos tratamentos. Porém, foi observado que todos os animais desse grupo tiveram uma cicatrização mais acelerada nas feridas controle negativo, impossibilitando um dado conclusivo no estudo. Entretanto, foi observado uma tendência nos dados com melhor cicatrização nas feridas tratadas com rhPDGF-BB, PRP fresco e PRP armazenado/liofilizado, em relação ao grupo controle negativo.

Também foram realizadas análises estatísticas pareadas utilizando teste t-Student entre os valores das feridas dos animais dos grupos A e B tratados com rhPDGF-BB, PRP fresco ou PRP armazenado/liofilizado. Em nenhuma dessas análises foi encontrado diferença significativa, indicando que o tratamento com os PRPs preparados frescos ou armazenados, de ambos os doadores, foram efetivos.

Gráfico 1 – Média da área das feridas no dia 7 do processo de regeneração tecidual em pele de dorso de ratos nus. Os animais foram tratados com solução fisiológica (Controle Negativo), rhPDGF-BB, PRP Fresco (PRP-F) ou PRP Armazenado/Liofilizado por 15 dias a temperatura ambiente. Os asteriscos mostram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$). N=3.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

Gráfico 2 – Mediana da área das feridas no dia 7 do processo de regeneração tecidual em pele de dorso de ratos nudes. Os animais foram tratados com solução fisiológica (controle Negativo), rhPDGF-BB, PRP Fresco (PRP-F) ou PRP Armazenado/Liofilizado por 18 dias a temperatura ambiente. Os asteriscos mostram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$). N=3.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

5.3 ELISA PARA O FATOR DE CRESCIMENTO PDGF-BB

A dosagem do fator de crescimento humano PDGF-BB foi testada nas preparações de PRP frescos e armazenados utilizando o kit de ELISA Duoset da R&D, porém a proteína não pode ser detectada, ficando abaixo do nível de detecção do kit mesmo quando utilizando-se até 30 μ L de PRP. Novas dosagens serão testadas utilizando o PRP concentrado por ultrafiltração.

5.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DOS TECIDOS DE RATOS

Os animais foram eutanasiados no sétimo dia de cicatrização e os tecidos relativos às feridas foram coletados, fixados e analisados por histologia.

Foram realizadas as análises histológicas das peles de ratos não tratadas (Figura 10) e tratadas após sete dias de tratamento com solução fisiológica

(controle negativo), rhPDGF-BB, PRP-fresco e PRP-Armazenado/Liofilizado identificadas no painel dos dois grupos de doadores (Figura 11 e 12).

Figura 10– Histologia de pele de rato sem tratamento. À esquerda tecido corado em Hematoxilina e Eosina e à direita em Tricrômico de Masson. Epiderme fina com diversos folículos pilosos (FP) e as estruturas de colágenos (C) são visualizados

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

Figura 11– Imagem fotográfica da evolução da regeneração e histologia de pele de todas as feridas tratadas dos animais do Grupo 1.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

Figura 12– Imagem fotográfica da evolução da regeneração e histologia de pele de todas as feridas tratadas dos animais do Grupo 2.

Fonte: (CAMPOS, R.A., 2018).

6 DISCUSSÃO

O PRP tem sido utilizado há quase sete décadas (SHAHID e KUNDRA, 2017) com resultados controversos pela falta de um protocolo estabelecido no processamento, tanto em tempo de centrifugação como em força de rotação e na periodicidade da aplicação, dificultando assim uma avaliação comparativa. Também é importante salientar, que cada indivíduo possui sua particularidade fisiológica devido a doenças sistêmicas e debilitações, o que pode influenciar no número de plaquetas e comprometendo os resultados da preparação do PRP (PIETRAMAGGIORI et al., 2006).

O preparo do PRP requer tempo laboratorial e alguns materiais específicos, mas podemos observar que em diversas publicações muitos protocolos não são totalmente descritos, faltando diversas informações para que sejam reproduzíveis, e o mais crítico é não existir na grande maioria dos casos, uma comparação no número de plaquetas antes de realizar os procedimentos, o que poderia influenciar em como realizar o preparo, e podendo comprometer o resultado final do tratamento (CAMPOS e CARREIRA, revisão em preparação).

Os fatores de crescimento do PRP são moléculas que atuam de forma autócrina regulando a quimiotaxia, migração celular, mitose e proliferação celular, interferindo na interação celular e na formando a matriz extracelular (LACCI; DARDIK, 2010; GONCHAR et al., 2017).

Alguns estudos foram direcionados para observar a capacidade de eficiência do PRP após o armazenamento para facilitar, não só o processo laboratorial de preparo, como minimizar o desconforto no paciente na coleta do sangue.

Entretanto, a literatura continua controversa e neste estudo analisamos a redução da área de cicatrização obtida em modelo de cicatrização de dorso em ratos nudes com a aplicação de PRP Fresco e PRP Liofilizado, e armazenado a temperatura ambiente, comparado com rhPDGF-BB, mostrado em estudos prévios (dados não publicados, Carreira et al., em preparação) com resultados benéficos acelerando a cicatrização.

Observou-se uma boa cicatrização tanto na aplicação de PRP Fresco como no PRP Armazenado, mostrando inclusive que o resultados foram comparativos à cicatrização com a aplicação de rhPDGF-BB. Observa-se que o

controle negativo, em algumas amostras apresenta-se sem diferença significativa perante as demais feridas. Talvez a localização das feridas podem ter influência sob resultado, pois a movimentação do pescoço do animal tende a encolher as feridas superiores (controle e PDGF) e isso poderia facilitar a cicatrização e influenciar no resultado de algumas feridas. Por mais que tentamos fazer a incisão da pele nos animais exatamente no mesmo local, observamos que em alguns animais esta incisão foi realizada mais próximas, ou mais lateralmente.

Neste estudo os doadores de sangue para o preparo de PRP apresentaram os valores de 189.000 a 216.000/mm³ plaquetas. Em um estudo realizado (HOSNUTER et al., 2017) relatou que a quantidade de plaquetas não é significativa para o resultado do PRP, pois o que importa é o nível dos fatores de crescimento. Entretanto a quantidade de fatores de crescimento está diretamente correlacionada com o número de plaquetas, que quando ativadas liberam o conteúdo dos seus grânulos. Porém, já foi relatado em alguns estudos que níveis elevados de plaquetas podem mesmo introduzir alguns efeitos negativos através da regulação negativa dos receptores (WEIBRICH et al., 2004; CHOI et al., 2005). Portanto, obter um número ideal de plaquetas para preparo do PRP é essencial na padronização de um protocolo efetivo.

O PDGF é apresentado como um fator de crescimento de extrema importância na sinalização celular, e é um dos fatores mais abundantes presentes no PRP. Isso mostra que o PRP Armazenado apresenta resultados seguros e satisfatórios preservando suficientemente a qualidade do PRP para induzir a regeneração tecidual em apenas sete dias no modelo de cicatrização em dorso de rato, sendo capaz de induzir a proliferação e a produção de componentes da matriz extracelular, e reposição de colágeno.

Um estudo realizado em 2005, analisou as plaquetas armazenadas de um a 21 dias, já que para uso clínico sua vida útil é determinada em cinco dias, e verificou-se que as plaquetas como agentes hemostáticos, degradam-se em pouco tempo, mas observa-se que as plaquetas podem permanecer intactas durante pelo menos três semanas servindo assim, como possível reservatório para fatores de crescimento (CHAN et al., 2005). Relaciona-se que a aplicação do PRP, como abrange uma maior quantidade de moléculas, pode ser considerado mais completo e com maiores benefícios, já que no plasma identificou-se mais de 1.500 moléculas tanto reguladoras e fatores de crescimento (HOSNUTER et al.,

2017). Observa-se que para determinadas aplicações como em tratamentos capilares, oculares, ortodonticos, ortopédicos, dentre outros, mais o PRP está sendo amplamente difundido.

No Brasil o PRP tem sido utilizado em procedimentos de Ortopedia, Cirurgia, Dermatologia e Odontologia, e as indicações clínicas e terapêuticas devem ser determinadas pelo Conselho Federal de Medicina e o de Odontologia. Entretanto, ainda é considerado como procedimento experimental pelo Conselho Federal de Medicina (Parecer CFM nº 20, de 2011; disponível na íntegra em Publicado em 02/01/2018 http://www.portalmédico.org.br/pareceres/CFM/2011/20_2011.htm) e para a ANVISA sua aplicação deve estar no âmbito da Hemoterapia, seguindo o preconizado pela legislação vigente para a área de sangue (RDC da Anvisa nº 57/2010, “que determina o regulamento sanitário para os serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais e a Portaria Ministerial nº 1353/2011, que aprova o regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos”).

É importante também observar que o PRP tem a capacidade de estimular a proliferação de células indiferenciadas (SPARTALIS et al., 2017), e por isso, podem formar novos folículos capilares, novas células epiteliais e novos vasos sanguíneos. O PRP está em ampla expansão para uso em cicatrização em úlceras vasculares de diferentes causas, inclusive em pacientes diabéticos, e, possivelmente, pacientes com anemia falciforme, ambos com comprometimento vascular e extremamente sujeitos à infecções e à amputações pela deficiência de vascularização periférica, pois já está estabelecido que o fator VEGF presente no PRP é capaz de estimular a angiogênese.

Na fase inflamatória da cicatrização e no início da fase proliferativa, a infiltração de neutrófilos e macrófagos é intensa, com isso ocorre a formação de folículos pilosos e novas formações e organizações de fibras de colágenos, e, portanto, sendo capazes de reconstituir a ferida.

A epiderme é o órgão que detecta e responde aos estímulos externos, mudanças do meio ambiente e ao estresse, se comunicando com o sistema nervoso central pela produção e liberação local e sistêmica de hormônios, neurotransmissores, neuropeptídeos e reguladores biológicos. As células da

epiderme, queratinócitos e melanócitos, exercem propriedades análogas aos neurônios secretórios, exercendo um eixo hipotálamo-hipófise-adrenal altamente organizado. Em resposta aos estímulos externos diversas alterações ocorrem, inclusive ativação de hormônios esteroides como por exemplo, a conversão de T4 com T3 ou testosterona em di-hidrotestosterona ou 5 α -estradiol. A produção desses hormônios são sintetizados localmente levando a expressão de seus receptores.

Embora tenha sido descrito que não há diferença entre estrógeno e testosterona na cicatriz, sendo ambos inibitórios, a aplicação tópica de estradiol tem apontado melhora na cicatrização com uso de estradiol tópico (PASTAR et al., 2014). Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram a ação tópica do cortisol, pois o doador A era do sexo feminino. Entretanto, a cicatrização de controle negativo do grupo B (sexo masculino) foi menor, provavelmente, devido ao ciclo astral da rata ou m antagonismo entre as ações do estrógeno e testosterona. Estudos futuros são necessários para concluir essa hipótese.

Humanos com a pele negra estão mais sujeitos ao desenvolvimento de queloides, o qual é representada pelo exacerbação de colágeno (HOCHMAN et al., 2012; PENN; GROBBELAAR; ROLFE, 2012). Porém, no nosso modelo de estudo em ratos com a pele pigmentada não foi identificado nenhuma alteração nas amostras dos ratos de pele escura, mas se analisarmos o controle negativo do grupo 2, que apresentou uma aceleração mais comparada ao controle negativo do grupo 1, seria interessante investigar se essa característica pode ter influenciado no resultado, já que no grupo 2 existiam dois animais de pele pigmentada e o grupo 1 apresentava somente animais de pele clara (albino).

Sugere-se novos estudos concentrando o PRP fresco e armazenado para acelerar a aplicação da ferida com protocolos de armazenamentos em diferentes tempos de armazenamento, mas com o mesmo protocolo de preparação do PRP para que seja possível uma análise comparativa. Fazendo análises com mais animais e comparando inclusive animais de pele escura.

7 CONCLUSÃO

A cicatrização tecidual no modelo de regeneração tecidual em pele no dorso de ratos nudes com a aplicação do Plasma Rico em Plaquetas caracterizado por um concentrado de fatores de crescimento representa um grande potencial terapêutico, preparado a fresco a partir de sangue recém-coletado, ou do PRP liofilizado e armazenado durante 18 dias a temperatura ambiente, obtido a partir de dois doadores, mostrou-se comparável, indicando uma possibilidade no armazenamento do produto e facilidade de aplicação para o paciente, sem a necessidade de novas coletas de sangue.

O protocolo aqui apresentado para preparação de PRP, com doador contendo um número de plaquetas ao redor de $190.000/\text{mm}^3$, permitiu uma preparação rápida, segura e confiável com atividade biológica demonstrada *in vivo*, e comparável ao resultado obtido com a aplicação do rhPDGF-BB purificado, indicando um caminho para a padronização dos protocolos para obtenção de um produto seguro e efetivo pelos profissionais da Saúde e regulamentado pelas agências regulatórias, a fim de garantir sucesso no procedimento.

Novos estudos com diferentes tempos de armazenamento do PRP, variação no número de plaquetas e feridas com maiores comprometimentos, como em animais diabéticos e em feridas vasculares, fazem-se necessários para que seja possível avaliar a atuação do produto armazenado equilibrando os fatores de crescimento nas diversas fases da cicatrização.

Além disto, uma outra possibilidade seria adicionar o rhPDGF-BB purificado ao PRP a fim de acelerar ainda mais o processo de cicatrização.

8 REFERÊNCIAS

- A. ABDULLAHI, S. AMINI-NIK, and M. J. Animal models in burn research. NIH Public Access. **Cell Mol Life Sci.**, v. 49, n. 18, p. 1841–1850, 2009.
- ABDUL LATIF, M.; ZULASYRAF MOHD ZAKI, M.; MAY LENG, T.; HIDAYAH ABDUL RAHMAN, N.; AISYAH ARSHAD, S.; HAMID, A. *Alocasia denudata* Engler treatment enhance open wound healing activities in Wistar rat's skin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 258–267, 2015.
- ANITUA, E.; MURUZABAL, F.; PINO, A.; MERAYO-LLOVES, J.; ORIVE, G. Biological stability of plasma rich in growth factors eye drops after storage of 3 months. **Cornea**, v. 32, n. 10, p. 1380–1386, 2013.
- BAUSSET, O.; GIRAUDO, L.; VERAN, J.; MAGALON, J.; COUDREUSE, J.-M.; MAGALON, G.; DUBOIS, C.; SERRATRICE, N.; DIGNAT-GEORGE, F.; SABATIER, F. Formulation and Storage of Platelet-Rich Plasma Homemade Product. **BioResearch Open Access**, v. 1, n. 3, p. 115–123, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/biores.2012.0225>>. Acesso em: 2 jul. 2018.
- CASTILLO, T. N.; POULIOT, M. A.; HYEON JOO KIM; DRAGOO, J. L. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. **American Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 2, p. 266–271, 2011.
- CHAN, R. K.; LIU, P.; LEW, D. H.; IBRAHIM, S. I.; SREY, R.; VALERI, C. R.; HECHTMAN, H. B.; ORGILL, D. P. Expired liquid preserved platelet releasates retain proliferative activity. **Journal of Surgical Research**, v. 126, n. 1, p. 55–58, 2005.
- CHIGURUPATI, S.; ARUMUGAM, T. V.; SON, T. G.; LATHIA, J. D.; JAMEEL, S.; MUGHAL, M. R.; TANG, S.-C.; JO, D.-G.; CAMANDOLA, S.; GIUNTA, M.; RAKOVA, I.; MCDONNELL, N.; MIELE, L.; MATTSON, M. P.; POOSALA, S. Involvement of Notch Signaling in Wound Healing. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1167, 2007. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0001167>>. Acesso em: 1 jun. 2018.
- CHOI, B. H.; ZHU, S. J.; KIM, B. Y.; HUH, J. Y.; LEE, S. H.; JUNG, J. H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: An in vitro study. **International Journal of Oral and**

Maxillofacial Surgery, v. 34, n. 4, p. 420–424, 2005.

CHOI, J.; MINN, K. W.; CHANG, H. The Efficacy and Safety of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells: An Update. **Archives of Plastic Surgery**, v. 39, n. 6, p. 585, 2012. Disponível em: <<http://e-aps.org/journal/view.php?doi=10.5999/aps.2012.39.6.585>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

COSTA, A. **Tratado Internacional de Cosmecêuticos**. [s.l: s.n.]

DE SOUZA, M. V.; PINTO, O. J. de; DA COSTA, M. B. M.; ALVES, M. S.; DA SILVA, M. O.; MARTINHO, K. O.; FIETTO, L. G. Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 233–240, 2014.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158–167, 2009.

EVANS, N. D.; OREFFO, R. O. C.; HEALY, E.; THURNER, P. J.; MAN, Y. H. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 28, p. 397–409, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.04.023>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

EVERTS, P. a M.; KNAPE, J. T. a; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J. P. a M.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, E. P.; BOX, H. a M.; VAN ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of extra-corporeal technology**, v. 38, n. 2, p. 174–187, 2006.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 9, p. 560–582, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2015.0635>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

GARG, S.; MANCHANDA, S. Platelet-rich plasma—an “Elixir” for treatment of alopecia: personal experience on 117 patients with review of literature. **Stem Cell Investigation**, v. 4, p. 64–64, 2017. Disponível em: <<http://sci.amegroups.com/article/view/15645/15704>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

GERSCH, R. P.; GLAHN, J.; TECCE, M. G.; WILSON, A. J.; PERCEC, I. Platelet Rich Plasma Augments Adipose-Derived Stem Cell Growth and Differentiation.

- Aesthetic Surgery Journal**, n. April 2016, p. 1–7, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/asj/article/3045375/Platelet>>. Acesso em: 2 abr. 2018.
- GONCHAR, I. V.; LIPUNOV, A. R.; AFANASOV, I. M.; LARINA, V.; FALLER, A. P.; KIBARDIN, A. V. Platelet rich plasma and growth factors cocktails for diabetic foot ulcers treatment: State of art developments and future prospects. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871402117302941>>. Acesso em: 12 set. 2017.
- GUEVARA-ALVAREZ, A.; SCHMITT, A.; RUSSELL, R. P.; IMHOFF, A. B.; BUCHMANN, S. Growth factor delivery vehicles for tendon injuries: Mesenchymal stem cells and Platelet Rich Plasma. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 3, p. 378–385, 2014.
- HALL, M. P.; BAND, P. a; MEISLIN, R. J.; JAZRAWI, L. M.; CARDONE, D. a. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 17, n. 10, p. 602–608, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19794217>.
- HOCHMAN, B.; ISOLDI, C. B. F. F. C.; FURTADO, S. F. F. F.; FERREIRA, L. M. Distribuição de queleide e cicatriz hipertrófica segundo fototipos de pele de Fitzpatrick. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 2, p. 185–189, 2012.
- HOSNUTER, M.; ASLAN, C.; ISIK, D.; CALISKAN, G.; ARSLAN, B.; DURGUN, M. Functional assessment of autologous platelet-rich plasma (PRP) after long-term storage at –20 °C without any preservation agent. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**, v. 51, n. 4, p. 235–239, 2017.
- JOEL, B. S. Implications for Wound Healing. **Blood**, v. 114, n. November, p. 1502–1508, 2004.
- KIERSZENBAUM, ABRAHAM L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. 3a. edição ed. [s.l: s.n.]
- KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. [s.l: s.n.]
- LACCI, K. M.; DARDIK, A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 83, n. 1, p. 1–9, 2010. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2844688&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

LAURA A PETERSON, J. C. H. Wound Healing in Peripheral Arterial Disease: Current and Future Therapy. **Journal of Vascular Medicine & Surgery**, v. 2, n. 4, 2014. Disponível em: <<http://www.esciencecentral.org/journals/wound-healing-in-peripheral-arterial-disease-current-and-future-therapy-2329-6925.1000157.php?aid=35693>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

LEE, J. H.; KIM, J. T.; CHO, Y. G. Effect of nitric oxide on the cryopreservation of platelets. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 28, n. 2, p. 136–143, 2008.

LENZA, M.; FERRAZ, S. D. B.; CARAI, D.; VIOLA, M.; FERNANDO, O.; NETO, M. C.; FERRETTI, M. Platelet-rich plasma for long bone healing Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. v. 11, n. 1, p. 122–127, 2013.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225–8, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085519>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

MASSARA, M.; BARILLÀ, D.; DE CARIDI, G.; SERRA, R.; VOLPE, A.; SURACE, R.; FOTI, G.; MARCUCCIO, D.; PUCCI, G.; VOLPE, P. Application of autologous platelet-rich plasma to enhance wound healing after lower limb revascularization: A case series and literature review. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 28, n. 3–4, p. 195–200, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2016.01.002>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G. Da; MARQUES, M. E. A. Physiopathology of melasma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623–635, 2009.

MOORE, G. W.; MALONEY, J. C.; ARCHER, R. A.; BROWN, K. L.; MAYGER, K.; BROMIDGE, E. S.; NAJAFI, M. F. Platelet-rich plasma for tissue regeneration can be stored at room temperature for at least five days. **British Journal of Biomedical Science**, v. 74, n. 2, p. 71–77, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09674845.2016.1233792>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

MURPHY, S.; GARDNER, F. H. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. **The New England Journal of Medicine**, p. 1094–1098, 1969.

NAKATANI, Y.; AGATA, H.; SUMITA, Y.; KOGA, T.; ASAHINA, I. Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering. **Archives of Oral Biology**,

- v. 73, p. 172–178, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.006>>. Acesso em: 2 jul. 2018.
- NEPSTAD, I.; REIKVAM, H.; STRANDENES, G.; HESS, J. R.; APELSETH, T. O.; HERVIG, T. A. Comparison of in vitro responses to fresh whole blood and reconstituted whole blood after collagen stimulation. **Blood Transfusion**, v. 12, n. 1, p. 50–55, 2014.
- PAN, L.; YONG, Z.; YUK, K. S.; HOON, K. Y.; YUEDONG, S.; XU, J. Growth Factor Release from Lyophilized Porcine Platelet-Rich Plasma: Quantitative Analysis and Implications for Clinical Applications. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 40, n. 1, p. 157–163, 2016.
- PARK, J.; HWANG, S.; YOON, I.-S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1259, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/22/8/1259>>.
- PARK, Y. G.; LEE, I. H.; PARK, E. S.; KIM, J. Y. Hydrogel and platelet-rich plasma combined treatment to accelerate wound healing in a nude mouse model. **Archives of Plastic Surgery**, v. 44, n. 3, p. 194–201, 2017.
- PASTAR, I.; STOJADINOVIC, O.; YIN, N. C.; RAMIREZ, H.; NUSBAUM, A. G.; SAWAYA, A.; PATEL, S. B.; KHALID, L.; ISSEROFF, R. R.; TOMIC-CANIC, M. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 445–464, 2014. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/wound.2013.0473>>.
- PATEL, A. N.; SELZMAN, C. H.; KUMPATI, G. S.; MCKELLAR, S. H.; BULL, D. A. Evaluation of autologous platelet rich plasma for cardiac surgery: Outcome analysis of 2000 patients. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13019-016-0452-9>>. Acesso em: 10 jul. 2017.
- PENN, J. W.; GROBBELAAR, A. O.; ROLFE, K. J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. **International journal of burns and trauma**, v. 2, n. 1, p. 18–28, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3415964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 jun. 2017.
- PICCIN, A.; DI PIERRO, A. M.; CANZIAN, L.; PRIMERANO, M.; CORVETTA, D.; NEGRI, G.; MAZZOLENI, G.; GASTL, G.; STEURER, M.; GENTILINI, I.; EISENDLE, K.; FONTANELLA, F. Platelet gel: A new therapeutic tool with great

potential. **Blood Transfusion**, v. 15, n. 4, p. 333–340, 2017.

PIETRAMAGGIORI, G.; KAIPAINEN, A.; CZECZUGA, J. M.; WAGNER, C. T.; ORGILL, D. P. Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 5, p. 573–580, 2006.

RINGWALD, J.; ZIMMERMANN, R.; ECKSTEIN, R. The new generation of platelet additive solution for storage at 22°C: Development and current experience. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 20, n. 2, p. 158–164, 2006.

ROFFI, A.; FILARDO, G.; ASSIRELLI, E.; CAVALLO, C.; CENACCHI, A.; FACCHINI, A.; GRIGOLO, B.; KON, E.; MARIANI, E.; PRATELLI, L.; PULSATELLI, L.; MARCACCI, M. Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SAMPSON, S.; GERHARDT, M.; MANDELBAUM, B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 1, n. 3–4, p. 165–174, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12178-008-9032-5>>.

SERRANO, K.; SCAMMELL, K.; WEISS, S.; CULIBRK, B.; LEVIN, E.; GYÖNGYÖSSY-ISSA, M.; DEVINE, D. V. Plasma and cryoprecipitate manufactured from whole blood held overnight at room temperature meet quality standards. **Transfusion**, v. 50, n. 2, p. 344–353, 2010.

SHIGA, Y.; KUBOTA, G.; ORITA, S.; INAGE, K.; KAMODA, H.; YAMASHITA, M.; ISEKI, T.; ITO, M.; YAMAUCHI, K.; EGUCHI, Y.; SAINOH, T.; SATO, J.; FUJIMOTO, K.; ABE, K.; KANAMOTO, H.; INOUE, M.; KINOSHITA, H.; FURUYA, T.; KODA, M.; AOKI, Y.; TOYONE, T.; TAKAHASHI, K.; OHTORI, S. Freeze-dried human platelet-rich plasma retains activation and growth factor expression after an eight-week preservation period. **Asian Spine Journal**, v. 11, n. 3, p. 329–336, 2017.

SINGER, A. J.; TASSIOPOULOS, A.; KIRSNER, R. S. Evaluation and Management of Lower-Extremity Ulcers. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 16, p. 1559–1567, 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMr1615243>>.

SPARTALIS, E.; TSILIMIGRAS, D. I.; CHARALAMPOUDIS, P.; KARACHALIOU, G.-S.; MORIS, D.; ATHANASIOU, A.; SPARTALIS, M.; BOLKAS, V.;

DIMITROULIS, D.; NIKITEAS, N. The “Yin and Yang” of Platelet-rich Plasma in Breast Reconstruction After Mastectomy or Lumpectomy for Breast Cancer. **Anticancer Research**, v. 37, n. 12, p. 6557–6562, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29187430>%0A<http://ar.iiarjournals.org/content/37/12/6557.abstract>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 941–945, 2014.

TAMBELLA, A. M.; ATTILI, A. R.; DUPRÉ, G.; CANTALAMESSA, A.; MARTIN, S.; CUTERI, V.; MARCAZZAN, S.; FABBRO, M. Del; DEL FABBRO, M. Platelet-rich plasma to treat experimentally- induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191093, 2018. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29324848>%0A<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0191093>%0A<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0191093&type=printable>>.

VIEIRA, C. P. de B.; FURTADO, A. S.; DE ALMEIDA, P. C. D.; LUZ, M. H. B. A.; PEREIRA, A. F. M. Prevalência E Caracterização De Feridas Crônicas Em Idosos Assistidos Na Atenção Básica. **Revista Baiana de Enfermagem**, v. 31, n. 3, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<https://portalseer.ufba.br/index.php/enfermagem/article/view/17397>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

WEIBRICH, G.; HANSEN, T.; KLEIS, W.; BUCH, R.; HITZLER, W. E. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, v. 34, n. 4, p. 665–671, 2004.