FÁBIO LUÍS MOURA LIMA

**EFEITOS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO DE FERIDAS DÉRMICAS
PADRONIZADAS, EM RATOS**

São Paulo

2009

Fábio Luís Moura Lima

**Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação
de feridas dérmicas padronizadas, em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lima FLM. Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas, em ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo...../...../.....

Banca Examinadora

1) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof.(a) Dr.(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Á Deus, por tudo que sou e pela força que me faz seguir em frente;

Aos meus pais, Moacir e Moura, pelo amor e renúncia indispensáveis a realização desse trabalho e por me estimularem a seguir em frente mesmo diante de obstáculos que pareciam intransponíveis. Vocês são meu porto seguro.....

Aos meus irmãos, Márcio e Júlio, pelo amor e dedicação com que acompanharam mais uma etapa de minha vida;

À minha cunhada Denise e aos meus sobrinhos Alan, Arnon, Bruno, Elisa, Kairon, Emanuele e Gabrilele, pelo carinho e pelo apoio em todos os momentos;

Aos demais parentes e amigos, que de uma forma ou de outra, demonstraram apoio e carinho nos momentos mais difíceis;

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Francisco Emílio Pustiglioni, pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança em mim depositada, pela dedicação na orientação deste trabalho e, principalmente, pela amizade, compreensão e por ter me acolhido em um momento tão importante de minha vida e ter, então, guiado meus passos com segurança e sabedoria, o meu eterno muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Jarbas Arruda Bauer do Instituto de Ciências Biológicas da USP, pela orientação da fase cirúrgica desse projeto, pelas críticas construtivas no momento de minha qualificação, pelo carinho, e pelo incentivo que me fez driblar inúmeras dificuldades encontradas durante a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Luciana Correia por permitir o desenvolvimento deste trabalho na Disciplina de Patologia Geral da FOUSP, pela orientação e pelos ensinamentos científicos indispensáveis para este trabalho;

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Junior, por ter despendido parte de seu tempo para a realização das fotos;

À Profa. Dra. Primavera Borelli da Disciplina de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por possibilitar a realização da contagem do número de plaquetas, possibilitando o enriquecimento desta pesquisa;

À Profa. Dra. Alison Colquhoun do Instituto de Ciências Biológicas da USP por disponibilizar o Laboratório de Metabolismo da Célula Tumoral, sempre que necessário, para a realização desta pesquisa;

Aos professores da Disciplina de Periodontia Giuseppe Alexandre Romito, Roberto Lotufo (*in memoriam*), Giorgio de Micheli, Luiz Lima, José Hidelbrando Todescan, Marco Georgetti, Koto, Claudio Mendes Pannuti, Marina Conde e Silvia Rosana Carneiro (*in memoriam*) pelos ensinamentos valiosos para minha formação e crescimento profissional;

Aos meus colegas de pós-graduação Cássia, Priscila, Hsu, Ivan, Veronica, Giovane, Valéria, Adriane, Takiy pelos bons momentos que tivemos juntos, pelas risadas, pela troca de conhecimentos e pela convivência enriquecedora;

À Carlinha, uma grande amiga, que com suas palavras de incentivo muitas vezes ajudaram a superar as carências familiares e dificuldades encontradas no decorrer deste curso, pela solidariedade que sempre nos uniu e pela valiosa amizade;

À Eliane dos Santos, minha auxiliar de consultório dentário (ACD), minha eterna gratidão, por ter sido a pessoa que mais me acompanhou durante todos os momentos sempre com esmero e profissionalismo;

A aluna de mestrado Priscila Peron do Instituto de Ciências Biológicas da USP, pela força, incentivo o que me deram coragem para ir cada vez mais longe e tornar essa pesquisa o mais completa possível;

A estagiária Mariana Koeche e a aluna de doutorado Amanda Crisma da Disciplina de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela atenção e ajuda indispensáveis para a contagem da plaquetas, requisito importante nessa pesquisa;

À Márcia, funcionária da Disciplina de Periodontia, pela atenção, pelo carinho e pela ajuda;

À Rogéria, por ter me auxiliado na clínica de pós-graduação e ter participado na realização de trabalhos científicos;

À Elisa dos Santos, especialista de laboratório da disciplina de patologia da FOUSP, pelo carinho e por ter me ensinado todos os passos para a confecção das lâminas, elementos chaves para a obtenção desta pesquisa;

À Bia que me incentivou a driblar todos os obstáculos encontrados na realização da fase laboratorial desta pesquisa;

A Profa. Dra. Claudia da Faculdade de Veterinária da USP pelo ensinamento para a realização da punção cardíaca em minhas amostras (grupo teste);

Aos funcionários do biotério do ICB-USP, Fernando de Araújo e Claudio Modia, pelos cuidados dados aos animais durante todo o período experimental;

Aos funcionários da biblioteca da FOUSP pela atenção oferecida sempre que solicitado;

Aos funcionários da sessão de pós-graduação da FOUSP, Catia, Tiezze, Nair Costa e Alessandra Moreira, pelos estimáveis auxílios prestados;

À PROAP, pelo auxílio que possibilitou a concretização desse trabalho;

À CAPES, pelo auxílio que foi indispensável na realização deste trabalho;

A todos que de uma forma anônima e silenciosa contribuíram na elaboração deste trabalho.

Lima FLM. Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas, em ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O uso do plasma rico em plaquetas pode apresentar resultados favoráveis na reparação por se constituir em fonte natural de fatores de crescimento, que podem acelerar a reparação dos tecidos. A proposição desta pesquisa foi analisar os efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação tecidual. Foram realizadas feridas dérmicas padronizadas, com a utilização de “punch”, para excisão do fragmento de pele, com 5mm de diâmetro e 2mm de profundidade, no dorso de 48 ratos. Destes, 40 foram utilizados para análise microscópica e 8 ratos para análise macroscópica. Os animais foram divididos em dois grupos, conforme o tratamento realizado: em um grupo (teste), as feridas foram tratadas com plasma rico em plaquetas e em outro (controle), foi utilizado soro fisiológico. Além disso, utilizamos 5 ratos para a determinação do número de plaquetas presentes no plasma rico em plaquetas. Estas análises foram realizadas no analisador automático de células sangüíneas ABC Vet (ABX DIAGNOSTICS). Dos 40 ratos utilizados para análise microscópica, 5 ratos (grupo teste) e 5 ratos (grupo controle) foram sacrificados nos períodos de 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias. Nos 8 ratos utilizados para análise macroscópica, sendo 4 ratos (grupo teste) e 4 ratos (grupo controle), as feridas foram fotografadas nos períodos “baseline”, 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias e as imagens foram analisadas por software de morfometria (ImageLab2000®). Os espécimes foram processados para análises macroscópica e microscópica. As

análises histomorfológica e histomorfométrica mostraram que a reparação das feridas evolui de forma similar em ambos os grupos. Os resultados desta pesquisa sugeriram que embora não ofereçam efeitos tóxicos ou prejudicial sobre os tecidos moles, o PRP não favorece a reparação de feridas dérmicas, em ratos.

Palavras-Chaves: reparação tecidual, contração de ferida, tratamento, plasma rico em plaquetas.

Lima FLM. Effect of platelet-rich plasma on the standardized dermal wound healing in rats [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

The employ of platelet-rich plasma can present favorable outcomes in healing to consist of natural source of growth factors for acceleration tissue healing. The purpose of this research was to analyze the effects of platelet-rich plasma on tissue healing. Standard dermical wounds were made with a punch to excise a skin fragment with 5 millimeters diameter and 2 milliner's depth, in the back of 48 rats. Of these, 40 had been used for microscopical analysis and 8 rats for macroscopic analysis. The animals had been divided in two groups according to treatment: in a group (test), the wounds had been dealt with platelet-rich plasma and in another one (control), saline was used. Also, we use 5 rats for the determination of the number of platelets present in the platelet-rich plasma. These analyses had been carried through in the automatic analyzer of sanguine cells ABC Vet (ABX DIAGNOSTICS). Of the 40 rats used for microscopical analysis, 5 rats (group test) and 5 rats (group control) were sacrificed in the 24 hours, 3 days, 7 days and 14 days. In the 8 rats used for macroscopic analysis, being 4 rats (group test) and 4 rats (group control), the wounds had been photographed in the baseline , 24 hours, 3 days, 7 days and 14days and the images had been analyzed by morphometry software (ImageLab2000®). The specimens had been processed for macroscopic and

microscopic analysis. All the data had been submitted to a quantitative analysis and the data got by the software had been also submitted to statistic analysis. The results of this research had suggested that, even so do not produce toxic or harmful effect, the PRP does not act on the dermal wound healing in rats.

Keywords: tecidual healing, wound contraction, treatment, platelet-rich plasma

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – “punch”	32
Figura 4.2 – Obtenção do PRP.....	34
Figura 4.3 – PRP (gel).....	34
Figura 4.4 - Delimitação do perímetro da ferida cirúrgica.....	38
Figura 4.5 - Cálculo da área da ferida cirúrgica.....	38
Figura 4.6 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 24 horas.....	41
Figura 4.7 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 3 dias.....	42
Figura 4.8 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 7 dias.....	42
Figura 4.9 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 14 dias.....	43
Figura 5.1 – Fotografias das feridas de acordo com os grupos e períodos.....	46
Figura 5.2 – Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 24 horas (25x).....	48
Figura 5.3 – Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 24 horas (100x).....	49

Figura 5.4 – Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 3 dias horas (100x).....	49
Figura 5.5 – Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 7 dias (25x).....	50
Figura 5.6 – Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 7 dias (100x).....	50
Figura 5.7 – Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 14 dias (100x).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1- Dados da análise morfométrica com relação à porcentagem de perímetro, área e fator de forma.....	45
Tabela 5.2 - Dados da análise histomorfológica de acordo com escala arbitrária de expressão – comparação entre momentos dentro de cada grupo.....	53
Tabela 5.3 - Dados da análise histomorfométrica digital.....	56
Tabela 5.4 – Dados da análise histomorfométrica digital – comparação entre os momentos de observação (grupo teste).....	57
Tabela 5.5 – Dados da análise histomorfométrica digital – comparação entre os momentos de observação (grupo controle).....	58
Tabela 5.6 - Dados da análise histomorfométrica – comparação entre os momentos dentro do grupo controle.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FGF	Fator de crescimento fibroblástico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
ICB	Instituto de ciências Biológicas
IGF	Fator de crescimento insulínico
IGF-I	Fator de crescimento insulínico tipo I
IGF-II	Fator de crescimento insulínico tipo II
IL-1	Interleucina tipo 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF aa	Fator de crescimento derivado de plaquetas tipo aa
PDGF bb	Fator de crescimento derivado de plaquetas tipo bb
PDGF ab	Fator de crescimento derivado de plaquetas tipo ab
PRP	Plasma rico em plaquetas
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TGF	Fator de crescimento transformador
TGF – α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF – β	Fator de crescimento transformador beta
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SIMBOLOS

°C	Grau Celsius
Cc	Centímetros cúbico
cm	Centímetros
μm	Micrometro
μg	Microgramas
dpi	Dots per Inch = Pontos por Polegada
g	Grama
h	Hora
KDa	Quilodaltons
Kg	Quilograma
ml	Mililitro
mg	Miligramas
MHz	Um milhão de Hert
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mm ³	Milímetro cúbico
pmol	Picomol
rpm	Rotação por minuto
X	Vezes
%	Por cento
+/-	Desvio Padrão
π	pi = 3,14...

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Reparação tecidual	19
2.2 Considerações sobre aplicações clínicas.....	23
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Amostra experimental.....	31
4.2 Procedimento cirúrgico	31
4.3 Obtenção do plasma	33
4.4 Contagem de plaquetas	34
4.5 Cuidados pós-operatórios.....	35
4.6 Avaliação pós-cirúrgica	35
4.7 Procedimento histológico	36
4.8 Avaliação macroscópica.....	37
4.9 Avaliação microscópica.....	39
4.9.1 Análise histomorfológica.....	39
4.9.2 Análise histomorfométrica	39
5 RESULTADOS	44
5.1 Avaliação macroscópica – análise morfométrica.....	44
5.2 Avaliação microscópica.....	47
5.2.1 Análise histomorfológica.....	47
5.2.2 Análise histomorfométrica	55
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de reparação tecidual é um fenômeno observado nos seres vivos e de grande importância para sua sobrevivência, quando ocorrem lesões acidentais ou cirúrgicas.

A reparação é um processo biológico que envolve fatores sistêmicos e locais. Os eventos da reparação da derme podem ser agrupados em três fases, a inflamatória, a proliferativa ou de fibroplasia, e a maturação ou remodelação. Estas fases são separadas apenas didaticamente, ocorrendo na realidade superposição e transição contínua e gradual de uma fase para outra. A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão, e envolve fenômenos vasculares, coagulação sangüínea, migração de células inflamatórias e liberação de fatores de crescimento. A fase de fibroplasia é caracterizada pela formação de tecido de granulação e pela contração tecidual. O tecido de granulação contém numerosos capilares neoformados, macrófagos, fibroblastos e matriz extracelular. A remodelação dessa matriz ocorre por meio da contração tecidual, processo biológico que diminui a dimensão dos tecidos conectivos envolvidos na lesão (Fundamentos de Medicina Estética e Laser, [2009]).

A reparação tecidual de uma área submetida a um trauma depende da presença das plaquetas. Elas têm papel importante na hemostasia e constituem uma das principais fontes de fatores de crescimento. Dessa forma, a aplicação de concentrados autógenos derivados de plaquetas, em uma área submetida a uma lesão acidental ou cirúrgica, pode promover uma melhor hemostasia e acelerar o processo de reparação (PIETRZAK et al, 2007; SANTOS, SANTOS, 2004).

As plaquetas são células sanguíneas responsáveis pela liberação de mediadores químicos, denominados citocinas, que desencadeiam o processo de reparação tecidual. As citocinas, quando em grande quantidade, além de estimular, aceleram a reparação dos tecidos lesados (EPPLEY; WOODDELL; HIGGINS, 2004).

Relatos na literatura têm sugerido que os fatores de crescimento presentes nas plaquetas promovem uma potencialização da quimiotaxia, proliferação, diferenciação e secreção celular, podendo influenciar o tempo de reparação. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto autógeno, atóxico, sem risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas e fonte de fatores de crescimento. A estratégia é acelerar e otimizar o efeito dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas, os iniciadores da reparação tecidual (PIERCE et al., 1991; SANTOS; SANTOS, 2004).

Por ser um procedimento com poucos riscos e com resultados encorajadores segundo a literatura, a utilização dos fatores de crescimento plaquetário tem se difundido na odontologia e medicina.

O PRP tem sido usado com sucesso em regeneração periodontal (KAWASE et al., 2003; LYNCH et al., 1989; LYNCH et al., 1991; OBARRIO et al., 2000; OKUDA et al., 2003; PETRUNGARO, 2001; PETRUNGARO, 2002b; WANG et al., 1994); áreas de reconstrução oral e maxilo-facial (LIND, 1996; SLATER et al., 1995) e como procedimentos adjunto relacionado com a instalação de implantes osseointegrados (LYNCH et al., 1991; PETRUNGARO, 2001; PETRUNGARO, 2002a).

Têm sido pesquisados e comprovados efeitos biológicos com uso do PRP em tecidos moles, como por exemplo, estimulação da reparação de feridas epiteliais em pacientes com úlceras crônicas (ANITUA, 2007; CROVETTI et al., 2004; KNIGHTON et al., 1986) e pacientes com feridas agudas (KAZAKOS et al., 2008), síntese de

colágeno e neovascularização em córneas de coelhos (KNIGHTON et al., 1982), estímulo da síntese de DNA e quimiotaxia de fibroblastos e células do músculo liso, síntese de colágeno, glicosaminoglicanas e colagenase pelos fibroblastos *in vitro* (LYNCH et al., 1987), regeneração de tecido conjuntivo e reepitelização de feridas cirúrgicas em animais envolvendo a derme e epiderme (CARTER et al., 2003; LYNCH; COLVIN; ANTONIADES, 1989; PIETRZAK et al., 2007; WATANABE; MORI, 2005).

Nos estudos realizados com PRP em pacientes com úlceras não foi realizada a padronização dos diâmetros das feridas (ANITUA, 2007; CROVETTI et al., 2004; KAZAKOS et al., 2008; KNIGHTON et al., 1986) e nos estudos realizados em animais foram utilizadas amostras pequenas (CARTER et al., 2003; LYNCH; COLVIN; ANTONIADES, 1989; PIETRZAK et al., 2007) ou foram realizadas feridas cirúrgicas lineares (WATANABE; MORI, 2005).

Neste contexto, seria interessante pesquisar os efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas na reparação de feridas dérmicas padronizadas no dorso de ratos, como uma terapia inicial importante para subsídio científico que fundamente seu possível uso clínico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reparação Tecidual

A reparação tecidual depende do local em que se encontra a ferida cirúrgica, tornando-se mais lenta em áreas submetidas a constantes movimentos estimulados. Áreas de boa vascularização reparam mais rapidamente quando comparadas a locais pouco vascularizados. De acordo com Graziani (1986), na reparação por segunda intenção, ocorre organização de tecido de granulação que, posteriormente, se epitelizará. Esse processo é lento e pode demorar semanas ou meses.

A reparação tecidual consiste em eventos progressivos e ordenados, caracterizada por várias fases concomitantes, reguladas por eventos biológicos específicos, que se iniciam no momento do trauma e permanecem por períodos variados (GREGORY, 1999).

Para Anitua (1999), os fatores de crescimento presentes nas plaquetas, mais freqüentemente citados na literatura, são PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de crescimento e transformação beta), IGF (fator de crescimento similar à insulina) EGF (fator de crescimento epidérmico) e; a-FGF e b-FGF (fator de crescimento de fibroblastos ácido e básico respectivamente).

Segundo Marx (2001), os sete fatores de crescimento encontrados no plasma rico em plaquetas (PRP) são PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\alpha\beta$, PDGF $\beta\beta$, TGF β_1 , TGF β_2 , VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e EGF.

Knighton et al. (1982) isolaram plaquetas e fibrina livre de plaquetas do sangue de coelhos, coletados por punção cardíaca, e avaliaram diferentes preparações de plaquetas, obtidas do PRP, após centrifugação, os quais foram injetados nas córneas dos coelhos. Postularam que plaquetas ativadas pela trombina liberam PDGF que inicia a resposta celular da reparação, sendo responsável pelo início da síntese de colágeno e neovascularização.

Eppey, Woodell e Higgins (2004) selecionaram 10 pacientes que seriam submetidos à cirurgia plástica e coletaram amostras de sangue (55cc) utilizando seringas de 60cc contendo no seu interior 5cc de solução de citrato de dextrose (anticoagulante). O PRP foi obtido após centrifugação, durante 12 minutos, a uma velocidade de 3200 rpm. Coletaram também amostra de sangue (total) em uma seringa de 12cc, contendo 1cc do mesmo para servir como controle. O PRP e o sangue total foram acondicionados em tubos contendo 1000 unidades de trombina bovina por milímetro de cloreto de cálcio a 10 %. Após a formação de um coágulo firme, esses tubos foram centrifugados por 5 minutos a uma velocidade de 3200rpm. Análise foi realizada para as amostra de sangue total (controle) e PRP de cada participante do estudo. As plaquetas foram quantificadas através da mensuração de P selectina, que adere a receptor específico destas células, tornando-as ativas. Os fatores de crescimento mensurados foram PDGF-BB, TGF- β 1, VEGF, EGF e IGF-1. Reações imunohistoquímicas foram empregadas para essas análises. Foi verificado que o PRP apresentou um aumento do número de plaquetas em média de 197.000 ± 42.000 plaquetas/ μ l para $1.603.000 \pm 330.000$ plaquetas/ μ l. As mensurações do sangue total variaram de 142.000 a 263.000 plaquetas/ μ l. Em relação aos fatores de crescimento observou-se que o conteúdo de PDGF, TGF- β 1, VEGF e EGF foi significativamente maior que nas amostras de sangue total. Não existiu diferença

estatisticamente significativa nas mensurações do IGF-1 obtidas do sangue total e do PRP.

Lynch et al. (1987) estudaram o efeito sinérgico do PDGF com outros fatores de crescimento, na reparação de feridas. O PDGF *in vitro* estimula a síntese de DNA e quimiotaxia de fibroblastos e células do músculo liso, síntese de colágeno, glicosaminoglicanas e colágenase pelos fibroblastos. Estas propriedades, *in vitro*, sugerem que o PDGF liberado pelas plaquetas no local da lesão, *in vivo*, pode desempenhar papel importante na iniciação do processo de reparação de feridas. Este estudo verificou que a adição do PDGF puro na ferida tem pouco efeito na morfologia ou bioquímica da reparação da epiderme e derme. Em contraste, a adição de PDGF, parcialmente purificado, resulta em significativo aumento, dose-dependente, na largura de um novo tecido conjuntivo sintetizado e camada epidérmica. Observou-se um aumento no número de células no novo tecido conjuntivo e na camada epitelial. Além disso, a adição de PDGF parcialmente purificado resulta em significativo aumento na taxa de síntese de proteína e de DNA. Efeito similar foi obtido quando o IGF-I foi adicionado, em combinação com PDGF puro. O IGF-I aplicado isoladamente não causou mudanças significantes na morfologia. O EGF isolado, ou em combinação com o PDGF, resultou em espessamento somente da epiderme. Estes resultados indicam que ação sinérgica de outros fatores de crescimento com o PDGF são importantes na modulação do processo de reparação de feridas.

Para Solheim (1998), o número de receptores ativos de uma célula geralmente diminui quando um fator de crescimento está em excesso (regulação para menos), enquanto eles aumentam quando há uma deficiência de fatores (regulação para mais). O PDGF é um dímero de dois peptídeos, A e B, que

compartilham 60 % da cadeia de aminoácidos homólogos. Seu peso molecular varia de 28 a 35 kDa (quilodaltons). Age como fator de crescimento sistêmico e como fator de crescimento local no osso, especialmente na forma PDGF-AA. Esses PDGF são sintetizados pelas plaquetas, monócitos, macrófagos e células endoteliais, e influenciam a maioria das células de origem mesodérmica. Duas subunidades de receptores de PDGF têm sido demonstradas, alfa e beta, e a ativação de ambas é necessária para que ocorra uma resposta máxima. Interleucina tipo-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e TGF- β 1 afetam a agregação de PDGF aos seus receptores. Os TGF- β são homodímeros com 25 kDa que compartilham 60 a 80 % de similaridade em suas cadeias de aminoácidos. Outros fatores de crescimento a serem levados em consideração seria a família dos FGF que consiste de nove tipos, com estruturas similares a polipeptídeos. Os mais comuns e abundantes no ser humano são as formas ácida (a-FGF) e básica (b-FGF), que têm 16 e 17 kDa de peso molecular, respectivamente, e aderem ao mesmo receptor. Parecem estar relacionados com processo de reparação normal. No mesmo estudo também ressaltaram a família dos IGF que podem ser do tipo I (IGF-I) ou II (IGF-II) com peso molecular de 7,5 e 8,7 kDa respectivamente.

De acordo com Padgett e Patterson (2001), após revisão sobre as funções de TGF β , esses fatores de crescimento são sintetizados por tecidos específicos, os quais, em muito baixa concentração, vão agir como reguladores locais das funções celulares. Estes fatores provocam sua ação ao aderirem à receptores específicos na superfície celular de células alvo. Aderindo à porção extracelular destes receptores, ativam, na porção intracelular, suas enzimas (quinases). Estas enzimas ativam uma cascata de eventos que leva à transcrição do gene em um RNAm (RNA

mensageiro) que é então traduzido em proteínas que podem ser utilizadas pela célula, ou exportadas.

2.2 Considerações sobre aplicações clínicas

Ao avaliarem 49 pacientes, dos quais 29 diabéticos, que possuíam úlceras crônicas não reparadas, Knighton et al. (1986) abordaram o uso de fatores de crescimento de plaquetas na estimulação da reparação de feridas epiteliais crônicas. Verificaram que esses fatores, aplicados topicamente, promoveram a reparação em 100% das lesões. O período de reparação foi, em média, de 10,6 semanas, sendo que estas feridas estavam recebendo tratamento convencional há um tempo médio de 198 semanas.

Os efeitos da aplicação tópica de 125-1500mg de PDGF, EGF, IGF-I, FGF, TGF- α e TGF- β , em 30 μ l de gel de metilcelulose (veículo inerte), até 45 minutos após a criação de feridas no dorso de porcos Yorkshire, foram avaliados por Lynch, Colvin e Antoniades (1989). Quando o PDGF-2, IGF-I, EGF e FGF foram utilizados isoladamente, pouco ou nenhum efeito foi obtido. Por outro lado, a combinação do PDGF e do IGF produziu aumento considerável na regeneração de tecido conjuntivo (aumento de quatro vezes) e epitelização da ferida (aumento de duas vezes na espessura da derme e epiderme). O TGF- α foi capaz de substituir parcialmente o IGF-I na ação sinérgica com o PDGF, mostrando, entretanto, aumento variável na espessura do epitélio e diferenciação anormal, caracterizada pela presença de áreas com disceratose. O FGF não apresentou bons resultados, mesmo quando

combinado com outros fatores de crescimento, enquanto que o TGF- β foi aquele que apresentou os melhores resultados individualmente, aumentando a síntese de colágeno e o número de fibroblastos. De modo oposto, causou diferenciação anormal de ceratinócitos e inibiu o crescimento de células epiteliais. Outra característica mostrada foi o acúmulo de fagócitos mononucleares, provavelmente decorrente do efeito quimioatrativo deste sobre monócitos, especialmente macrófagos, levando à angiogênese.

Carter et al. (2003) avaliaram o potencial de dois fatores de crescimento contidos no PRP, PDGF-AB e TGF- β 1, em feridas dérmicas padronizadas em um cavalo de puro sangue com 16 anos de idade. Foram realizadas feridas cirúrgicas abaixo do joelho, distantes 3 cm uma da outra. Três modalidades de tratamento foram comparadas: somente gaze (controle), solução salina fisiológica (controle) e PRP (teste). As biópsias foram realizadas após 7, 36 e 79 dias e as lâminas obtidas foram coradas com HE e tricômio de Masson. Utilizando o método ELISA verificou-se que os fatores de crescimento estavam elevados no PRP. Também foi realizado coloração com citoceratina 10, que é um marcador de diferenciação de ceratinócitos suprabasais. Após 7 dias verificou-se que as feridas tratadas com PRP apresentavam grande quantidade de citoceratina 10 distribuídos nas camadas suprabasais da epiderme, enquanto que, nos grupos controles, o marcador estava em menor quantidade e restrito a uma área apical da epiderme. Após 36 dias, observou-se presença de mais células divididas na camada espinhosa no grupo do PRP, em comparação aos demais grupos. Após 76 dias não se observou diferença entre os grupos quanto a esse aspecto. Entretanto, após esse período, o grupo do PRP apresentava grande quantidade de feixes de fibras colágenas densas,

orientadas paralelamente umas as outras, enquanto os grupos controles mostraram poucas fibras colágenas e orientadas aleatoriamente.

Crovetti et al. (2004) promoveram aplicação semanal de gel de concentrado de plaquetas em 24 pacientes com úlceras cutâneas crônicas de diferentes etiologias. Três pacientes foram tratados com gel autógeno de plaquetas e os demais com gel homólogo de plaquetas. Em 9 pacientes observou-se completa reparação das úlceras e em 7 pacientes ocorreu diminuição de 50% da área das feridas, após uma média de 10 aplicações de gel de plaquetas. Dois pacientes receberam enxertos de pele antes das aplicações e não se sabia o tamanho das úlceras, 2 pacientes ainda estão sob tratamento e 4 interromperam o tratamento. Foi verificado, em todos os casos acompanhados, aumento da formação de tecido de granulação e redução da dor, mas a completa reepitelização foi mais lenta.

Anitua (2007), realizaram um estudo em 14 pacientes com o intuito de avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas na reparação de úlceras cutâneas crônicas, com diâmetros inferiores a 12 cm. A amostra inicialmente consistia em 7 pacientes do grupo teste (PRP) e 7 pacientes do grupo controle (solução salina fisiológica 0,9%). Cinco pacientes do grupo teste e 4 pacientes do grupo controle permaneceram até a finalização do estudo. O total de 14 úlceras foi avaliado. As lesões foram fotografadas com câmera digital e submetidas a um software para analisar a área de cada ferida. Também foram realizados, previamente, em 25 pacientes, as quantificações de plaquetas e de fatores de crescimento do PRP obtido pelo método empregado na pesquisa. Foi verificado que o PRP empregado induziu à liberação de diferentes fatores de crescimento dos grânulos α plaquetários. Também se observou uma correlação direta entre o número de plaquetas e alguns fatores de crescimento, tais como, PDGF, TGF- β 1, VEGF e

EGF, sugerindo que as plaquetas são a principal fonte de fatores de crescimento. Após avaliação semanal, por um período de 8 semanas, constataram que as úlceras tratadas com PRP mostraram maior área de reparação do que as do grupo controle, estatisticamente significativa, durante todos os períodos de avaliação.

Pietrzak et al. (2007) realizaram um estudo no dorso de 3 porcos, nos quais foram removidos um retângulo na pele (6cm x 8 cm x 1 cm). Foram realizadas 3 feridas cirúrgicas em cada animal, sendo uma para tratamento com PRP, outra para tratamento com plasma pobre em plaquetas (PPP) e outra para controle. Após o tratamento, foi colocado, em cada ferida, uma gaze estéril por 5, 10, e 15 minutos para absorver o exsudato e, dessa forma, permitir sua mensuração. As gazes foram pesadas individualmente e em seguida foram dissolvidas com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em elevada temperatura para obtenção de ferro inorgânico. Realizou-se a filtragem desse elemento químico que foi mensurado através absorção atômica (espectroscopia). Foi observado que o exsudato e íons ferro foram significativamente menores nas feridas tratadas com PRP do que nas tratadas com PPP e do que nas feridas do grupo controle, em todos os tempos. O PPP não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, após o período de 5 minutos, entretanto, após os períodos de 10 e 15 minutos, mostrou-se estatisticamente superior. Os autores salientaram que tanto o PRP como PPP podem ser aplicados na forma de gel para selagem de feridas cirúrgicas, possibilitando menor sangramento, uma vez que apresentam propriedades hemostáticas por apresentarem um complexo de proteínas de plasma da cascata de coagulação (complemento). Assim, enfatizaram a importância da hemostasia durante a cirurgia para minimizar os riscos ao paciente e favorecer resultados clínicos favoráveis.

Aplicações únicas de PDGF-BB (2 µg/80 pmol) e TGF-β1 (20 µg, 600 pmol) foram utilizadas por Pierce et al. (1989) em incisões lineares realizadas no dorso de ratos. Cada um dos fatores promoveu a força necessária ao fechamento das feridas em 5 dias após sua confecção, em até 212% acima do controle. A análise histológica das feridas tratadas demonstrou resposta quimiotática de macrófagos e fibroblastos, tanto para o PDGF, quanto para o TGF. Entretanto, a resposta à segunda substância foi significativamente inferior à primeira. Além disso, esse efeito foi observado em períodos de tempos prolongados (7 semanas) apenas para o PDGF-BB. Após 21 dias, as feridas tratadas com este produto mostraram aumento persistente do número de fibroblastos e tecido de granulação. Macrófagos e fibroblastos isolados destas feridas apresentaram níveis intracelulares mais acentuados de TGF-β, sugerindo que essa substância atrairia transitoriamente os fibroblastos, podendo estimular diretamente a síntese de colágeno.

Watanabe e Mori (2005) selecionaram 30 ratos (Fisher) para a realização de um estudo no qual foram realizadas feridas cirúrgicas cutâneas lineares, paralelas com 6 cm de espessura total. Em 15 ratos, foi colocado 0,2 ml de cola de fibrina nos bordos de uma das feridas e na outra ferida não foi utilizado nenhum veículo. Nos outros 15 ratos, uma ferida foi tratada com 0,2 ml de cola de fibrina e a outra ferida foi tratada com 0,2 ml de cola de fibrina contendo PRP. Todas as feridas foram suturadas em três pontos com fio de sutura absorvível 5.0 e cobertas com curativo. Os animais foram sacrificados após 3, 7 e 14 dias e obtidos espécimes excluídas de tecido muscular e tecido adiposo com dimensões de 3 cm de comprimento por 1,5 cm de largura e com o fio de sutura no centro. Foram confeccionadas lâminas que foram coradas com tricômio de Masson. A análise histológica mostrou diferenças no progresso da reparação das feridas cirúrgica entre

os três grupos. No terceiro dia foi observado reepitelização na parte interna dos bordos da ferida nos grupos que foram tratados somente com cola de fibrina e com associação de cola de fibrina e PRP, enquanto no grupo controle não tinha ocorrido reepitelização. No sétimo dia observou-se um aumento na organização dos feixes de fibras colágenas e um avanço relativo na reepitelização no grupo tratado com cola de fibrina associada ao PRP quando comparado aos demais grupos. Após 14 dias todas as feridas apresentaram grande quantidade de feixes de fibras colágenas, entretanto somente as feridas tratadas com cola de fibrina associada ao PRP apresentaram rica neovascularização. Dessa forma, os autores concluíram que o PRP acelera a reparação de feridas cirúrgicas incisionais.

Kazakos et al. (2008) realizaram um estudo em 59 pacientes com feridas agudas de pele, dos quais, 32 pacientes (grupo controle) foram tratados pelo método convencional, através lavagem tópica, remoção de tecido necrótico e curativo com gaze vaselinada a cada dois dias. Vinte e sete pacientes (grupo teste) foram tratados com lavagem, aplicação tópica de gel de PRP e curativo com gaze esponjosa, uma vez por semana. Após uma, duas e três semanas, foi observado uma melhor reparação estatisticamente significativa no grupo teste do que no grupo controle. O tempo requerido para realização de cirurgia foi estatisticamente menor nos pacientes tratados com PRP. Não existiu, entre os grupos, diferença estatisticamente significativa em relação à dor no final da primeira semana, entretanto após a segunda e terceira semanas, os pacientes do grupo teste apresentaram menos dor que os pacientes do grupo controle.

Tendo em vista os resultados descritos na literatura, em relação aos benefícios da utilização do PRP em melhorar a reparação de tecidos moles,

propusemos-nos avaliar os efeitos do PRP na reparação por segunda intenção de feridas cirúrgicas no dorso de ratos.

Optamos por utilizar ratos, como modelos de estudo, já que os eventos do processo de reparação em seus tecidos moles podem ser relacionados com os eventos do processo de reparação em humanos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas (PRP) na reparação tecidual de feridas dérmicas induzidas em ratos por meio de avaliação macroscópica e microscópica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra experimental

Neste trabalho foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), adultos jovens, machos, com peso variável entre 250 e 300g, procedentes da Faculdade de Veterinária da USP. Os animais foram mantidos por um período de 20 dias no biotério do ICB da USP para adaptação ao novo ambiente, sendo alimentados com ração comercial granulada para roedores (Labina, Purina) e água *ad libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética em Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) com protocolo nº 01/05 (Anexo A).

4.2 Procedimento cirúrgico

Após pesados, todos os ratos foram submetidos a uma intervenção cirúrgica, sob anestesia geral pela aplicação intra-peritoneal de cloridrato de cetamina (Dopalen® - Vetbrands) na dose de 100 mg/kg de peso corporal e cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer SA) na dose de 8,0 mg/kg de peso corporal. Em seguida, com uma lâmina de barbear, procedeu-se a tricotomia no dorso dos

animais envolvendo uma área de aproximadamente 3,0 cm de comprimento e 2,0 cm de largura, na região lombar. Foi realizada a anti-sepsia destas áreas com solução de digluconato de clorexidina a 2 %.

Para a realização do procedimento cirúrgico foi utilizado um motor com controle de torque (BLM 550 – Driller ®) para padronizarmos a força (400 rpm) durante a realização da ferida cirúrgica. Removeu-se em cada rato um fragmento de tecido mole, na altura da crista ilíaca, com um “punch” de 5mm de diâmetro, previamente preparado, no qual foi confeccionado um sulco demarcador à dois milímetros da borda cortante do mesmo, com o objetivo de padronizar o diâmetro e a profundidade das feridas durante o ato cirúrgico (Figura 4.1). Cada fragmento foi removido com uma pinça dente de rato e uma lâmina de bisturi 15 C. O ato operatório transcorreu sem contaminação e com o menor trauma possível e foi realizado por um único cirurgião.

Figura 4.1– “Punch” (5mm x 2mm)

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (20 ratos para cada grupo). No grupo controle, após a remoção do fragmento, a ferida cirúrgica foi umedecida com soro fisiológico. No grupo teste, após a remoção do fragmento, a ferida cirúrgica foi coberta com gel de PRP. Em todos os grupos, a área cirúrgica foi protegida com uma gaze e micropore (3M), que foi removida, após 24 horas.

4.3 Obtenção do PRP

Foram colhidos 2,5ml de sangue, por punção cardíaca, com uma seringa estéril contendo 250 µl de citrato de sódio a 10 % e colocados em dois tubos de Eppendorf de 1,5ml. Os tubos contendo o sangue foram centrifugados (Allegra 21R Centrifuge Beckman®), a uma força centrífuga relativa de 160g, durante seis minutos, à temperatura ambiente. (Ocorreu a separação do sangue em dois componentes básicos, células vermelhas do sangue (fundo do tubo), plasma com concentrado de plaquetas na porção superior (ANITUA, 1999).

Para o grupo teste, aspiramos, de cada tubo, com uma micropipeta estéril (Lappette-Labnet) 0,25ml de plasma situado próximo do limite da divisão com as células vermelhas (Figura 4.2). Obtivemos 0,5ml de plasma com concentrado de plaquetas que foi para outro tubo (Eppendorf) contendo 20 µl cloreto de cálcio 10% (laboratório Unipharmus) para a obtenção de um gel de consistência amolecida. Este gel foi colocado sobre a ferida cirúrgica (Figura 4.3). O período após coleta do sangue do rato, a obtenção do plasma e a sua utilização para o propósito deste trabalho não ultrapassou 4 horas, visto que a meia vida do PDGF é de 4,2 horas (LYNCH et al. 1989).

Figura 4.2 – Obtenção do PRP

Figura 4.3 – PRP (gel)

4.4- Contagem das plaquetas

Foi obtido o PRP de 5 ratos de mesma linhagem, idade, sexo, peso e origem dos ratos utilizados para o grupo teste, utilizando o mesmo método de obtenção, porém sem a fase geleificação. A amostra de PRP de cada um destes animais foi colocada em um Eppendorf de 1,5ml e foi utilizada para a determinação do número de plaquetas. Estas análises foram realizadas no analisador automático de células sanguíneas ABC Vet (ABX DIAGNOSTICS).

Realizamos a média e o desvio padrão da quantificação das plaquetas presentes 0,5 ml de plasma coletados de 5 animais. Obtivemos uma média de $749 \times 10^3/\text{mm}^3$ de PRP (Anexo B). Os valores do número de plaquetas no sangue total de ratos variam de $140\text{-}600 \times 10^3/\text{mm}^3$ de acordo com o “Coulter counter” (contador automático de células) utilizado para esse procedimento.

Segundo Marx (2001) o PRP é a concentração de pelo menos 1.000.000 de plaquetas por mm^3 de plasma em um volume de 5 ml e que não existiriam evidências que justificassem melhor reparação se não fosse alcançada essa contagem. Em nosso estudo utilizamos 0,5ml de plasma, portanto a quantificação das plaquetas mostrou-se viável.

4.5 Cuidados pós-operatórios

Todos os ratos foram alimentados com ração para roedores fragmentada e água *ad libitum*.

4.6 Avaliação pós-cirúrgica

Os animais foram sacrificados no período de 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias de pós operatório, por dose letal de anestésico. Em cada período foram sacrificados

10 animais, 5 amostras do grupo teste e 5 do grupo controle. Após o sacrifício, foi obtida, de cada animal, uma peça cirúrgica da região submetida à cirurgia.

4.7 Processamento histológico

Todos os procedimentos laboratoriais foram criteriosamente realizados. As peças cirúrgicas, obtidas após o sacrifício dos animais, foram processadas, pelo mesmo profissional, na Disciplina de Patologia Bucal e Disciplina de Patologia Geral, do Departamento de Estomatologia da FOU SP.

As amostras teciduais colhidas foram imediatamente submetidas ao seguinte processo: fixação em solução de formol a 10%, por um período mínimo de 24 horas, à temperatura ambiente; lavagem em água corrente, por meia hora; desidratação em uma seqüência de álcool etílico a 70%, 80%, 90%, 95%, álcool absoluto, permanecendo por 5 minutos em cada álcool; diafanização em xilol I, II, por 5 minutos em cada xilol; banho em parafina fundida na estufa, a 58°C, onde permaneceram por pelo menos 24 horas à temperatura ambiente; corte semi-seriado, num plano perpendicular à superfície da derme, na região central da ferida cirúrgica, permitindo amostras do interior da ferida e dos tecidos circunvizinhos, usando-se um micrótomo de rotação (RM2045, Jung-Leica) calibrado para a espessura de 5µm; coloração feita com hematoxilina-eosina (HE)

4.8 Avaliação macroscópica

Foram utilizados 8 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), sendo 4 ratos para o grupo teste e 4 ratos para o grupo controle com o intuito de avaliarmos macroscopicamente as feridas cirúrgicas. As amostras foram fotografadas no “baseline”, 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias por meio de câmera digital (D70 Nikon®) e objetiva de 105mm (AF micro Nikkor Nikon®) afixadas em uma estativa, de forma a manter a padronização de distância focal. Cada animal foi anestesiado, em todos os períodos, para a realização das fotografias, dessa forma foi possível avaliar, no mesmo animal, o processo de reparação da ferida nos momentos de observação.

As imagens das feridas foram submetidas ao software Adobe® Photoshop® Elements 6.0, e transferidas para o software de morfometria digital (Imagelab2000®) utilizando um computador Pentium® IV, 512 MHz, monitor HP Pavillion®, 800X600 dpi. Essa avaliação foi feita pelo mesmo examinador que não teve conhecimento da identificação das amostras e que foi submetido a um período de padronização para esta avaliação.

As feridas foram analisadas pelo software quanto à porcentagem de perímetro (Figura 4.4) e área (Figura 4.5), medidas em mm², bem como quanto à relação entre essas duas dimensões, obtendo-se o fator de forma (fator de forma = $3\pi \times \text{área}/\text{perímetro}^2$). A mesma análise foi realizada nas oito feridas, no “baseline”, 24 horas, 3 dias, 7 dias de pós-operatório, sendo que a média das feridas do “baseline” foi utilizada como referência inicial.

Figura 4.4 - Delimitação do perímetro da ferida cirúrgica

Figura 4.5 - Cálculo da área da ferida cirúrgica

Com essas dimensões obtiveram-se dados quanto ao processo de contração da ferida nos diferentes tempos experimentais. A contração tecidual foi considerada mais regular quanto mais próximo o valor do fator de forma estivesse do valor de referência, e irregular, quanto mais inferior ao mesmo.

Os dados obtidos por esta análise foram objeto de estudo quantitativo e, os referentes à área e ao fator de forma, também de estudo estatístico.

A análise do fator de forma serviu para termos certeza que o posicionamento da ferida cirúrgica no momento da realização das fotografias estava centralizado possibilitando uma melhor padronização das fotografias.

4.9 Avaliação microscópica

4.9.1 Análise histomorfológica

Os cortes corados com HE foram analisados em microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X. Esta análise foi realizada por um único observador que não conhecia os dados das amostras. Empregou-se uma escala arbitrária de expressão classificada de 0 a 3 (0=ausente; 1=discreto; 2=moderado; 3= intenso) para identificação de: reepitelização (RE), exsudato inflamatório (EI), presença de necrose (NE), edema (ED), vasos neoformados (NE), população de fibroblastos jovens (FJ), síntese de colágeno (CL). Para a presença ou ausência de crosta foi empregado “sim” ou “não” respectivamente. Com esta análise foi possível avaliar de forma quantitativa as diferenças histomorfométricas entre os grupos (FERNANDES et al., 2000; TRAINA, 2008).

4.9.2 Análise histomorfométrica

A aplicação do método morfométrico neste trabalho foi utilizado com a finalidade de demonstrar, em base numérica, a evolução do processo reparativo nas feridas cirúrgicas tratadas com PRP, quando comparadas às feridas cirúrgicas

tratadas com soro fisiológico. Foi realizada análise de histomorfometria digital, que seguiu protocolo estabelecido por Matos et al. (1994) e utilizado em outros diferentes trabalhos (FERNANDES et al., 2000; ROSSUM et al., 2007; TRAINA, 2008). Essa avaliação foi realizada pelo mesmo avaliador que não teve conhecimento da identificação das amostras e que foi submetido a um período de padronização para esta avaliação.

Para o estudo de histomorfometria digital, as imagens das lâminas histológicas coradas pelo HE foram capturadas por câmera tipo CCD (Sony®), acoplada a microscópio Joel® e placa de digitalização de imagens (Captivator®) e transferidas para software de morfometria digital (ImageLab 2000®), utilizando computador Pentium® IV, 512MHz, monitor Pavillion, 800X600 dpi. As imagens do campo histológico (aumento de 400X), na região da lesão induzida, foram digitalizadas e analisadas (em porcentagem de pixels) quanto à celularidade (quantidade de elementos celulares presentes, tais como células inflamatórias e fibroblastos, medida pela presença de tons roxos indicativas de núcleos celulares), ao espaço branco (podendo ser interpretado por edema, vasos sanguíneos, artefato e/ou espaços entre fibras colágenas dentro da matriz organizada) e quanto às fibras colágenas e matriz colagênica (medida pela porcentagem de tons róseos indicativas de tais fibras e matriz). Esses elementos teciduais forneceram uma estimativa da evolução do processo inflamatório/reparativo, em cada tempo experimental.

Para cada animal foram quantificados 12 campos consecutivos que foram distribuídos próximos às margens da ferida, nos períodos de 24 horas e 3 dias (6 campos em cada borda, sem envolver a base da ferida) e nos períodos de 7 e 14 dias em toda a extensão da ferida, ou seja, de uma borda da a outra (6 campos

próximos à superfície e 6 campos mais profundamente), conforme ilustração esquemática nas figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9.

Todos os dados obtidos por esta histomorfometria foram analisados de forma quantitativa e foram objetos de estudo estatístico, seguindo a metodologia descrita anteriormente.

Figura 4.6 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 24 horas

Figura 4.7 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 3 dias

Figura 4.8 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 7 dias

Figura 4.9 – Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 14 dias

5 RESULTADOS

Os resultados foram analisados adotando-se o nível de significância de 5% (0,050), para a aplicação dos testes estatísticos, ou seja, quando o valor da significância calculada (p) for menor do que 5% (0,050), observamos uma diferença “estatisticamente significativa” (marcada em vermelho); e quando o valor da significância calculada (p) for igual ou maior do que 5% (0,050), observamos uma diferença ou relação dita “estatisticamente não significativa”.

5.1 Avaliação macroscópica – análise morfométrica

Os resultados da análise morfométrica com relação à porcentagem de perímetro, área e fator de forma foram analisados através do teste de Mann-Whitney e estão demonstrados nas tabelas 5.1, e ilustrados pela figura 5.1.

Tabela 5.1 - Dados da análise morfométrica com relação à porcentagem de perímetro, área e fator de forma

Variável	Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Area_BL	Teste	4	16,99	1,98	0,149
	controle	4	14,53	2,16	
Perimetro_BL	Teste	4	15,86	0,84	0,054
	controle	4	14,40	0,86	
F_forma_BL	Teste	4	0,83	0,02	0,051
	controle	4	0,86	0,01	
Area_24h	Teste	4	13,64	2,54	0,083
	controle	4	11,17	1,89	
Perimetro_24h	Teste	4	14,26	1,29	0,083
	controle	4	12,84	0,93	
F_forma_24h	Teste	4	0,83	0,03	0,554
	controle	4	0,84	0,03	
Area_3d	Teste	4	10,56	2,63	0,149
	controle	4	8,69	2,08	
Perimetro_3d	Teste	4	12,51	1,70	0,149
	controle	4	11,38	1,37	
F_forma_3d	Teste	4	0,83	0,02	0,882
	controle	4	0,83	0,02	
Area_7d	Teste	4	4,91	3,57	> 0,999
	controle	4	4,33	0,52	
Perimetro_7d	Teste	4	8,09	3,59	> 0,999
	controle	4	8,21	0,60	
F_forma_7d	Teste	4	0,82	0,05	0,375
	controle	4	0,80	0,04	
	controle	4	3,77	1,19	

Figura 5.1 – Fotografias das feridas de acordo com os grupos e períodos

Foi verificado que não existiram diferenças estatisticamente significantes com relação a área e perímetro e fator de forma, entre os grupos teste e controle, nos quatro momentos de observação.

Devemos salientar que no período de 14 dias, todas as amostras (grupos teste e controle) apresentavam completa reparação da ferida cirúrgica ficando apenas o formato de uma cicatriz. Dessa forma, não realizamos a análise

morfométrica no período de 14 dias. Foi aplicado o teste de *Friedman*, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os momentos de observação com relação à área, perímetro e fator de forma, para os grupos teste (Anexo C) e controle (Anexo D).

O estudo estatístico de distribuição da área e de distribuição do perímetro verificou que em ambos os grupos estudados, houve diferenças significantes entre os períodos de avaliação, sendo maior no “baseline”, seguido em ordem decrescente pelos períodos 24 horas, 3, 7 dias.

O estudo estatístico de distribuição do fator de forma não verificou diferenças estatisticamente significantes no grupo teste nos diferentes tempos de observação. Entretanto houve diferenças estatisticamente significantes entre os cinco períodos no grupo controle, sendo maior no “baseline”, seguido em ordem decrescente pelos períodos 24 horas, 3, 7 dias.

5.2 Avaliação microscópica

5.2.1 Análise histomorfológica

Os dados da análise histomorfológica dos cortes corados com HE, de acordo com a escala arbitrária de expressão, foram comparados entre grupos e foi aplicado o Teste de *Mann-Whitney* com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os

dois grupos estudados, em cada momento de observação, ou seja, nos períodos de 24 horas (Anexo E), 3 dias (Anexo F), 7 dias (Anexo G) e 14 dias (Anexo H).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle em relação às variáveis estudadas (edema, exsudato inflamatório, neovascularização, necrose, colagenização, fibroblastos jovens, reepitelização, crosta), nos quatro períodos de observação (24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias).

Os principais aspectos histológicos analisados de forma quantitativa em microscópio de luz convencional de acordo com escala arbitrária de expressão estão ilustrados pelas figuras 5.2 a 5.7 e descritos a seguir:

Figura 5.3 – Fotomicrografia dos grupos controle (A) e teste (B) no período de 24 horas. Em A e B observa-se que o fundo do defeito apresenta edema, infiltrado inflamatório difuso, sem a presença de crosta. (HE, 100x)

Figura 5.4 – Fotomicrografia dos grupos controle (A) e teste (B) no período de 3 dias. Observa-se início da migração epitelial, crosta (material necrótico superficial), áreas focais hemorrágicas e vasos sangüíneos congestionados. Em (B) nota-se material fibrinoide com células inflamatórias, compatível com o plasma. (HE, 100x)

Figura 5.5 – Fotomicrografia dos grupos controle (A) e teste (B) no período de 7 dias. Em (A) nota-se reepitelização praticamente completa. Em (B) as bordas do epitélio ainda existem distanciamento com tecido necrótico interposto. (HE, 25x)

Figura 5.6 - Fotomicrografia dos grupos controle (A) e teste (B) no período de 7 dias. Em (A) nota-se que o tecido de granulação com grande quantidade de fibroblastos e intensa colagenização. Em (B) nota-se que o tecido de granulação é exuberante com grande quantidade de vasos sanguíneos e colagenização moderada. (HE, 100x)

Figura 5.7 - Fotomicrografia dos grupos controle (A) e teste (B) no período de 14 dias. Em (A) observa-se maturação epitelial com maior número de camadas, projeção conjuntiva e início da queratinização. Alguns anexos cutâneos são vistos nas bordas do defeito. O tecido de granulação é discreto, havendo substituição quase completa por colágeno. Em (B), a reepitelização está completa, um epitélio mais delgado em relação a (A) e plano. O tecido de granulação ainda é evidente com substituição paulatina por tecido conjuntivo. (HE, 100x)

Grupo Controle

- no período de 24 horas: os cortes histológicos mostraram fragmento de pele exibindo descontinuidade epidérmica e dérmica, tecido necrótico superficial, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear difuso, intenso edema estendendo-se para hipoderme e intensa congestão vascular.
- no período de 3 dias: observamos fragmento da pele com reepitelização avançada, formação da língua epitelial, presença de crosta superficial. Na derme observamos intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso e edema moderado.
- no período de 7 dias: observamos fragmento de pele com reepitelização quase completa, epitélio neoformado espesso e já exibindo queratina. Notamos remanescentes da crosta na superfície. Na derme notamos tecido de granulação exuberante com grande quantidade de fibroblastos e neovascularização.

- no período de 14 dias: observamos fragmento de pele exibindo reepitelização praticamente completa e substituição parcial do tecido de granulação por fibras colagênicas delicadas. O epitélio recém formado apresentou zonas atróficas e zonas de hiperplasia. Na hipoderme notamos regeneração muscular com discreto edema e presença de vasos sanguíneos congestos.

Grupo Teste

- no período de 24 horas: observamos fragmento de pele exibindo descontinuidade epidérmica e dérmica, início da formação da crosta superficial, intenso infiltrado inflamatório predominantemente superficial com difusão parcial para a hipoderme, intenso edema com material fibrinoide.

- no período de 3 dias: observamos fragmento de pele com reepitelização inicial, presença de crosta superficial exibindo tecido necrótico e grande quantidade de células inflamatórias. Áreas hemorrágicas foram vistas próximo da crosta. Na derme notamos infiltrado mononuclear com grande quantidade de macrófagos ao redor de material exógeno basófilo de granulação fina. Esse material é sugestivo de PRP, porém não está descartada a possibilidade de contaminação secundária.

- no período de 7 dias: observamos reepitelização parcial com língua epitelial exibindo epitélio com várias camadas, crosta superficial delicada. Na derme notamos tecido de granulação exuberante com grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados e macrófagos, mas na profundidade observamos células gigantes multinucleadas em meio ao material exógeno basofílico.

- no período de 14 dias: notamos reepitelização completa, queratinização no epitélio, tecido de granulação parcialmente substituído por fibras colágenas delicadas. Na

hipoderme observamos infiltrado inflamatório mononuclear localizado com presença de material exógeno basofílico em meio ao tecido conjuntivo neoformado e regeneração parcial do músculo.

Foi realizada a comparação entre os 4 momentos de observação, com o intuito de verificar possíveis diferenças, dentro de cada grupo, através do teste de *Kruskal-Wallis*. Estes dados estão nos Anexo I (grupo teste) e Anexo J (grupo controle).

Foi observado que as diferenças encontradas foram estatisticamente significantes em quase todas as comparações entre momentos dentro do mesmo grupo, dessa forma aplicamos o teste de *Mann-Whitney*, de modo a identificar quais os momentos diferem-se dos demais (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Dados da análise histomorfológica de acordo com escala arbitrária de expressão – comparação entre momentos dentro de cada grupo

Grupos	Par de Momentos	Variáveis							
		ED	EI	NV	NE	CL	FJ	RP	CR
Teste	24h x 3d	0,317	0,134	0,009	0,339	0,003	0,033	0,005	0,317
	24h x 7d	0,014	0,005	0,004	0,017	0,003	0,005	0,018	> 0,999
	24h x 14d	0,011	0,004	0,009	0,006	0,004	0,006	0,014	0,072
	3d x 7d	0,005	0,020	0,053	0,049	0,003	0,018	0,313	0,317
	3d x 14d	0,005	0,011	> 0,999	0,009	0,014	0,054	0,100	0,014
	7d x 14d	0,549	0,513	0,053	0,189	0,083	0,317	0,343	0,072
Controle	24h x 3d	0,439	0,136	0,018	0,116	0,053	0,077	0,032	—
	24h x 7d	0,032	0,004	0,005	0,011	0,004	0,006	0,032	—
	24h x 14d	0,009	0,004	0,004	0,021	0,004	0,006	0,006	—
	3d x 7d	0,147	0,309	0,021	0,080	0,154	0,014	> 0,999	—
	3d x 14d	0,085	0,309	0,189	0,233	0,082	0,014	0,174	—

Através da análise estatística observamos para ambos os grupos estudados que a expressão do edema e do exsudato inflamatório foi mais expressiva nos

períodos de 24 horas e 3 dias, porém sem diferença estatisticamente significativa entre esses períodos. Existiram diferenças estatisticamente significantes em relação ao EI, em ambos os grupos, quando comparamos os períodos 24 horas e 7 dias, 24 e 14 dias, sendo mais marcante em 24 horas. Em relação ao edema existiram diferenças estatisticamente significantes mais marcantes para o grupo teste quando comparamos os períodos 3 dias e 7 dias, 3 dias e 14 dias, sendo mais expressivo no terceiro dia. No grupo controle, existiram diferenças estatisticamente significante ao compararmos os períodos 24 horas e 7 dias, 24 horas e 14 dias, sendo mais expressivo no período de 24 horas.

Verificamos que no grupo teste a expressão de neovascularização foi maior nos períodos de 3, 7 e 14 dias em relação ao período de 24 horas, sem diferença estatisticamente significativa entre os períodos 3 dias e 7 dias, 3 dias e 14 dias, 7 dias e 14 dias. O mesmo foi observado no grupo controle, com exceção da comparação dos períodos 3 dias e 7 dias, na qual foi observado diferença estatisticamente significativa, sendo mais expressiva no período de 7 dias. Entre os períodos comparados a diferença estatisticamente significativa foi maior quando comparamos os períodos de 24 horas e 14 dias.

Em ambos os grupos a expressão de necrose foi maior no período de 24 horas que nos de mais períodos de observação com diferenças estatisticamente significantes entre os períodos 24 horas e 7 dias, 24 e 14 dias. No grupo teste também observamos diferenças estatisticamente significantes entre os períodos 3 dias e 7 dias, 3 dias e 14 dias.

Nos grupos teste e controle, a expressão colagenização apresentou-se ausente no período de 24 horas e com maior expressão no período de 14 dias. Verificamos diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os

períodos de 24 horas e 7 dias, 24 horas e 14 dias, em ambos os grupos. No grupo teste também observamos diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os períodos 24 horas e 3 dias, 3 dias e 7 dias, 3 dias e 14 dias.

Em ambos os grupos estudados, a presença de fibroblastos jovens foi mais intensa no período de 7 dias e menos intensa no período de 24 horas. Observamos diferenças estatisticamente significante entre os grupos 24 horas e 7 dias, 24 horas e 14 dias, 3 dias e 7 dias. Além disso, verificamos diferenças estatisticamente significante no grupo teste entre os períodos 24 horas e 3 dias e no grupo controle entre os períodos 3 dias e 14 dias.

A expressão de reepitelização, em ambos os grupos, foi mais expressiva no período de 14 dias, seguidos em ordem decrescente pelos períodos de 7, 3 dias. No grupo teste todas as amostras apresentavam--se ausentes dessa expressão e no grupo controle a maioria encontrava-se ausente e quando presente apresentava-se discreta. Verificou-se também em ambos os grupos diferenças estatisticamente significante entre os períodos 24 horas e 3 dias, 24 horas e 7 dias, 24 horas e 14 dias.

Não foi observado diferenças estatisticamente significantes entre os períodos avaliados no grupo controle em relação a expressão de crosta. Entretanto no grupo teste verificamos diferença estatisticamente significante quando comparamos os períodos 3 dias e 14 dias. Essa expressão foi mais marcante no terceiro dia.

5.2.2 Análise histomorfométrica

Os dados da análise histomorfométrica digital, com relação às porcentagens de celularidade, espaço branco e matriz colagênica, estão descritos na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Dados da análise histomorfométrica digital

Período	Variável	Grupo	n	Média %	Desvio-padrão (+/-)	Significância (p)
24 horas	Celularidade	teste	5	9,32	4,06	0,602
		controle	5	8,64	2,85	
	Espaço Branco	teste	5	51,98	18,65	0,465
		controle	5	40,34	9,83	
	Matriz Extracelular	teste	5	38,59	14,55	0,175
		controle	5	51,01	7,25	
Período	Variável	Grupo	n	Média (%)	Desvio-padrão (+/-)	Significância (p)
3 dias	Celularidade	teste	5	6,00	2,40	0,602
		controle	5	7,51	4,23	
	Espaço Branco	teste	5	51,11	3,71	0,754
		controle	5	50,94	8,47	
	Matriz Extracelular	teste	5	42,89	1,68	0,465
		controle	5	41,55	5,47	
Período	Variável	Grupo	n	Média %	Desvio-padrão +/-	Significância (p)
7 dias	Celularidade	teste	5	8,31	7,28	0,347
		controle	5	10,29	5,76	
	Espaço Branco	teste	5	40,18	17,41	0,465
		controle	5	30,32	10,66	
	Matriz Extracelular	teste	5	51,33	11,16	0,251
		controle	5	59,36	5,59	
Período	Variável	Grupo	n	Média %	Desvio-padrão +/-	Significância (p)
14 dias	Celularidade	teste	5	10,38	6,70	0,602
		controle	5	7,94	2,20	
	Espaço Branco	teste	5	36,31	13,11	0,347
		controle	5	29,80	8,63	
	Matriz Extracelular	teste	5	53,32	8,28	0,076
		controle	5	62,26	7,69	

Foi realizada a comparação entre os grupos teste e controle, para cada momento de observação, através do teste de Mann-Whitney, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os dois grupos estudados.

Pelo estudo quantitativo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle em relação às três variáveis estudadas nos quatro períodos de observação.

Utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*, realizamos a comparação entre os quatro momentos de observação para cada grupo. Os dados desta análise estatística estão descritos na tabela 5.4 (grupo teste) e 5.5 (grupo controle).

Tabela 5.4 – Dados da análise histomorfométrica digital – comparação entre os momentos de observação (grupo teste)

GRUPO TESTE	Variável	Momento	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
	Celularidade	24h	5	9,32	4,06	0,796
		3d	5	6,00	2,40	
		7d	5	8,31	7,28	
		14d	5	10,38	6,70	
		Total	20	8,50	5,29	
	Espaço Branco	24h	5	51,98	18,65	0,336
		3d	5	51,11	3,71	
		7d	5	40,18	17,41	
		14d	5	36,31	13,11	
		Total	20	44,89	14,99	
	Matriz Extracelular	24h	5	38,59	14,55	0,202
		3d	5	42,89	1,68	
		7d	5	51,33	11,16	
		14d	5	53,32	8,28	

Tabela 5.5 – Dados da análise histomorfométrica digital – comparação entre os momentos de observação (grupo controle)

GRUPO CONTROLE	Variável	Momento	N	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
	Celularidade	24h	5	8,64	2,85	0,946
		3d	5	7,51	4,23	
		7d	5	10,29	5,76	
		14d	5	7,94	2,20	
		Total	20	8,60	3,83	
	Espaço Branco	24h	5	40,34	9,83	0,030
		3d	5	50,94	8,47	
		7d	5	30,32	10,66	
		14d	5	29,80	8,63	
		Total	20	37,85	12,40	
	Matriz Extracelular	24h	5	51,01	7,25	0,005
		3d	5	41,55	5,47	
		7d	5	59,36	5,59	
		14d	5	62,26	7,69	

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no grupo teste, mas como duas variáveis do grupo controle (espaço branco e matriz extracelular) apresentaram diferença estatisticamente significativa, aplicamos o teste de *Mann-Whitney* com o intuito de identificarmos quais momentos diferenciavam entre si. Os dados desta análise estão descritos na tabela 5.6.

Tabela 5.6 Dados da análise histomorfométrica – comparação entre os momentos dentro do grupo controle

Variável	Par de Momentos					
	24h x 3d	24h x 7d	24h x 14d	3d x 7d	3d x 14d	7d x 14d
Espaço Branco	0,175	0,251	0,117	0,016	0,016	0,917

Verificamos no grupo controle diferenças estatisticamente significantes em relação à porcentagem de espaço branco quando comparamos os períodos 3 dias e 7 dias, 3 dias e 14 dias, sendo essa característica mais expressiva no período de 3 dias seguido em ordem decrescente pelos períodos de 7 dias e 14 dias.

Com relação à matriz extracelular, diferenças estatisticamente significantes foram observadas no grupo controle, quando comparamos os períodos 24 horas e 3 dias, 24 horas e 14 dias, 3 dias e 7 dias, 3 dias e 14 dias, sendo que a maior

porcentagem foi observada no período de 14 dias, seguido em ordem decrescente pelos períodos de 7 dias, 24 horas e 3 dias.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos do plasma rico em plaquetas na reparação tecidual de feridas dérmicas induzidas em ratos por meio de avaliação macroscópica e microscópica.

Com relação aos resultados da análise morfológica quantitativa foi observado que não existiram diferenças estatisticamente significantes com relação à área e perímetro, entre os grupos teste e controle, nos momentos de observação. Dessa forma, os resultados com relação à área e perímetro puderam sugerir que o PRP não mostrou atuação superior ao soro fisiológico na reparação das lesões teciduais. Entretanto, com relação às distribuições da área e do perímetro, houve diferenças estatisticamente significantes em ambos os grupos estudados, entre os períodos de avaliação, sendo maior no período “baseline” seguido em ordem decrescente pelos períodos 24 horas, 3, 7 dias. Ponderamos que não houve retardo no processo de reparação tecidual em nenhuma situação, sendo que todas as lesões apresentaram fechamento condizente com o processo normal de reparação. Durante todos os períodos de observação, todos os grupos apresentaram diminuição da área ao longo do tempo, possibilitando contração da ferida. Quanto ao fator de forma, verificamos diferenças estatisticamente significantes, entre os grupos teste e controle, sendo maior no grupo controle. Não observamos diferenças estatisticamente significantes no grupo teste entre os períodos estudados. Já no grupo controle houve diferenças estatisticamente significantes entre os períodos, sendo maior no “baseline”, seguido em ordem decrescente pelos períodos 24 horas, 3, 7 dias.

Pacientes com úlceras crônicas tratadas com aplicação semanal de PRP mostraram maior área de reparação do que as úlceras tratadas com solução salina fisiológica 0,9%, estatisticamente significativa, nos períodos de 10,6 semanas, em média (KNIGHTON et al., 1986), 10 semanas (CROVETTI et al., 2004) e 8 semanas (ANITUA, 2007). No ano seguinte, Kazakos et al. (2008) confirmaram os efeitos benéficos do PRP no tratamento de úlceras agudas de pele quando comparadas ao tratamento com soro fisiológico. Entretanto os resultados encontrados, em nosso estudo, pela avaliação macroscópica demonstraram que supostamente a utilização do PRP possa não implicar em uma redução mais rápida da ferida e nem em alterações de contração tecidual no processo de reparação. Em nossa pesquisa, o PRP e o soro fisiológico foram aplicados uma única vez no grupo teste e no grupo controle respectivamente, ao contrário dos estudos acima mencionados, o que sugere que aplicações repetidas do PRP seria necessário para promover resultados mais satisfatórios.

A análise histomorfológica revelou que não existiram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle em relação às variáveis estudadas, edema, exsudato inflamatório, neovascularização, necrose, colagenização, presença de fibroblastos jovens, reepitelização, presença de crosta, nos quatro períodos de observação (24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias). Diferentemente dos dados encontrados nesta pesquisa, feridas dérmicas tratadas com PRP em um cavalo, apresentaram uma maior reepitelização após 7 dias do que feridas tratadas com solução salina, além disso a colagenização foi superior no grupo tratado com PRP no final do estudo (CARTER et al., 2003). Resultados também contraditórios foram observados no tratamento de feridas cutâneas lineares realizadas com cola de fibrina associada ao PRP em ratos (Fischer) nos quais a

análise histológica mostrou presença de reepitelização na parte interna dos bordos das feridas no período de 3 dias quando comparadas as feridas tratadas somente com cola de fibrina ou feridas nas que não receberam nenhum tipo de tratamento, nas quais mostrou-se ausência de reepitelização. No período de 7 dias observou-se um aumento na organização dos feixes de fibras colágenas e um avanço relativo na reepitelização no grupo tratado com cola de fibrina associada ao PRP quando comparado aos grupo demais estudados. Após 14 dias, observou-se intensa neovascularização e presença de grande quantidade de feixes de fibras colágenas somente no grupo tratado com cola de fibrina associada ao PRP (WATANABE; MORI, 2005). O fato de termos utilizado uma metodologia em que empregamos feridas cirúrgicas com exposição de tecido conjuntivo, ao contrário da metodologia empregada por Watanabe e Morri (2005) que realizou um estudo com feridas incisionais, sugere que o PRP pode trazer resultados mais satisfatórios em feridas com bordos coaptados. O fato de termos utilizado uma metodologia em que empregamos feridas cirúrgicas com exposição de tecido conjuntivo, ao contrário da metodologia empregada por Watanabe e Morri (2005) que realizou um estudo com feridas incisionais, sugere que o PRP pode trazer resultados mais satisfatórios em feridas com bordos coaptados.

Foi constatado que o processo reparação tecidual seguiu um curso similar ao longo dos períodos observados em ambos os grupos estudados. Nas feridas tratadas com PRP o edema foi mais expressivo no período de 3 dias e menor no período de 14 dias. Nas feridas tratadas com soro fisiológico o edema foi maior no período de 24 horas e menor no período de 14 dias. A presença de edema mais intenso no início do processo de reparação é bem menor no período final de observação estão condizentes com Cotran, Kumar e Robbins (1994) e Gregory

(1999). No curso do processo de reparação, o exsudato inflamatório é mais intenso na fase inicial (HARRISON, 1991), a neovascularização é mais acentuada após o sétimo dia e a colagenização aumenta principalmente após 14 dias (ALVARES, 1972). Nossos resultados estão condizentes com esses autores, uma vez que verificamos diferenças estatisticamente significantes em relação ao exsudato inflamatório, em ambos os grupos, quando comparamos os períodos 24 horas e 7 dias, 24 horas e 14 dias, sendo mais marcante em 24 horas. No grupo teste, a neovascularização foi menos expressiva no período de 24 horas e maior em ordem crescente nos períodos de 3 dias, 7 dias e 14 dias, resultados parecidos foram encontrados no grupo controle, sendo que no período de 7 dias a significância foi levemente menor em relação ao período de 14 dias. Quanto a colagenização, nos grupos teste e controle, apresentou-se ausente no período de 24 horas e com maior expressão no período de 14 dias. Verificamos diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os períodos de 24 horas e 7 dias, 24 horas e 14 dias, em ambos os grupos.

Em ambos os grupos estudados, a presença de fibroblastos jovens foi mais intensa no período de 7 dias e menos intensa no período de 24 horas, ratificando os resultados dos estudos de Alvares (1972) e Gregory (1999). Observamos diferenças estatisticamente significante entre os grupos 24 horas e 7 dias, 24 horas e 14 dias, 3 dias e 7 dias.

Para todas as feridas tratadas com PRP e com soro fisiológico a expressão de necrose foi maior no período de 24 horas que nos demais períodos de observação com diferenças estatisticamente significantes entre os períodos 24 horas e 7 dias, 24 e 14 dias. A reepitelização, em ambos os grupos, foi maior no período de 14 dias, seguidos em ordem decrescente pelos períodos de 7, 3 dias. Nossos

resultados, quanto a essa expressão, foram condizentes com os estudos de Alvares (1872) e Gregory (1999). No período de 24 horas todas as amostras do grupo teste apresentavam--se ausentes dessa expressão e no grupo controle a maioria encontrava-se ausente e quando presente apresentava-se discreta. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos avaliados no grupo controle em relação à expressão de crosta. Entretanto, no grupo teste verificamos diferença estatisticamente significativa quando comparamos os períodos 3 dias e 14 dias. Essa expressão foi mais marcante no terceiro dia.

Não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle em relação à celularidade, espaço em branco e matriz extracelular (matriz colagênica) nos quatro períodos de observação.

A presença de um processo inflamatório mais intenso no período de 3 dias em ambos os grupos, pode ser visualizada nos resultados da análise histomorfométrica pela maior porcentagem de espaço em branco (interpretado como edema, vasos sangüíneos e/ou espaços entre as fibras colágenas e matriz colagênica), como mencionaram Cotran, Kumar e Robbins (1994) e Gregory (1999). Entretanto, não encontramos diferenças estatisticamente significantes em relação à celularidade, entre os quatro períodos observados dentro de cada grupo. Provavelmente, isso resulte da presença dos diferentes tipos celulares presentes ao longo do processo de reparação, no qual após 24 horas da realização da ferida existe uma predominância de neutrófilos, após 3 dias maior predominância de macrófagos (COTRAN; KUMAR; ROBBINS; 1994), sendo que após esse período aumenta-se o número de fibroblastos, encontrando-se no período de 7 dias uma ferida preenchida por tecido de granulação constituído por grande número destas células (ALVARES, 1972).

A presença de matriz extracelular, que representa as fibras colágenas e matriz colagênica, foi superior nos períodos de 7 e principalmente no período de 14 dias, em ambos os grupos, confirmando os achados de Alvares (1972) e Gregory (1999).

Mesmo atuando em animais saudáveis e feridas não infectadas, os nossos resultados demonstraram que o uso do PRP não proporcionou efeitos superiores ao uso do soro fisiológico no processo de reparação de feridas durante os períodos de observação.

Diante da pesquisa explanada, nossos resultados puderam identificar que a aplicação do PRP não interferiu no processo de reparação tecidual de organismos saudáveis, no entanto não produziu efeito tóxico ou prejudicial.

7 CONCLUSÕES

A avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas no processo de reparação tecidual em feridas dérmicas padronizadas em ratos, através das análises macroscópica, histomorfológica e histomorfométrica, permite afirmar, dentro das condições experimentais utilizadas na presente pesquisa, que:

- não houve diferença entre as feridas tratadas com plasma rico em plaquetas e as feridas controle com relação à contração das mesmas, quando avaliadas macroscopicamente.
- não houve diferenças histomorfológicas relevantes entre as feridas tratadas com plasma rico em plaquetas e as controle, nos vários períodos avaliados.
- através da avaliação histomorfométrica, não observou-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle em relação as variáveis estudadas nos períodos estudados.
- o plasma rico em plaquetas não apresentou efeitos superiores ao uso do soro fisiológico no processo de reparação das feridas durante os períodos de observação e não apresentou efeitos tóxicos ou deletérios.

REFERÊNCIAS¹

Alvares S. Contribuição para o estudo histométrico e histoquímico do processo de reparação de lesões obtidas experimentalmente na pele de ratos albinos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1972.

Anitua E. Effectiveness of autologus preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. Disponível em: URL: <http://www.interscience.wiley.com> [2007 June 26].

Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation off future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(4):529-35.

Carter CA, Jolly DG, Worder Sr CE, Hendren DG, Kane CJM. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003;74:244-55.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation and repair. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of diseases*. 5^a ed. Philadelphia:W.B. Saunders; 1994. cap.3, p.85-8.

Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci* 2004;30:145-51.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implication for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:1502-8.

Fernandes LC, Matos D, Novelli MD, Kim SB. Comparative study of intestinal anastomosis with manual suture and biofragmentable ring in dogs under corticosteroid administration. *Rev Assoc Med Bras* 2000;46(2):113-20.

Fundamentos de Medicina Estética e Laser. Reparação tecidual. [2009]. cap. 4. Disponível em: URL: <http://plastica.fm.usp.br/estetica/capitulo-4.html> [2009 12 9].

---

¹ De acordo com o estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

Graziani M. Período pós-operatório. In: Graziani M. Cirurgia buco-maxilo-facial. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986. cap. 8, p. 103-7.

Gregory CR. Wound healing and influencing factors. In: Fowler D, Williams JM. Manual of canine and feline wound management and reconstruction. [S.l]: British Small Animal Veterinary Association; c1999. p. 13-24.

Harrison JW. Healing of surgical wounds in oral mucoperiosteal tissues. J Endod 1991;17(8):401-8.

Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. J Periodontol 2003;74(6): 858-64.

Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, Tilkeridis M, Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. Injuri 2008 Aug 12. [Epub ahead of print].

Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factor (PDWHF). Ann Surg 1986;204(3):322-30.

Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. Ann Surg 1982;196(4):379-88.

Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. Acta Orthop Scand 1996;67(4):407-17.

Lynch SE, Castilla GR, Williams RC, Kiristy CP, Howell TH, Reddy MS, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J Periodontol 1991;62(7):458-67.

Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84(21):7696-700.

Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa EU, et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. J Clin Periodontol 1989;16(8):545-8.

Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10(4):225-8.

Matos D, Saad S, Francischi JRO, Barreto EP, Novelli MD. Colonic anastomosis with the biofragmentable ring manual suture. An experimental and comparative study. *Coloproctol* 1994;16(3):169-73

Obarrio JJ, Arauz JJ, Chamberlain TM, Croston A. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20(5):486-97.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74(6):849-57.

Padgett RW, Patterson GI. New developments for TGF β . *Dev Cell* 2001;1(3):343-9.

Petrungaro P. Immediate restoration of multiple tooth implants for aesthetic implant restorations. *Implant Dent* 2002a;11(2):118-27.

Petrungaro P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. *Dent Implantol Update* 2002b;12(6):41-6.

Petrungaro P. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent* 2001; 22(9):729-46.

Pierce GF, Mustoe TA, Altrick BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem* 1991;45(4):319-26.

Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Gramates P, Deuel TF. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(7):2229-33.

Pietrzak WS, An YH, Kang QK, Demos HA, Ehrens KH. Platelet-rich and platelet-poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. *J Craniofac Surg* 2007;18(3):559-67.

Rossum MV, Walboomers VXF, Hoekstra MJ, Jansen SJA. The influence of a PHI-5-loaded silicone membrane, on cutaneous wound healing in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:1449-56.

Santos MD, Santos MDD. O sangue e medula óssea. In: Pontual MAB, Magini RS. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica. 1ª ed. São Paulo: Santos; 2004. cap. 1, p. 3-44.

Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995;13(5):655-63.

Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998;22(6):410-16.

Traina AA. Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

Wang H, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ Jr, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: na autoradiographic sthudy on dogs. *J Periodontol* 1994; 65(5):429-36.

Watanabe N, Mori T. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. *J Dermatol Sci* 2005;40:205-8.

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PROTOCOLO nº 01/05
PARECER nº 01/05

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***“Avaliação histológica do plasma rico em plaquetas e do plasma pobre em plaquetas na reparação de tecido mole em ratos”***, de responsabilidade do pesquisador **Fábio Luis Moura Lima**, sob orientação do Professor Doutor **Francisco Emilio Pustiglioni**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 01 de março de 2005

Prof. Dr. **CELSONO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

ANEXO B – Análise Estatística

Análise estatística com relação à quantificação de plaquetas.

Média e desvio padrão

V ariável	n	Mínimo 10 ³ /mm ³	Máximo 10 ³ /mm ³	Média 10 ³ /mm ³	Desvio-padrão
Quantidade de plaquetas	5	533,00	894,000	749,000	140,58

ANEXO C – Análise Estatística

Dados da análise morfológica, com relação à área, perímetro e fator de forma entre os diferentes momentos de observação no grupo teste.

Bloco de Variáveis	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Area_BL	4	16,99	1,98	0,003
Area_24h	4	13,64	2,54	
Area_3d	4	10,56	2,63	
Area_7d	4	4,91	3,57	
Area_14d	4	1,36	0,76	

Bloco de Variáveis	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Perimetro_BL	4	15,86	0,84	0,003
Perimetro_24h	4	14,26	1,29	
Perimetro_3d	4	12,51	1,70	
Perimetro_7d	4	8,09	3,59	
Perimetro_14d	4	4,98	1,74	

Bloco de Variáveis	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
F_forma_BL	4	0,83	0,02	0,060
F_forma_24h	4	0,83	0,03	
F_forma_3d	4	0,83	0,02	
F_forma_7d	4	0,82	0,05	
F_forma_14d	4	0,63	0,03	

ANEXO D – Análise Estatística

Dados da análise morfológica, com relação à área, perímetro e fator de forma entre os diferentes momentos de observação no grupo controle.

Bloco de Variáveis	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Area_BL	4	14,53	2,16	0,004
Area_24h	4	11,17	1,89	
Area_3d	4	8,69	2,08	
Area_7d	4	4,33	0,52	
Area_14d	4	1,43	0,83	

Bloco de Variáveis	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
Perimetro_BL	4	14,40	0,86	0,004
Perimetro_24h	4	12,84	0,93	
Perimetro_3d	4	11,38	1,37	
Perimetro_7d	4	8,21	0,60	
Perimetro_14d	4	3,77	1,19	

Bloco de Variáveis	n	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
F_forma_BL	4	0,86	0,01	0,015
F_forma_24h	4	0,84	0,03	
F_forma_3d	4	0,83	0,02	
F_forma_7d	4	0,80	0,04	
F_forma_14d	4	0,76	0,05	

ANEXO E – Análise Estatística

Dados da análise semiquantitativa de expressão no período de 24 horas.

24 horas					
Grupo	EDEMA				Total
	ausente	Discreto	moderado	intenso	
teste	0	1	0	4	5
	0,00	20,00	0,00	80,00	100,00
controle	0	0	1	4	5
	0,00	0,00	20,00	80,00	100,00
Total	0	1	1	8	10
	0,00	10,00	10,00	80,00	100,00
p = 0,881					
Grupo	EXSUDATO INFLAMATÓRIO				Total
	ausente	Discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	0	5	5
	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
controle	0	0	0	5	5
	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
Total	0	0	0	10	10
	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
p > 0,999					
Grupo	NEOVASCULARIZAÇÃO				Total
	ausente	Discreto	moderado	intenso	
teste	4	1	0	0	5
	80,00	20,00	0,00	0,00	100,00
controle	5	0	0	0	5
	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Total	9	1	0	0	10
	90,00	10,00	0,00	0,00	100,00
p = 0,317					
(Continua...)					

Grupo	NECROSE				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	3	2	5
	0,00	0,00	60,00	40,00	100,00
controle	0	1	0	4	5
	0,00	20,00	0,00	80,00	100,00
Total	0	1	3	6	10
	0,00	10,00	30,00	60,00	100,00

$p = 0,403$

Grupo	COLAGENIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	5	0	0	0	5
	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00
controle	5	0	0	0	5
	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Total	10	0	0	0	10
	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00

$p > 0,999$

Grupo	FIBROBLASTOS JOVENS				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	2	3	0	0	5
	40,00	60,00	0,00	0,00	100,00
controle	3	2	0	0	5
	60,00	40,00	0,00	0,00	100,00
Total	5	5	0	0	10
	50,00	50,00	0,00	0,00	100,00

$p = 0,549$

Grupo	REEPITELIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	5	0	0	0	5
	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00
controle	3	2	0	0	5
	60,00	40,00	0,00	0,00	100,00
Total	8	2	0	0	10
	80,00	20,00	0,00	0,00	100,00

$p = 0,134$

(Continua...)

Grupo	CROSTA		Total
	sim	não	
teste	4	1	5
	80,00	20,00	100,00
controle	3	2	5
	60,00	40,00	100,00
Total	7	3	10
	70,00	30,00	100,00
p = 0,513			

(Conclusão)

ANEXO F – Análise Estatística

Dados da análise semiquantitativa de expressão no período de 3 dias.

3 dias					
Grupo	EDEMA				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	0	5	5
	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
controle	1	1	0	3	5
	20,00	20,00	0,00	60,00	100,00
Total	1	1	0	8	10
	10,00	10,00	0,00	80,00	100,00
p = 0,136					
Grupo	EXSUDATO INFLAMATÓRIO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	2	3	5
	0,00	0,00	40,00	60,00	100,00
controle	1	1	0	3	5
	20,00	20,00	0,00	60,00	100,00
Total	1	1	2	6	10
	10,00	10,00	20,00	60,00	100,00
p = 0,637					
Grupo	NEOVASCULARIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	1	2	2	5
	0,00	20,00	40,00	40,00	100,00
controle	1	2	2	0	5
	20,00	40,00	40,00	0,00	100,00
Total	1	3	4	2	10
	10,00	30,00	40,00	20,00	100,00
p = 0,100					

(Continua...)

Grupo	NECROSE				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	1	3	1	5
	0,00	20,00	60,00	20,00	100,00
controle	1	1	2	1	5
	20,00	20,00	40,00	20,00	100,00
Total	1	2	5	2	10
	10,00	20,00	50,00	20,00	100,00
p = 0,575					

Grupo	COLAGENIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	5	0	0	5
	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00
controle	2	2	0	1	5
	40,00	40,00	0,00	20,00	100,00
Total	2	7	0	1	10
	20,00	70,00	0,00	10,00	100,00

$p = 0,519$

Grupo	FIBROBLASTOS JOVENS				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	2	2	1	5
	0,00	40,00	40,00	20,00	100,00
controle	1	1	3	0	5
	20,00	20,00	60,00	0,00	100,00
Total	1	3	5	1	10
	10,00	30,00	50,00	10,00	100,00

$p = 0,572$

Grupo	REEPITELIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	2	3	0	5
	0,00	40,00	60,00	0,00	100,00
controle	0	3	1	1	5
	0,00	60,00	20,00	20,00	100,00
Total	0	5	4	1	10
	0,00	50,00	40,00	10,00	100,00

$p = 0,817$

(Continua...)

Grupo	CROSTA		Total
	sim	não	
teste	5	0	5
	100,00	0,00	100,00
controle	5	0	5
	100,00	0,00	100,00
Total	10	0	10
	100,00	0,00	100,00

$p > 0,999$

(Conclusão)

ANEXO G – Análise Estatística

Dados da análise semiquantitativa de expressão no período de 7 dias.

7 dias					
Grupo	EDEMA				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	2	3	0	0	5
	40,00	60,00	0,00	0,00	100,00
controle	3	1	0	1	5
	60,00	20,00	0,00	20,00	100,00
Total	5	4	0	1	10
	50,00	40,00	0,00	10,00	100,00
p = 0,817					
Grupo	EXSUDATO INFLAMATÓRIO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	3	2	0	5
	0,00	60,00	40,00	0,00	100,00
controle	0	4	1	0	5
	0,00	80,00	20,00	0,00	100,00
Total	0	7	3	0	10
	0,00	70,00	30,00	0,00	100,00
p = 0,513					
Grupo	NEOVASCULARIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	0	5	5
	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
controle	0	0	2	3	5
	0,00	0,00	40,00	60,00	100,00
Total	0	0	2	8	10
	0,00	0,00	20,00	80,00	100,00
p = 0,134					
Grupo	NECROSE				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	2	2	1	0	5
	40,00	40,00	20,00	0,00	100,00
controle	3	2	0	0	5
	60,00	40,00	0,00	0,00	100,00
Total	5	4	1	0	10
	50,00	40,00	10,00	0,00	100,00
p = 0,419					

(Continua...)

Grupo	COLAGENIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	5	0	5
	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00
controle	0	1	4	0	5
	0,00	20,00	80,00	0,00	100,00
Total	0	1	9	0	10
	0,00	10,00	90,00	0,00	100,00
p = 0,317					

Grupo	FIBROBLASTOS JOVENS				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	0	5	5
	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
controle	0	0	1	4	5
	0,00	0,00	20,00	80,00	100,00
Total	0	0	1	9	10
	0,00	0,00	10,00	90,00	100,00
p = 0,317					

Grupo	REEPITELIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	1	0	2	2	5
	20,00	0,00	40,00	40,00	100,00
controle	0	3	1	1	5
	0,00	60,00	20,00	20,00	100,00
Total	1	3	3	3	10
	10,00	30,00	30,00	30,00	100,00
p = 0,448					

Grupo	CROSTA		Total
	sim	não	
teste	4	1	5
	80,00	20,00	100,00
controle	4	1	5
	80,00	20,00	100,00
Total	8	2	10
	80,00	20,00	100,00
p > 0,999			

(Conclusão)

ANEXO H – Análise Estatística

Dados da análise semiquantitativa de expressão no período de 14 dias.

14 dias					
Grupo	EDEMA				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	3	2	0	0	5
	60,00	40,00	0,00	0,00	100,00
controle	2	2	1	0	5
	40,00	40,00	20,00	0,00	100,00
Total	5	4	1	0	10
	50,00	40,00	10,00	0,00	100,00
p = 0,419					
Grupo	EXSUDATO INFLAMATÓRIO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	4	1	0	5
	0,00	80,00	20,00	0,00	100,00
controle	0	4	1	0	5
	0,00	80,00	20,00	0,00	100,00
Total	0	8	2	0	10
	0,00	80,00	20,00	0,00	100,00
p > 0,999					
Grupo	NEOVASCULARIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	1	2	2	5
	0,00	20,00	40,00	40,00	100,00
controle	0	1	4	0	5
	0,00	20,00	80,00	0,00	100,00
Total	0	2	6	2	10
	0,00	20,00	60,00	20,00	100,00
p = 0,343					
Grupo	NECROSE				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	4	1	0	0	5
	80,00	20,00	0,00	0,00	100,00
controle	2	2	1	0	5
	40,00	40,00	20,00	0,00	100,00
Total	6	3	1	0	10
	60,00	30,00	10,00	0,00	100,00
p = 0,189					

(Continua...)

Grupo	COLAGENIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	1	0	4	5
	0,00	20,00	0,00	80,00	100,00
controle	0	0	4	1	5
	0,00	0,00	80,00	20,00	100,00
Total	0	1	4	5	10
	0,00	10,00	40,00	50,00	100,00

$p = 0,204$

Grupo	FIBROBLASTOS JOVENS				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	0	0	1	4	5
	0,00	0,00	20,00	80,00	100,00
controle	0	0	1	4	5
	0,00	0,00	20,00	80,00	100,00
Total	0	0	2	8	10
	0,00	0,00	20,00	80,00	100,00

$p > 0,999$

Grupo	REEPITELIZAÇÃO				Total
	ausente	discreto	moderado	intenso	
teste	1	0	0	4	5
	20,00	0,00	0,00	80,00	100,00
controle	0	0	4	1	5
	0,00	0,00	80,00	20,00	100,00
Total	1	0	4	5	10
	10,00	0,00	40,00	50,00	100,00

$p = 0,204$

Grupo	CROSTA		Total
	sim	não	
teste	1	4	5
	20,00	80,00	100,00
controle	4	1	5
	80,00	20,00	100,00
Total	5	5	10
	50,00	50,00	100,00

$p = 0,072$

(Conclusão)