

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ELEN CAROLINA DAVID JOÃO DE MASI**

**A INFLUÊNCIA DE FATORES DE CRESCIMENTO NA CICATRIZAÇÃO DE  
FERIDAS CUTÂNEA EM RATAS**

**CURITIBA**

**2015**

**ELEN CAROLINA DAVID JOÃO DE MASI**

**A INFLUÊNCIA DE FATORES DE CRESCIMENTO NA CICATRIZAÇÃO DE  
FERIDAS CUTÂNEA EM RATAS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de acadêmico de Doutor.**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos**

**Coorientadores: Prof. Dr. Marcos Mocellin  
Prof. Sergio Ioshii**

**CURITIBA**

**2015**

Masi, Elen Carolina David João de

A influência de fatores de crescimento na cicatrização de feridas cutâneas em ratas  
/ Elen Carolina David João De Masi. Curitiba, 2015

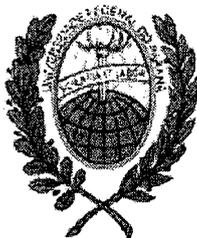
99 F.; IL.; 30 CM.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de  
Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1.Fator de crescimento epidérmico. 2. Ferimentos e lesões. 3.Cicatrização.  
4. Ratos. I. Campos, Antônio Carlos Ligocki. II. Título.

NLM: WO 100



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

## DECLARAÇÃO

Declaramos que a aluna **ELEN CAROLINA DAVID JOÃO DE MAIS** completou os requisitos necessários para obtenção do Grau Acadêmico de Doutor em Clínica Cirúrgica, ofertado pela Universidade Federal do Paraná.

Para obtê-los, concluiu os créditos didáticos previstos no Regimento do Programa e apresentou sua tese sob título **FATORES DE CRESCIMENTO – EGF, VEGF, IGF e FGF – NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATAS** em tempo hábil.

A tese foi defendida nesta data e aprovada pela Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Antonio Celso Nunes Nassif Filho, Paulo Afonso Nunes Nassif, Maria Cecília Closs Ono, Evaldo Dacheux de Macedo Filho – Membros e Rogério Hamerschmidt - Presidente da Banca.

E, por ser verdade, firmo a presente.  
Curitiba, 22 de julho de 2015

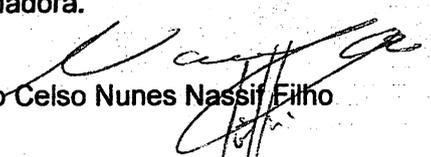
  
**Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias**  
Coordenador

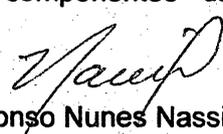


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL - MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 171ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente a aluna **ELEN CAROLINA DAVID JOÃO DE MAIS** sob o título **FATORES DE CRESCIMENTO - EGF, VEGF, IGF e FGF - NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATAS** na **Linha de Pesquisa: Cicatrização e Medidas de Resistência dos Tecidos** **Área de Concentração: Nutrição e Cicatrização em Cirurgia** tendo como orientador Professor Doutor Antonio Carlos L. Campos.

Às sete horas e trinta minutos do dia dezesseis de julho de dois mil e quinze no Auditório da CAD 7º andar – sala 701 do prédio central do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos doutores Antonio Celso Nunes Nassif Filho, Paulo Afonso Nunes Nassif, Maria Cecília Closs Ono, Evaldo Dacheux de Macedo Filho e Rogério Hamerschmidt sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pela candidata das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou a candidata a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de até trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pela candidata, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. A candidata foi **APROVADA** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à Sala de Sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para constar, eu, Regina Aparecida Sass Marques, secretária desta Pós-Graduação lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada será assinada pelos componentes da Banca Examinadora.

  
Antonio Celso Nunes Nassif Filho

  
Paulo Afonso Nunes Nassif

  
Evaldo Dacheux de Macedo Filho

  
Maria Cecília Closs Ono

  
Rogério Hamerschmidt

*Aos meus queridos pais Salim e Delcy  
exemplos de vida a serem seguidos.*

*As minhas filhas Flávia e Roberta,  
que são estímulo e motivação para mim.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carolos Ligocki Campos, Professor Titular de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pelas prestigiosas orientações recebidas neste estudo, pela confiança e amizade, e pela grande contribuição para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Marcos Mocellin, Professor e Chefe do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade Federal do Paraná, pelas valiosas sugestões, ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Sergio Ioshii, Professor de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos em patologia.

À Professora Marcia Olandoski, da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração das análises e estudos estatísticos deste trabalho.

Ao Sr. Edson Luiz Peracchi, proprietário da empresa Formédica, farmácia de manipulação, pelo fornecimento dos fatores de crescimento injetáveis.

À Sr.<sup>a</sup> Sandra M Kuniyoshi, farmacêutica da empresa Formédica, farmácia de manipulação, pelo fornecimento dos fatores de crescimento injetáveis.

À Sr.<sup>a</sup> Regina A. Sass Marques, secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná.

Ao Sr. Misael Ferreira Barbosa, pela presteza e colaboração durante a realização das cirurgias experimentais.

Aos Acadêmicos Flávia David João De Masi, Isabella Shin Ike, Marco Aurelio Soato Ratti e Roberta David João De Masi, pela colaboração durante a realização das cirurgias experimentais e durante o trabalho.

À Antônia Schwinden, pela revisão do texto.

À Léia Rachel Castellar, pela editoração.

*Nós somos o que fazemos repetidas vezes.  
Portanto, a excelência não é um ato, mas um hábito.*

*(Aristóteles)*

## RESUMO

**Introdução:** A cicatrização é um processo de restauração da integridade física interna e (ou) externa das estruturas do corpo e compreende complexas interações entre células e outros fatores. É um processo dinâmico, complexo, multicelular envolvendo matriz extracelular, citocinas, células sanguíneas e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento são proteínas que estimulam e ativam a proliferação celular mediante a ativação da angiogênese, mitogênese, transcrição genética, entre outras reações, ativando e acelerando o processo de cicatrização. **Objetivos:** Avaliar a evolução macro e microscópica de feridas realizadas no dorso de ratas, com infiltração de fatores de crescimento epitelial e misto; e comparar a evolução do processo cicatricial com a ferida controle, sem infiltração de fator de crescimento. **Método:** Foram utilizadas 45 ratas *Wistar*, submetidas a excisões de pele no dorso, após infiltração de fatores de crescimento nas feridas epitelial (F2) e mista (F3). As avaliações macroscópicas com fotografias padronizadas e mensuração da área e as microscópicas foram realizadas no terceiro, no sétimo e no décimo quinto dia do experimento, após a exérese da ferida, e comparadas nos 15 dias do experimento e nos momentos de morte. Para análise microscópica, utilizou-se coloração de Hematoxilina-Eosina para avaliar o processo inflamatório; vimentina, para a avaliação dos vasos e fibroblastose, e coloração de *Picro Sirius Red*, para avaliar o colágeno. **Resultados:** Na avaliação macroscópica, o uso de fatores de crescimento proporcionou cicatrização mais rápida e diminuição do tecido de granulação no sétimo e décimo quinto dia; em oposição, a ferida controle, que apresentou tecido de granulação até o décimo quinto dia ( $80 \pm 0,311\%$  de redução na ferida controle vs  $83 \pm 0,201\%$  na ferida epitelial vs  $100\%$  na ferida mista). Na microscopia, nos três momentos do experimento (três, sete e quinze dias), não foram encontradas diferenças significativas entre as três feridas, os resultados foram semelhantes; entretanto, quando comparados os dias de morte em relação a cada tipo de ferida, observou-se resultado favorável para as feridas epiteliais (infiltradas com fator de crescimento epitelial) e mistas (infiltradas com fator de crescimento misto: fator de crescimento vascular, fibroblastos e insulínico) em comparação à ferida controle (entre 3° x 15° dias houve diferença significativa com  $p < 0,001$  e na comparação entre 7° x 15° dias também houve diferença significativa, com  $p = 0,002$  e  $p = 0,001$  para as feridas epiteliais e mistas) resultado com maior número de fibroblastos angiogênese e colágeno tipo I. **Conclusão:** A utilização de fatores de crescimento, tanto epitelial como misto, acelera o processo de cicatrização, estimula maior atividade angiogênica, acelera a fibroplasia e maturação do colágeno e conseqüentemente a maturação da cicatrização.

**Palavras-chave:** Feridas em ratas. Fator de crescimento. Cicatrização.

## ABSTRACT

**Introduction:** Wound healing is a process of restoring the internal physical integrity and (or) of the external body and comprises complex structures and interactions between cells and other factors. It is a dynamic and complex process, involving multistage extracellular matrix, cytokines, blood cells and growth factors. Growth factors are proteins that stimulate and activate cell proliferation through the activation of angiogenesis, mitogenesis, gene transcription, among other reactions, activating and accelerating the healing process. **Objective:** To assess macro and microscopic evolution of wounds made in the backs of rats with infiltration of epithelial and mixed growth factors; and compare the evolution of the healing process with a control without growth factor infiltration. **Method:** 45 female Wistar rats were submitted to skin excisions on the backs followed by infiltration of growth factors in the wound epithelial (F2) and mixed (F3). Macroscopic assessments with standardized photographs and measurements of the area and the microscopic were carried out in the third, the seventh and the fifteenth day of the experiment, after excision of the wound. And compared within fifteen days of the experiment and in times of death. For microscopic analysis, we used hematoxylin-eosin staining was used to evaluate the inflammatory process; vimentin for the evaluation of the vessels and fibroblastose and picosirius red staining to evaluate the collagen. **Results:** To macroscopic evaluation, use of growth factors was associated with faster healing and decrease of granulation tissue in the seventh and fifteenth day; in contrast, the wound control showed granulation tissue until the fifteenth day ( $80 \pm 0,311\%$  reduction in wound control vs  $83 \pm 0,201\%$  in epithelial wound vs  $100\%$  in the mixed wound). In microscopy, the three moments of the experiment (three, seven, and fifteen days), there were no significant differences between the three wounds, the results were similar; however when compared to the day of death for each type of wound, there was a favorable outcome for the epithelial wounds (infiltrated with epithelial growth factor) and mixed (infiltrated with mixed growth factor: fibroblast growth factor, fibroblast and insulin) compared to the control wound (between 3 x 15 days was no significant difference, the results were similar, with  $p < 0.001$  and the comparison between 7th x 15 days also was no significant difference,  $p = 0.002$  and  $p = 0.001$  for epithelial and mixed wounds), results with more number of fibroblasts, vessels and collagen type I. **Conclusion:** The use of growth factors, either epithelial or mixed accelerates the healing process, stimulates more angiogenic activity, fibroplasia and accelerates the maturation of the collagen and thus maturation of the healing process.

**Keywords:** Wounds in rats. Growth factor. Healing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	DESENHO ESQUEMÁTICO, MOSTRANDO O LOCAL DE INFILTRAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO NAS FERIDAS EPITELIAL E MISTA. NOS QUATRO QUADRANTES, 0, 3, 6 E 9 H.....	33
FIGURA 2 -	DENOMINAÇÃO DAS FERIDAS, FERIDA 1 – CONTROLE (1,0 CM DE DIAM.), FERIDA 2- EPITELIAL (0,6 CM DE DIAM.), FERIDA 3 – MISTA (0,6 CM DE DIAM) .....	33
FIGURA 3 -	FOTOGRAFIA DAS FERIDAS DO PRRO AO DÉCIMO QUINTO DIA DO EXPERIMENTO, TIRADAS EM DIFERENTES ANIMAIS .....	41
FIGURA 4 -	GRÁFICO COMPARATIVO DA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 POR MEIO DA MEDIDA DAS FERIDAS 1, 2 E 3, EM ÁREA, NOS 15 DIAS DO EXPERIMENTO .....	43
FIGURA 5 -	GRÁFICO COMPARATIVO DA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 POR MEIO DA MEDIDA DAS FERIDAS 1, 2 E 3, EM CENTÍMETROS, NOS 15 DIAS DO EXPERIMENTO .....	43
FIGURA 6 -	GRÁFICO COMPARATIVO DA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 POR MEIO DA MEDIDA DAS FERIDAS 1, 2 E 3, EM PORCENTAGEM, NOS 15 DIAS DO EXPERIMENTO...	44
FIGURA 7 -	EXEMPLO DAS FERIDAS NO TERCEIRO DIA DO EXPERIMENTO, PRÉVIO À EXÉRESE DAS FERIDAS.....	44
FIGURA 8 -	EXEMPLO DAS FERIDAS NO SÉTIMO DIA DO EXPERIMENTO, PRÉVIO À EXÉRESE DAS FERIDAS.....	45
FIGURA 9 -	EXEMPLO DAS FERIDAS NO DÉCIMO QUINTO DIA DO EXPERIMENTO, PRÉVIO À EXÉRESE DAS FERIDAS.....	45
FIGURA 10 -	FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS MOSTRANDO A PRESENÇA DE PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO 3.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3 (HE 100x).....	46
FIGURA 11 -	FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS MOSTRANDO A PRESENÇA DE PROCESSO	

	INFLAMATÓRIO, NO 7.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 e 3 (HE 100x).....	47
FIGURA 12 -	FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS MOSTRANDO A PRESENÇA DE PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO 15.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3 (HE 100x) .....	47
FIGURA 13 -	EVOLUÇÃO DE HE- NEUTRÓFILOS EM CADA FERIDA, ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE .....	48
FIGURA 14 -	EVOLUÇÃO DE HE- LINFÓCITOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO INTRAGRUPOS.....	50
FIGURA 15 -	EVOLUÇÃO DE HE- MACRÓFAGOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO INTRAGRUPOS NOS MOMENTOS DE MORTE ....	51
FIGURA 16 -	EVOLUÇÃO DE HE- FIBROBLASTOS EM CADA FERIDA, ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, AVALIAÇÃO ENTRE GRUPOS.....	53
FIGURA 17 -	EVOLUÇÃO DE HE- VASOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, AVALIAÇÃO INTRAGRUPPO .....	54
FIGURA 18 -	FOTOMICROGRAFIA VIMENTINA - NAS QUAIS SE AVALIAM MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS E VASOS, NO 3.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3.(VIM.200X).....	55
FIGURA 19 -	FOTOMICROGRAFIA VIMENTINA - NAS QUAIS SE AVALIAM MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS E VASOS, NO 7.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (VIM.200X).....	55
FIGURA 20 -	FOTOMICROGRAFIA VIMENTINA- NAS QUAIS SE AVALIAM MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS E VASOS, NO 15.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (VIM.200X) .....	56
FIGURA 21 -	EVOLUÇÃO DE VIMENTINA FIBROBLASTOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO DOS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPOS .....	57
FIGURA 22 -	EVOLUÇÃO DE VIMENTINA MACRÓFAGOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPPO .....	59

FIGURA 23 - EVOLUÇÃO DE VIMENTINA VASOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPO .....	61
FIGURA 24 - FOTOMICROGRAFIA NAS QUAIS SE AVALIA COLÁGENO TIPO I E III (VERMELHO – MADURO E VERDE- IMATURO), NO 3.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (PSR 400X)....	62
FIGURA 25 - FOTOMICROGRAFIA NAS QUAIS SE AVALIA COLÁGENO TIPO I E III (VERMELHO – MADURO E VERDE- IMATURO), NO 7.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (PSR 400X)....	62
FIGURA 26 - FOTOMICROGRAFIA NAS QUAIS SE AVALIA COLÁGENO TIPO I E III (VERMELHO – MADURO E VERDE- IMATURO), NO DÉCIMO 15.º DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (PSR 400X).....	63
FIGURA 27 - EVOLUÇÃO DE ÁREA DE COLÁGENO TIPO I AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPO .....	64
FIGURA 28 - EVOLUÇÃO DE ÁREA DE COLÁGENO TIPO III, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPO .....	66
FIGURA 29 - EVOLUÇÃO DA ÁREA DE COLÁGENO TIPO I - PERCENTUAL ....	68
FIGURA 30 - EVOLUÇÃO DA ÁREA DE COLÁGENO TIPO III - PERCENTUAL....	69
GRÁFICO 1 - DEMONSTRAÇÃO DOA PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NO 3.º DIA DO EXPERIMENTO NAS TRÊS FERIDAS.....	70
GRÁFICO 2 - DEMONSTRAÇÃO DOA PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NO 7.º DIA DO EXPERIMENTO NAS TRÊS FERIDAS.....	71
GRÁFICO 3 - DEMONSTRAÇÃO DOA PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NO 15.º DIA DO EXPERIMENTO NAS TRÊS FERIDAS .....	71

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1 -	DIVISÃO DOS GRUPOS DE ACORDO COM O FATOR DE CRESCIMENTO INJETADO E O DIA DA EUTANÁSIA.....	31
TABELA 1 -	MEDIDA DO DIÂMETRO, ÁREA E PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DAS FERIDAS .....	42
TABELA 2 -	AVALIAÇÃO DE HE- NEUTRÓFILOS NO 3.º, 7.º E 15.º DIAS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS.....	47
TABELA 3 -	CONTAGEM DE LINFÓCITOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1,2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTO DE MORTE (AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS).....	49
TABELA 4 -	CONTAGEM DE MACRÓFAGOS POR CAMPO E A COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE .....	51
TABELA 5 -	CONTAGEM DE FIBROBLASTOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE .....	52
TABELA 6 -	CONTAGEM DE VASOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE .....	54
TABELA 7 -	CONTAGEM DE VIMENTINA FIBROBLASTOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE .....	56
TABELA 8 -	CONTAGEM DE MACRÓFAGOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE .....	58
TABELA 9 -	CONTAGEM DE VIMENTINA VASOS POR CAMPOS E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE .....	60
TABELA 10 -	CONTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE ...	63
TABELA 11 -	CONTAGEM DE COLÁGENO TIPO III, COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE ...	65

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE .....	67
TABELA 13 - CONTAGEM DE COLÁGENO TIPO I, COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE ...	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABMP 15	- Matriz anorgânica derivado bovino e peptídeo 15
CEUA/ BIO –UFPR	- Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná
CNV	- Neovascularização corneal
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTGF	- Fator de crescimento de tecido conjuntivo ( <i>Connective Tissue Growth Factor</i> )
DP	- Desvio Padrão
ECGF	- Fator de crescimento de células epiteliais ( <i>Epithelial Cels Growth Factor</i> )
EGF	- Fator de crescimento epitelial ( <i>Epithelial Growth Factor</i> )
F1	- Ferida 1 ( <i>Wound 1</i> )
F2	- Ferida 2 ( <i>Wound 2</i> )
F3	- Ferida 3 ( <i>Wound 3</i> )
FC	- Fator de crescimento ( <i>Growth Factor</i> )
FCE	- Fator de crescimento epitelial ( <i>Epithelial Growth Factor</i> )
FCV	- Fator de crescimento vascular ( <i>Endothelial Growth Factor</i> )
FGF	- Fator de crescimento de fibroblastos ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
GM-CSF	- Fator estimulador das colônias de macrófagos e granulócitos ( <i>Stimulating factor - granulocyte macrophage colony</i> )
HE	- Hematoxilina-eosina
IGF	- Fator de crescimento semelhante a insulina ( <i>Insulin Like Growth Factor</i> )
IL-1	- Interleucina 1 ( <i>Interleucin 1</i> )
KGF	- Fator de crescimento de keratinócitos ( <i>Keratinocytes Growth Factor</i> )
MIP 1 alfa	- Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa ( <i>macrophage inflammatory protein 1 alpha</i> )
MSC	- Células tronco mesenquimais ( <i>mesenchymal stem cells</i> )

NAOH	- Hidróxido de Sódio ( <i>Sodium Hydroxide</i> )
PBS	- Fosfato salino tamponado ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDG	- Fator de crescimento derivado de plaquetas ( <i>Platelet derived Growth Factor</i> )
PHOSPHO- JNK	- Proteína quinase ativadora de mitose 9 ( <i>protein kinase activator of mitosis 9</i> )
PPP	- Plasma pobre em plaquetas ( <i>Platelet Poor Plasma</i> )
PRP	- Plasma rico em plaquetas ( <i>Platelet Rich Plasma</i> )
PSR	- Picro Sirius Red ( <i>Picro Sirius Red</i> )
TGF- b1 e b2	- Fator transformador de crescimento beta 1 e beta 2 ( <i>Transforming Growth Factor beta 1 and 2</i> )
TNF alfa	- Fator de necrose tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> )
TSP -1	- Trombospondin 1
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VEGF	- Fator de crescimento endotelial ( <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1	CICATRIZAÇÃO .....	19
2.1.1	Fase inflamatória ou exsudativa .....	20
2.1.2	Fase proliferativa ou fibroblástica .....	21
2.1.3	Fase de remodelamento ou maturação .....	22
2.2	PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	22
2.3	FATORES DE CRESCIMENTO.....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1	MATERIAIS.....	28
3.1.1	Animais.....	28
3.1.2	Local do experimento, ambiente e alimentação .....	28
3.1.3	Material utilizado.....	29
3.1.4	Drogas e soluções .....	29
3.1.5	Fatores de crescimento (FC).....	30
3.2	MÉTODO .....	30
3.2.1	Animais de experimentação .....	30
3.2.2	Procedimento anestésico .....	31
3.2.3	Confecção das incisões.....	31
3.2.4	Injeção dos fatores de crescimento .....	32
3.2.5	Pós-operatório .....	33
3.3	INSPEÇÃO DAS FERIDAS .....	34
3.3.1	Distribuição dos grupos e identificação dos animais .....	34
3.3.2	Controle fotográfico .....	34
3.3.3	Eutanásia.....	35
3.3.4	Avaliação da contração da ferida.....	35
3.4	ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO .....	35
3.4.1	Avaliações histológicas.....	35
3.4.1.1	Análise qualitativa do colágeno .....	36
3.4.1.2	Análise da vimentina .....	37

3.4.1.3	Preparo das lâminas.....	37
3.4.1.4	Avaliação morfológica .....	38
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	40
4.1.1	Avaliação macroscópica das feridas.....	40
4.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA .....	46
4.2.1	Análise microscópica morfológica.....	46
4.2.1.1	Avaliação de HE – neutrófilos no 3.º, 7.º e 15.º dias .....	47
4.2.1.2	Avaliação HE – linfócitos no 3.º, 7.º e 15.º dias.....	49
4.2.1.3	Avaliação de HE – macrófagos no 3.º, 7.º e 15.º dias .....	50
4.2.1.4	Avaliação HE – fibroblastos no 3.º, 7.º e 15.º dias .....	52
4.2.1.5	Avaliação HE – vasos no 3.º, 7.º e 15.º dias, avaliação entre os grupos.....	53
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOMÉTRICA .....	55
4.3.1	Análise imunoistoquímica .....	55
4.3.1.1	Avaliação de vimentina fibroblastos no 3.º, 7.º e 15.º dias .....	56
4.3.1.2	Avaliação vimentina macrófagos no 3.º, 7.º e 15.º dias.....	58
4.3.1.3	Avaliação vimentina vasos no 3.º, 7.º e 15.º dias .....	60
4.4	AVALIAÇÃO DO COLÁGENO .....	62
4.4.1	Avaliação colágeno – tipo I – área.....	63
4.4.2	Avaliação de colágeno – tipo III - área.....	65
4.4.3	Percentual de colágeno (TIPO I e TIPO III).....	66
4.4.3.1	Variável: percentual de colágeno tipo I.....	67
4.4.3.2	Variável: percentual de colágeno tipo III.....	68
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
5.1	PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	73
5.2	FATORES DE CRESCIMENTO.....	76
5.3	MODELO EXPERIMENTAL.....	78
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Cicatrização é um processo de restauração da integridade física interna e (ou) externa das estruturas do corpo e compreende complexas interações entre as células e vários outros fatores (SENGUPTA *et al.*, 2015). É um processo dinâmico e complexo, composto de três fases: inflamação, proliferação e remodelação dos tecidos. O processo de cicatrização abrange matriz extracelular, as citocinas, as células sanguíneas e os fatores de crescimento. Um grande número de fatores de crescimento e proteínas ligadas a fator de crescimento presente na epiderme e derme está envolvido na cicatrização de feridas. Esses fatores de crescimento são expressos não somente pelo dano causado pelos trombócitos e pela ativação dos macrófagos como também pelas células epiteliais.

Dentre os fatores de crescimento, os mais importantes para cicatrização são: fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador Beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). VEGF age na angiogênese e na granulação dos tecidos num estágio inicial da cicatrização. PDGF é crucial para inflamação, granulação, reepitelização e remodelação nas três fases da cicatrização das feridas (XIE *et al.*, 2013; KUTLU *et al.*, 2013).

Devido à complexidade patológica e fisiológica do processo de cicatrização, a perfeita regeneração dos tecidos é difícil de ser alcançada. Portanto, é necessária a avaliação de novos tratamentos, bem como o uso de novas estratégias. Tratamentos com fechamento tradicional por meio de sutura agem como uma barreira temporária para a hemostasia e prevenção de infecção. Nos últimos anos, têm-se desenvolvido retalhos de pele natural e sintéticos para aplicação em feridas com perda de pele, com o intuito de acelerar a cicatrização. O uso de fatores de crescimento e suas combinações tem sido sugerido como tratamento promissor, pois promove a aceleração do processo de cicatrização. Entretanto, somente os fatores de crescimento derivados das plaquetas completaram com sucesso os ensaios clínicos. Um dos maiores obstáculos é que os fatores de crescimento são degradados por proteinases ou removidos por exsudatos antes de atingir o leito da ferida.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um produto derivado do sangue fresco contendo grande quantidade de plaquetas, e quando elas são ativadas liberam grande quantidade de fator de crescimento, com propriedades anti-inflamatórias e regenerativas que permitem ao organismo cicatrização mais rápida e eficiente. O PRP foi desenvolvido no início da década de 1970, mas somente em 1997 Whitman difundiu seu uso na cirurgia maxilo-facial. Estudos postulavam que, mediante a ativação de plaquetas e a posterior liberação de fatores de crescimento, poderiam ser obtidas melhoras na cicatrização de feridas (GRESELE *et al.*, 2003; WOODALL JR. *et al.*, 2007; ROZMAN; BOLTA, 2007; MARTINEZ-ZAPATA *et al.*, 2009).

As plaquetas contêm grande quantidade de fatores de crescimento e citocinas, que são fundamentais na cicatrização dos tecidos moles e na mineralização óssea (WOODALL JR. *et al.*, 2007). Os principais fatores de crescimento presentes no PRP são: PDGF, TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2, IGF-1, EGF, VEGF, fator de crescimento para hepatócitos (KASSOLIS; ROSEN; REYNOLDS, 2000; PRYOR *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007; CERVELLI; GENTILE; GRIMALDI, 2009).

Os fatores de crescimento, presentes em grandes quantidades no PRP, são fundamentais para a estimulação do processo de cicatrização e cura de feridas. Eles desempenham papel importante no processo de regulação celular, tais como: mitogênese, diferenciação celular, metabolismo, produção de colágeno, crescimento vascular e reepitelização (ANITUA *et al.*, 2004; BORZINI; MAZZUCCO, 2007; WOODALL JR. *et al.*, 2008).

Além dos fatores de crescimento, as plaquetas liberam diversas proteínas bioativas, que são responsáveis pela atração de macrófagos, células estaminais, mesenquimais e osteoblastos. Promovem a remoção do tecido necrótico e potencializam a regeneração tecidual e o processo de cicatrização, estimulando mais rapidamente a cura de lesões crônicas (WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997; LANDESBURG; MOSES; KARPATKIN, 1998; SAMPSON; GERHARDT; MANDELBAUM, 2008).

Muitos dos fatores de crescimento estimulam a divisão celular em diferentes tipos de células, enquanto outros são específicos para um tipo celular. A ligação a receptores de superfície na célula-alvo emite um sinal por meio da membrana citoplasmática e efetua um comando celular ou nuclear. Muitos desses processos são básicos no metabolismo da célula, a exemplo da angiogênese, mitogênese, transcrição genética, entre outras reações.

Nos últimos anos, os fatores de crescimento têm sido amplamente estudados em diversos procedimentos médicos e odontológicos, especialmente nas áreas de cirurgia ortopédica, crânio-maxilo-facial, cirurgia plástica, torácica, vascular, oftalmologia e periodontia. Atualmente têm sido usados como estratégia para promover cicatrização tecidual mais rápida e eficiente (HOM; LINZIE; HUANG, 2007).

Neste estudo foram utilizados os fatores de crescimento VEGF, EGF, IGF e FGF, para quantificar e estimular o colágeno, a elastina, os vasos e a proliferação celular na cicatrização cutânea de ratas, e foi comparada a efetividade dos fatores de crescimento no processo de cicatrização em relação à ferida controle, onde não foi injetado fatores de crescimento ou solução salina, para mimetizar a cicatrização natural.

## 1.1 OBJETIVOS

- Avaliar a influência dos fatores de crescimento ( EGF, VEGF, FGF e IGF) no processo cicatricial, mediante a evolução macroscópica.
- Avaliar a microscopia com as colorações Hematoxilina –Eosina, Vimentina e *Picro Sirius Red*, do processo de cicatrização de feridas realizadas no dorso de ratas, com infiltração de EGF e VEGF combinados com FGF e IGF, em comparação com a ferida controle sem infiltração dos fatores de crescimento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CICATRIZAÇÃO

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou provocadas intencionalmente como parte da realização de procedimentos, remontam à Antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia a importância de protegê-las de forma a evitar que se complicassem e repercutissem em danos locais ou gerais para o paciente. Os registros mais antigos falam sobre manuscritos egípcios que datam de 3000-2000 a.C. e neles são mencionados curativos à base de mel, graxa, fios de linho e diversos tipos de excrementos, que faziam parte dos princípios da farmacopeia egípcia. Hipócrates, que lançou as bases da medicina científica, recomendava que as feridas fossem mantidas limpas e secas, e preconizava sua limpeza com água morna, vinho e vinagre. Foi ele também quem criou os conceitos de cicatrização por primeira e segunda intenção. A partir do século XIX, foram criados vários tipos de curativos, à base de fibras de linho. Entre o final de 1840 e a Segunda Guerra Mundial, o foco para o tratamento das feridas e cicatrização foi a utilização de antissépticos e agentes tópicos com ação antimicrobiana e a proteção com coberturas secas. Entre 1945 e 1950 teve início o uso de filme transparente permeável para tratamento de queimaduras. Somente a partir de 1962, quando Winter e Roove demonstraram que a taxa de epitelização era 50% mais rápida em um ambiente úmido e que a formação de crostas era minimizada, houve grande interesse pelo desenvolvimento de pesquisas, produção e comercialização desse tipo de recurso, ocorrendo uma verdadeira revolução no conceito de curativos. Nos EUA e Europa registra-se uma avalanche de novos recursos a partir de 1970; com esta preocupação, diversos órgãos e agências passaram a coordenar estudos que pudessem estabelecer critérios para a avaliação adequada das feridas. Esses critérios têm sido exaustivamente estudados, e embora ainda exista muita controvérsia entre os diversos estudos, de forma geral se buscam reunir as melhores evidências sobre as tecnologias, os materiais, recursos e procedimentos para tratamento das feridas.

A cicatrização pode ocorrer de diversas formas, como hipertrofia, atrofia e (ou) normotrofia da área lesionada. O processo de cicatrização tecidual tem início com a formação do coágulo e a degranulação de plaquetas, sendo composto por três fases: inflamação, proliferação e remodelamento. Ademais, depende de vários fatores, entre os quais raça, tipo de pele, localização anatômica e técnica cirúrgica utilizada. Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas durante essa complexa e bem organizada série de eventos são responsáveis por induzir mecanismos de reparação tecidual como a quimiotaxia, proliferação celular, angiogênese, depósito de matriz extracelular e remodelamento, segundo o estudo de Martinez-Zapata *et al.* (2009), Mehta e Watson (2008). Como foi estudado em nosso trabalho, os fatores de crescimento interferiram positivamente em todas as fases da cicatrização.

Durante o reparo tecidual, observam-se: coagulação, inflamação, fibroplasia, deposição matricial, angiogênese, epitelização e contração da ferida. Esse processo é organizado em três fases das quais participam eventos diversos e interligados. Elas se sobrepõem continuamente, constituindo a fase inflamatória ou exsudativa, proliferativa ou fibroblástica e de remodelagem ou maturação (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; BALBINO e PEREIRA, 2005; JUNIOR *et al.*, 2006).

### 2.1.1 Fase inflamatória ou exsudativa

É a primeira fase, que se inicia no momento da lesão e se encerra no quarto ou quinto dia, incluindo as etapas de: hemostasia, migração de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual. Em resposta a agentes inflamatórios, há diminuição do fluxo sanguíneo pela vasoconstrição para prevenção de perda sanguínea e (ou) de líquidos corporais. Há a formação de um tampão hemostático primário pelas plaquetas; estas, induzidas pela trombina, passam a ativar os processos bioquímicos e a liberar mediadores na área lesada, que incluem fatores de crescimento, como PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, TGF- $\alpha$  e o VEGF, além de glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e trombospondina, que constituem a matriz extracelular provisória. Essas ativações produzem fatores quimiotáticos e mediadores vasoativos que auxiliam o

recrutamento das células inflamatórias no reparo da lesão (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ROCHA JR. *et al.*, 2006; ISAAC *et al.*, 2010).

Logo após, são atraídos para o local da lesão neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas que chegam no momento da injúria tecidual e permanecem por um período que varia de três a cinco dias e são responsáveis pela fagocitose e degradação de colágeno e elastina. Os mastócitos, linfócitos e eosinófilos se integram ao processo para o controle da infecção juntamente com os neutrófilos e macrófagos. Nesta fase, o macrófago é a célula mais importante, permanece do terceiro ao décimo dia, estabiliza a ferida e realiza a limpeza da área lesionada por meio da fagocitose de bactérias e tecido necrosado, direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação e preparando a área para a segunda fase de reparação tecidual (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ROCHA JR. *et al.*, 2006; ISAAC *et al.*, 2010).

#### 2.1.2 Fase proliferativa ou fibroblástica

Esta fase inicia-se no quarto dia e persiste até o décimo quarto dia. É a fase responsável pelo "fechamento" da lesão. Caracteriza-se por três processos: reepitelização, proliferação dos fibroblastos e angiogênese (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998).

Durante a reepitelização ocorre a migração de queratinócitos do leito da ferida e dos anexos epiteliais. Fatores de crescimento podem ser os prováveis responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio. A fase de proliferação epitelial inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos pelo TGF- $\alpha$  e EGF. Tão importante quanto a epitelização é a formação do tecido de granulação, e ambas se iniciam na fase de reparo (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ROCHA JR. *et al.*, 2006; ISAAC *et al.*, 2010).

A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia. Os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, que são responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico. Ademais, produzem o colágeno, a substância responsável pela força e integridade do tecido. Este sustenta uma nova

rede de capilares que mantém a base da formação do tecido de granulação, que proporciona crescimento de capilares ao redor da lesão. Este tecido tem coloração vermelha e aparência heterogênea.

A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para a nutrição e a oxigenação do novo tecido que está sendo formado. As células endoteliais migram para a área lesionada, logo após, ocorre proliferação destas células, tornando o tecido preparado para as células responsáveis pelas próximas fases (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; ROCHA JR. *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Fase de remodelamento ou maturação

É a fase mais longa da cicatrização de feridas, podendo durar meses ou anos. É marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno. As principais citocinas envolvidas nessa fase são TNF- $\alpha$ , IL-1, PDGF e TGF- $\beta$ , produzidos pelos fibroblastos, além dos produzidos pelas células epiteliais, como EGF e TGF- $\beta$ .

Durante essa fase, o tecido de granulação retrocede, o colágeno depositado se remodela e uma cicatriz com maior força de tensão se forma, devido ao cruzamento de diferentes padrões das fibras de colágeno, sendo este o responsável pela força e integridade do reparo. Esses elementos extracelulares, principalmente o colágeno, comprimem de maneira mecânica as paredes recém-formadas e delicadas dos capilares sanguíneos, diminuindo o número de fibroblastos ativos e a formação de novos vasos (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC *et al.*, 2010).

## 2.2 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Sampson, Gerhardt e Mandelbaum (2008) definiram o PRP como um volume da fração de plasma de sangue autólogo que tem uma concentração de plaquetas

acima da linha de base. A concentração normal no sangue é em média de 200.000 plaquetas/unidade Internacional e no PRP fica em torno de 1.200.000 plaquetas /UI. O PRP é usado para melhorar tanto a regeneração de tecidos ósseos e tecidos moles quanto a cicatrização. O uso do PRP autólogo foi primeiramente descrito por Ferrari *et al.*, em 1987, após uma cirurgia cardíaca aberta, com o objetivo de evitar a transfusão excessiva de derivados sanguíneos homólogos. Desde então, a aplicação do PRP autólogo vem sendo utilizada com segurança para realizar hemostasia intraoperatória, bem como para estimular o aumento dos fatores de crescimento de osso e a cicatrização de tecidos moles.

O uso do PRP vem sendo cada vez mais descrito em diferentes áreas de atuação, como na ortopedia, medicina desportiva, odontologia, neurocirurgia, oftalmologia, urologia, cicatrização de feridas, cosmetologia, cirurgia cardiorácica e cirurgia maxilofacial (RUTKOWSKI *et al.*, 2007).

Woodall Jr. *et al.* (2008) constataram que as plaquetas têm uma grande quantidade de fatores de crescimento e citocinas, que são fundamentais na cicatrização dos tecidos moles e na mineralização óssea. Os principais fatores de crescimento presentes no PRP são: PDGF, TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 2, IGF-1, EGF, fator de crescimento para hepatócitos, VEGF. Os fatores de crescimento desempenham papel importante no processo de regulação celular, tal como mitogênese, quimiotaxia, na diferenciação celular, no metabolismo, na produção de colágeno e no crescimento vascular.

Graziani *et al.* (2005), por meio de um estudo *in vitro*, avaliaram a obtenção do PRP por um processo de centrifugação, que gera aumento muito significativo na quantidade de fatores de crescimento naturais. Segundo os autores, essa concentração mais elevada de plaquetas pode determinar o aumento de moléculas biologicamente ativas que reforçam o recrutamento de osteoblastos e células estaminais em comparação com o coágulo de sangue normal.

Eppley, Woodell e Higgins (2004) demonstraram as vantagens do uso do PRP autólogo em procedimentos envolvendo o tecido ósseo, no qual a regeneração tanto em fraturas como em processo de fusão depende dos componentes envolvidos: tais como os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células osteoprogenitoras e componentes hematopoiéticos. Estes realizam um processo de deposição, reabsorção e remodelamento influenciados por elementos bioquímicos. O osso maduro, formador de osteoblastos, secreta fatores de crescimento que também estão presentes nas

plaquetas. Dessa forma, concluem os autores, o PRP age como uma forma exógena de fator de crescimento, estimulando a atividade de células ósseas.

Everts *et al.* (2006) constataram que feridas crônicas de difícil cicatrização são um desafio no tratamento e necessitam de terapia individualizada, que nem sempre resulta no fechamento da ferida. O PRP possui grande quantidade de plaquetas e fatores de crescimento que são importantes na cicatrização da ferida. O recrutamento de células brancas do sangue e a secreção de fatores bactericidas das plaquetas ajudam a combater infecções. Em função desses fatores, o PRP pode ser utilizado sozinho ou combinado com enxertos, apresentando resultados positivos no tratamento de pacientes com lesões crônicas, como úlceras de membro inferior.

Kaux *et al.* (2011) fizeram um estudo comparando oito técnicas de obtenção de PRP, em pacientes com tendinite crônica. Avaliaram o volume de sangue obtido, anticoagulantes utilizados em cada técnica, velocidade de centrifugação inicial e final, tempo da primeira e segunda centrifugação, resultado da primeira e da segunda centrifugação, tempo total, resultado final qualitativo e o método da coagulação do concentrado plaquetário. Em cada paciente injetou-se um tipo de PRP, e concluíram que o melhor resultado foi obtido com a técnica Platelex (MARX *et al.*, 1998), que apresenta a maior concentração de plaquetas e conseqüentemente maior quantidade de fator de crescimento no sítio lesado.

### 2.3 FATORES DE CRESCIMENTO

Autores como Barrientos *et al.* (2014), que fundamentam esta revisão da literatura, conduziram pesquisa a respeito do desenvolvimento de fatores de crescimento e citocinas no tratamento de feridas. Discutiram quatro fatores de crescimento no tratamento de cicatrização de feridas: fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), PDGF, VEGF e b-FGF. Os autores observaram que enquanto os resultados clínicos do uso de fatores de crescimento e citocinas são encorajadores, muitos estudos envolvem uma pequena amostra e são díspares no resultado final.

Shi *et al.* (2012) demonstraram, em experimento com feridas em córneas de ratos *Wistar*, sendo que um olho foi o controle e outro, receptor de injeção de fator

de crescimento, que houve diminuição da cicatriz em relação ao controle. Nesse estudo foi mostrado que TGF- $\beta$ 1 penetra na ferida corneal e induz a ativação de phospho-JNK, uma enzima que estimula a expressão de CTGF e inibe a cicatriz anômala. Phospho-JNK pode potencialmente servir como uma nova estratégia para reduzir má formação corneal.

O uso de glicocorticoides promove um atraso na cicatrização de feridas, sendo um dos efeitos colaterais mais comuns deles. Sanchis *et al.* (2012) verificaram por meio de estudo experimental em ratos que o uso de glicocorticóide atrasa a cicatrização das feridas cutâneas. Foram avaliadas feridas de pele em ratos transgênicos, com restrição de queratinócitos com dois tipos de receptores: com expressão restrita de queratinócitos, por meio de transativação e transrepressão. Demonstraram que, em ambos os modelos, as feridas cicatrizaram lentamente, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os autores concluíram que os glicocorticóides regulam negativamente os estádios de cicatrização das feridas, apesar da presença de fatores de crescimento.

Li *et al.* (2008), em estudo realizado em ratos *Wistar*, com infarto do miocárdio, fizeram a comparação no miocárdio isquêmico após injeção de PRP e PPP, e constataram que houve maior remodelação ventricular no local da injeção do PRP. Concluíram que a injeção de PRP poderia modular favoravelmente no processo de remodelação pós-infarto.

Por *et al.* (2009) elaboraram um estudo comparativo em retalhos cutâneos livres, de ratos, com o uso do PRP, pois estes dependem do leito vascular. Os autores hipotetizaram que a presença dos fatores de crescimento no PRP poderia melhorar a sobrevivência do retalho livre. Compararam o uso de retalho associado a PRP e no grupo controle retalho associado à solução salina. Após 26 semanas, constataram que não houve diferença nos parâmetros clínicos e histológicos, entre os retalhos com PRP e os retalhos com solução salina.

Ndip, Ebah e Mbako (2012) estudaram úlceras em neuropatia diabética. O debridamento e a aplicação de gel de PRP, em conjunto, são efetivos no tratamento das úlceras. Usaram como tratamento coadjuvante terapia com oxigênio hiperbárico, citocinas e fatores de crescimento. Nesse estudo, os casos foram avaliados com o uso de PRP em forma de gel e os autores concluíram que houve uma redução de 30% do tempo de cicatrização.

Gauglitz *et al.* (2012) avaliaram amostras de pele obtidas de pacientes após lesão por queimadura grave e a presença de queratinócitos em injúria cutânea por queimadura aguda, em comparação com o grupo controle. Concluíram que os fatores de crescimento estavam presentes em ambas as amostras, porém diferindo na secreção dos queratinócitos, encontrados em maior número de células proliferativas nos tecidos queimados. Isso demonstra, segundo os autores, que os fatores de crescimento podem contribuir para a cicatrização de queimaduras.

Knox *et al.* (2006), em estudo de escara de decúbito, avaliaram o uso do PRP isolado e em combinação com retalho de pele. O estudo teve duração de 27 semanas. Nas 13 primeiras semanas foram usadas diversas terapias e na 14.<sup>a</sup> semana foi introduzido o PRP, ao qual associou-se redução de 26% da profundidade da ferida em quatro semanas. Na 19.<sup>a</sup> semana, a terapia do PRP foi combinada com retalho de pele que resultou em um retalho de tecido rico em plaquetas. A combinação mostrou-se efetiva, por eliminar o espaço morto e reduzir a dimensão da ferida.

Kazakos *et al.* (2009) analisaram 59 pacientes com feridas agudas (fraturas abertas e fechadas, com necrose de pele e queimaduras por fricção), e separaram em dois grupos aleatoriamente, Grupo A (32 pacientes) tratados com curativos convencionais e Grupo B (27 pacientes) tratados com aplicação de PRP gel. A taxa de cicatrização das feridas foi significativamente mais rápida no Grupo B, nas três primeiras semanas. O tempo para cirurgia plástica reconstrutora do Grupo B foi de 21 a 26 dias e no Grupo A foi de 40 a 46 dias. Esse estudo mostrou que o tratamento com PRP gel pode ter um valor efetivo no cuidado de feridas de trauma agudo.

Hsu *et al.* (2009) estudaram que o uso do PRP pode acelerar a cicatrização de feridas da cavidade oral em função da maior concentração de fatores de crescimento. Poucos estudos têm investigado o efeito negativo do PRP. Nesse estudo, investigaram se o PRP contém um efeito inibidor da angiogênese pela

presença da trombospondin-1 (TSP-1). Deixaram PRP e PPP em incubação por seis dias e observaram que a produção do TSP-1 foi muito maior no PRP. A alta concentração do PRP inibe a proliferação das células orais. Alta concentração do PRP inibe a proliferação celular devido a abundante secreção do TSP-1. Os autores apontam para os efeitos negativos do PRP.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Animais

Neste estudo, foram utilizadas 45 ratas *Wistar* (*RATTUS norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), adultas, fêmeas, idade entre 115 e 130 dias, e peso médio 234 gramas (DP  $\pm 45,4$ ), variando de 200 a 253 gramas. O manejo dos animais foi efetuado conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals" (OLFERT; CROSS; WILLIAN, 1993). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, portaria 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, sob PROCESSO: 23075.013736/2012-11 (Anexo 1).

##### 3.1.2 Local do experimento, ambiente e alimentação

O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica na Universidade Federal do Paraná, ambiente apropriado para manipulação dos animais e execução dos procedimentos cirúrgicos. Durante todo o período de estudo, os animais permaneceram em gaiolas coletivas de (41,4cm x 34,4cm x 16cm) e agrupados em cinco animais por gaiola, num total de nove gaiolas. Os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , ruído e luminosidade (ciclos claro-escuro de 12 horas – Cronomat®, Mallory do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

Os animais foram observados durante o período de estudo no Biotério da UFPR; as condições de higiene foram mantidas com troca diária das forrações de cepilho, a adaptação foi de sete dias e o período de estudo foi de 15 dias.

Durante o período de aclimação e de estudo, os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum*, Nuvilab1<sup>®</sup>, produzida pela empresa Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil (Anexo 3).

### 3.1.3 Material utilizado

Foram utilizadas luvas de látex para manipulação diária dos animais (anestesia, documentação fotográfica e biopsia excisional). Lâmina de bisturi número 15, cabo de bisturi número 03, tesoura de iris, punch de 0,6 cm de diâmetro, pinça anatômica, régua milimetrada, campos cirúrgicos, pranchas de madeira para colocação dos animais e micropore para fixação dos animais, gaze, canetas cirúrgicas para marcação das incisões.

A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital Sony DSC-W9 (Sony, Tokio, Japão), com resolução 16 megapixels.

### 3.1.4 Drogas e soluções

Para anestesia e eutanásia dos animais foram utilizados cloridrato de quetamina 50 mg/ml (Vetanarcol<sup>®</sup>, Konig), cloridrato de xilasina 20 mg/ml (Anasedam<sup>®</sup>, Vetbrands). A pesagem foi feita em balança modelo AM 500 Marte<sup>®</sup>, regulada nos padrões do Inmetro.

### 3.1.5 Fatores de crescimento (FC)

Foram usados: VEGF, EGF, IGF, FGF, obtidos da empresa FORMÉDICA (farmácia de manipulação, que forneceu os fatores de crescimento na forma injetável).

Os fatores de crescimento foram obtidos da bactéria *Escherichia Coli*, por meio do método de Engenharia Genética, e importados da Ásia (Coreia do Sul), fornecedor é a PharmaSpecial (Fundada em 1991, empresa de distribuição de insumos químicos e farmacêuticos fracionados). Estes dados foram informados pela farmacêutica/ bioquímica da Formédica.

Foram utilizadas duas ampolas com fatores de crescimento, uma contendo fator de crescimento epitelial, denominada ampola 1, e foi aplicada na ferida 2, e outra denominada ampola 2, contendo fator de crescimento endotelial vascular, fibroblastos e fator de crescimento insulínico, que foi aplicada na ferida 3.

## 3.2 MÉTODO

### 3.2.1 Animais de experimentação

Após a pesagem, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de 15 animais. Foram alimentadas com ração comercial (Nuvital) e com livre acesso à água durante todo o experimento, e mantidas no Biotério da Universidade Federal do Paraná. O ciclo noite e dia, a temperatura e a umidade do ambiente foram controlados.

QUADRO 1 - DIVISÃO DOS GRUPOS DE ACORDO COM O FATOR DE CRESCIMENTO INJETADO E O DIA DA EUTANÁSIA

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	TRATAMENTO
D3	15	Ferida 1 controle Ferida 2 epitelial (FCE) Ferida 3 mista (FCV+FCF)
D7	15	Ferida 1 controle Ferida 2 epitelial (FCE) Ferida 3 mista (FCV+FCF)
D15	15	Ferida 1 controle Ferida 2 epitelial (FCE) Ferida 3 mista (FCV+FCF)

FONTE: O autor

NOTA: FCE- Fator de crescimento epitelial, FCV- fator de crescimento vascular, FCF- fator de crescimento de fibroblasto.

### 3.2.2 Procedimento anestésico

As ratas foram submetidas a jejum de 12 horas e a restrição hídrica de duas horas no pré-operatório. Para indução anestésica foi utilizada solução feita com um mililitro de quetamina (50mg/ml) e um mililitro de xilasina (10mg/ml) administrando-se 0,2 ml intramuscular para cada 100 g de peso da rata.

### 3.2.3 Confeção das incisões

Após a anestesia foi realizada tricotomia no dorso de cada animal e foram criadas três feridas: uma de 1 cm de diâmetro realizada com bisturi de lâmina fria número 15; as outras duas de 0,6 cm de diâmetro foram confeccionadas com punch. As feridas foram produzidas em tamanhos distintos com vistas a medir a tensão delas. Não foi realizada a tensão das feridas, pois o tensiômetro não estava disponível e prosseguiu-se o trabalho avaliando a macroscopia e a microscopia. Como se trata de um estudo comparativo de cicatrização entre ferida controle e feridas com fatores de crescimento epitelial e misto, foi possível realizá-lo mesmo sem medir a tensão. Em cada animal, a incisão se estendeu da pele até o plano muscular.

Foram denominadas feridas 1,2,3 (F1,F2,F3), a F1 controle (proximal), F2 (central ou medial) sendo injetado FCE e na F3 (distal) FCV e FCF (denominado fator misto; estes dois fatores estavam num único frasco isovolumétrico e continha fator de crescimento insulínico e que estabilizam os fatores de crescimento inibindo a enzima alfa redutase, que inibe a ação dos fatores de crescimento).

#### 3.2.4 Injeção dos fatores de crescimento

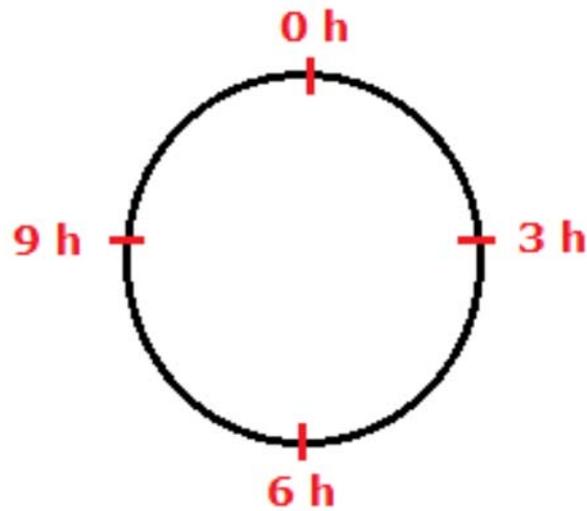
Os fatores de crescimento foram injetados somente no dia da confecção das incisões e foram injetados logo após a confecção das feridas.

Na ferida 1: controle ou proximal, não foi injetado fator de crescimento; na ferida 2 ou ferida epitelial: foi injetado FCE (fator de crescimento epitelial, e na ferida 3 ou mista foi injetado FCV, FCF e FCI (fator de crescimento vascular, de fibroblastos e insulínico). Para injeção dos fatores de crescimento, foram utilizadas seringa e agulha de insulina 13x03 mm, foram injetados 0,5 ml por ferida em 0, 3, 6 e 9 horas.

A infiltração foi feita com seringa e agulha de insulina 13/03 gauge e infiltrados 0,5 ml por ferida em quatro pontos, 0, 3, 6 e 9 horas na derme e tecido celular subcutâneo.

As feridas foram deixadas cicatrizar espontaneamente.

FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO, MOSTRANDO O LOCAL DE INFILTRAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO NAS FERIDAS EPITELIAL E MISTA. NOS QUATRO QUADRANTES, 0, 3, 6 E 9 H



FONTE: O autor

FIGURA 2 - DENOMINAÇÃO DAS FERIDAS, FERIDA 1 – CONTROLE (1,0 CM DE DIAM.), FERIDA 2- EPITELIAL (0,6CM DE DIAM.), FERIDA 3 – MISTA (0,6 CMDE DIAM)



FONTE: O autor

### 3.2.5 Pós-operatório

Ao fim da lesão experimental cada rata foi colocado na gaiola até completa recuperação anestésica. Durante todo o período de estudo os animais foram

observados diariamente, até o dia da eutanásia, a fim de monitorar o estado geral das ratas e complicações locais ou atrasos na cicatrização.

### 3.3 INSPEÇÃO DAS FERIDAS

#### 3.3.1 Distribuição dos grupos e identificação dos animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de 15 animais, sendo que em cada grupo avaliou-se a cicatrização em fases diferentes. No grupo 1 avaliou-se no terceiro dia, no grupo dois no sétimo dia e no grupo três no décimo quinto dia. Estes animais foram mortos no terceiro, sétimo e décimo quinta dia, para avaliar o processo de cicatrização, neovascularização, fibroplasia e proliferação epitelial.

#### 3.3.2 Controle fotográfico

As feridas excisionais de 1,0 cm (ferida controle), e 0,6 cm de diâmetro (ferida epitelial e ferida mista), foram documentadas diariamente, com fotografia digital padrão.

Os animais foram fotografados diariamente, e as feridas foram medidas pelo diâmetro de cada um delas nos 15 dias do experimento. Diariamente foram medidas as feridas controle (1), epitelial (2) e mista (3) de todos os animais e feita a média das feridas.

Foi usada uma câmera digital Sony DSCW 9, 16 mega pixels (Sony Corporation Cyber Shot, Tokio, Japão)®. Foram obtidas fotografias diárias de todos as ratas com a máquina fixada a 15 cm acima da superfície, com as ratas mobilizadas, sem anestesia.

### 3.3.3 Eutanásia

As ratas foram submetidas à morte com Pentobarbital (120mg/kg intraperitoneal) nos dias 3, 7 e 15 do experimento. A área da ferida foi totalmente ressecada para avaliação histológica. Os espécimes foram identificados, conforme o grupo a que pertencia o animal e fixados em formalina a 10%.

### 3.3.4 Avaliação da contração da ferida

As feridas foram consideradas circulares, e realizada a medida do diâmetro da ferida, por meio das fotos, com uma régua comum milimetrada. Os resultados da redução dos diâmetros das feridas foram colocados num gráfico com as percentagens das respectivas medidas avaliadas.

## 3.4 ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

### 3.4.1 Avaliações histológicas

Os experimentos foram feitos conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (Anexo 1). Os estudos histológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Após morte dos animais, no terceiro, sétimo e décimo quinto dias de experimento, por meio de aplicação de anestésico em dose letal, foram removidos os retalhos cutâneo-aponeuróticos, contendo as lesões, e os espécimes foram imediatamente imersos em solução salina de formol a 10%, para fixação pelo período

de 24 horas. Na sequência, o material foi amostrado e submetido a processamento histológico automatizado e emblocamento em parafina. Os espécimes emblocados em parafina foram seccionados a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica, Alemanha). Lâminas histológicas contendo as secções foram coradas pelas técnicas da hematoxilina e eosina e *Picro Sirius Red*. Secções adicionais foram confeccionadas para técnica da imunistoquímica, utilizando-se o anticorpo antivimentina.

Com os cortes corados em hematoxilina e eosina, foram avaliadas a quantidade de neutrófilos polimorfonucleares, células inflamatórias crônicas (linfócitos e plasmócitos), capilares neoformados, fibroblastos em proliferação e quantidade de fibras depositadas. A regeneração epitelial foi considerada como parcial ou completa.

Cortes corados em *Picro Sirius Red* foram utilizados para avaliar a presença e o tipo de colágeno (se maduro ou imaturo) por meio de microscopia de luz polarizada, captura de imagem com câmera digital e estudo morfométrico com software Image ProPlus®, quantificando-se em porcentagem ambos os tipos de colágeno (Colágeno Jovem = Verde; Colágeno Maduro = Vermelho).

Cortes histológicos, submetidos ao estudo imunistoquímico e marcados com anticorpo antivimentina, foram utilizados para se identificar os fibroblastos e os capilares neoformados.

Foi avaliada a quantidade de células inflamatórias, tais como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e os neovasos, na fase aguda da cicatrização, e contados três campos por lâmina. Também avaliaram-se os tipos de colágeno, colágeno imaturo e maduro, bem como o aspecto final da cicatrização e a proliferação celular.

As peças foram divididas utilizando-se lâminas de bisturi, em fragmentos no local das feridas.

#### 3.4.1.1 Análise qualitativa do colágeno

Foi feita a identificação e quantificação das fibras colágenas maduras (tipo I) e imaturas (tipo III) por meio da técnica de microscopia óptica com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. Após emblocamento dos tecidos em

parafina, foram realizados microtomias (5 µm) e subsequente coloração com picrossirius-red.

Os cortes histológicos foram analisados por meio de microscopia óptica (com fonte de luz polarizada Olympus U-pot para evidenciar o colágeno). As imagens foram captadas por uma câmera fotográfica (Nikon® 0,45X, Tóquio, Japão), digitalizadas e analisadas pelo aplicativo Image ProPlus® (midia cibernética, São Paulo, Brasil), em aumento de 400X. No sistema RGB (*Red, Blue, Green*) considerando-se tons de vermelho e laranja o colágeno maduro (tipo I) e tons de verde o colágeno imaturo (tipo III).

Em cada campo analisado foi calculada a área ocupada por colágeno maduro e imaturo, desconsiderando as áreas escuras e de outras tonalidades. A soma das porcentagens de fibras maduras e imaturas em cada amostra totalizou 100%.

#### 3.4.1.2 Análise da vimentina

No estudo imunoistoquímico, utilizou-se anticorpo antivimentina para identificar os fibroblastos e os capilares neoformados. Foi utilizado Microscópio Olympus BX 50 em objetiva de 20X e aumento de 200X). A captura das imagens foi realizada com a câmera Dino-eye AM® – 423X e software da câmera Dino-lite®. A análise das imagens foi realizada por meio do software Image Pró-plus 4.5®.

#### 3.4.1.3 Preparo das lâminas

As amostras foram confeccionadas conforme técnicas convencionais e emblocadas em parafina, sendo um bloco por ferida, três blocos por rata.

As lâminas foram coradas com HE, *PSR* e Vimentina.

Os cortes corados com HE foram utilizados para avaliar a cicatrização e aqueles corados com técnicas especiais (*Vimentina* e *PSR*), para verificar a qualidade da cicatriz.

#### 3.4.1.4 Avaliação morfológica

Foram avaliados pelo patologista três campos por lâminas e contados o número de células por campo, com aumento de 100X, a quantidade de células predominantes na reação inflamatória (infiltrados poli e monomorfonucleares) e o grau de formação de tecido de granulação (neovascularização) e de fibroplasia. A regeneração epitelial foi classificada como completa e incompleta.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após avaliação dos aspectos macroscópicos e microscópicos, das feridas 1,2 e 3 foi comparada com a coloração HE em relação a todas as variáveis do estudo (neutrófilos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos, vasos), e feita a análise separada para cada momento de avaliação (3, 7 e 15 dias) e submetidos à análise estatística. Para Vimentina foi feita da mesma maneira que para HE. Para HE e Vimentina foram comparados os momentos de avaliação (3, 7 e 15 dias), em relação a todas as variáveis do estudo. As análises foram feitas separadamente para cada um dos tratamentos da ferida. A distribuição dos dados foram testados para normalidade.

Os resultados obtidos no estudo foram descritos por técnicas estatísticas de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação das feridas 1, 2 e 3 (tratamentos) em relação a variáveis quantitativas (neutrófilos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos, vasos) foi considerado o teste não paramétrico de Friedman. Os momentos de morte foram comparados usando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

Inicialmente, para cada uma das variáveis avaliadas, em cada dia de morte, foram comparadas as três feridas 1, 2 e 3. Para tanto, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nas três feridas, *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos uma ferida tem resultados diferentes das demais. No caso de rejeição da hipótese nula, as feridas foram comparadas duas a duas.

Em seguida, considerando-se cada uma das feridas, foram comparados os momentos de avaliação de três dias, sete dias e quinze dias. Assim, para cada variável, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos três momentos, *versus* a hipótese alternativa de que em pelo menos um dos momentos os resultados são diferentes dos demais. No caso de rejeição da hipótese nula, os momentos de avaliação foram comparados pelo pareamento de duas a duas.

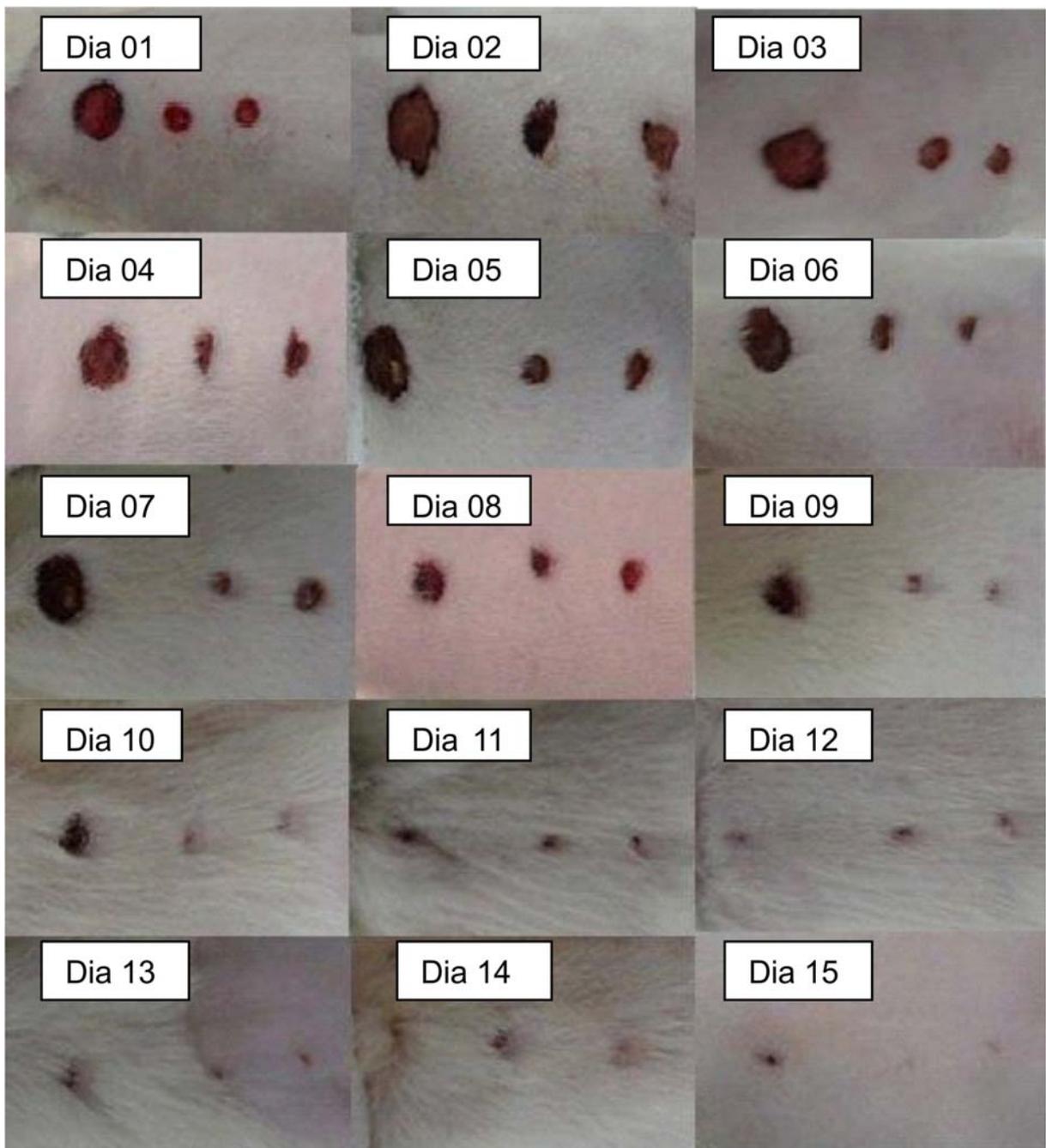
## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

#### 4.1.1 Avaliação macroscópica das feridas

A avaliação macroscópica das feridas foi realizada diariamente e registrada em fotografias. Foram medidas as feridas 1, 2 e 3 de todas as ratas, por meio de uma régua graduada em milímetros posicionada ao nível da lesão e foi feita a média entre todas as feridas 1, 2 e 3 em cada dia do experimento.

FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DAS FERIDAS DO PRIMEIRO AO DÉCIMO QUINTO DIA DO EXPERIMENTO, TIRADAS EM DIFERENTES ANIMAIS



FONTE: O autor

Após obtidas todas as medidas de todos os dias, elaborou-se uma tabela com as porcentagens de redução das feridas. Na ferida 1, que é a ferida controle (sem uso de fator de crescimento), houve redução de oitenta por cento, nos quinze dias do experimento. Na ferida 2, ferida com injeção de fator de crescimento epitelial, houve redução de oitenta e três por cento da ferida nos quinze dias do experimento. Na ferida 3, ferida com injeção de fator endotelial e insulínico, houve redução total da ferida nos quinze dias do experimento

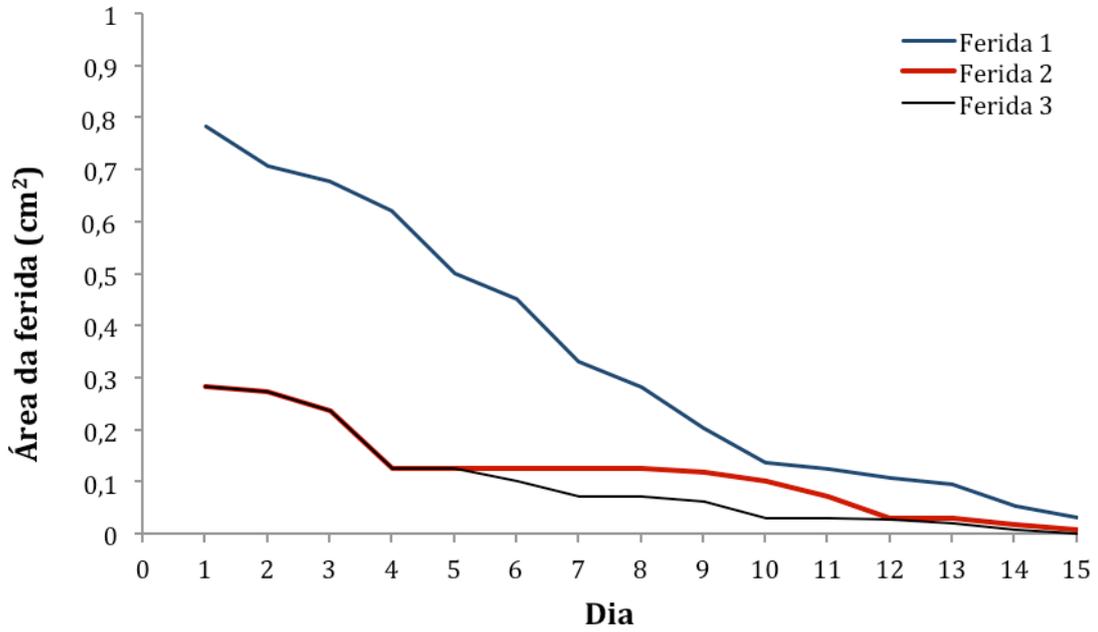
TABELA 1 - MEDIDA DO DIÂMETRO, ÁREA E PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DAS FERIDAS

DIA	FERIDA 1			FERIDA 2			FERIDA 3		
	Tamanho (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	Redução %	Tamanho (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	Redução%	Tamanho (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	Redução%
1	1	<b>0,785</b>	100	0,6	<b>0,283</b>	100	0,6	<b>0,283</b>	100
2	0,95	<b>0,708</b>	95	0,59	<b>0,273</b>	98	0,59	<b>0,273</b>	98
3	0,93	<b>0,679</b>	93	0,55	<b>0,237</b>	92	0,55	<b>0,237</b>	92
4	0,89	<b>0,621</b>	89	0,4	<b>0,126</b>	67	0,4	<b>0,126</b>	67
5	0,8	<b>0,502</b>	80	0,4	<b>0,126</b>	67	0,4	<b>0,126</b>	67
6	0,76	<b>0,453</b>	76	0,4	<b>0,126</b>	67	0,36	<b>0,102</b>	60
7	0,65	<b>0,331</b>	65	0,4	<b>0,126</b>	67	0,3	<b>0,071</b>	50
8	0,6	<b>0,283</b>	60	0,4	<b>0,126</b>	67	0,3	<b>0,071</b>	50
9	0,51	<b>0,204</b>	51	0,39	<b>0,119</b>	65	0,28	<b>0,062</b>	47
10	0,42	<b>0,138</b>	42	0,36	<b>0,102</b>	60	0,2	<b>0,031</b>	33
11	0,4	<b>0,126</b>	40	0,3	<b>0,071</b>	50	0,2	<b>0,031</b>	33
12	0,37	<b>0,107</b>	37	0,2	<b>0,031</b>	33	0,19	<b>0,028</b>	32
13	0,35	<b>0,096</b>	35	0,2	<b>0,031</b>	33	0,16	<b>0,02</b>	27
14	0,26	<b>0,053</b>	26	0,15	<b>0,018</b>	25	0,1	<b>0,008</b>	17
15	0,2	<b>0,031</b>	20	0,1	<b>0,008</b>	17	0	<b>0</b>	0

FONTE: O autor

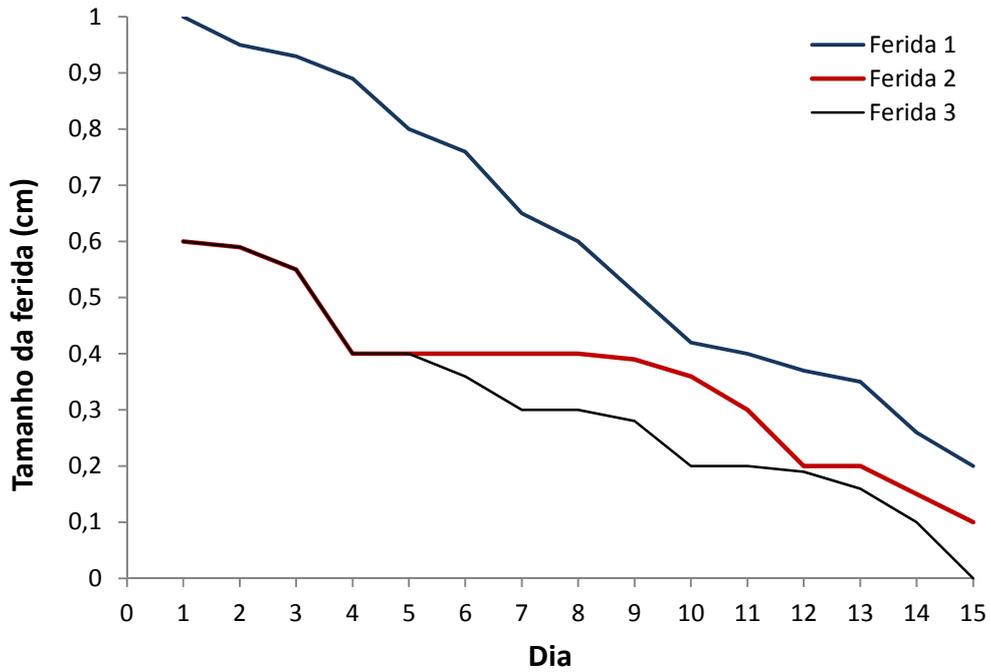
NOTA: Medida em centímetro em todos os animais, todos os dias do experimento.

FIGURA 4 - GRÁFICO COMPARATIVO DA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 POR MEIO DA MEDIDA DAS FERIDAS 1, 2 E 3, EM ÁREA, NOS 15 DIAS DO EXPERIMENTO



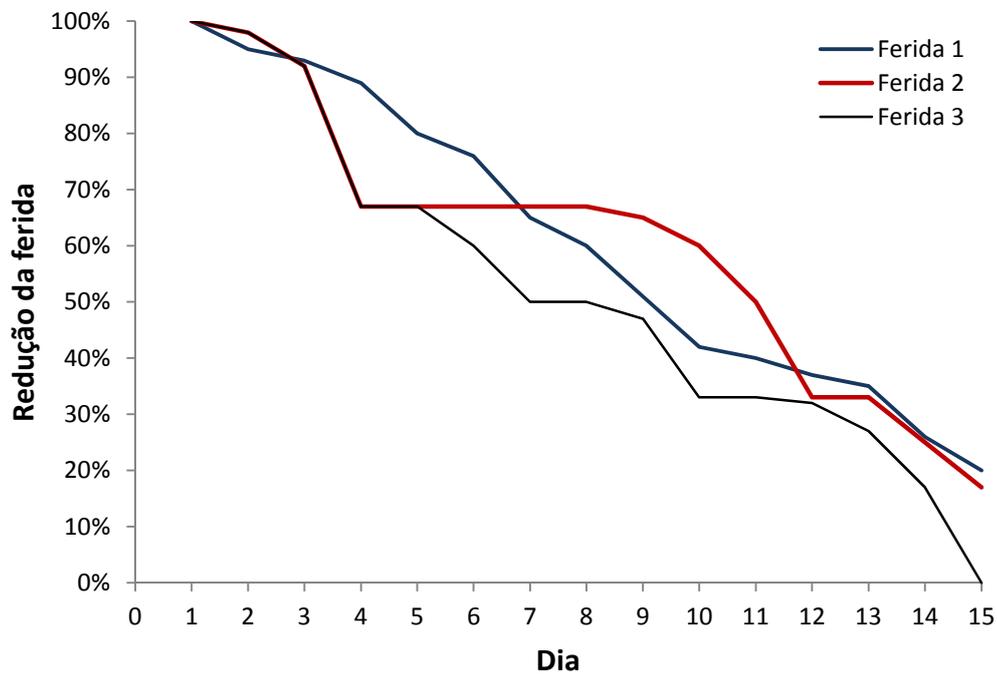
FONTE: O autor

FIGURA 5 - GRÁFICO COMPARATIVO DA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 POR MEIO DA MEDIDA DAS FERIDAS 1, 2 E 3, EM CENTÍMETROS, NOS 15 DIAS DO EXPERIMENTO



FONTE: O autor

FIGURA 6 - GRÁFICO COMPARATIVO DA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 POR MEIO DA MEDIDA DAS FERIDAS 1, 2 E 3, EM PORCENTAGEM, NOS 15 DIAS DO EXPERIMENTO



FONTE: O autor

No terceiro dia do experimento, todas as feridas estavam abertas, na ferida controle havia pouca contração de ferida e muito tecido de granulação; nas feridas epiteliais e mista, havia uma discreta melhora em relação à ferida controle.

### Terceiro Dia

FIGURA 7 - EXEMPLO DAS FERIDAS NO TERCEIRO DIA DO EXPERIMENTO, PRÉVIO À EXÉRESE DAS FERIDAS



FONTE: O autor

No sétimo dia do experimento, as feridas ainda estavam abertas com ligeira contração de todas as feridas, mas a ferida controle apresentava tecido de granulação, mostrando retardo na cicatrização.

### Sétimo Dia

FIGURA 8 - EXEMPLO DAS FERIDAS NO SÉTIMO DIA DO EXPERIMENTO, PRÉVIO À EXÉRESE DAS FERIDAS



FONTE: O autor

No décimo quinto dia do experimento, as cicatrizes das feridas apresentaram-se da seguinte forma: na ferida controle houve redução de  $80 \pm 0,311\%$  da ferida, na ferida epitelial a redução foi de  $83 \pm 0,201\%$  e na ferida mista foi de  $100\%$ .

### Décimo Quinto Dia

FIGURA 9 - EXEMPLO DAS FERIDAS NO DÉCIMO QUINTO DIA DO EXPERIMENTO, PRÉVIO À EXÉRESE DAS FERIDAS



FONTE: O autor

## 4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

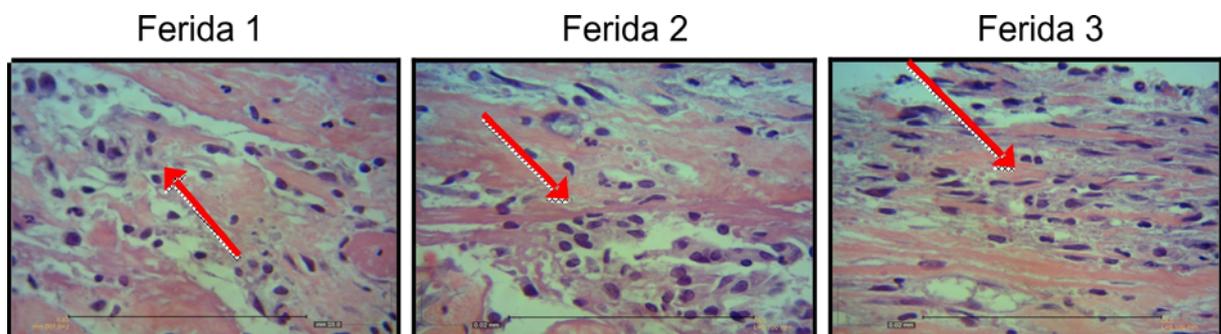
Inicialmente, para cada uma das variáveis avaliadas, em cada dia de morte, foram comparadas as três feridas 1, 2 e 3. Para tanto, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nas três feridas, *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos uma ferida tem resultados diferentes das demais. No caso de rejeição da hipótese nula, as feridas foram comparadas duas a duas.

Em seguida, considerando-se cada uma das feridas, foram comparados os momentos de avaliação de três dias, sete dias e 15 dias. Para tanto, para cada variável, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nos três momentos, *versus* a hipótese alternativa de que em pelo menos um dos momentos os resultados são diferentes dos demais. No caso de rejeição da hipótese nula, os momentos de avaliação foram comparados duas a duas.

### 4.2.1 Análise microscópica morfológica

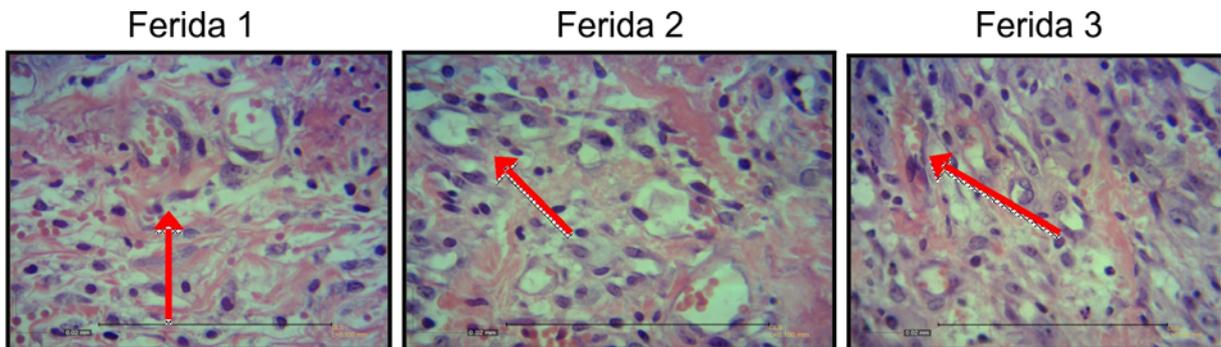
Nas figuras 10, 11 e 12, são exibidas detalhes histológicos das cicatrizes, nos três espaços de tempo avaliados.

FIGURA 10 - FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS MOSTRANDO A PRESENÇA DE PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO 3.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3 (HE 100x)



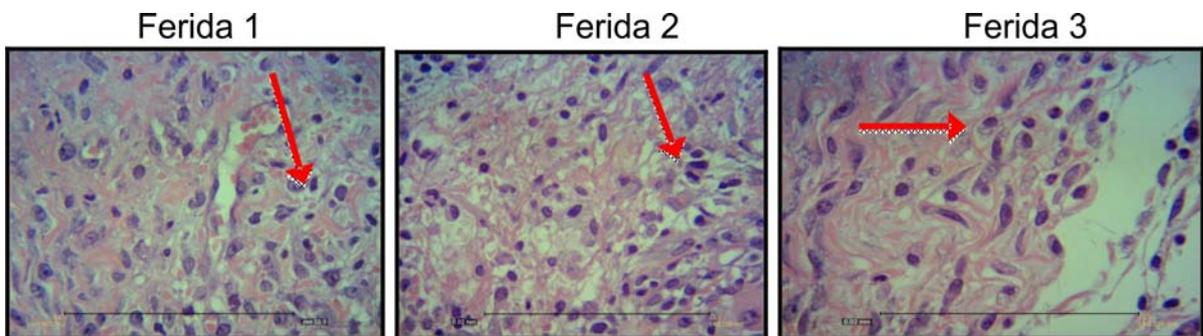
FONTE: O autor

FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS MOSTRANDO A PRESENÇA DE PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO 7.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 e 3 (HE 100x)



FONTE: O autor

FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIAS DE CORTES HISTOLÓGICOS MOSTRANDO A PRESENÇA DE PROCESSO INFLAMATÓRIO, NO 15.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 e 3 (HE 100x)



FONTE: O autor

#### 4.2.1.1 Avaliação de HE – neutrófilos no 3.º, 7.º e 15.º dias

Ao comparar os três tipos de ferida, em cada dia de morte, não foram encontradas diferenças significativas entre as feridas em relação ao número de neutrófilos (HE) (Tabela 2).

TABELA 2 - AVALIAÇÃO DE HE- NEUTRÓFILOS NO 3.º, 7.º E 15.º DIAS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

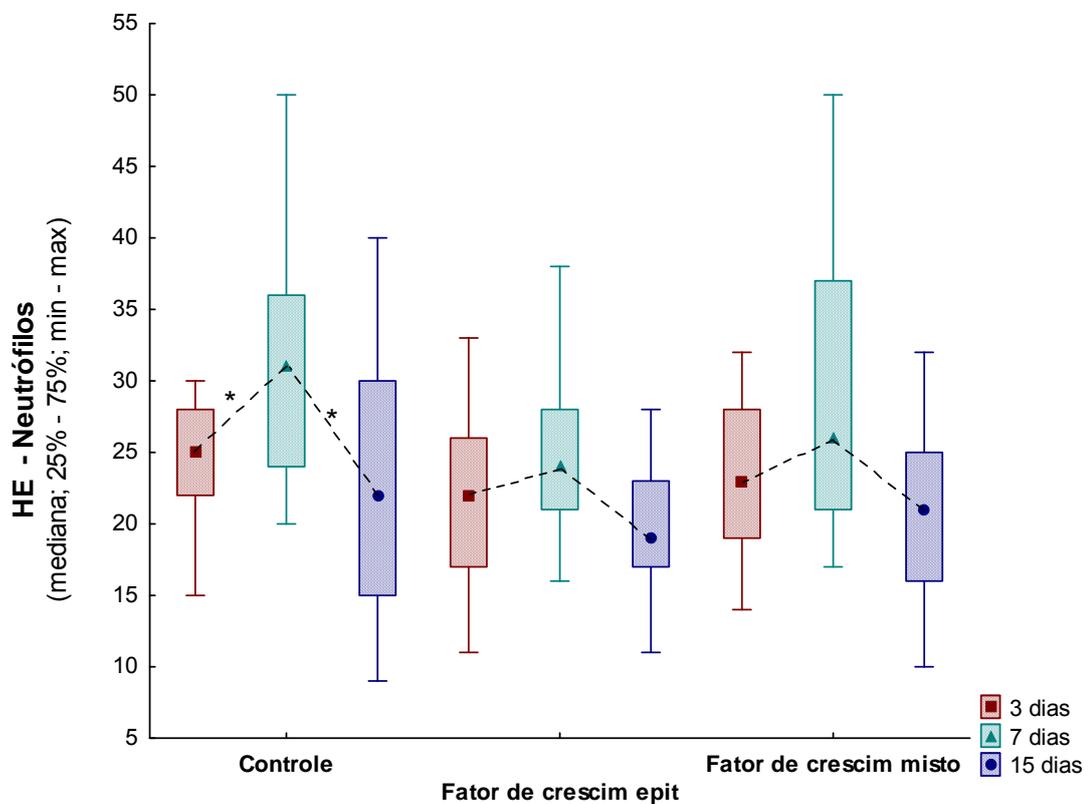
DIA DO SACRIFÍCIO	FERIDA	N	MÉDIA ± DP	p <sup>(1)</sup>
3 dias	Controle	15	24,2 ± 4,5	0,482
	Ferida epitelial	15	21,7 ± 5,7	
	Ferida mista	15	22,9 ± 5,2	
7 dias	Controle	15	31,6 ± 8,4	0,155
	Ferida epitelial	15	24,8 ± 5,5	
	Ferida mista	15	28,5 ± 9,6	
15 dias	Controle	15	23,1 ± 9,6	0,856
	Ferida epitelial	15	19,9 ± 4,4	
	Ferida mista	15	20,7 ± 6,2	

FONTE: O autor

(1) Teste não paramétrico de Friedman,  $p < 0,05$ ; n: número de animais; dp: desvio padrão; p: resultado do teste estatístico.

Entretanto, ao avaliar a evolução de cada ferida nos três dias de morte, foi encontrada diferença significativa para a ferida controle, onde apresentou maior número de neutrófilos. Para esta ferida, houve diferença entre o 3.º e o 7.º dias ( $p=0,029$ ) e entre o 7.º e o 15.º dias ( $p=0,007$ ). Já entre o 3.º e o 15.º dias não foi observada diferença significativa, pois os resultados foram similares ( $p=0,557$ ). Para as feridas com fator de crescimento epitelial e com fator de crescimento misto, os resultados foram menores apresentando tendência a significância entre os três dias de avaliação ( $p=0,058$  e  $p=0,076$ , respectivamente) (Figura 13).

FIGURA 13 - EVOLUÇÃO DE HE- NEUTRÓFILOS EM CADA FERIDA, ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias e 7 - 15 dias na ferida controle.

#### 4.2.1.2 Avaliação HE – linfócitos no 3.º, 7.º e 15.º dias

Na comparação das feridas 1, 2 e 3 em cada um dos momentos de morte (comparação entre os grupos), observou-se que, para três dias, a comparação das três feridas indicou que não existe diferença significativa entre elas ( $p=0,270$  que é maior que 0,05). Para sete dias, também não foi verificada diferença significativa entre as três feridas ( $p=0,759$ ). O mesmo foi obtido para quinze dias ( $p=0,451$ ). Os resultados são apresentados na tabela 3.

TABELA 3 - CONTAGEM DE LINFÓCITOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1,2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTO DE MORTE (AVALIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS)

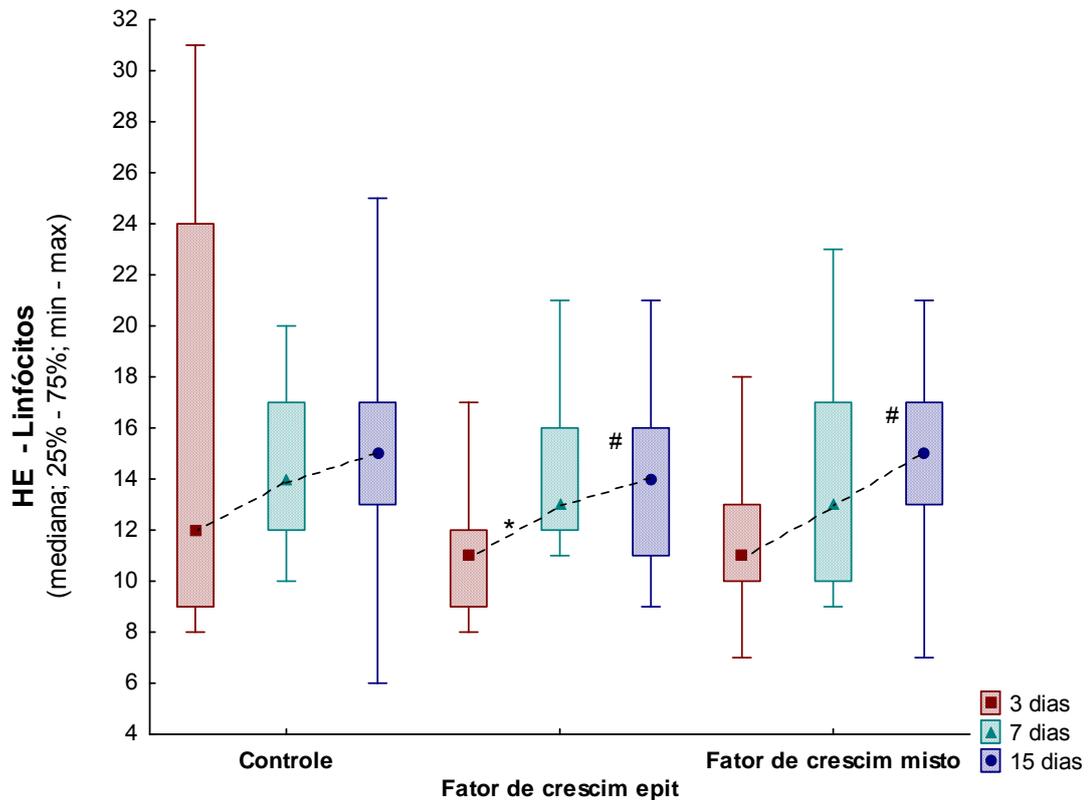
DIA DO SACRIFÍCIO	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
3 dias	Controle	15	15,5 ± 7,6	0,270
	Ferida epitelial	15	11,2 ± 2,4	
	Ferida mista	15	11,5 ± 2,7	
7 dias	Controle	15	14,5 ± 2,7	0,759
	Ferida epitelial	15	14,1 ± 2,9	
	Ferida mista	15	13,9 ± 4,3	
15 dias	Controle	15	14,9 ± 5,3	0,451
	Ferida epitelial	15	14,1± 3,4	
	Ferida mista	15	15,0± 3,5	

FONTE: O autor

(1) Teste não-paramétrico de Friedman,  $p<0,05$ .

Na ferida 1 (controle) os resultados foram similares quando os dias de avaliação foram comparados em relação aos linfócitos ( $p=0,774$ ). Já para a ferida 2 (epitelial), foi observada diferença significativa, aumento do numero de linfócitos entre o 3.º e o 7.º dias ( $p=0,007$ ) e entre o 3.º e o 15.º dias ( $p=0,007$ ). Não houve diferença significativa entre o 7.º e o 15.º dias, os resultados foram semelhantes. Nas comparações entre os dias de avaliação para a ferida 3 (misto), foi encontrada diferença significativa, aumento do numero de linfócitos somente na comparação entre 3.º e 15.º dias (Figura 14).

FIGURA 14 - EVOLUÇÃO DE HE- LINFÓCITOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO INTRAGRUPOS



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias na ferida com fator de crescimento epitelial.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias na ferida com fator epitelial e na ferida com crescimento misto.

#### 4.2.1.3 Avaliação de HE – macrófagos no 3.<sup>o</sup>, 7.<sup>o</sup> e 15.<sup>o</sup> dias

Em relação a macrófagos, tanto para três dias como para sete dias, os resultados foram semelhantes entre as três feridas ( $p=0,247$  e  $p=0,344$ , respectivamente). Já em 15 dias, o resultado apresentou diferença significativa entre as três feridas menor número de macrófagos nas feridas 2 e 3 ( $p=0,005$ ). Ainda para quinze dias, ao comparar as feridas duas a duas, foi observada diferença entre as feridas 1 e 2 ( $p=0,001$ ) menor número de macrófagos para a ferida 2 e entre as feridas 1 e 3, menor número de macrófagos para a ferida 3 ( $p=0,004$ ). As feridas 2 e 3 não apresentaram diferença significativa, pois os resultados foram semelhantes ( $p=0,660$ ) (Tabela 4).

TABELA 4 - CONTAGEM DE MACRÓFAGOS POR CAMPO E A COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

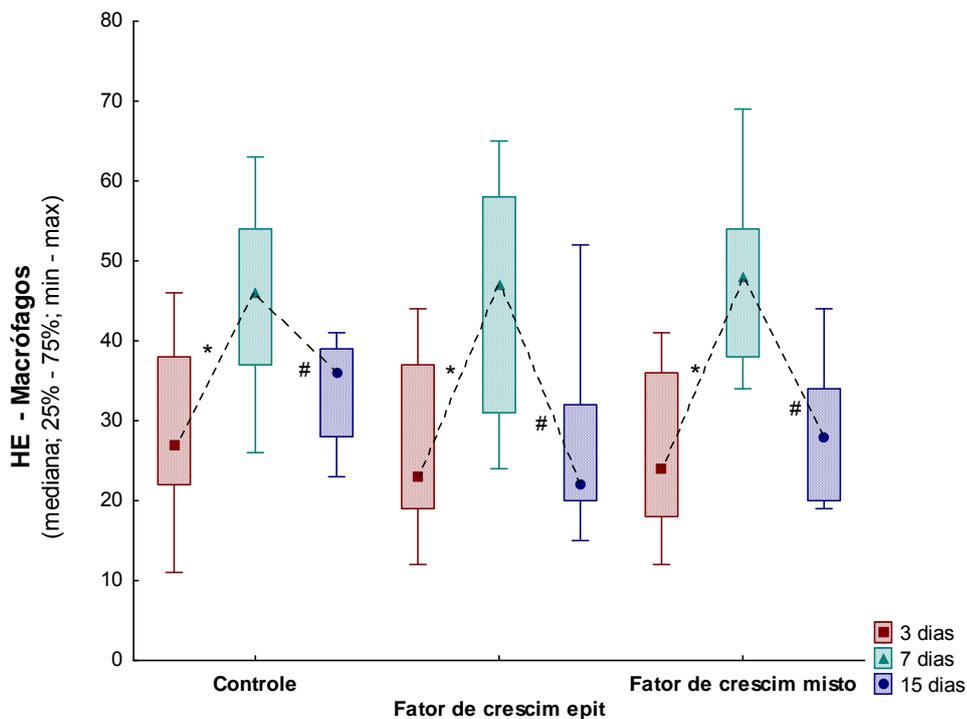
DIA DO SACRIFÍCIO	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
3 dias	Controle	15	28,2± 10,5	0,247
	Ferida epitelial	15	26,9± 10,6	
	Ferida mista	15	25,9± 10,1	
7 dias	Controle	15	45,5± 9,9	0,344
	Ferida epitelial	15	44,8± 13,5	
	Ferida mista	15	48,1± 10,7	
15 dias	Controle	15	33,9± 5,5	0,005
	Ferida epitelial	15	25,8± 10,1	
	Ferida mista	15	27,3± 8,1	

FONTE: O autor

(1) Teste não paramétrico de Friedman,  $p < 0,05$ .

Ao comparar os dias de morte em relação aos macrófagos, foram encontradas diferenças significativas entre eles ( $p < 0,001$  para as três feridas), com diminuição do número de macrófagos. Ao comparar os dias de morte dois a dois, verificaram-se diferenças entre o 3.º e o 7.º dias, maior número de macrófagos no 7.º dia ( $p < 0,001$  para as três feridas) e entre o 7.º e 15.º dias, menor número de macrófagos no 15.º dia ( $p = 0,002$  para a ferida 1;  $p < 0,001$  para as feridas 2 e 3). Também para as três feridas, não foram identificadas diferenças significativas quando o 3.º dia foi comparado com o 15.º dia, os resultados foram similares (Figura 15).

FIGURA 15 - EVOLUÇÃO DE HE- MACRÓFAGOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO INTRAGRUPOS NOS MOMENTOS DE MORTE



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias nas três feridas.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias nas três feridas.

#### 4.2.1.4 Avaliação HE – fibroblastos no 3.º, 7.º e 15.º dias

Ao comparar os três tipos de ferida em relação aos fibroblastos, em cada dia do sacrifício, não foram encontradas diferenças significativas entre as feridas, os resultados foram similares para as três feridas em número de fibroblastos (Tabela 5).

TABELA 5 - CONTAGEM DE FIBROBLASTOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

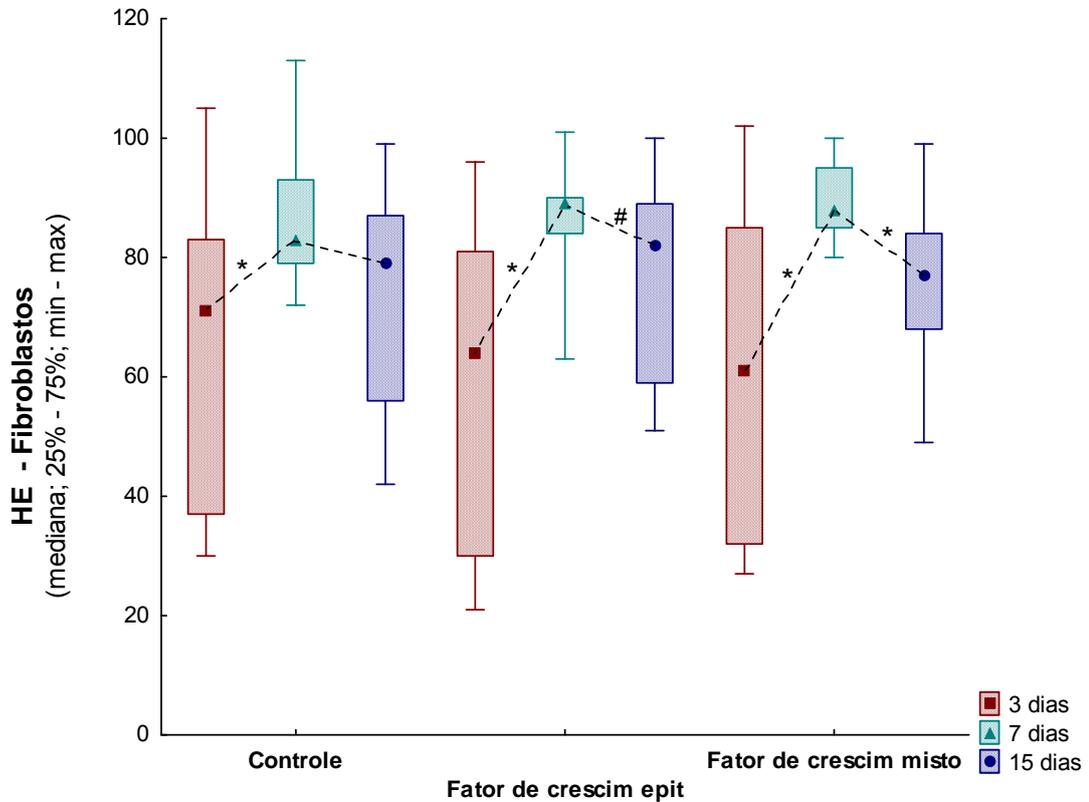
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	63,5± 25,2	0,127
	Ferida epitelial	15	59,1± 26,0	
	Ferida mista	15	60,5± 24,8	
D7	Controle	15	87,1± 11,8	0,627
	Ferida epitelial	15	86,5± 8,7	
	Ferida mista	15	89,1± 6,5	
D15	Controle	15	74,6± 17,5	0,423
	Ferida epitelial	15	77,1± 17,2	
	Ferida mista	15	76,0± 12,6	

FONTE: O autor

(1) Teste não paramétrico de Friedman,  $p < 0,05$ .

Ao comparar os dias de sacrifício em relação aos fibroblastos, foram obtidas diferenças significativas entre eles, maior número de fibroblastos para as feridas epitelial e mista ( $p=0,018$  para a ferida controle;  $p=0,003$  para a ferida epitelial e  $p < 0,001$  para a ferida mista). Ao comparar os dias de morte dois a dois, observaram-se diferenças entre o 3.º e o 7.º dias ( $p=0,004$  para a ferida 1 e  $p < 0,001$  para as feridas 2 e 3, que apresentaram maior número de fibroblastos no sétimo dia). Na comparação entre 3.º e 15.º foi registrada diferença significativa somente para a ferida 2 ( $p=0,044$ ) e na comparação entre 7.º e 15.º dias, somente para a ferida 3 ( $p=0,003$ ) (Figura 16).

FIGURA 16 - EVOLUÇÃO DE HE- FIBROBLASTOS EM CADA FERIDA, ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, AVALIAÇÃO ENTRE GRUPOS



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias nas três feridas e para a diferença 7 - 15 dias na ferida com fator de crescimento misto.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias na ferida com fator de crescimento epitelial.

#### 4.2.1.5 Avaliação HE – vasos no 3.º, 7.º e 15.º dias, avaliação entre os grupos

Ao comparar os três tipos de ferida em relação aos vasos, não foram encontradas diferenças significativas entre as feridas nos três dias de morte, pois os resultados foram semelhantes (Tabela 6).

TABELA 6 - CONTAGEM DE VASOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

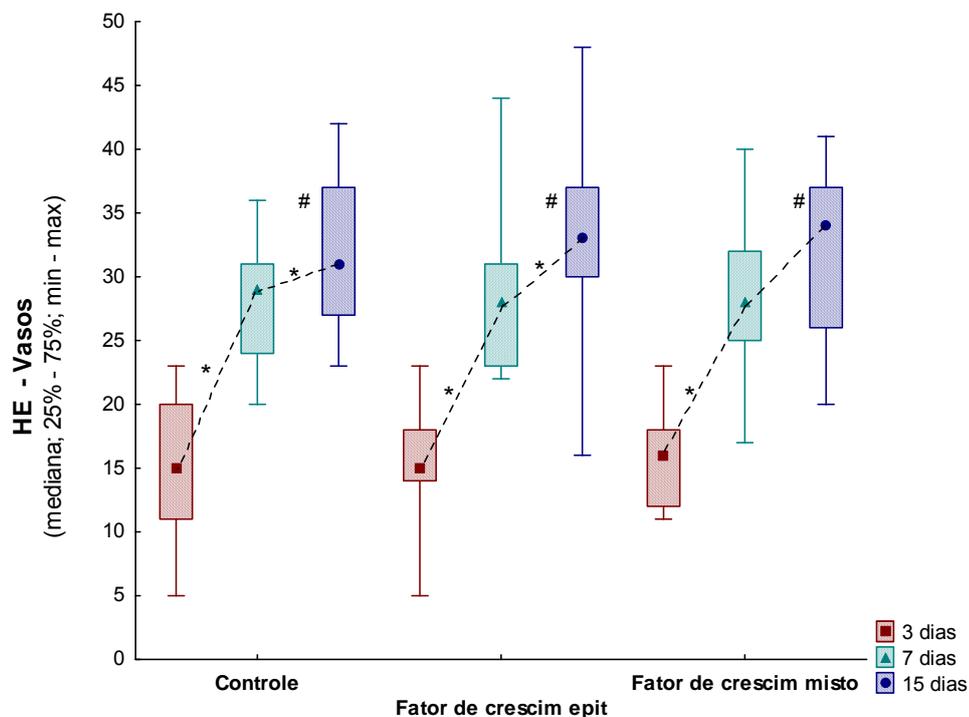
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	15,2 ± 5,7	0,813
	Ferida epitelial	15	15,2 ± 5,0	
	Ferida mista	15	15,9 ± 3,7	
D7	Controle	15	27,8 ± 4,8	0,802
	Ferida epitelial	15	27,9 ± 5,6	
	Ferida mista	15	28,9 ± 6,5	
D15	Controle	15	31,9 ± 6,3	0,884
	Ferida epitelial	15	32,6 ± 8,4	
	Ferida mista	15	32,1 ± 6,4	

FONTE: O autor

(1) Teste não paramétrico de Friedman,  $p < 0,05$ .

Ao avaliar a evolução de cada ferida nos três dias de morte foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,001$  para as três feridas, maior número de vasos). Na comparação dos dias de morte dois a dois, houve diferença significativa entre o 3.º e 7.º dias ( $p < 0,001$  para as três feridas) e houve também diferenças significativas entre o 3.º e 15.º dias ( $p < 0,001$  para as três feridas). Já entre o 7.º e 15.º dias houve diferença significativa para as feridas 1 e 2 ( $p = 0,044$  e  $p = 0,035$ , respectivamente) (Figura 17).

FIGURA 17 - EVOLUÇÃO DE HE- VASOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, AVALIAÇÃO INTRAGRUPO



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias nas três feridas e diferença 7 - 15 dias nas feridas controle e com crescimento epitelial.

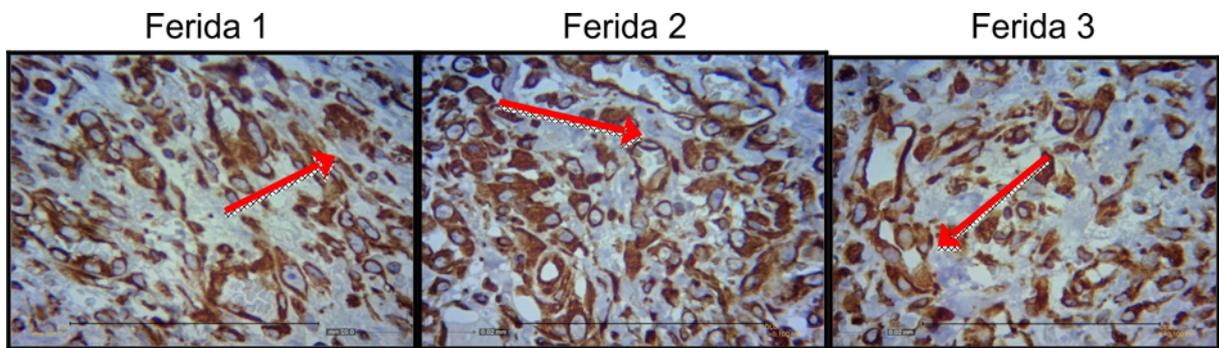
#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias nas três feridas.

### 4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA MORFOMÉTRICA

#### 4.3.1 Análise imunoistoquímica

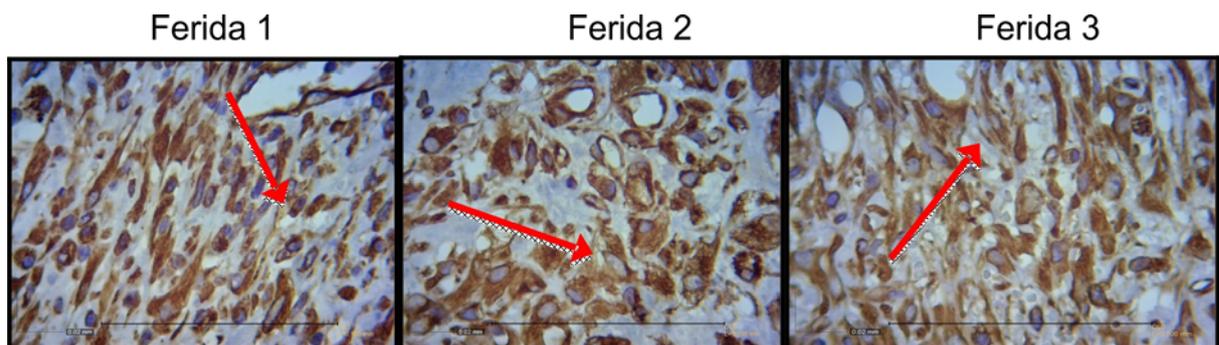
As figuras 18, 19 e 20 mostram detalhes histológicos das cicatrizes, nos três espaços de tempo avaliados.

FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIA VIMENTINA - NAS QUAIS SE AVALIAM MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS E VASOS, NO 3.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (VIM.200X)



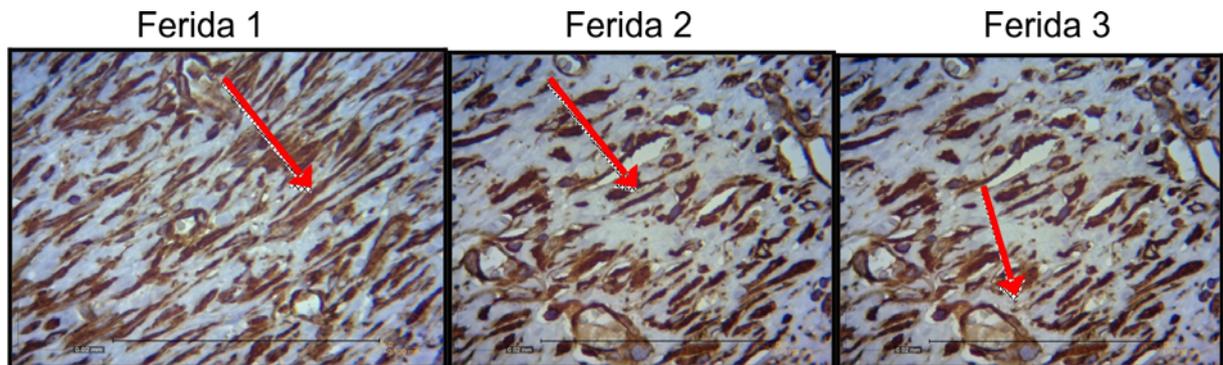
FONTE: O autor

FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIA VIMENTINA - NAS QUAIS SE AVALIAM MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS E VASOS, NO 7.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (VIM.200X)



FONTE: O autor

FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIA VIMENTINA- NAS QUAIS SE AVALIAM MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS E VASOS, NO 15.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (VIM.200X)



FONTE: O autor

#### 4.3.1.1 Avaliação de vimentina fibroblastos no 3.º, 7.º e 15.º dias

Ao comparar os três tipos de ferida, em cada dia de morte, não foram encontradas diferenças significativas entre as feridas em relação à vimentina-fibroblastos, os resultados foram similares (Tabela 7).

TABELA 7 - CONTAGEM DE VIMENTINA FIBROBLASTOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

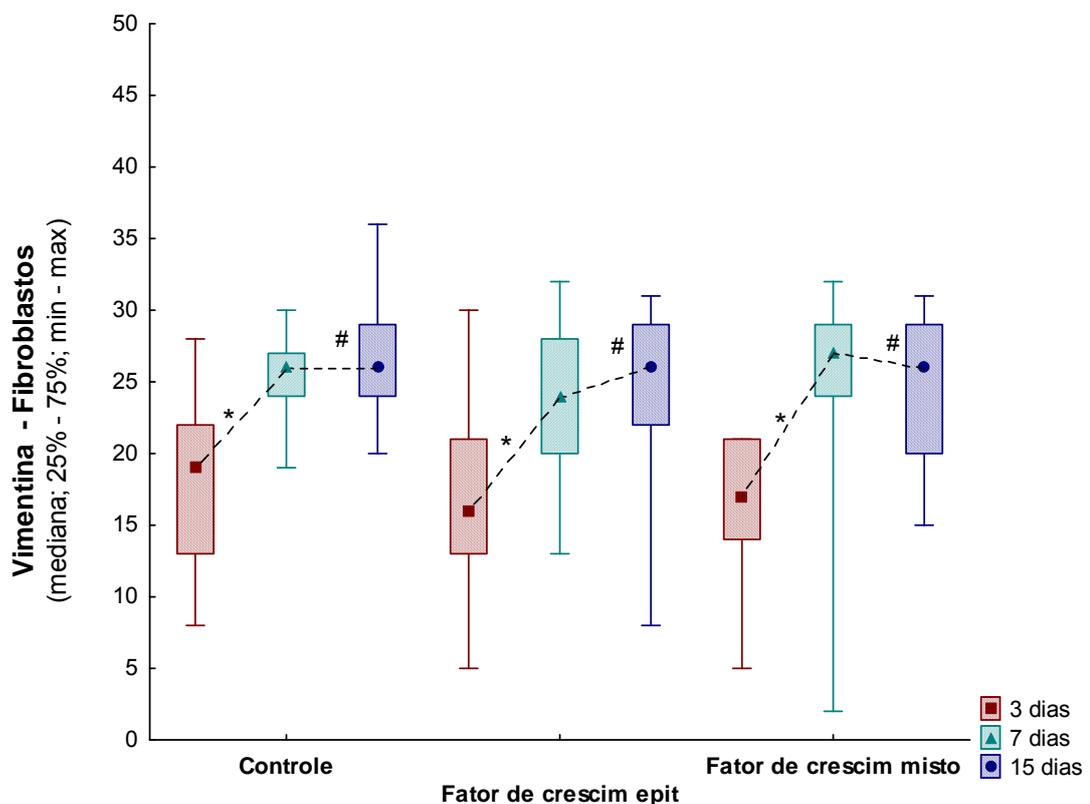
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	17,7 ± 5,7	0,856
	Ferida epitelial	15	16,7 ± 6,3	
	Ferida mista	15	16,0 ± 5,2	
D7	Controle	15	25,3 ± 3,1	0,124
	Ferida epitelial	15	23,2 ± 5,2	
	Ferida mista	15	25,1 ± 7,1	
D15	Controle	15	26,1 ± 4,3	0,878
	Ferida epitelial	15	24,5 ± 6,7	
	Ferida mista	15	25,0 ± 5,3	

FONTE: O autor

(1) Teste não paramétrico de Friedman, p<0,05.

Ao avaliar a evolução de cada ferida nos três dias de morte, foi encontrada diferença significativa ( maior número de fibroblastos) entre nos dias de morte três dias x sete dias x quinze dias ( $p < 0,005$ ). Para as feridas 1, 2 e 3 foi constatada diferença significativa entre os dias de morte, sendo assim estes foram comparados dois a dois. Para três dias x sete dias, houve diferença significativa para as feridas 1 e 3 ( $p < 0,001$ ) e não houve diferença significativa para a ferida 2 ( $p = 0,11$ ). Para três dias X quinze dias houve diferença significativa entre as 3 feridas ( $p < 0,001$ ). E entre sete dias x quinze dias não houve diferença significativa entres as feridas ( $p > 0,005$ ).

FIGURA 21 - EVOLUÇÃO DE VIMENTINA FIBROBLASTOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO DOS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPOS



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias nas três feridas.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias nas três feridas.

#### 4.3.1.2 Avaliação vimentina macrófagos no 3.º, 7.º e 15.º dias

Ao comparar os três tipos de ferida, em cada dia de morte, não houve diferença significativa entre as feridas em relação à vimentina-macrófagos (Tabela 8), sendo que no 7.º dia do experimento houve uma tendência à significância ( $p=0,05$ ).

TABELA 8 - CONTAGEM DE MACRÓFAGOS POR CAMPO E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

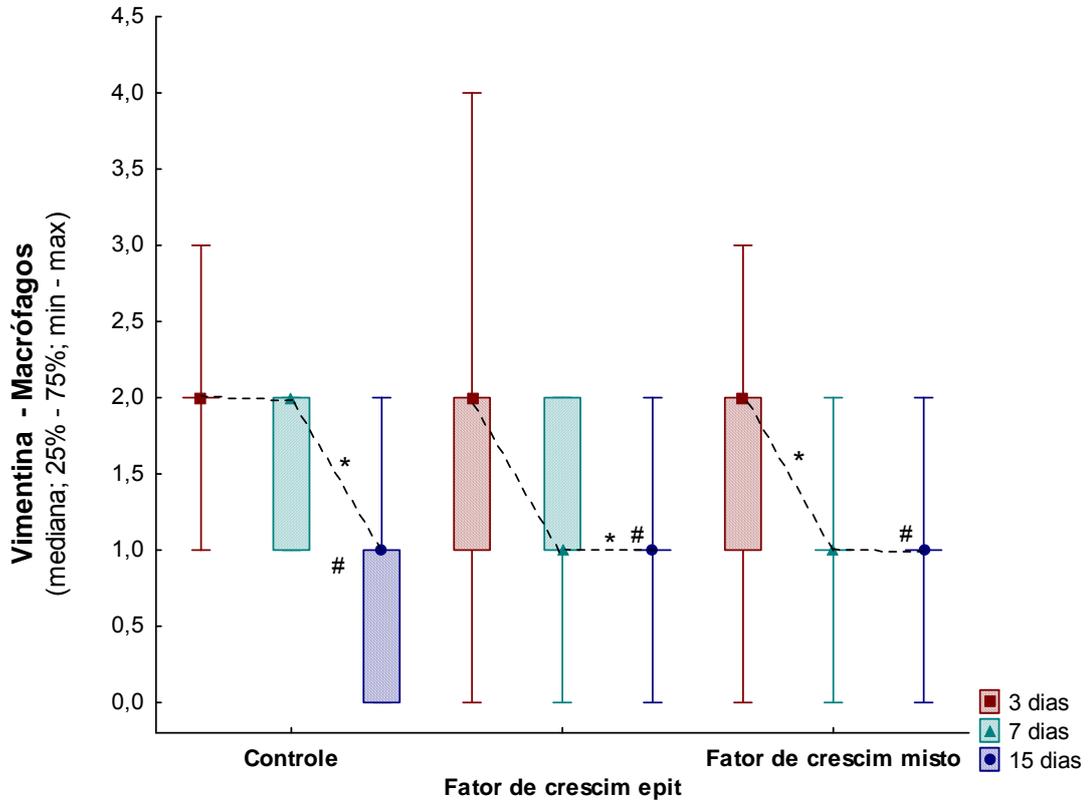
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	1,9 ± 0,6	0,728
	Ferida epitelial	15	1,8 ± 1,0	
	Ferida mista	15	1,8 ± 0,9	
D7	Controle	15	1,5 ± 0,5	0,050
	Ferida epitelial	15	1,3 ± 0,6	
	Ferida mista	15	1,1 ± 0,5	
D15	Controle	15	0,9 ± 0,6	0,786
	Ferida epitelial	15	0,9 ± 0,5	
	Ferida mista	15	1,0 ± 0,5	

FONTE: O autor

(1) Teste não paramétrico de Friedman,  $p<0,05$ .

Entretanto, ao avaliar a evolução de cada ferida nos três dias de morte, foi encontrada diferença significativa, menor número de macrófagos, para as três feridas ( $p<0,001$ ,  $p=0,008$  e  $p=0,007$  respectivamente, para as feridas 1, 2 e 3). Por tal razão foram comparadas duas a duas. Para 3.º e 7.º dias houve diferença significativa para a ferida 3, menor número de macrófagos ( $p=0,010$ ) e para as feridas 1 e 3 não houve diferença significativa, os resultados foram similares ( $p>0,05$ ). Para 3.º e 15.º dias houve diferença significativa para as três feridas ( $p<0,001$ ,  $p=0,001$  e  $p=0,002$ ). E para 7.º e 15.º dias houve diferença significativa apenas para a ferida 1 ( $p=0,004$ ); nas feridas 2 e 3 não houve significância ( $p>0,05$ ).

FIGURA 22 - EVOLUÇÃO DE VIMENTINA MACRÓFAGOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPO



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias na ferida com crescimento misto e para a diferença 7 - 15 dias para as feridas com crescimento epitelial e crescimento misto.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias nas três feridas.

#### 4.3.1.3 Avaliação vimentina vasos no 3.º, 7.º e 15.º dias

Para 3 dias, a comparação das três feridas indicou que não houve diferença significativa, resultados semelhantes ( $p=0,751$ ) o mesmo ocorreu para sete dias ( $p=0,062$ ). Para o momento de avaliação no 15.º dia, houve diferença significativa entre as três feridas, aumento do número de vasos ( $p=0,016$ ).

TABELA 9 - CONTAGEM DE VIMENTINA VASOS POR CAMPOS E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	3,0 ± 1,7	0,751
	Ferida epitelial	15	3,2 ± 1,7	
	Ferida mista	15	3,4 ± 2,0	
D7	Controle	15	4,1 ± 1,6	0,062
	Ferida epitelial	15	4,2 ± 1,9	
	Ferida mista	15	5,4 ± 2,3	
D15	Controle	15	5,3 ± 1,2	0,016
	Ferida epitelial	15	6,4 ± 2,3	
	Ferida mista	15	7,6 ± 2,3	

FONTE: O autor

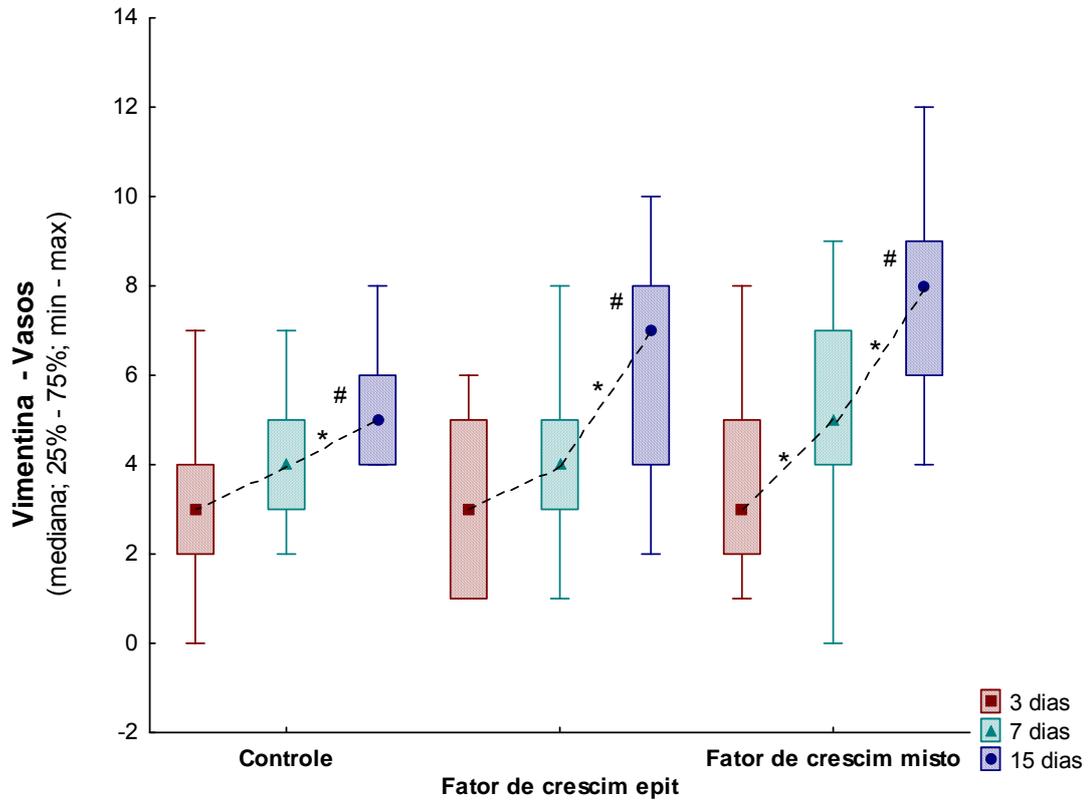
(1) Teste não paramétrico de Friedman,  $p<0,05$ .

Sendo assim, estas foram comparadas duas a duas, e houve diferença significativa entre as feridas 1 e 2, maior número de vasos ( $p=0,040$ ) e entre as feridas 1 e 3, maior número de vasos ( $p=0,001$ ); entre as feridas 2 e 3 não foram encontradas diferenças significativas, resultados foram semelhantes ( $p>0,05$ ).

Na comparação dos momentos de morte, para cada ferida, constatou-se diferença significativa entre os momentos três dias x sete dias x quinze dias ( $p<0,05$ ), nas três feridas. Daí porque os momentos estes foram comparados dois a dois.

Para 3.º dia x 7.º dia houve diferença significativa para a ferida 3, maior número de vasos ( $p=0,009$ ) e uma tendência a significância para a ferida 1 ( $p>0,05$  e  $<0,094$ ) e não houve diferença significativa para a ferida 2, não houve aumento de vasos, os resultados foram similares ( $p>0,05$ ). Para 3.º dias x 15.º dias houve diferença significativa entre as três feridas ( $p<0,001$ ) e para 7.º x 15.º dias também houve diferença significativa ( $p=0,025$ ,  $p=0,007$  e  $p=0,13$  nas feridas 1, 2 e 3).

FIGURA 23 - EVOLUÇÃO DE VIMENTINA VASOS EM CADA FERIDA, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPPO



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 7 dias na ferida com crescimento misto e para a diferença 7 - 15 dias para as três feridas.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias nas três feridas.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO

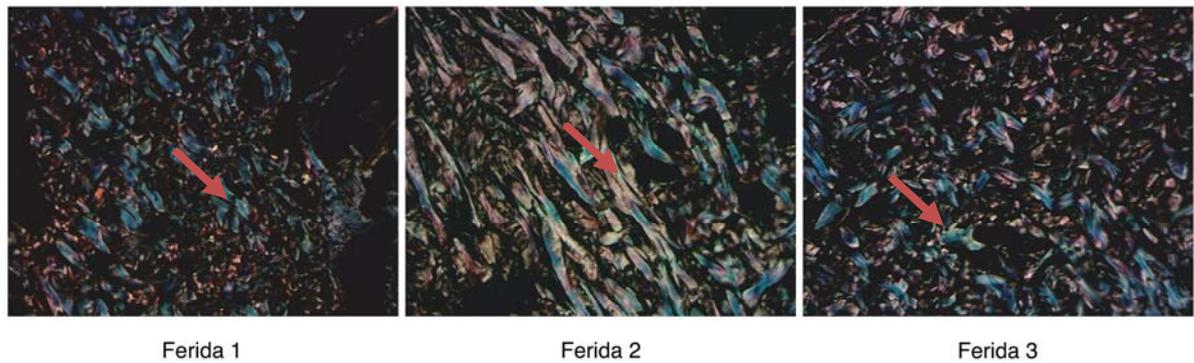
Nas figuras 24, 25, 26, podem-se identificar detalhes histológicos das cicatrizes, nos três momentos avaliados.

FIGURA 24 - FOTOMICROGRAFIA NAS QUAIS SE AVALIA COLÁGENO TIPO I E III (VERMELHO – MADURO E VERDE- IMATURO), NO 3.º DIA DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (PSR 400X)



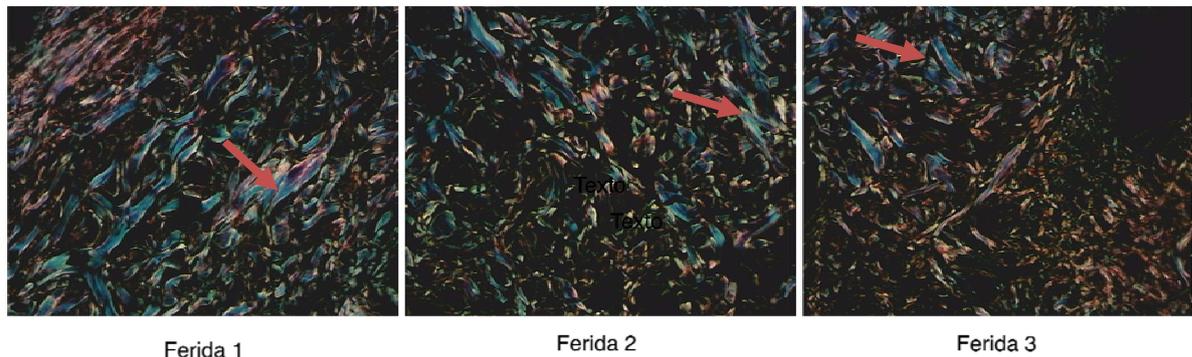
FONTE: O autor

FIGURA 25 - FOTOMICROGRAFIA NAS QUAIS SE AVALIA COLÁGENO TIPO I E III (VERMELHO – MADURO E VERDE- IMATURO), NO 7.º Dia De Evolução, Nas Feridas 1, 2 E 3. (PSR 400X)



FONTE: O autor

FIGURA 26 - FOTOMICROGRAFIA NAS QUAIS SE AVALIA COLÁGENO TIPO I E III (VERMELHO – MADURO E VERDE- IMATURO), NO DÉCIMO 15.º DE EVOLUÇÃO, NAS FERIDAS 1, 2 E 3. (PSR 400X)



FONTE: O autor

#### 4.4.1 Avaliação colágeno – tipo I – área

Para três dias, a comparação das três feridas indicou que não existe diferença significativa entre elas, resultados similares ( $p=0,627$ ). Para sete dias também não foi observada diferença significativa entre as três feridas ( $p=0,344$ ). O mesmo foi identificado para 15 dias ( $p=0,189$ ). Sendo assim, nos três momentos de morte (3 dias, 7 dias e 15 dias) não foram encontradas diferenças significativas entre as três feridas, pois os resultados foram semelhantes.

TABELA 10 - CONTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

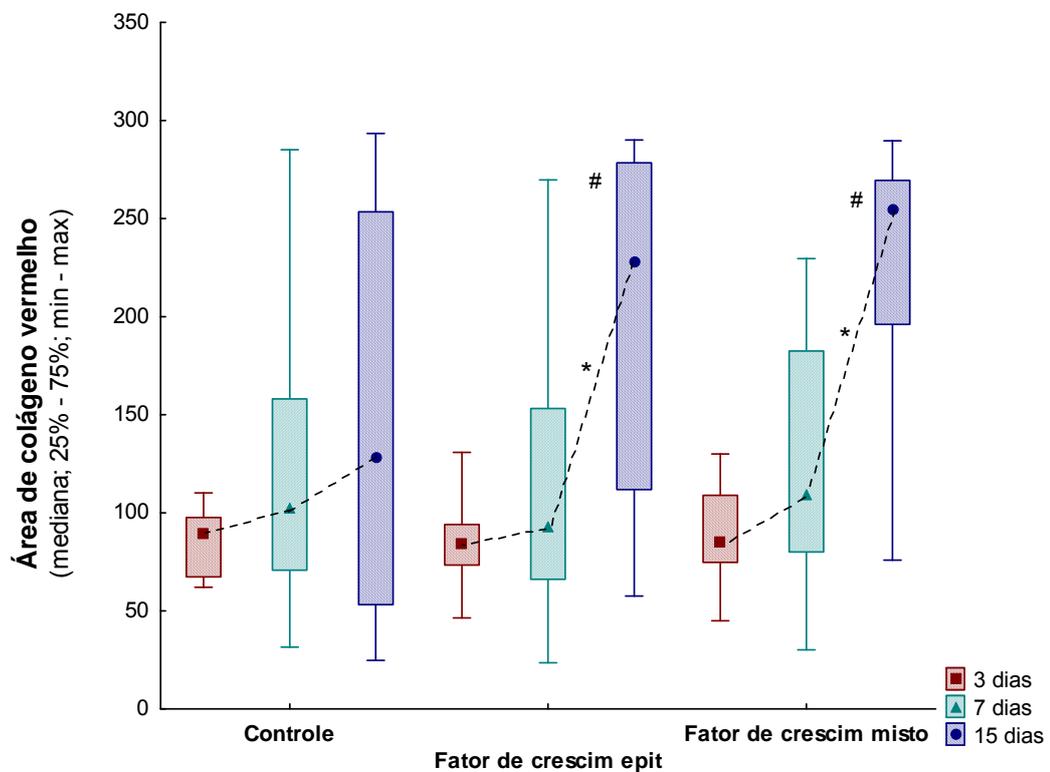
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA±DP	VALOR DE $p^{(1)}$ (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	83,6 ± 16,0	0,627
	Ferida epitelial	15	82,7 ± 21,3	
	Ferida mista	15	88,7 ± 23,7	
D7	Controle	15	125,8 ± 76,6	0,344
	Ferida epitelial	15	110,7 ± 74,9	
	Ferida mista	15	125,4 ± 58,4	
D15	Controle	15	147,5 ± 100,2	0,189
	Ferida epitelial	15	194,0 ± 82,4	
	Ferida mista	15	219,8 ± 67,8	

FONTE: O autor

(1) Teste não-paramétrico de Friedman,  $p<0,05$ .

Nas comparações dos dias de morte não houve significância estatística para a ferida 1 ( $p=0,240$ ), enquanto para as feridas 2 e 3 houve significância estatística, maior número do colágeno tipo I ( $p \leq 0,001$ ). Em função disso, eles foram comparados dois a dois, sendo que no 3.º dias x 7.º dias não houve diferença significativa, para 3.º dias x 15.º dias houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) e para 7.º dias x 15.º dias também houve diferença significativa, maior número de colágeno tipo I ( $p=0,002$  e  $p=0,001$  para as feridas 2 e 3, respectivamente).

FIGURA 27 - EVOLUÇÃO DE ÁREA DE COLÁGENO TIPO I AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPO



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 7 - 15 dias nas feridas do fator de crescimento epitelial e fator de crescimento misto.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 - 15 dias nas feridas do fator de crescimento epitelial e fator de crescimento misto.

#### 4.4.2 Avaliação de colágeno – tipo III - área

A comparação das três feridas em cada um dos momentos de morte indicou que não existe diferença significativa entre elas, nos 3.º dia, 7.º e 15.º dias, resultados semelhantes ( $p=0,627$ ,  $p=0,344$  e  $p=0,189$ , respectivamente).

TABELA 11 - CONTAGEM DE COLÁGENO TIPO III, COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

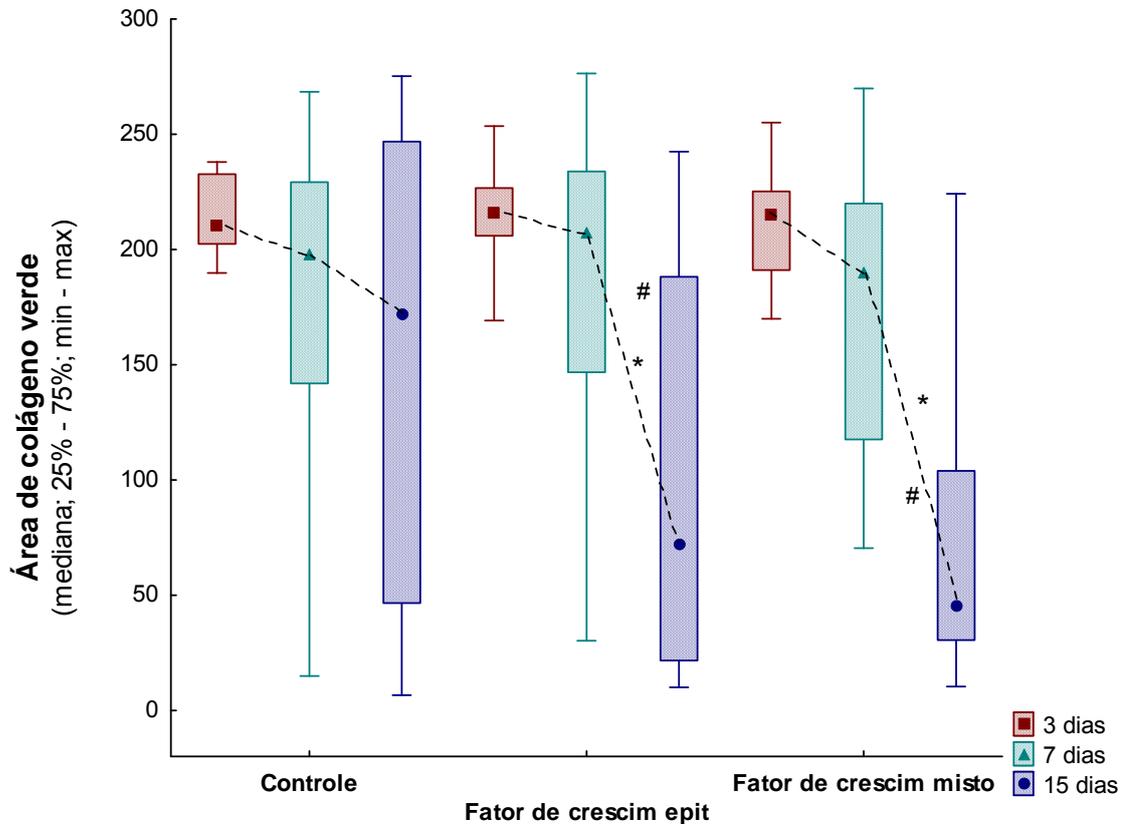
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA±DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	216,4 ± 16,0	0,627
	Ferida epitelial	15	217,3 ± 21,3	
	Ferida mista	15	211,3 ± 23,7	
D7	Controle	15	174,2 ± 76,6	0,344
	Ferida epitelial	15	189,3 ± 74,9	
	Ferida mista	15	174,6 ± 58,4	
D15	Controle	15	152,5 ± 100,2	0,189
	Ferida epitelial	15	106,0 ± 82,4	
	Ferida mista	15	80,2 ± 67,8	

FONTE: O autor

(1) Teste não-paramétrico de Friedman,  $p<0,05$ .

Nas comparações nos três momentos de morte (3 dias, 7 dias e 15 dias), não foram encontradas diferenças significativas entre a ferida 1, e foram encontradas diferenças significativas na ferida 2 e 3, menor número de colágeno tipo III ( $p\leq 0,001$ ). Sendo assim, os momentos foram comparados dois a dois. Para 3 dias x 7 dias não houve diferença significativa entre as feridas 2 e 3. Em 3 dias x 15 dias houve diferença significativa ( $p<0,001$ ) e em 7 dias x 15 dias também houve diferença significativa, menor número de colágeno tipo III ( $p=0,002$  e  $p=0,001$ , respectivamente nas feridas 2 e 3).

FIGURA 28 - EVOLUÇÃO DE ÁREA DE COLÁGENO TIPO III, AVALIAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS DE MORTE, INTRAGRUPO



FONTE: O autor

NOTA: \*  $p < 0,05$  para a diferença 7 – 15 dias nas feridas do fator de crescimento epitelial e fator de crescimento misto.

#  $p < 0,05$  para a diferença 3 – 15 dias nas feridas do fator de crescimento epitelial e fator de crescimento misto.

#### 4.4.3 Percentual de colágeno (TIPO I e TIPO III)

O percentual de colágeno tipo I corresponde ao percentual de área com colágeno tipo I em relação ao total de área de colágeno (tipo I + tipo III). Da mesma forma, o percentual de colágeno tipo III corresponde ao percentual de área com colágeno tipo III em relação ao total de área de colágeno (tipo I + tipo III). Sendo assim, a soma do percentual de colágeno tipo I com o percentual de colágeno tipo III é igual a 100%. Como as áreas de colágeno tipo I e tipo III são complementares, os valores de  $p$  dos testes estatísticos são os mesmos já apresentados na análise das áreas.

#### 4.4.3.1 Variável: percentual de colágeno tipo I

Para três dias, a comparação das três feridas indicou que não existe diferença significativa entre elas, resultados similares ( $p=0,627$ ). Para sete dias, também não foi observada diferença significativa entre as três feridas ( $p=0,344$ ). O mesmo foi verificado para quinze dias ( $p=0,189$ ).

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

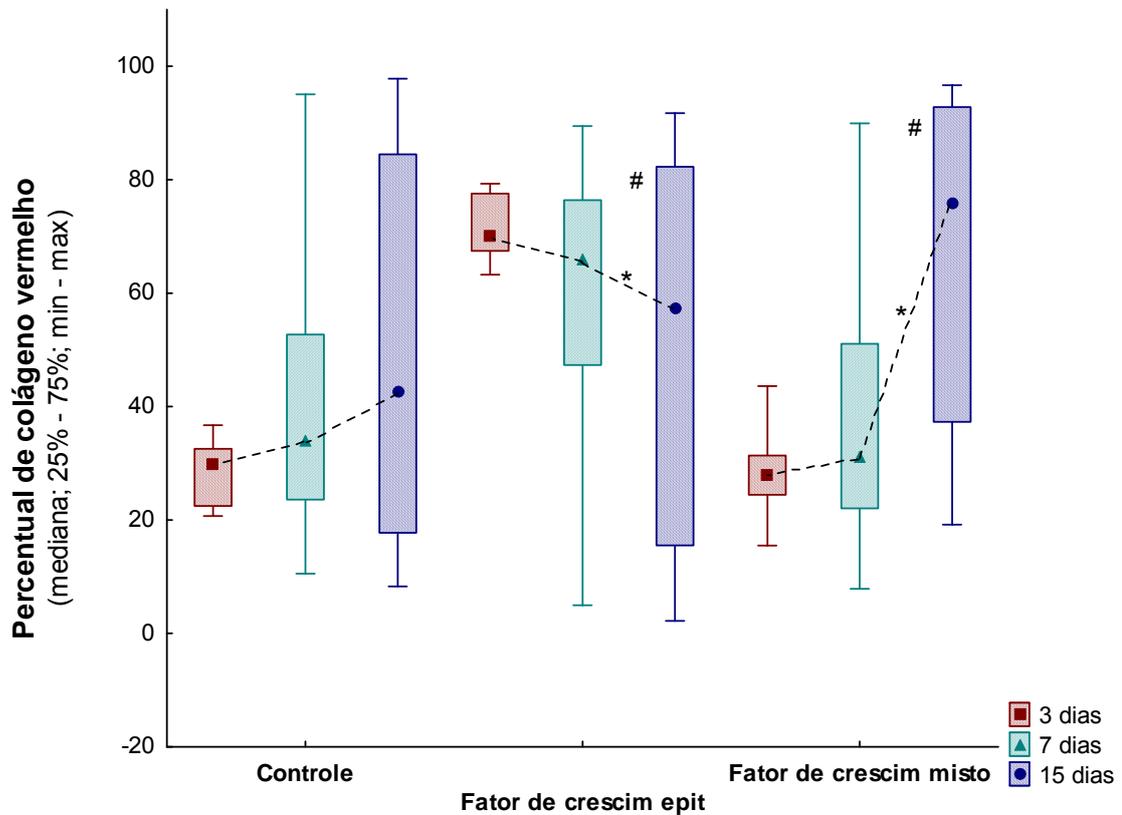
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	27,9 ± 5,3	0,627
	Ferida epitelial	15	27,6 ± 7,1	
	Ferida mista	15	29,6 ± 7,9	
D7	Controle	15	41,9 ± 25,5	0,344
	Ferida epitelial	15	36,9 ± 25,0	
	Ferida mista	15	41,8 ± 19,5	
D15	Controle	15	49,2 ± 33,4	0,189
	Ferida epitelial	15	64,7 ± 27,5	
	Ferida mista	15	73,3 ± 22,6	

FONTE: O autor

(1) Teste não-paramétrico de Friedman,  $p<0,05$ .

Nos três momentos de morte (três dias, sete dias e quinze dias), não foram encontradas diferenças significativas para a ferida controle ( $p=0,240$ ) e não foram encontradas diferenças significativas entre as feridas epitelial e mista, resultados similares ( $p\leq 0,001$ ). Diante disso, foram comparadas duas a duas, para três dias x sete dias não houve diferença significativa ( $p=0,419$  e  $p=0,63$ ); para três dias x quinze dias houve diferença significativa, maior número de colágeno tipo I ( $p<0,001$ ) e em sete dias x quinze dias também houve diferença significativa, maior número de colágeno tipo I ( $p=0,002$  e  $p=0,001$ , respectivamente, para as feridas epitelial e mista).

FIGURA 29 - EVOLUÇÃO DA ÁREA DE COLÁGENO TIPO I - PERCENTUAL



FONTE: O autor

#### 4.4.3.2 Variável: percentual de colágeno tipo III

Para três dias, a comparação das três feridas indicou que não existe diferença significativa entre elas, resultados similares ( $p=0,627$ ). Para sete dias, também não foi observada diferença significativa entre as três feridas ( $p=0,344$ ). O mesmo foi verificado para quinze dias ( $p=0,189$ ). Nas comparações dos dias de morte três dias x sete dias x quinze dias, não houve diferença significativa para a ferida controle ( $p=0,240$ ), houve diferença significativa para as feridas epitelial e mista, menor número de colágeno tipo III ( $p \leq 0,001$ ).

TABELA 13 - CONTAGEM DE COLÁGENO TIPO I, COMPARAÇÃO DAS FERIDAS 1, 2 E 3 EM CADA UM DOS MOMENTOS DE MORTE

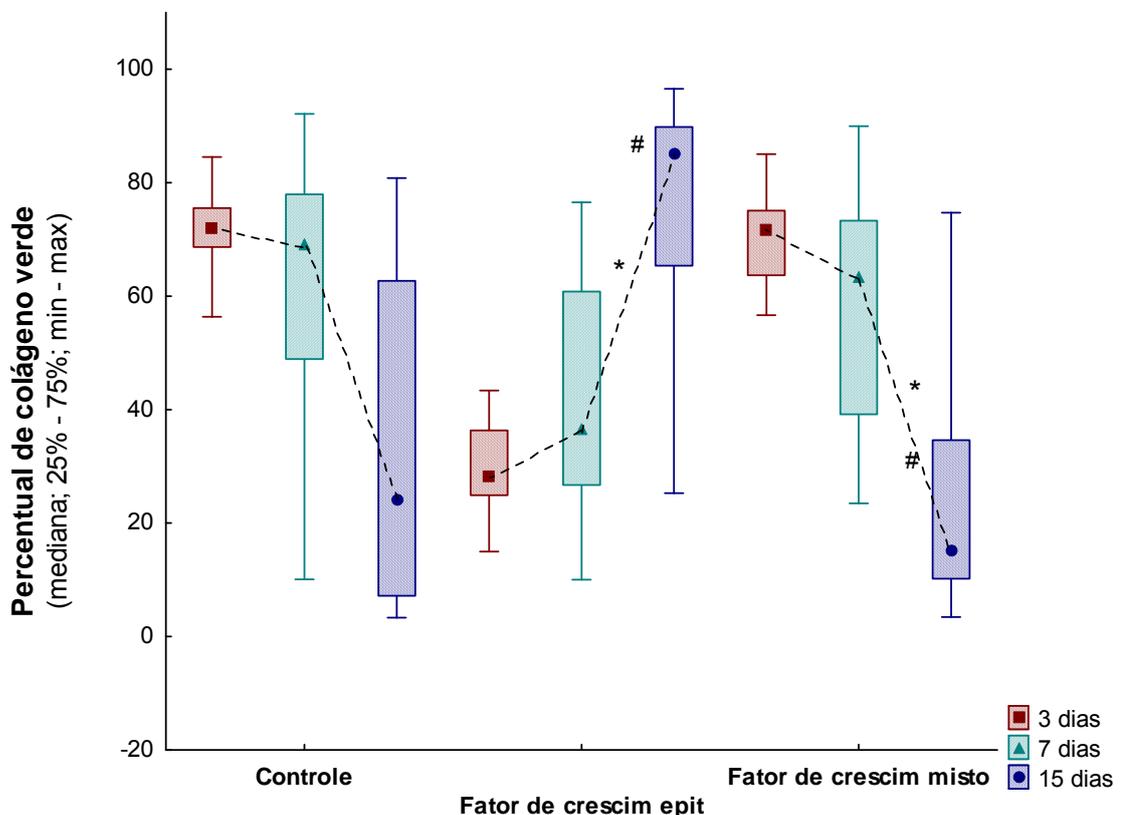
DIA DA MORTE	FERIDA	N	MÉDIA± DP	VALOR DE p <sup>(1)</sup> (F1 x F2 x F3)
D3	Controle	15	72,1 ± 5,3	0,627
	Ferida epitelial	15	72,4 ± 7,1	
	Ferida mista	15	70,4 ± 7,9	
D7	Controle	15	58,1 ± 25,5	0,344
	Ferida epitelial	15	63,1 ± 25,0	
	Ferida mista	15	58,2 ± 19,5	
D15	Controle	15	50,8 ± 33,4	0,189
	Ferida epitelial	15	35,3 ± 27,5	
	Ferida mista	15	26,7 ± 22,6	

FONTE: O autor

(1) Teste não paramétrico de Friedman,  $p < 0,05$ .

Os momentos foram comparados dois a dois; para três dias x sete dias não houve diferença significativa, resultados similares ( $p > 0,05$ ); para três dias x quinze dias, houve diferença significativa, menor número de colágeno tipo III ( $p < 0,001$  nas feridas 2 e 3); e em sete dias x quinze dias também houve diferença significativa, menor número de colágeno tipo III ( $p = 0,002$  e  $p = 0,001$ , respectivamente, para as feridas epitelial e mista).

FIGURA 30 - EVOLUÇÃO DA ÁREA DE COLÁGENO TIPO III - PERCENTUAL



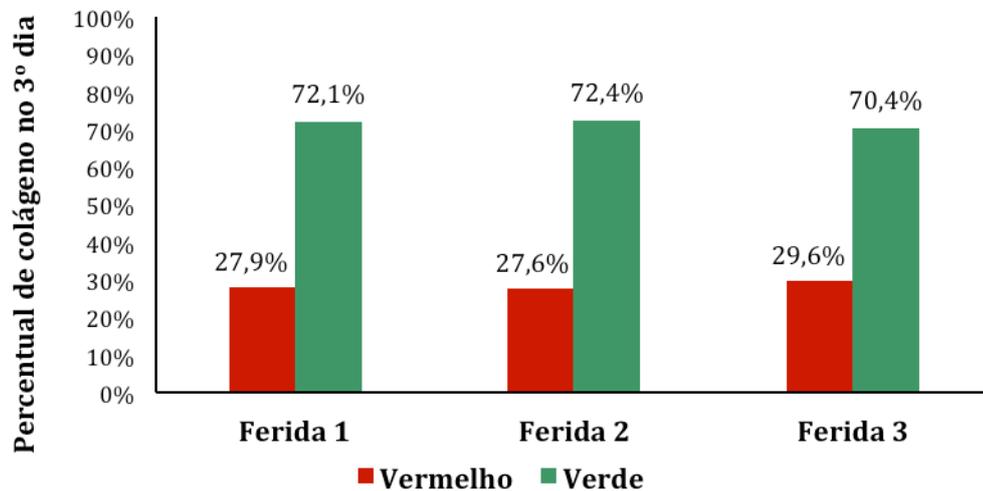
FONTE: O autor

A análise com Sirius Red, no terceiro, sétimo e décimo quinto dia, apontou uma quantidade maior de colágeno tipo I – Vermelho (maduro) nas feridas com fator de crescimento epitelial e mista (ferida 2 e ferida 3), com valor de  $p=0,001$  e  $p<0,001$ , respectivamente, demonstrando diminuição da quantidade de infiltrado inflamatório, maior angiogênese, fibroplasia, com cicatrização mais rápida e organizada.

Gráfico do colágeno tipo I e tipo III, nos dias 3, 7 e 15 do experimento

### ▪ 3.º DIA

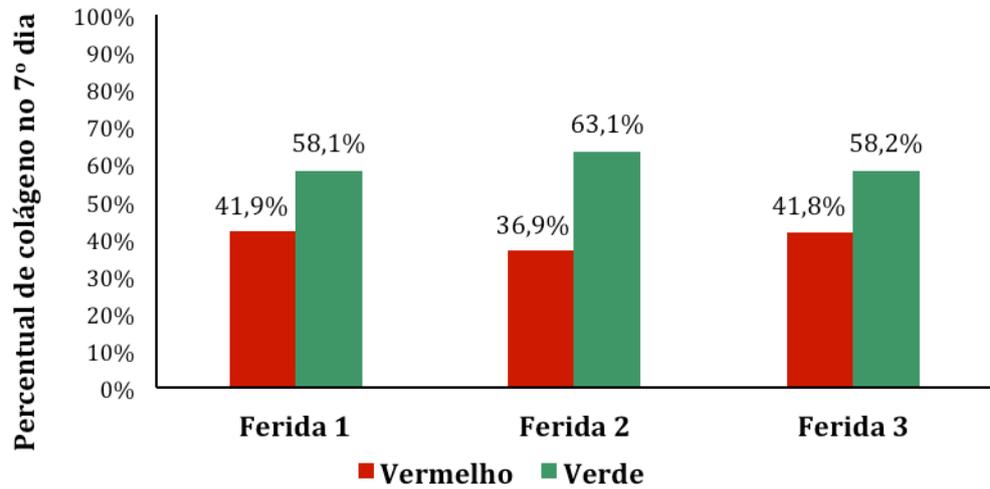
GRÁFICO 1 - DEMONSTRAÇÃO DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NO 3.º DIA DO EXPERIMENTO NAS TRÊS FERIDAS



FONTE: O autor

## ▪ 7.º DIA

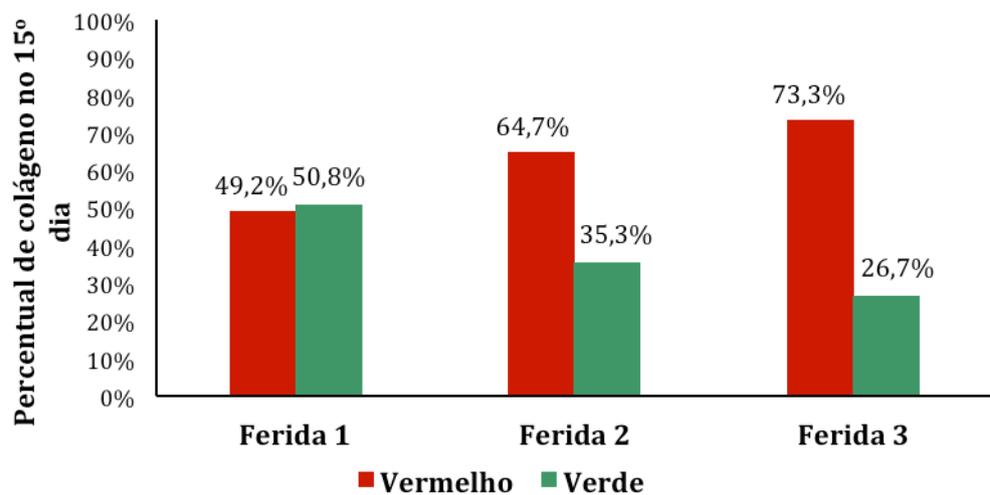
GRÁFICO 2 - DEMONSTRAÇÃO DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NO 7.º DIA DO EXPERIMENTO NAS FERIDAS TRÊS



FONTE: O autor

## ▪ 15.º DIA

GRÁFICO 3 - DEMONSTRAÇÃO DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NO 15.º DIA DO EXPERIMENTO NAS FERIDAS TRÊS



FONTE: O autor

## 5 DISCUSSÃO

As grandes mudanças ocorridas nas últimas décadas nos conceitos referentes à cicatrização têm mobilizado as indústrias a desenvolver e comercializar produtos cada dia mais específicos que sejam eficazes e adequados a cada tipo de ferida em termos de custo/benefício. Atualmente se pretende interferir na biologia molecular, abordando a síntese de substâncias envolvidas nos fenômenos cicatriciais (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003b). Diante de tantos recursos para cicatrização, no presente estudo optou-se por estudar fatores de crescimento injetáveis na cicatrização de feridas, com o objetivo de avaliar se os mesmos interferem positivamente na cicatrização.

A cicatrização das feridas é uma série complexa de reações e interações de mediadores inflamatórios e interações de crescimento celular (YAZAWA *et al.*, 2003; MARLOVITS *et al.*, 2004; VICK *et al.*, 2006; WROTNIAK; BIELECKI; GAZDZIK, 2007). Muitos fatores intrínsecos e extrínsecos afetam a cicatrização das feridas e existe grande variabilidade de opções comerciais que pretendem neutralizar interferências negativas ou estimular o processo cicatricial. A inter-relação entre nutrição e o processo de cicatrização da ferida age junto com o sistema imune e com a função imuno-moduladora (CAMPOS *et al.*, 2007). Neste trabalho foi analisado o processo de cicatrização nos aspectos macroscópicos e microscópicos, e a influência de fatores de crescimento no processo cicatricial. No início do processo de cicatrização há migração de neutrófilos estimulados pelas plaquetas, após os macrófagos, e estes contribuem para a angiogênese e fibroplasia, como ocorreu neste estudo, no qual as feridas com infiltração de fatores de crescimento epitelial e misto apresentaram maior quantidade de neutrófilos ( $p=0,058$  e  $p=0,076$ ). Para macrófagos foram encontradas diferenças significativas nas três feridas ( $p<0,01$ ), mas comparando as feridas duas a duas foi encontrada diferença significativa para as feridas epiteliais e mistas, menor número de macrófagos. Na avaliação de HE vasos houve diferença significativa entre as três feridas, aumento do número de vasos ( $p<0,001$ ). A imunoistoquímica também demonstrou aumento de fibroblastos, macrófagos e vasos para as feridas epiteliais e mistas ( $p<0,001$ ). Para o Colágeno tipo I, as feridas com fator de crescimento epitelial e misto apresentaram maior deposição

deste tipo de colágeno ( $p=0.001$  e  $p<0.001$ ), demonstrando resposta inflamatória com diminuição da deposição de infiltrado inflamatório, maior angiogênese, com cicatrização mais rápida. E as porcentagens de colágeno tipo I no 15 dias do experimento foram: para a ferida controle 49,2%, ferida epitelial 64,7% e para a ferida mista 73,3%. Isso demonstrando a melhora da cicatrização das feridas onde houve infiltração de fatores de crescimento em relação a ferida controle

## 5.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Há pelo menos 60 substâncias biologicamente ativas nas plaquetas que estão envolvidas no processo de cicatrização dos tecidos. Dentre os fatores plaquetários, as proteínas de adesão promovem a interação celular, a coagulação e a composição da matriz extracelular; os fatores de coagulação produzem trombina e regulam a angiogênese; os fatores fibrinolíticos produzem plasmina e atuam no remodelamento vascular. Os fatores de crescimento são considerados os mais importantes fatores plaquetários. Eles possuem extensas habilidades na formação tecidual, auxiliando a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular e angiogênese (GRESELE *et al.*, 2003; FILORYAN; BERGHOFF, 2004; FERNANDEZ-BARBERO *et al.*, 2006). No presente estudo foi analisada a cicatrização das feridas após o uso de fatores de crescimento, com resultado positivo em relação à ferida controle, na qual não foi infiltrado fator de crescimento ou solução salina, para mimetizar a cicatrização natural.

Alguns dos numerosos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas já identificados são o PDGF, TGF alfa e beta, EGF, FGF, KGF, IGF, interleucina 8, TNF alfa, CTGF, GM-CSF (BORZINI; MAZZUCCO, 2007). Dhurat e Sukesh (2014) demonstraram *in vitro* e *in vivo* a efetividade dos fatores de crescimento na cicatrização de feridas de pele. Nesse artigo, os autores revisaram os princípios e métodos de preparação do plasma rico em plaquetas baseados na literatura disponível e padronizaram um protocolo simples que pode ser seguido para obter resultado com ótimo rendimento do plasma, para obtenção de fatores de crescimento. No estudo ora realizado foi usado fator de crescimento isolado em laboratório ( FCE, FCV,FCF,

FCI) e não obtido do PRP, pois em ratas foi analisada a dificuldade de colheita do sangue, e a quantidade para centrifugar inviabilizaria o estudo e por isso optou-se por fator de crescimento obtido de laboratório.

Kassolis, Rosen e Reynolds (2000) avaliaram em seu estudo a aplicação clínica de PRP autólogo para melhorar a cicatrização de feridas em diferentes sistemas do organismo; observaram a melhora da cicatrização de feridas ósseas em qualidade e quantidade, e obtiveram biópsias das espécimes que permitiram estudo histológico da regeneração alveolar. A observação histológica, entretanto, sugeriu que a combinação do PRP e retalho ósseo seco resfriado (FDBA) suporta a neoformação de osso, que está em consonância com outros estudos clínicos e histológicos que usam gel de plaqueta, cola de fibrina, em conjunção com retalhos ósseos. Estudos pré-clínicos têm como suporte o conceito de que as plaquetas possuem fatores de crescimento que estimulam o aumento do processo de cicatrização das feridas. Esses achados clínicos e histológicos sugerem que retalhos de osso associados a PRP viabilizam a alternativa terapêutica para o sítio de preparação para implante ósseo, pois aceleram a formação de tecido ósseo e a cicatrização (MAZZUCCO *et al.*, 2009, WOODSELL-MAY *et al.*, 2005). No presente estudo analisaram-se fatores de crescimento epitelial, vascular, fibroblástico e insulínico.

Vários trabalhos tem indicado que a aplicação do PRP acelera a regeneração dos defeitos dos tecidos, como o estudo realizado por Pallua, Wolter e Markowicz (2010), em queimados. No presente estudo, a relevância do PRP em cirurgia de queimados não está muito clara, pois aumenta o processo inflamatório na superfície da ferida e melhora a cicatrização na profundidade da ferida, pela melhora da vascularização e formação de tecido de granulação. O PRP parece oferecer um certo grau de eficácia em algumas feridas agudas e crônicas. No tratamento de queimados, o PRP poderia, pela estimulação da regeneração dermal, aumentar a taxa de retalho dérmico ou velocidade de reepitelização. Porém, este mecanismo deve ser elucidado na ordem de ajustar a liberação de fatores de crescimento em queimados (FENNIS; STOELING; JANSEN, 2005).

Para Scaflani *et al.*, 2005, o tratamento com concentrado de plaquetas acelera a maturação de feridas experimentais. Por 14 dias avaliaram quatro grupos, sendo dois com implantes acelulares e tratados com plasma pobre em plaquetas e dois grupos com implantes celulares e tratados com plasma rico em plaquetas,

analisando o grau e a qualidade da celularidade das feridas. Rápida cicatrização de feridas era esperada com este modelo cirúrgico, que foi escolhido para observar os efeitos biológicos na cicatrização precoce de um gel de plasma rico em plaquetas em uma ferida não comprometida. Concluiu-se que o tratamento com concentrado de plaquetas PRP é benéfico para melhorar e acelerar o processo de cicatrização de feridas em relação ao PPP. Também compararam a força tênsil das feridas e encontraram no 7.º e 14º dia diferença significativa; entretanto, no 28º dia todas as feridas tinham a mesma força tênsil. Esse resultado é semelhante ao obtido neste estudo, em que as feridas com injeção de fator de crescimento epitelial e misto obtiveram resultado final de cicatrização melhor, comparadas à ferida controle, quando analisadas as fotos das feridas no 15º dias do experimento com ratas estavam todas epitelizadas. Não foi realizada a força tensil devido a problemas de greve na UFPR, pois não havia técnico para manipular o tensiômetro e o aparelho estava quebrado; entretanto esse fato não invalida os resultados deste estudo, uma vez que o objetivo era comparar as fases da cicatrização entre as feridas e a maturação da cicatrização.

Cervelli *et al.* (2009b) demonstraram que o PRP, adicionado a enxerto de gordura, resulta em aumento da sobrevida do retalho de gordura. Também relataram que o uso do PRP sozinho em defeitos maxilo-facial produz regeneração tecidual. O PRP é uma mistura de proteínas autólogas cujas funções consistem em estimular fibroblastos dermais quando injetados. No experimento foi documentado que o uso de PRP melhora a manutenção do tecido adiposo e a sua sobrevida em cirurgias periodontais e orais, maxilo-facial, plástica estética, cirurgia para bypass cardíaco e tratamento de úlcera de tecidos moles. O estudo *in vitro* apontou a concordância entre a hipótese de que o estímulo de regeneração do tecido adiposo com PRP, tanto como a verificada em estudo *in vivo*, aumenta a neoangiogênese e a atividade fibrogenética de fibroblastos melhora a sobrevida do tecido adiposo e a sua organização tridimensional. O estudo *in vitro* também constatou que o PRP acelera a reepitelização de úlcera crônica em pacientes submetidos a cirurgia plástica e reconstrutora, bem como melhora a manutenção e função do retalho de tecido adiposo derivado de proliferação de células tronco. Neste estudo, cuja aproximação metodológica com Cervelli *et al.* consiste na avaliação histológica de neoangiogênese e neocolagênese, verificou-se que houve aceleração no processo cicatricial.

## 5.2 FATORES DE CRESCIMENTO

Werner e Grose (2003) demonstraram nessa revisão sobre o assunto que uma quantidade de fatores de crescimento e citocinas estão presentes no sítio da ferida. Suas expressões dinâmicas mostram características temporais e espaciais na regulação e mudanças no padrão de expressão dos fatores de crescimento que estão associados com cicatrização de feridas debilitadas. Mais importantes alterações nos níveis de um fator são como afetam a produção de outros fatores de crescimento e citocinas. Assim, tem sido mostrado que citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento do soro são liberados durante a fase inicial da cicatrização das feridas, são potentes estimuladores da expressão de vários outros fatores de crescimento. Um exemplo é a regulação de FGF7, um fator de crescimento produzido por fibroblastos no sítio da injúria. Um outro exemplo é a regulação de VEGF, um maior regulador da angiogênese, que é produzido por queratinócitos e macrófagos no sítio da ferida. Foi verificado que citocinas pró-inflamatórias podem induzir a expressão de VEGF em ambos os tipos de células. Tais exemplos realçam as complexas interações que ocorrem durante a cicatrização das feridas. Essas interações devem ser consideradas na interpretação de resultados obtidos pela superexpressão ou eliminação de um único fator de crescimento no sítio da ferida. Neste estudo foi demonstrado que o uso de fatores de crescimento injetáveis acelera o processo de cicatrização e que o uso de vários fatores de crescimento tem um resultado mais rápido e efetivo. Reforçando o que apontaram os autores do estudo citado, demonstrou-se que na macroscopia a porcentagem de redução da ferida controle foi de  $80 \pm 0,311\%$ , enquanto na ferida epitelial foi de  $83 \pm 0,201\%$  e na ferida mista  $100\%$ , constatando-se que o uso de vários fatores de crescimento em relação ao uso de fator de crescimento isolado, acelera a cicatrização e a maturação da ferida.

Nos trabalhos realizados por KEYSER, 1993; VALBONESI *et al.*, 2002, foram usados fatores de crescimento do plasma rico em plaquetas na forma de gel, diferente deste estudo em que os fatores de crescimento foram injetados.

Também foram analisados neste estudo os tipos de colágeno que são produzidos após a injeção de VEGF, EGF, IGF e FGF em derme e tecido celular subcutâneo, e se avaliaram a quantidade e qualidade do colágeno, da elastina e dos

vasos no sítio de implantação. No estudo de CROVETTI *et al.*, 2004, foram estudadas feridas cutâneas de 24 pacientes com fator de crescimento em forma de gel, diferente deste trabalho em que foram analisadas feridas de ratas com fator de crescimento injetável, sendo importante analisar a qualidade e tempo de cicatrização.

### 5.3 MODELO EXPERIMENTAL

Van Den Dolder *et al.* (2006) realizaram estudo de fatores de crescimento derivados de plaquetas em matriz óssea de ratos e fizeram a cultura *in vitro*, uma amostra de matriz óssea coberta com pele e PRP e outra amostra apenas matriz óssea com pele e concluíram que o PRP estimula a matriz e diferenciação óssea. No presente estudo foi analisada a utilização de VEGF, EGF, FGF e IFG para acelerar a cicatrização de feridas, e foram obtidos resultados favoráveis quando comparado com a ferida controle, sem presença de fatores de crescimento. A área das feridas foi analisada macroscopicamente e apresentou o seguinte resultado: a ferida controle apresentou uma área de 0,031 cm<sup>2</sup> ao final do experimento e nas feridas 2 e 3 a área foi, respectivamente, 0,008 cm<sup>2</sup> e 0, demonstrando uma cicatrização mais efetiva.

Pryor *et al.* (2005) avaliaram, em modelo experimental, a cicatrização de calvário de ratos. A ferida foi dividida em duas partes: um lado foi considerado controle e no outro lado foi colocada uma esponja com PRP. Avaliaram em quatro e oito semanas, quando a biópsia foi coletada e radiografias acompanhadas. Os resultados sugeriram que o PRP não tem um efeito significativo na osteogênese. No presente estudo, quando comparadas com a ferida controle, as feridas com fatores de crescimento obtiveram resultado melhor em relação ao processo cicatricial, com maior porcentagem de colágeno maduro nas feridas epiteliais e mistas, 64,7% e 73,3%, respectivamente, enquanto na ferida controle este percentual foi de 49,2%.

Feng *et al.* (2014) realizaram estudo em ratos diabéticos; para tanto, foram criadas feridas no dorso e injetados fatores de crescimento de Keratinócitos para avaliar a cicatrização. Foram feitas duas feridas de 2 cm de diâmetro, realizadas uma de cada lado da coluna vertebral, sendo que em um lado foi injetado fator de crescimento e no outro lado, solução salina. O tempo de estudo foi de quatro semanas e foram feitas fotografias diárias por um período de 28 dias. Os resultados mostraram proliferação de células e um significativo estímulo à cicatrização nas feridas com fator de crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, pois nas análises macroscópicas das feridas observou-se redução maior nas feridas epiteliais e mistas em relação à ferida controle, sendo as medidas em diâmetros de 0,2 cm,

0,1cm e 0, respectivamente para as feridas controle, epiteliais e mistas; diferente mostrou-se o tempo de avaliação, que foi de 15 dias, pois neste tempo as feridas epiteliais e mistas estavam epitelizadas, a ferida controle estava com tecido de granulação, como observado na macroscopia com controle fotográfico diário.

Xie *et al.* (2013) usaram modelos de ratos e compararam a cicatrização em feridas tratadas com fator de crescimento tópico e ferida controle. As feridas foram acompanhadas diariamente e medidas com caliper nos dias 1, 7, 14 e 28 dias, quando foi realizada eutanásia e biópsia excisional. Procedeu-se à análise microscópica com HE e o colágeno foi medido por porcentagem. A metodologia foi semelhante à utilizada neste estudo na confecção das feridas, medidas, biópsia e microscopia. Também os resultados foram semelhantes, por registrarem colágeno com porcentagem maior nas feridas com fator de crescimento. Na histologia com HE foi observada menor resposta inflamatória nas feridas com fator de crescimento que na ferida controle.

Asai *et al.* (2013) criaram feridas no dorso de ratos diabéticos, com 0,8 cm de diâmetro, realizadas por punch e foram aplicadas células progenitoras endoteliais, topicamente, imediatamente após a cirurgia, e outra ferida foi usada como controle. Foram realizadas medidas nos dias 5, 10 e 14, após o tratamento. Como no presente estudo, as feridas também foram ressecadas, e foi realizada a análise histológica da vascularização, com resultado significativos (maior número de vasos), quando comparadas intragrupos, entre 3.º e 7.º dias, 3.º e 15.º dias entre as três feridas; já entre o 7.º e 15.º dias houve diferença significativa para as feridas 1 e 2. O estudo de Asai *et al.* apontou que a aplicação tópica de células progenitoras epiteliais, foram estrategicas para a produção de fator de crescimento, promoveu melhora da cicatrização, tal como o identificado no estudo ora apresentado.

Kutlu *et al.* (2013) compararam por meio da expressão de fatores de crescimento um modelo de cicatrização de feridas em ratos *Wistar*, grupo 1: saudável sem criação de ferida; grupo 2: ferida excisional; grupo 3: estimulador elétrico (TENS); grupo 4: solução salina tópica; grupo 5: iodo povidona; grupo 6: óleo de lavanda. O experimento foi de cinco dias e os fatores de crescimento foram mensurados por meio de ensaio imunoenzimático e imunistoquímica. Os níveis dos fatores de crescimento PDGF e EGF foram significativamente maiores no grupo TENS em comparação aos outros grupos e o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Esse estudo

mostrou os vários tratamentos para a cicatrização de feridas, diferente do presente estudo em que foram avaliados apenas fatores de crescimento na cicatrização de feridas; não houve estímulo externo, foram usados apenas fatores de crescimento.

Yao *et al.* (2012) investigaram os efeitos de células tronco mesenquimais (MSCs) administradas em região subconjuntival na cicatrização de ferida de córnea em estágio agudo de queimadura alcalina. Um modelo de queimadura alcalina de córnea foi criado com hidróxido de sódio (NaOH) em 48 ratos. Em 24 ratos foi feito curativo com fosfato tamponado salino (PBS) nos dias 0 e 3 como controle e após a queimadura; nos outros 24 ratos foi administrada a injeção de MSCs. A avaliação histológica foi realizada nos dias 3 e 7. Na imunistoquímica com CD 68 foram detectados e avaliados macrófagos, fator de necrose tumoral, monócitos e fator de crescimento endotelial vascular. As MSCs aumentaram significativamente a recuperação do epitélio corneal e diminuíram a área de neovascularização corneal comparada com o grupo controle. O infiltrado inflamatório foi significativamente menor no dia 7 no grupo com MSCs. Os resultados sugerem que as injeções subconjuntivais de MSCs aceleram a cicatrização de feridas de córnea, atenuam a inflamação e reduzem a neovascularização corneal (CNV) em queimaduras alcalinas de córneas; estes efeitos foram encontrados com redução de infiltrados de células CD 68 e a baixa regulação de MIP-1 $\alpha$  (proteína macrófagos inflamatória-1 alfa), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral –alfa) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Neste trabalho a avaliação de HE vasos mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas feridas controle e fator com crescimento epitelial e  $p < 0,05$  nas três feridas, resultando em maior atividade angiogênica e favorecendo a cicatrização mais efetiva.

Wu *et al.* (2007) estudaram o PRP no subcutâneo do dorso de coelhos, que foram divididos em dois grupos: um com condrócitos + PRP e o outro grupo apenas com PRP. Esses componentes foram injetados no subcutâneo da região dorsal dos coelhos; como controle, foi injetado apenas o PRP em quatro coelhos. Após dois meses foram submetidos à ressonância magnética, análise histológica e quantificação de glicosaminoglicanos. A ressonância mostrou formação de nova cartilagem, o que indica que o PRP regenera a cartilagem e mostra o potencial do uso deste método para a reconstrução dos defeitos da cartilagem (MAZOR *et al.*, 2004; CERVELLI *et al.*, 2009a). Neste estudo foi avaliada a utilização de fatores de crescimento epitelial e

misto na regeneração tecidual, obtendo-se uma quantidade de colágeno maduro maior do que na ferida controle.

Para Shi *et al.* (2012), a ativação de fator de crescimento conjuntivo e a formação de cicatriz em feridas corneais em coelhos marcadamente melhoram a arquitetura do estroma corneal e reduzem a formação de cicatriz, mas não tem um impacto mensurável *in vivo* da cicatriz de ferida corneal, e deve ser considerado como alvo específico da terapia de drogas para cicatriz de córnea. No presente estudo, observou-se que houve diferença significativa entre a porcentagem de colágeno maduro nas feridas 2 e 3, o que demonstra cicatrização mais efetiva que na ferida controle.

É interessante ilustrar que também, segundo Chang *et al.* (2009), foi demonstrado em estudo um acesso para fabricar tecido ósseo em coelhos. Criaram-se 4 câmaras em contato com a medula óssea da crista íliaca para observar qual teria o melhor crescimento de matriz óssea. A primeira câmara estava vazia, a segunda foi preenchida com colágeno tipo I e hidroxiapatita de cálcio, a terceira com colágeno tipo I + hidroxiapatita de cálcio e PRP e a quarta apenas PRP. Observou-se radiograficamente e histologicamente que na câmara com colágeno tipo I + hidroxiapatita e PRP se criou um tecido ósseo com rede fibrovascular, enquanto nas outras câmaras não houve o mesmo. Constatou-se que os fatores de crescimento presentes no PRP utilizados juntamente com o colágeno e hidroxiapatita têm ações na remodelação óssea e na cicatrização dos tecidos.

Como no presente estudo demonstrou-se a efetividade dos fatores de crescimento na cicatrização, com resultado imunoistoquímico para fibroblastos com significância estatísticas entre as feridas controle e ferida mista, no 3.<sup>o</sup> e 7.<sup>o</sup> dias do experimento e entre o 3.<sup>o</sup> e 15.<sup>o</sup> dias entre as três feridas.

Gerald *et al.* (2006) avaliaram o efeito do PRP na cicatrização de retalho ósseo autólogo em mandíbula de cachorro. Concluíram que o PRP tem função no início da cicatrização, obtendo resultado significativo na densidade óssea, de acordo com a radiografia, porém ao final de 3 a 6 meses os resultados são semelhantes entre a ferida tratada com PRP e as não tratadas. O mesmo ocorreu com a análise histomorfométrica. No presente estudo foi analisado em 3, 7 e 15 dias.

Monteiro, Lepage e Theoret (2009) avaliaram os efeitos do PRP em feridas na parte distal das patas de cavalos. Em seis éguas de várias raças, foram criadas

três feridas na região de metacarpo de cada égua num total de 36 feridas; destas 36 feridas, 18 foram tratadas com PRP e bandagem e 18 foram feridas controle, tratadas apenas com bandagem sem medicação. Estudo anatomopatológico foi realizado após 1, 2 e 3 semanas da criação da ferida. Nas feridas tratadas com PRP observaram-se grande quantidade de tecido de granulação e alta concentração de fator de crescimento transformador B1, comparada com feridas sem tratamento com PRP. Dados histológicos, biomecânicos e expressão gênica não diferiram significativamente entre feridas tratadas e não tratadas com PRP. Os autores concluíram que a aplicação tópica de PRP autóloga não acelera ou melhora a reparação de feridas com granulação em membros de cavalos. Este tratamento pode melhorar feridas com grande perda de tecido ou alternativamente feridas crônicas que beneficiaria mediadores para acelerar o processo cicatricial. No presente estudo obteve-se um resultado favorável com fatores de crescimento epitelial e misto, entre os três dias de avaliação e maior porcentagem de colágeno maduro para as feridas 2 e 3, com 64,7% e 73,3%, respectivamente. Já para a ferida controle, a porcentagem de colágeno maduro foi de apenas 49,2%, assinalando um atraso na cicatrização.

Brugues *et al.* (2014) usaram um modelo de movimentação celular para avaliar a cicatrização das feridas mediante cultura de células fetais bovinas. O modelo de tração microscópica mediu a velocidade e força tênsil das feridas. O resultado indicou que apenas dois mecanismos são insuficientes para explicar o padrão de forças observadas durante o fechamento da ferida no processo cicatricial. No presente estudo não foi possível avaliar a força tênsil no fechamento da ferida, por problemas externos (greve na universidade); contudo, como visto no estudo de Brugues *et al.*, no início do processo cicatricial há um rastejamento de células, mas nos períodos tardios não há participação da força de tração, o que demonstra o não prejuízo neste estudo.

Os cuidados e objetivos do estudo de Pradeep *et al.* (2009) consistiram em comparar a efetividade clínica de duas técnicas regenerativas no tratamento de defeitos ósseos em humanos. Foram usados PRP e PRP associado à matriz anorgânica derivada de tecido bovino e peptídeo 15 (ABM/P-15). Analisando parâmetros clínicos e radiológicos em 14 pacientes, criaram defeitos ósseos e injetaram PRP e em outro grupo, PRP associado ao AMB/P-15. Em todos os parâmetros clínicos analisados houve grande diferença estatística (índice de placas, índice de sangramento de

sulco, nível de inserção e nível marginal gengival, profundidade de sondagem), para o grupo de enxerto associado a PRP. A Tomografia Computadorizada demonstrou que o crescimento ósseo obteve melhores resultados através da combinação de PRP + AMB/P- 15, com significância estatística. Concluiu-se que a combinação de PRP com AMB/P-15 foi mais efetivo que o PRP sozinho no tratamento de defeitos intraósseos. Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo, pois as feridas com fator de crescimento misto obtiveram cicatrização melhor em relação à ferida com fator de crescimento epitelial, o que leva a concluir que a associação de fatores de crescimento resulta numa cicatriz melhor.

## 6 CONCLUSÕES

Quando comparadas as feridas com fator de crescimento epitelial e a ferida com fator de crescimento misto, estas obtiveram uma cicatrização mais efetiva em relação à ferida com fator de crescimento epitelial isolado, apesar de a quantidade de colágeno maduro ser semelhante entre os grupos com uso de fator de crescimento. Conclui-se que o uso de vários fatores de crescimento permite acelerar a cicatrização e a maturação da cicatriz.

A análise dos resultados macroscópicos e microscópicos do presente estudo com o uso de fatores de crescimento injetados nos bordos das feridas cutâneas de ratas, associa-se a estímulo na redução da área cruenta, permite concluir que a utilização dos fatores de crescimento tanto epitelial como misto, quando comparada à ferida controle, evidências nesse trabalho :

- acelera o processo de cicatrização,
- desenvolve maior atividade angiogênica,
- acelera a fibroplasia e a deposição de colágeno tipo I,
- e acelera a maturação da cicatrização.

## REFERÊNCIAS

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v.91, p.4-15, 2004.

ASAI, J.; TAKENAKA, H.; LI, M.; ASAHI, M.; KISHIMOTO, S.; KATOH, N.; LOSORDO, D. W. Topical application of ex vivo expanded endothelial progenitor cells promotes vascularisation and wound healing in diabetic mice. **International Wound Journal**. v.10, n.5, p.527-533, 2013.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARRIENTOS, S.; BREM, H.; STOJADINOVIC, O.; TOMIC-CANIC, M. Clinical Application of Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.22, n.5, p.569-578, 2014.

BORZINI, P.; MAZZUCCO, L. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biological view point? **Vox Sang ISBT Science Series**, v.2, n.1, p.272-281, 2007.

BRUGUES, A.; ANON, E.; CONTE, V.; VELDHUIS, J. H.; GUPTA, M.; COLOMBELLI, J.; MUÑOZ, J. J.; BRODLAND, G. W.; LADOUX, B.; TREPAT, X. Forces driving epithelial wound healing. **Nature Physics**, v.10, n.9, p.683-670, 2014.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **ABCD, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. vol.20, n.1, p 51-8, 2007

CERVELLI, V.; GENTILE, P.; GRIMALDI, M. Regenerative surgery: use of fat grafting combined with platelet rich plasma for chronic lower-extremity ulcers. **Aesthetic Plastic Surgery**, v.33, n.3, p.340-345, 2009.

CERVELLI, V.; GENTILE, P.; SCIOLI, M. G.; GRIMALDI, M.; CASCIANI, C. U.; SPAGNOLI, L. G.; ORLANDI, A. Application of platelet- rich plasma in plastic surgery: clinical and *in vitro* evaluation. **Tissue Engineering: Part C: Methods**, v.15, n.4, p.625-634, 2009a.

CERVELLI, V.; PALLA, L.; PASCALI, M.; DE ANGELIS, B.; CURCIO, B. C.; GENTILE, P. Autologous platelet rich plasma mixed with purified fat graft in aesthetic plastic surgery. **Aesthetic Plastic Surgery**, v.33, n.5, p.716-721, 2009b.

CHANG, S-H.; HSU, Y-M.; WANG, Y. J.; TSAO, Y-P.; TUNG, K-Y.; WANG, T-Y. Fabrication of pre-determined shape of bone segment with collagen- hydroxyapatite scaffold and autogenous platelet- rich plasma. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v.20, n.1, p.23-41, 2009.

COUTINHO-NETTO, J.; MENDONÇA, R.J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.257-262, 2009.

CROVETTI, G.; MARTINELLI, G.; ISSI, M.; BARONE, M.; GUIZZARDI, M.; CAMPANATI, B.; MORONI, M.; CARABELLI, A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfusion and Apheresis Science**, v.30, n.2, p.145-151, 2004.

DHURAT, R.; SUKESCH, M. S. Principles and Methods of Platelet Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v.7, n.4, p.189-197, 2014.

EPPLEY, B. L.; WOODDELL, J. E.; HIGGINS, J. B. S. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.114, n.6, p.1502-1508, 2004.

EVERTS, P. M. A.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G.; SCHOENBERGER, J. P. A. M.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, E. P.; BOX, H. A. M.; ZUNDERT, A.V. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of The American Society of Extra-Corporal Technology**, v.38, n.2, p.174-187, 2006.

FENG, Z-G.; PANG, S-F.; GUO, D-J.; YANG, Y-T.; LIU, B.; WANG, W.; ZHENG, K-Q.; LIN, Y. Recombinant Keratinocyte Growth Factor 1 in Tobacco Potentially Promotes Wound Healing in Diabetics Rats. **Biomed Research International**, p.1-8, 2014.

FENNIS, J. P. M.; STOELING, P. J. W.; JANSEN, J. A. Reconstruction of the mandible with an autogenous irradiated cortical scaffold, autogenous corticocancellous bone- graft and autogenous platelet rich plasma: an animal experiment. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.34, n.2, p.158-166, 2005.

FERNANDEZ-BARBERO, J. E.; GALINDO-MORENO, P.; AVILA-ORTIZ, G.; CABA, O.; SANCHEZ-FERNANDEZ, E.; WANG, H-L. Flow cytometric and morphological characterization of platelet rich plasma gel. **Clinical Oral Implants Research**, v.17, n.6, p.687-693, 2006.

FERRARI, M.; ZIA, S.; VALBONESI, M.; HENRIQUET, F.; VENERE, G.; SPAGNOLO, S.; GRASSOM M. A.; PANZANI, I. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. **The International Journal of Artificial Organs**, v.10, n.1, p.47-50, 1987.

FILORYAN, K. M.; BERGHOFF, W. J. Intraoperative use of autologous platelet rich and platelet poor plasma for orthopedic surgery patients. **AORN Journal**, v.80, n.4, p.668-674, 2004.

GAUGLITZ, G. G.; ZEDLER, S.; SPIEGEL, F. V.; FUHR, J.; DONNERSMARCK, G. H. V.; FAIST, E. Functional characterization of cultured keratinocytes after acute cutaneous burn injury. **PLoS one**, v.7, n.2, p. e29942, 2012.

GERALD, D.; CARLSON, E. R.; GOTCHER, J. E.; JACOBS, M. Effects of platelet rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.64, n.3, p.443-451, 2006.

GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N. A. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.3, n.1, p. 5-13, 1998.

GRAZIANI, F.; CEI, S.; DUCCI, F.; GIUCA, M. R.; DONOS, N.; GABRIELE, M. In vitro effects of different concentration of PRP on primary bone and gingival cell lines. Preliminary results. **Minerva Stomatologica**, v.54, n.1-2, p.15-22, 2005.

GRESELE, P.; PAGE, C.; FUSTER, V.; VERMYLEN, J. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. **Journal of the British Blood Transfusion Society**, v.13, n.1, p.57-58, 2003.

HOM, D. B.; LINZIE, B. M.; HUANG, T. C. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v.9, n.3, p.174-183, 2007.

HSU, C-W.; YUAN, K.; TSENG, C-C. The negative effect of platelet-rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.107, n.2, p.185-192, 2009.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; REGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina (SP)**, v.89, n.3/4, p.125-131, 2010.

KASSOLIS, J. D.; ROSEN, P. S.; REYNOLDS, M. A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. **Journal of Periodontology**, v.71, n.10, p.1654-1661, 2000.

KAUX, J. F.; LE GOFF, C.; SEIDEL, L.; PETERS, P.; GOTHOT, A.; ALBERT, A.; CRIELAARD, J-M. Étude comparative de cinq techniques de préparation plaquettaire (platelet- rich plasma). **Pathologie Biologie**, v.29, p.157-160, 2011.

KAZAKOS, K.; LYRAS, D. N.; VERETTAS, D.; TIKERIDIS, K.; TRYFONIDIS, M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. **International Journal of the Care of the Injured**, v.40, n.8, p.801-805, 2009.

KEYSER, J. E. Diabetic wound healing and limb salvage in an outpatient wound care program. **Southern Medical Journal**, v.86, n.3, p.311-317, 1993.

KNOX, R. L.; HUNT, A. L.; COLLINS, J. C.; DESMET, M.; BARNES, S. Platelet-rich plasma combined with skin substitute for chronic wound healing: a case report. **The Journal of the American Society of Extra-Corporeal Technology**, v.38, n.3, p.260-264, 2006.

KUTLU, A. K.; ÇEÇEN, D.; GÜRGEN, S. G.; SAYIN, O.; ÇETIN, F. A Comparison Study of Growth Factor Expression Following Treatment with Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation, Saline Solution, Povidone- Iodine, and Lavender Oil in Wound Healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-9, 2013.

LANDESBERG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risk of using platelet-rich plasma gel. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.56. n.9, p.1116-1117, 1998.

LI, X-H.; ZHOU, X.; ZENG, S.; YE, F.; YUN, J-L.; HUANG, T-G.; LI, H.; LI, Y-M. Effects of intramyocardial injection of platelet-rich plasma on the healing process after myocardial infarction. **Coronary Artery Disease**, v.19, n.5, p.363-370, 2008.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.4, p.393-410, 2003a.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.5, p.525-542, 2003b.

MARGOLIS, D. J.; KANTOR, J.; SANTANNA, J.; STROM, B. L.; BERLIN, J. A. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. **Diabetes Care**, v.24, n.3, p.483-488, 2001.

MARLOVITS, S.; MOUSSAVI, M.; GABLER, C.; ERDUS, J.; VECSEI, V. A new simplified technique for producing platelet rich plasma: a short technical note. **European Spine Journal**, v.13 (suppl 1), p.S102-6, 2004.

MARTINEZ-ZAPATA, M. J.; MARTI-CARVAJAL, A.; SOLA, I.; BOLIBAR, I.; EXPOSITO, J. A.; RODRIGUEZ, L.; GARCIA, J. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. **Tranfusion**, v.49, n.1, p44-56, 2009.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MAZOR, Z.; PELEG, M.; GARG, A.; LUBOSHITZ, J. Platelet rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. **Implant Dentistry**, v.13, n.1, p.65-72, 2004.

MAZZUCCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E.; GUASCHINO, R.; BORZINI, P. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. **Vox Sanguinis**, v.97, n.2, p.110-118, 2009.

MEHTA, S.; WATSON, T. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.22, n.6, p.433-438, 2008.

MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O. M.; THEORET, C. L. Effects of platelet- rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, n.2, p.277-282, 2009.

NANNEY, L. B. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.94, n.5, p.624-629, 1990.

NDIP, A.; EBAH, L.; MBAKO, A. Neuropathic diabetic foot ulcers-evidence-to-practice. **International Journal of General Medicine**, v.5, p.129-134, 2012.

OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; McWILLIAN, A. M. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. **Canadian Council on Animal Care**, v.1, 1993.

PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. **Burns**, v.36, n.1, p.4-8, 2010.

POR, Y-C.; YEOW, V.K-L.; LOURI, N.; LIM, T.K-H.; KEE, I.; SONG, I-C. Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v.62, n.8, p.1030-1034, 2009.

PRADEEP, A. R.; SHETTY, S. K.; GARG, G.; PAI, S. Clinical effectiveness of autologous platelet-rich plasma and Peptide-enhanced bone graft in the treatment of intrabony defects. **Journal of Periodontology**, v.80, n.1, p.62-71, 2009.

PRYOR, M. E.; YANG, J.; POLIMENI, G.; KOO, K-T.; HARTMAN, M. J.; GROSS, H.; AGELAN, A.; MANNS, J. M.; WIKESJO, U. M. E. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. **Journal of Periodontology**, v.76, n.8, p.1287-1292, 2005.

ROCHA JR., A. M.; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E; ANDRADE, L. C. F; AARESTRUP, F. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade ni processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.2, p.150-156, 2006.

ROZMAN, P.; BOLTA, Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica**, v.16, n.4, p.156-163, 2007.

RUTKOWSKI, J. L.; FENNELL, J. W.; KERN, J. C.; MADISON, D. E.; JOHNSON, D. A. Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth extraction sites using platelet rich plasma. **Journal of Oral Implantology**, v.33, n.3, p.116-121, 2007.

SABINE, W.; RICHARD, G. Regulation of wound healing by growth factors. **Physiological Reviews**, v.83, n.3, p.835-870, 2003.

SAMPSON, S.; GERHARDT, M.; MANDELBAUM, B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v.1, n.3-4, p.165-174, 2008.

SANCHIS, A.; ALBA, L.; LATORRE, V.; SEVILLA, L. M.; PEREZ, P. Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing. **PLoS One**, v.7, n.1, p.e29701, 2012.

SCAFLANI, A. P.; ROMO III, T.; OKRAINSKY, G.; McCORMICK, S. A.; JASON, L.; KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogenic implants with platelet concentrate. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v.7, n.3, p.163-169, 2005.

SENGUPTA, M.; BANERJEE, P.; PAUL, S.; SENGUPTA, J.; GHOSH, M. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. **Muller Journal of Medical Sciences and Research**, v.6, p.27-30, 2015.

SHI, L.; CHANG, Y.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; YU, F-S. X.; WU, X. Activation of JNK signaling mediates connective tissue growth factor expression and scar formation in corneal wound healing. **PLoS One**, v.7, n.2, p.e32128, 2012.

VALBONESI, M.; GIANNINI, G.; MIGLIORI, F.; DALLA COSTA, R.; GALLI, A. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. **The International Journal of Artificial Organs**, v.25, n.4, p.334-338, 2002.

VAN DEN DOLDER, J.; MOOREN, R.; VLOON, A. P. G.; STOELINGA, P. J. W.; JANSEN, J. A. Platelet rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. **Tissue Engineering**, v.12, n.11, p.3067-3073, 2006.

VICK, V. L.; HOLDS, J. B.; HARTESTEIN, M. E.; RICH, R.; DAVIDSON, B. R. Use of autologous platelet concentrate in blepharoplasty surgery. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, v.22, n.2, p.102-104, 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors. **Physiological Reviews**, v.83, n.3, p.835-870, 2003.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.55, n.11, p.1294-1299, 1997.

WOODALL JR., J.; TUCCI, M.; MISCHRA, A.; ASTOUR, A.; BENGHUZZI, H. Cellular effects of platelet rich plasma: interleukin-1 release from prp treated macrophages. **Biomedical Sciences Instrumentation**, v.44, p.489-494, 2008.

WOODALL JR., J.; TUCCI, M.; MISCHRA, A.; BENGHUZZI, H. Cellular effects of platelet rich plasma: a study on hl-60 macrophage-like cells. **Biomedical Sciences Instrumentation**, v.43, p.266-271, 2007.

WOODELL-MAY, J. E.; RIDDERMAN, D. N.; SWIFT, M. J.; HIGGINS, J. Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.16, n.5, p.749-756, 2005.

WROTNIAK, M.; BIELECKI, T.; GAZDZIK T.S. Current opinion about using the platelet rich gel in orthopedics a trauma surgery. **Orthopedic Traumatology Rehabilitacja**, v.9, n.3, p.227-238, 2007.

WU, W.; CHEN, F.; LIU, Y.; MA, Q.; MAO, T. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in a rabbit model. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, n.10, p.1951-1957, 2007.

XIE, Z.; PARAS, C. B.; WENG, H.; PUNNAKITIKASHEM, P.; SU, L-C.; VU, K.; TANG, L.; YANG, J.; NGUYEN, K. Dual growth factor releasing multi- functional nanofibers for wound healing. **Acta Biomaterialia**, v.9, n.12, p.9351-9359, 2013.

YAO, L.; LI, Z-R.; SU, W-R.; LI, Y-P.; LIN, M-L, ZHANG, W-X.; LIU, Y.; WAN, Q.; LIANG, D. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. **PLoS ONE**, v.7, n.2, p.e30842, 2012.

YAZAWA, M.; OGATA, H.; NAKAJIMA, T.; MORI, T.; WATANABE, N.; HANDA, MAKOTO. Basic studies on the clinical Applications of Platelet- Rich Plasma. **Cell Transplantation**, v.12, n.5, p.509-518, 2003.

YOO, J; ROTH, K; HUGHES, B; FUNG, K; FRANKLIN, J; LAMPE, H; PIETRZAK, S. Evaluation of post operative drainage with application of platelet rich and platelet poor plasma following hemi thyroidectomy: a randomized controlled clinical trial. **Head & Neck**, v.30, n.12, p.1552-1558, 2008.

## **NORMAS ADOTADAS**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS (ABNT). **NBR 6023**: elaboração de referências. Rio de Janeiro, ago. 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS (ABNT). **NBR 6024**: Informação e documentação - Numeração progressiva das seções de um documento escrito - Apresentação. Rio de Janeiro, maio 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS (ABNT). **NBR 6027**: Informação e documentação - Sumário - Apresentação. Rio de Janeiro, dez. 2012.

PUBMED a servisse of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em: <<http://decs.bvs.br>>. Último acesso em: 12 mar. 2015.

**Slovoed for IOS 3.55.46, dicionário Inglês – português, português- inglês, © Paragon Software Group, 2014. Web: [www.slovoed.com](http://www.slovoed.com).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**: teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos. 2.ed. Curitiba: UFPR, 2007. v.2.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**: citações e notas de rodapé. 2.ed. Curitiba: UFPR, 2007. v.3.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**: referências. 2.ed. Curitiba: UFPR, 2007. v.4.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**: redação e editoração. 2.ed. Curitiba: UFPR, 2007. v.9.

**ANEXOS**

**ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DO COBEA**



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
 Setor de Ciências Biológicas  
 Comissão de Ética no Uso de Animais  
 (CEUA)



Nº 609

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

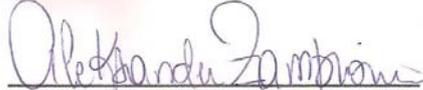
**PROCESSO:** 23075.013736/2012-11

**APROVADO:** 10/05/2012 – R.O. 04/2012

**TÍTULO:** Estudo de fatores de crescimento (VGF, VEGF, IGF) na cicatrização de feridas de pele – estudo experimental

**AUTORES:** Antonio Carlos Campos, Marcos Mocellin, Elen Carolina David João De Masi

**DEPARTAMENTO:** Cirurgia Geral

  
 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
 Coordenador da CEUA

**ANEXO 2 - FATOR DE CRESCIMENTO**

# Inovação Terapêutica

Mediadores biológicos naturais que atuam no reparo e regeneração celular.

**IGF-1** (RH Oligopeptide 2) - **EGF** (RH Oligopeptide 1) - **bFGF** (RH Polipeptide 1) - **TGF** (RH Polipeptide 5)  
**VEGF** (RH Polipeptide 9) - **IDP2** (Decapeptide 4) - **aFGF** (RH Polipeptide 11)  
**Copper tripeptide** (Copper tripeptide 1)

Propriedades técnicas	IGF	TGF	EGF	bFGF	aFGF	IDP-2	Copper Peptide
Favorece a cicatrização <sup>(1,3,5,6)</sup>	●	●	●	●	●	●	●
Repara e previne as rugas <sup>(2,4)</sup>	●	●	●	●		●	
Melhora a elasticidade e viço da pele <sup>(2,4)</sup>	●	●	●	●			
Estimula a circulação periférica <sup>(9,7)</sup>				●	●		
Imibe a enzima 5 alfa redutase <sup>(10)</sup>	●						●
Promove o crescimento de fios densos e fortes <sup>(9)</sup>					●		

## Aplicativos

- Procedimento capilar com fatores de crescimento.
- Serum com precursores hormonais de efeito tópico.
- Composto terapêutico para gordura localizada.
- Reparador de estrias.
- Creme Cicatrizante.

## Referências bibliográficas

1. Beckett S, Haack S, Hierlemann H, Farrahi F, Mayer P, Königsrainer A, Coerper S. Stimulation of steroid-suppressed cutaneous healing by repeated topical application of IGF-I: different mechanisms of action based upon the mode of IGF-I delivery. *J Surg Res.* 2007 May 15;139(2):217-21. Epub 2006 Oct 27.
2. Mehta RC, Fitzpatrick RE. Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatol Ther.* 2007 Sep-Oct;20(5):350-9.
3. Fu X, Shen Z, Guo Z, Zhang M, Sheng Z. Healing of chronic cutaneous wounds by topical treatment with basic fibroblast growth factor. *Chin Med J (Engl).* 2002 Mar;115(3):331-5.
4. Goldstein RH, Poliks CF, Pilch PF, Smith BD, Fine A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts. *Endocrinology.* 1989 Feb;124(2):964-70.
5. Hong JP, Kim YW, Jung HD, Jung KI. The effect of various concentrations of human recombinant epidermal growth factor on split-thickness skin wounds. *Int Wound J.* 2006 Jun;3(2):123-30.
6. Kwon YB, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Baek RM, Kim JY, Kweon H, Lee KG, Park YH, Lee JH. Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. *J Vet Sci.* 2006 Jun;7(2):105-9.
7. JIA LUO et al. *J Neurochem.* 67, 1442 (1996).
8. Yamanaka K, Inaba T, Nomura E, Hurwitz D, Jones DA, Hakamada A, Isoda K, Kupper TS, Mizutani H. Basic fibroblast growth factor treatment for skin ulcerations in scleroderma. *Cutis.* 2005 Dec;76(6):373-6.
9. Weger N, Schlake T. IGF-I signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *J Invest Dermatol.* 2006 Sep;126(9):2135; author reply 2135-6.
10. PYO, K. The effect of tripeptide-copper complex on human hair growth in vitro. Department of Dermatology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-744, Korea. *Arch Pharm Res.* 2007 Jul;30(7):834-9.
11. Derek Le Roith, M.D., Ph.D. *Insulin Like Growth Factors.* Volume 336:633-640. Número 9. Feb. 27, 1997.
12. Glick, Adam B.; Dlugosz, Andrzej A.; Yuspa, Stuart H. *Regulating Normal Skin Function by Polypeptide Growth Factors.* *Cosmetics and Toiletries.* Jul. 01, 1994.

**Atualização científica disponível à classe médica.**

**www.formedica.com.br - fale conosco (41) 3225 1616**

**ANEXO 3 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO DOS RATOS**

**COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS  
(NUVILAB CR1®)**

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL- metionina e lisina).
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína Bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Estrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina
Microelementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.

FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil