

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS
COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Tuane Nerissa Alves Garcez

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS
COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Autora: Tuane Nerissa Alves Garcez

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na
área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal

Orientador: Prof^o. Dr^o. Emerson Antonio Contesini

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Obino Cirne-Lima

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Garcez, Tuane Nerissa Alves

Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvantes da cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos Nova Zelândia / Tuane Nerissa Alves Garcez. -- 2012.

113 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Pele. 2. Cicatrização. 3. Terapia celular. 4. Fatores de crescimento. 5. Plaquetas. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Cirne-Lima, Elizabeth Obino, coorient. III. Título.

Tuane Nerissa Alves Garcez

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS
COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

APROVADO POR

Prof^o. Dr^o. EMERSON ANTONIO CONTESINI

Orientador e Presidente da Comissão

Prof^a. Dr^a. ANA HELENA PAZ

Membro da Comissão (HCPA/UFRGS)

Prof^a. Dr^a. ILMA SIMONI BRUM DA SILVA

Membro da Comissão (UFRGS)

Prof^o. Dr^o. MARCELO MELLER ALIEVI

Membro da Comissão (UFRGS)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Maria Luiza, meu anjo de luz, que com seu sorriso sincero renova minhas forças e me incentiva na conquista dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Emerson Antonio Contesini pela confiança depositada em mim ao longo dos anos. Obrigada por me ensinar o compromisso em contribuir para a ciência.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Elizabeth Obino Cirne-Lima, que gentilmente me recebeu no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular. Por sua orientação, colaboração, compreensão, incentivo e amizade serei eternamente grata.

A toda equipe do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular – HCPA/UFRGS pela acolhida, em especial à Prof^a. Dr^a. Ana Helena Paz pelo auxílio na elaboração e execução deste experimento. Sua experiência, dedicação e atenção foram essenciais para a realização deste trabalho.

À minha colega de mestrado Priscilla Domingues Mörchbächer e à doutoranda Anelise Bonilla Trindade por se colocarem à disposição durante as cirurgias nos animais experimentais. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio e tempo dedicado.

À colega doutoranda Viviam Nunes Pignone, exemplar e incansável companheira! Muito obrigada pelo teu tempo, carinho e dedicação durante toda fase experimental.

À colega de mestrado Alessandra Magrisso, pela dedicação, organização e essencial colaboração no processamento das amostras sanguíneas.

À Helena Flores, futura bióloga, minha IC “preferida”! Sempre disposta a ajudar e aprender novas técnicas. Teu apoio e disponibilidade foram muito importantes nesses meses de trabalho. Tenho certeza que ainda compartilharemos muitas manhãs de domingo na UEA.

Às estagiárias Silvana Bellini Vidor, Nicole Lângaro Amaral, Brunna Barni e Pâmela Garcia Almeida pela dedicação e esforço em auxiliar nas avaliações clínicas e procedimentos cirúrgicos. A vontade de aprender e de fazer sempre o melhor garantirá o sucesso no caminho de vocês.

À minha amiga querida e colega de curso, Luciana Paula Merini, com quem compartilhei minhas dúvidas, inseguranças, felicidades e êxitos.

À doutoranda Wanessa Beheregaray Gianotti por me ajudar a “ordenar” as primeiras ideias e por me passar seu *background* em cicatrização cutânea.

Aos colegas de pós-graduação: Aline, Cláudio, Fernanda, Giordano, Gustavo, Michelli, Paula, Gabriela, Paulo Albuquerque, Paulo Bertram, Verônica, Monalisa, Paula H., Renato, Fábio Teixeira, Cláudia Faraco e todos os demais pelas vivências e conhecimentos compartilhados na sala dos pós-graduandos, nas aulas, no bloco cirúrgico e nos corredores do HCV-UFRGS.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal por toda ajuda e apoio durante a fase experimental, em especial à enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e à médica veterinária Fabíola Schons Meyer. Obrigada pela “ginástica” para conseguir acomodar mais um projeto em um período crítico e principalmente, por oferecerem um ambiente saudável e acolhedor aos animais e também aos pesquisadores.

Ao Prof^o. Dr^o. Eduardo Cambruzzi pela gentileza, acessibilidade e dedicação nas avaliações histopatológicas.

Ao Prof^o. Dr^o. Seno Otto Kunrath pela feliz indicação do colega patologista.

À Prof^a. Dr^a Ilma Simoni Brum, por abraçar comigo as minhas batalhas e sempre encontrar um jeito de diminuir minhas angústias. Por despertar em mim o espírito investigativo nas tardes passadas no laboratório de fisiologia pipetando dezenas de *eppendorfs* quando eu ainda nem sabia o que seria um dia.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), na pessoa do Prof^o. Dr^o. Marcelo Meller Alievi, seu diretor, e do Prof^o. Dr^o. Carlos Afonso de Castro Beck, vice-diretor, por permitirem a minha atuação nesta instituição, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e oportunidades oferecidas.

A todos os professores que no decorrer deste trabalho, através de sua compreensão e conhecimento, direcionaram os estudos para que fossem consolidados.

À minha família, que me acolhe e ensina a ter coragem, amor e fé para buscar o aperfeiçoamento e vencer os obstáculos da vida, sem a qual o que eu sou não seria possível.

Aos animais, especialmente àqueles que doaram suas vidas em prol deste e de outros estudos científicos.

À Deus, por colocar anjos em meu caminho.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para tornar este trabalho possível.

Meu sincero agradecimento!

RESUMO

Muito se tem investido em pesquisa na compreensão dos processos e fenômenos envolvidos nas diversas fases da reparação tissular e, principalmente, no desenvolvimento de recursos e tecnologias com o objetivo de favorecer os avanços no tratamento de feridas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos biológicos da associação células-tronco mesenquimais (CTMs) e plasma rico em plaquetas (PRP) como adjuvantes da cicatrização cutânea de feridas padronizadas em coelhos. Foram utilizados 37 coelhos Nova Zelândia, dentre os quais, 36 foram distribuídos em seis grupos: grupo controle (GC), grupo células-tronco mesenquimais (GCTM), grupo plasma rico em plaquetas na forma líquida (GPRPLIQ), grupo plasma rico em plaquetas na forma de gel (GPRPGEL), grupo associação células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na forma líquida (GCTM+PRPLIQ), grupo associação células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na forma de gel (GCTM+PRPGEL). Após indução de lesões cutâneas agudas e padronizadas, os animais receberam o tratamento de acordo com o grupo que compunham. Macroscopicamente, a cada dois dias, foram analisadas as medidas das lesões e calculadas a área e a taxa de cicatrização das mesmas. Amostras para análise microscópica foram coletadas em sete e 14 dias e avaliadas quanto à presença de células inflamatórias, angiogênese, formação de fibrose colagênica, proliferação epitelial e fibroblástica. Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que: 1) a associação CTM e PRP em suas frações terapêuticas (CTM+PRPGEL e CTM+PRPLIQ) não acelerou o processo de cicatrização de feridas cutâneas agudas, na avaliação morfométrica aos 14 dias de pós-operatório; 2) a aplicação local da CTM e das frações de PRP quando utilizadas de maneira isolada não conseguiram acelerar o tempo necessário ao processo cicatricial na avaliação morfométrica aos 14 dias de pós-operatório; 3) a utilização do PRP na sua forma líquida obteve índices de epitelização menores em relação ao controle em avaliações histopatológicas aos 14 dias de pós-operatório; 4) à exceção do ocorrido com o grupo PRP líquido, os demais tratamentos não alteraram significativamente as fases inflamatória, proliferativa e inicial do remodelamento, segundo dados histopatológicos; 5) a terapia com as células-tronco mesenquimais promoveu cicatrizes esteticamente melhores na avaliação clínica, especialmente aos 14 dias de observação. Sugere-se a necessidade de novos estudos e a

utilização de outras ferramentas diagnósticas para melhores subsídios de interpretação sobre os resultados encontrados.

Palavras-chave: pele, terapia regenerativa, terapia celular, fatores de crescimento, plaquetas.

ABSTRACT

Much has been invested on research regarding comprehension of the processes and phenomena that are involved in several stages of tissue repairing and mainly on resources and technologies development in order to support advances on wound healing. This study has been performed in order to evaluate the biological effects of mesenchymal stem cells (CTM) and platelet rich plasma (PRP) association as adjuvants on skin healing of standardized wounds in rabbits. Thirty-seven New Zealand rabbits have been used and, among these animals, 36 were allocated into six groups: control group (GC), mesenchymal stem cells group (GCTM), liquid platelet rich plasma group (GPRPLIQ), gel platelet rich plasma group (GPRPGEL), mesenchymal stem cells associated with liquid platelet rich plasma group (GCTM+PRPLIQ) and mesenchymal stem cells associated with gel platelet rich plasma group (GCTM+PRPGEL). After the induction of acute and standardized skin wounds, animals received the treatment according to the group they belonged to. Macroscopically, every two days, wounds measures were taken to calculate their area and healing rate. Samples for microscopically analysis were collected on day 7 and on day 14 and were evaluated for the presence of inflammatory cells, angiogenesis, collagen fibrosis formation, epithelial and fibroblastical proliferation. Basing on the results it was concluded that: 1) CTM and PRP in its two therapeutic fractions association (GCTM+PRPLIQ and GCTM+PRPGEL) did not accelerate the healing process of acute skin wounds, on morphometric assessment at 14 days after surgery; 2) local injection of CTM and PRP fractions when isolated did not accelerate the time required for wound healing on morphometric assessment at 14 days after surgery; 3) PRP application on its liquid fraction showed lower levels of epithelization related to control on histopathological evaluation at 14 days after surgery; 4) except GPRPLIQ, other treatments did not alter significantly inflammatory, proliferative nor initial remodeling phases, based on histopathological data; 5) CTM therapy promoted aesthetically better scars on clinical evaluation, especially at 14 days of observation. It is suggested the requirement of further studies and use of different diagnostic tools to obtain better interpretation of the achieved results.

Key-words: *skin, regenerative therapy, cell therapy, growing factors, platelets.*

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Diagrama esquemático da estrutura da pele humana. FONTE: BEAR et al., 200824
- FIGURA 2 - Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune-celular. FONTE: PARK & BARBUL, 2004 (adaptado por GARCEZ, TNA. (2012)).....25
- FIGURA 3 - Diagrama representativo das fases da cicatrização e seus principais agentes facilitadores em função do tempo. FONTE: TIZARD, 2008 (adaptado por GARCEZ, TNA. 2012).....26
- FIGURA 4 - Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco (Fonte: ZAGO & COVAS, 2006) 33
- FIGURA 5 - Desenho ilustrativo dos diferentes sítios para obtenção de células-tronco (Fonte: SEONG et al., 2010).....36
- FIGURA 6 - Figura esquemática das plaquetas em repouso e quando ativadas. Onde: (a) trombina; (b) receptor; (c) ativação da trombina; (d) fatores de crescimento; (e) grânulos- α ; (f) sistema tubular aberto; (g) mitocôndria; (h e i) citoesqueleto e membrana; (j) grânulo denso e (k) pseudópodes. FONTE: EVERTS et al., 2006 (modificada por GARCEZ, TNA. 2012)39

FIGURA 7 - Coleta do tecido adiposo em coelho Nova Zelândia para obtenção das CTMs. (A) Incisão de pele até exposição do tecido subcutâneo na região cervical; (B) exposição da fração de tecido a ser coleta.....48

FIGURA 8 - Sequência da preparação do PRP. (A) Transferência do sangue do tubo com anticoagulante citrato de sódio 3% para um tubo Falcon; (B) primeira centrifugação; (C) tubo Falcon após a primeira centrifugação apresentando três camadas distintas formadas pelas hemácias – no fundo do tubo –, pela zona de névoa, composta pelos leucócitos e plaquetas maiores – camada intermediária – e pelo plasma – camada superior; (D) coleta das duas camadas superficiais (plasma e zona de névoa) e transferência para novo tubo Falcon; (E) formação (ao final da segunda centrifugação) de um “pellet” (sedimentado ao fundo do tubo) em uma porção superior de plasma; (G) coleta do “pellet” e uma fração de 150 μ L do plasma, que após homogeneização, formaram o PRP a ser utilizado nos experimentos52

FIGURA 9 - Esquematização do protocolo para obtenção do PRP. (A) sangue total; (1) primeira centrifugação do sangue total a 250 gravidades por 10 minutos; (B) fração plasmática; (C) zona de névoa; (D) hemácias; (2) segunda centrifugação das frações B e C a 1000 gravidades por 10 minutos; (E) fração plasmática final ou PPP (plasma pobre em plaquetas); (F) pellet e uma fração PRP..... 53

FIGURA 10 - Etapa final do PRP na forma de gel. Disposição da fração PRP em moldes circulares e posterior adição de 150 μ L de gliconato de cálcio para a coagulação e formação do gel de PRP54

- FIGURA 11 - Apresentação do molde circular de 1cm de diâmetro (trépano corneal 10.5) utilizado para demarcação da área de lesão.....55
- FIGURA 12 - Localização das referências anatômicas e determinação do campo cirúrgico. Onde: (A) Região escapular esquerda; (B) Região escapular direita; (C) Coluna vertebral. Os Triângulos demarcam a área de indução das lesões experimentais.....55
- FIGURA 13 - Sequência de indução das lesões experimentais. (A e B) Demarcação da área de excisão com um molde circular de 1cm de diâmetro (trépano corneal 10.5); (C) Excisão de fragmento circular de espessura completa (epiderme, derme, hipoderme) até a superfície externa das fâscias musculares; (D) aspecto final das lesões experimentais na região dorsal do tórax próximo cerca de 2cm da borda escapular, sendo uma no antímero direito e outra no esquerdo, distantes uma da outra cerca de 6cm56
- FIGURA 14 - Representação dos grupos de acordo com a terapêutica realizada.....57
- FIGURA 15 - Demonstração dos procedimentos terapêuticos realizados após indução de ferida cutânea aguda em coelhos. (A) Injeção de células-tronco mesenquimais na concentração 7×10^5 ressuspendidas em PBS em um volume final de 1 mL. (B) Injeção de plasma rico em plaquetas na forma de líquido em um volume final de 1 mL. (C) Plasma rico em plaquetas em formulação de gel aplicado no leito da ferida. (D) Aspecto das lesões após o tratamento e curativo primário com Tegaderm®.....59
- FIGURA 16 - CTMs derivadas do tecido adiposo de coelho Nova Zelândia coradas com Hematoxilina-Eosina e em aumento de 20X.....64

- FIGURA 17 - Caracterização das MSCs a partir da gordura. (A) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue em aumento de 10X; (B) diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red em aumento de 20X 64
- FIGURA 18 - Avaliações clínicas. Aspecto das lesões nas avaliações clínicas aos sete e 14 dias de pós-operatório. Nota-se uma melhora na qualidade da cicatriz nos grupos tratados com células-tronco mesenquimais (GCTM) e suas associações (GCTM+PRPLIQ e GCTM+PRPGEL).....68
- FIGURA 19 - Figura demonstrativa sobre a evolução em gráficos das médias obtidas sobre a relação taxa de contração média em cada grupo e o dia avaliados. Nesta figura estão abordados os dados obtidos nos dias dois, quatro, seis e sete. Nota: O eixo x representa o dia avaliado e o eixo Y a taxa de contração média em porcentagem obtida pelo grupo 71
- FIGURA 20 - Figura demonstrativa sobre a evolução em gráficos das médias obtidas sobre a relação taxa de contração média em cada grupo e o dia avaliados. Nesta figura estão abordados os dados obtidos nos dias oito, 10, 12, e 14. Nota: O eixo x representa o dia avaliado e o eixo Y a taxa de contração média em porcentagem obtida pelo grupo72
- FIGURA 21 - Demonstração gráfica da evolução da taxa de contração média de cada grupo avaliado em relação ao tempo de observação. Nota-se que existe diferença nas avaliações iniciais (até o sexto dia), no entanto, ao final do tempo de avaliação proposto não há diferença entre os grupos..... 73

- FIGURA 22 - Demonstração gráfica da análise dos parâmetros histopatológicos (reação inflamatória, deposição de colágeno e angiogênese). Não houve diferença nas médias dessas avaliações entre os grupos nos tempos avaliados (sete e 14 dias após a indução das lesões) 74
- FIGURA 23 - Demonstração gráfica da análise dos parâmetros imunoistoquímicos (porcentagem de proliferação epitelial e fibroblástica).....75
- FIGURA 24 - Demonstração gráfica da análise dos parâmetros imunoistoquímicos (porcentagem de proliferação epitelial e fibroblástica). Houve diferença significativa nas médias dessas avaliações apenas entre os grupos GPRPLIQ e GC (a e b) na avaliação aos 14 dias após a indução das lesões 76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Médias e desvios padrão do incremento plaquetário obtido em cada grupo tratamento. O círculo vermelho destaca a média geral obtida pelo protocolo empregado.....65

TABELA 2 - Taxa de contração média por grupo. Relação da média e erro padrão sobre a taxa de contração obtida entre os grupos tratados. As letras a e b, marcam os grupos que obtiveram valores estatisticamente significantes nos testes empregados..... 69

TABELA 3 - Taxa de contração. Relação da taxa de contração média considerando o grupo e o dia avaliados. Estão listados apenas os resultados que obtiveram relevância estatística 70

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
µL	Microlitros
ALFA-MEM	Meio essencial mínimo
BID	Duas vezes ao dia
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
C	Controle
CT	Célula-tronco
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMEM	Meio essencial modificado
EGF	Fator de crescimento endotelial
ES	Células-tronco embrionárias
FC	Fator de crescimento
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
HE	Hematoxilina-eosina
ID	Intradérmico
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
kg	Quilograma

IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
MMPs	Metaloproteases
MO	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
PBS	Tampão fosfato tamponado
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina 2
PRP	Plasma rico em plaquetas
SBF	Soro bovino fetal
SID	Uma vez ao dia
T CD4+	Linfócitos T CD4+
T CD8+	Linfócitos T CD8+
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócitos T reguladores
UEA	Unidade de experimentação animal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral	22
2.2	Específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	Modelo Experimental	23
3.2	A pele, os mecanismos de reparo e o tratamento de feridas cutâneas	24
3.2.1	Anatomia e fisiologia da pele	24
3.2.2	Cicatrização cutânea	25
3.2.3	Classificação das feridas e principais tratamentos disponíveis	31
3.3	Células-tronco mesenquimais	33
3.4	Plasma rico em plaquetas	37
3.5	Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na cicatrização	41
3.5.1	Células-tronco mesenquimais na cicatrização	41
3.5.2	Plasma rico em plaquetas na cicatrização	44
3.5.3	Associação células-tronco e plasma rico em plaquetas na cicatrização	46
4	MATERIAIS E MÉTODO	47
4.1	Modelo Experimental	47
4.2	Obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo	48
4.2.1	Coleta e processamento do tecido adiposo	48
4.2.2	Obtenção da cultura celular	49
4.2.3	Congelamento/descongelamento	50
4.2.4	Caracterização	50
4.3	Escolha e padronização dos protocolos de plasma rico em plaquetas	51
4.3.1	Protocolo de obtenção de plasma rico em plaquetas líquido	52

4.3.2	Protocolo de obtenção de plasma rico em plaquetas em gel.....	54
4.4	Procedimento Anestésico	55
4.5	Procedimento Cirúrgico	55
4.5.1	Procedimentos pré-operatórios.....	55
4.5.2	Indução das lesões experimentais	55
4.5.3	Procedimentos pós-operatórios	55
4.6	Procedimentos Terapêuticos	57
4.7	Avaliação Macroscópica	61
4.8	Avaliação Morfométria.....	62
4.9	Avaliação Microscópica	62
4.10	Análise Estatística	63
5	RESULTADOS.....	64
5.1	Modelo Experimental.....	64
5.2	Obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	64
5.3	Escolha e padronização dos protocolos de plasma rico em plaquetas	66
5.4	Procedimento Anestésico.....	67
5.5	Procedimento Cirúrgico	67
5.6	Procedimentos Terapêuticos	67
5.7	Avaliação Macroscópica	68
5.8	Avaliação Morfométrica	70
5.9	Avaliação Microscópica	75
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	93
8	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE 1	
	APÊNDICE 2	
	APÊNDICE 3	
	APÊNDICE 4	

APÊNDICE 5

1 INTRODUÇÃO

As lesões na pele são um transtorno para o homem desde tempos remotos. Atualmente, representam um problema de saúde pública com repercussões socioeconômicas significativas. Assim, muito se tem investido em pesquisa na compreensão dos processos e fenômenos envolvidos nas diversas fases do reparo tissular e, principalmente, no desenvolvimento de recursos e tecnologias com o objetivo de favorecer os avanços no tratamento de feridas.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes nos tecidos adultos em locais como medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos. Apesar de encontrarem-se em fase de experimentação no que se refere à sua utilização para o tratamento de lesões cutâneas, alguns artigos científicos têm demonstrado sua habilidade em promover a cicatrização.

As plaquetas (PL) são células sanguíneas que possuem importante papel na hemostasia e são uma das principais fontes de fatores de crescimento (FC). Vários estudos tem demonstrado que a aplicação de concentrados autógenos derivados de plaquetas ou plasma rico em plaquetas (PRP), em uma área submetida a uma lesão acidental ou cirúrgica, pode promover melhor hemostasia e acelerar o processo de reparação tecidual.

Embora o mecanismo exato da ação dos FC sobre a atividade das CTMs não esteja completamente elucidado, reconhece-se que a diferenciação celular é subordinada a estímulos bioquímicos produzidos pelo nicho no qual a célula está inserida. Tais estímulos, em sua maioria, decorrem da ação dos FCs, os quais possuem uma curta meia vida e são secretados em pequenas concentrações nos tecidos. Neste contexto, a associação de células-tronco mesenquimais e do plasma rico em plaquetas parece ser uma inovação promissora como adjuvantes da cicatrização cutânea, em que se somariam os benefícios de ambas as técnicas com a possibilidade de o PRP promover o meio adequado para o carreamento das CTMs e principalmente, funcionar como fonte de FCs potencializando a diferenciação celular e o reparo tecidual.

Este trabalho vem a contribuir para a análise dos efeitos biológicos da associação de células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas no tratamento de feridas cutâneas padronizadas em coelhos, como terapia inicial importante para subsídio científico que fundamente seu possível uso clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a utilização de células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas e suas associações quanto à capacidade de influenciar a qualidade e o tempo de reparo de feridas cutâneas padronizadas em coelhos Nova Zelândia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do tratamento de feridas cutâneas com CTMs e PRP e comparar as diferenças obtidas entre os grupos pesquisados: grupo associação de CTMs e PRP fração líquida (GCTM+PRPLIQ) e grupo associação de CTMs e PRP fração gel (GCTM+PRPGEL);

Estas comparações serão baseadas em resposta aos seguintes testes:

– cálculo da taxa de contração por meio da medida da ferida com a utilização de paquímetro digital nos dias zero, dois, quatro, seis, oito, 10, 12 e 14;

- avaliação da atividade celular através de histopatologia e imunoistoquímica de amostras obtidas nos tempos sete e 14 dias;

- capacidade de neovascularização, reepitelização e colagenização através de histopatologia e imunoistoquímica de amostras obtidas nos tempos sete e 14 dias.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Modelo Experimental

O modelo experimental adotado para este estudo foi o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) pertencente à Ordem Lagomorfa, Família Leporidae.

Atualmente diversas pesquisas têm sido realizadas na área da cicatrização cutânea e cirurgia plástica utilizando esta espécie, principalmente para avaliar regeneração tecidual. Além disso, este parece ser o modelo animal ideal para a investigação dos protocolos de obtenção e atividade do PRP, visto que existem ressalvas em pesquisas com modelos animais de tamanho inadequado (pequenos), nos quais pode haver prejuízo na forma de coleta e obtenção de volume sanguíneo ideal (MARX, 2001; EFEOGLU et al., 2004).

A adoção deste modelo possibilita o preparo de PRP autógeno, mantendo o animal com todos os sinais vitais preservados e sem qualquer tipo de comprometimento sistêmico, além de facilidade de obtenção, manuseio e manutenção (EFEOGLU et al., 2004).

Apesar de alguns autores questionarem a validade da comparação direta do valor proposto para obtenção de um PRP “terapêutico” em humanos e a simples extrapolação desse valor para outra espécie animal, principalmente pelas diferenças na morfologia dos elementos figurados do sangue entre coelhos e humanos, sendo a principal delas o tamanho das plaquetas ($5,17 \pm 0,46 \mu\text{m}^3$ para humanos e $4,78 \pm 0,26 \mu\text{m}^3$ para coelhos), tem-se observado um aumento percentual médio de plaquetas no PRP de coelhos semelhante ao proposto como ideal para o PRP em humanos (JAIN, 1993; MARX et al., 1998; ZECHNER et al., 2003; WEIBRICH et al., 2004).

3.2 A pele, os mecanismos de reparo e o tratamento de feridas cutâneas

3.2.1 Anatomia e fisiologia da pele

A pele é a principal barreira de proteção do organismo e tem como funções básicas impedir a perda excessiva de líquidos, proteger da ação de agentes externos, manter a temperatura corpórea, sintetizar vitamina D com a exposição aos raios solares, agir como órgão do sentido e participar da termorregulação (BRUNNER & SUDDARTH, 2005).

Histologicamente, é dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si (FIGURA 1). A epiderme é a porção mais superficial, continuamente renovada e organizada em camadas (basal, granulosa, espinhosa, lúcida e queratinosa). Apresenta três diferentes linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans (DYCE et al., 1990; BANKS, 1992). A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. É composta principalmente por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, apresentando-se bastante vascularizada e inervada, podendo, também, conter glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos. Pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna. A derme contém tipos diferentes de células, incluindo fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos (DYCE et al., 1990).

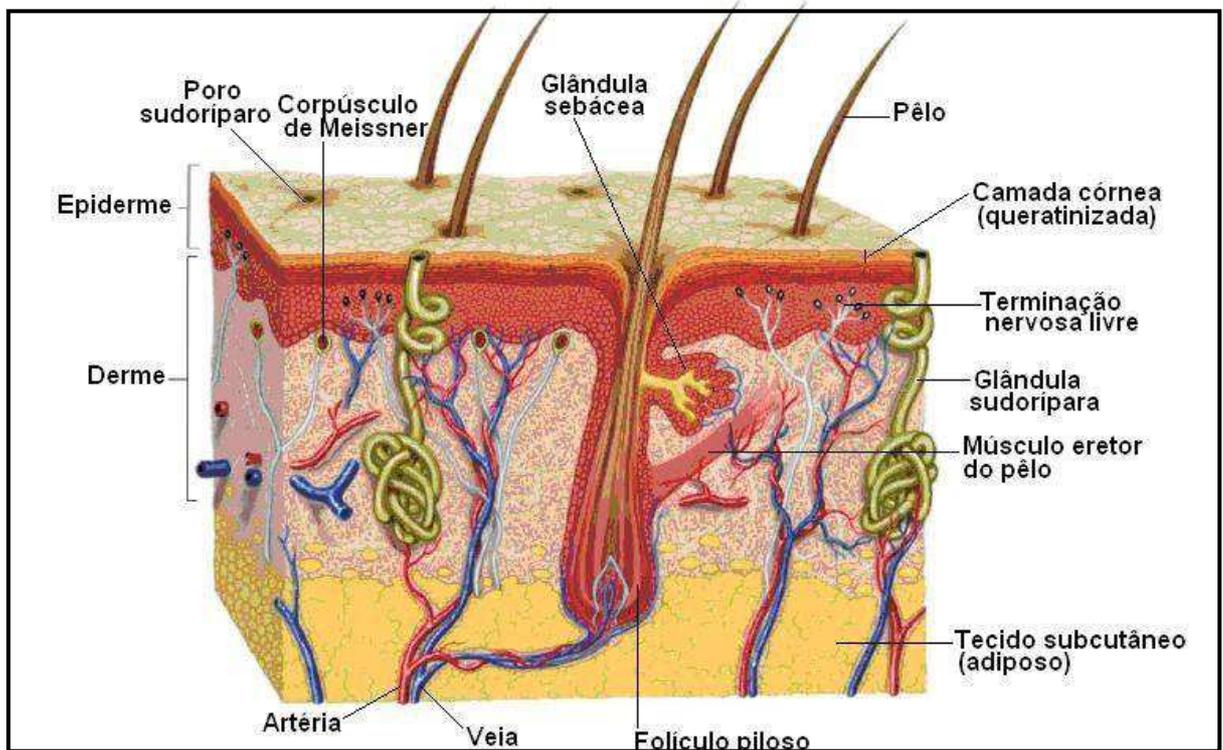


Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura da pele humana. FONTE: BEAR et al., 2008.

3.2.2 Cicatrização cutânea

O processo de cicatrização da pele compreende dois mecanismos de restauração dos tecidos: a regeneração e o reparo.

A regeneração ocorre com reposição do tecido "original". O trauma inicial gera uma resposta inflamatória aguda, manifesta por formação de edema e de exsudato seroso, rico em leucócitos, que cessa em menos de 24 horas. As células epiteliais das margens da ferida e das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas começam a proliferar e migrar no leito da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície (SANTOS, 2000).

O mecanismo de reparação de lesões cutâneas é composto de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, que são descritos em fases. Para Cesaretti (1998), Santos (2000), Blanes (2004) e Clark et al. (2007), estes eventos podem ser divididos em três etapas: inicialmente um estágio *inflamatório*, seguido por um de *proliferação* e finalizado com o reparo em um estágio de *remodelação* (FIGURA 2).

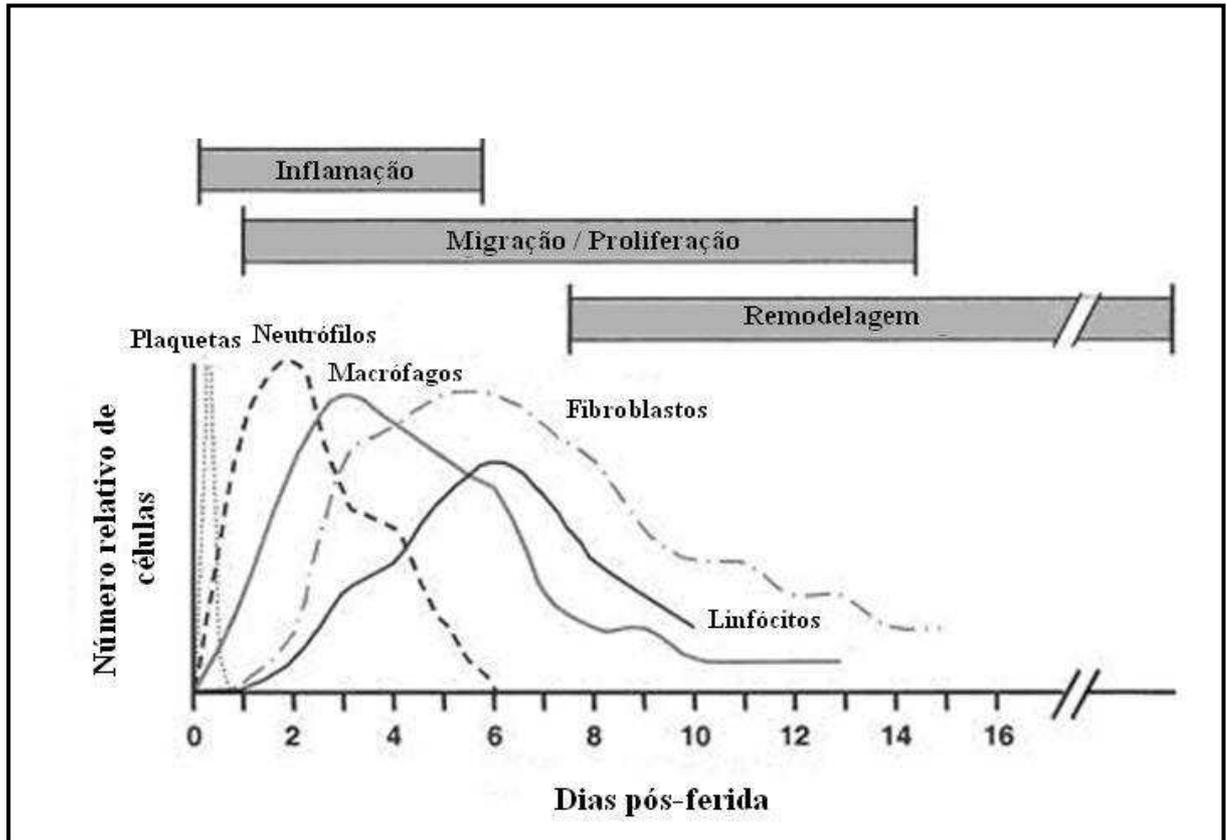


Figura 2. Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune-celular.
 FONTE: PARK & BARBUL, 2004 (adaptado por GARCEZ, TNA. 2012).

Este processo envolve uma regulada cascata de eventos, iniciada pela interação entre alguns tipos celulares, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (NWOMEH et al., 1998). Recrutamento de células inflamatórias, angiogênese, formação de tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e migração de queratinócitos contribuem para restaurar a integridade funcional e anatômica do tecido (ROH & LYLE, 2006). A perfeita interação de todos estes fatores determina a qualidade e a velocidade de cicatrização de uma lesão.

A fase *inflamatória* inicia com a hemostasia (BAUM & ARPEY, 2005). Após a ocorrência da ferida, tem início o extravasamento sanguíneo, que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A resposta imediata é a vasoconstrição local como tentativa de limitar a hemorragia. Posteriormente, observa-se vasodilatação, que é acompanhada por aumento da permeabilidade capilar. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina que, além de estabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de micro-organismos, organiza a matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá

também como fonte de fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (WERNER & GROSE, 2003; EMING et al., 2007).

As plaquetas, essenciais à formação do tampão hemostático, são ativadas e sofrem degranulação induzida pela trombina, secretando vários mediadores na área lesada. Dentre esses mediadores, podemos destacar o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador β (TGF- β), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), serotonina, bradicinina, prostaglandina e histamina, além de glicoproteínas adesivas como fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009). Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas difundem-se pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta o recrutamento e a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (BALBINO et al., 2005).

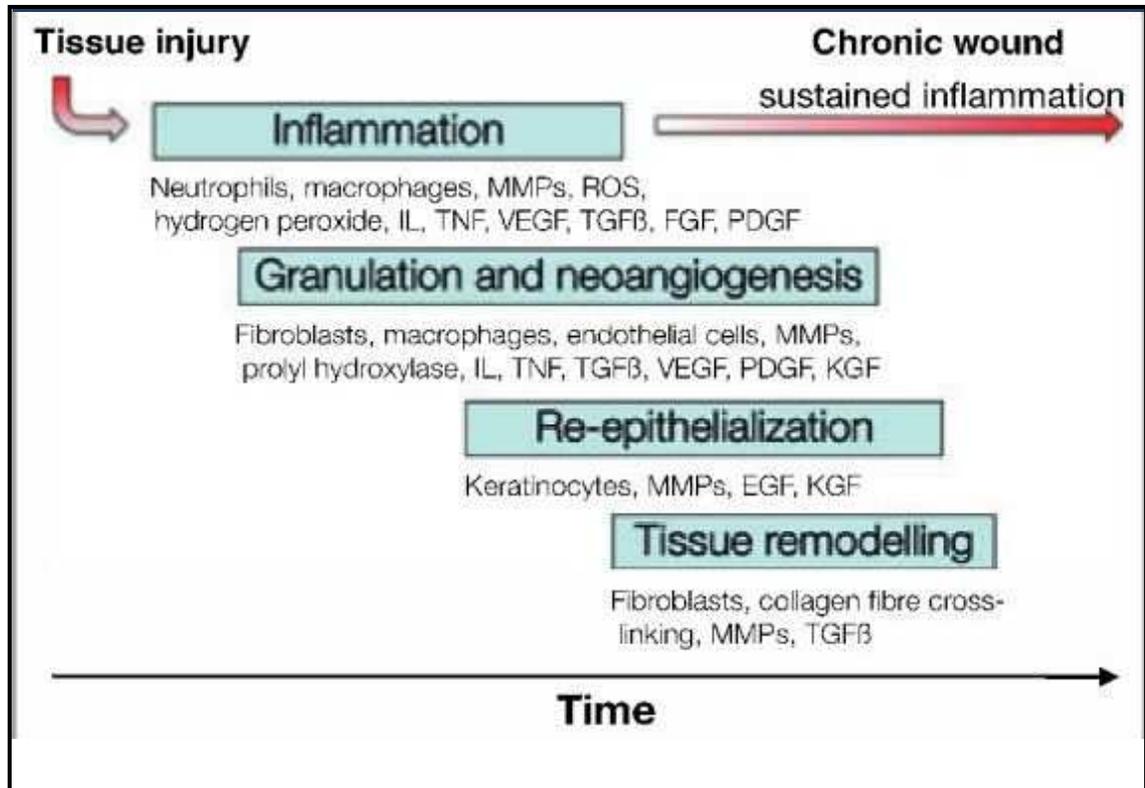


Figura 3: Diagrama representativo das fases da cicatrização e seus principais agentes facilitadores em função do tempo. FONTE: TIZARD, 2008 (adaptado por GARCEZ, TNA. 2012).

Durante esta etapa, o PDGF atua a partir de propriedades quimiotáticas sobre neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. O TGF- β apresenta papel central para a produção do infiltrado de neutrófilos, sendo secretado por plaquetas, macrófagos e fibroblastos imediatamente após o estabelecimento da lesão, além de induzir vários tipos celulares a produzirem mais TGF- β , elevando sua concentração no foco inflamatório (WERNER & GROSE, 2003).

Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a atingirem a região inflamada, sendo predominantes entre o primeiro e segundo dias (BALBINO et al., 2005). Sua função principal é fagocitar microorganismos (HATANAKA & CURI, 2007).

Os macrófagos derivados dos monócitos surgem na área da lesão, por volta do segundo ao quinto dia (PARK & BARBUL, 2004). Além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de microorganismos pela fagocitose, atuam degradando e eliminando componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina, proteoglicanos, e neutrófilos que perderam sua função (EMING et al., 2007; TIZARD, 2008).

Os macrófagos também são fonte de fatores de crescimento, tais como PDGF, TGF- β , VEGF e EGF, que são as principais citocinas envolvidas na formação do tecido de granulação na fase subsequente do processo cicatricial (ABBAS et al., 2008; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009). Estima-se que a fase inflamatória tenha, em condições normais, duração de 48 a 72 horas (HATANAKA & CURI, 2007).

A resposta inflamatória pode ser classificada em aguda ou crônica, dependendo da persistência da lesão e severidade dos sinais clínicos (FIGURA 4). A *reação inflamatória aguda* é caracterizada pela curta duração, aumento da permeabilidade vascular, exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Em geral, essa reação é autolimitante e sofre resolução, envolvendo remoção de células mortas e regeneração da matriz extracelular. A *reação inflamatória crônica* depende da não resolução do processo de fase aguda e, geralmente, possui longa duração. Caracteriza-se pela persistência de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese, proliferação de tecido conjuntivo e dano tissular, frequentemente resultando em reparo excessivo (BAUHMANN & GAUDIE, 1994; KUMAR et al., 2005; SERHAN & SAVIL, 2005).

A *fase proliferativa* caracteriza-se pelos processos de fibroplasia, angiogênese, deposição de matriz extracelular e reepitelização. Nesta fase, ocorre intensa migração e proliferação celular, principalmente de fibroblastos e queratinócitos (SEPHEL & WOODWARD, 2006), que atuam para o reparo do tecido conjuntivo e do epitélio.

Os fibroblastos surgem por volta do segundo e terceiro dia após o trauma. São células importantes na produção de componentes da substância fundamental e colágeno. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais denso e elástico. Esse processo é denominado de fibroplasia e sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, da neovascularização da região (HARTLAPP et al., 2001; HATANAKA & CURI, 2007). Inicialmente, a migração e ativação de fibroblastos são intensificadas em decorrência da liberação de mediadores destacando-se PDGF, TGF- β e VEGF. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e, após influência dos fatores de crescimento, são ativados e migram das bordas para o centro da ferida (THEORET, 2005; STOCUM, 2006; GHOSH & CLARK et al., 2007).

A indução da angiogênese ocorre principalmente pela ação direta de fatores de crescimento sobre as células endoteliais (BALBINO et al., 2005; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009). Sinalizadores, principalmente membros da família do VEGF, contribuem para formação de novos vasos (HATANAKA & CURI, 2007). Os macrófagos e os queratinócitos presentes na região em reparo aumentam de forma significativa a expressão gênica de VEGF e seus receptores estão aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação (LAUER et al., 2000). Por volta do quarto dia, com a fibroplasia e a angiogênese, inicia-se a formação do tecido de granulação, o qual é constituído por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares, os quais são sustentados pela matriz extracelular. Esse tecido é edematoso e exsudativo e caracteriza-se pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos (BAUM & ARPEY, 2005; HATANAKA & CURI, 2007).

A matriz extracelular, que inicialmente era formada essencialmente por proteínas derivadas das plaquetas e plasma, tem sua composição modificada. Os fibroblastos passam a depositar grandes quantidades de fibronectina e ácido hialurônico. Posteriormente, há aumento na produção de glicosaminoglicanos, que serão, em parte,

substituídos por proteínas como colágeno, elastina, laminina e proteases responsáveis pelo remodelamento fisiológico (BALBINO et al., 2005).

Durante o amadurecimento fenotípico dos fibroblastos em células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à diferenciação de alguns fibroblastos das margens das feridas em miofibroblastos, células com características funcionais semelhante às células do músculo liso (THEORET, 2005; SEPHEL & WOODWARD, 2006).

Dentre as moléculas, cujos efeitos sobre a reepitelização são os mais estudados destacam-se EGF e TGF- β . Esses fatores de crescimento endógenos, produzidos principalmente por macrófagos e eosinófilos, são considerados importantes reguladores da proliferação dos queratinócitos no sítio da lesão (SANTORO & GAUDINO, 2005). Os queratinócitos tornam-se células hiperproliferativas e migratórias que produzem e secretam componentes da matriz extracelular e polipeptídeos sinalizadores, ao mesmo tempo em que seu citoesqueleto é alterado para a produção de queratina (SANTORO & GAUDINO, 2005). A formação do epitélio ocorre pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração das células da camada basal da epiderme sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente. Nas feridas com perda total da derme, a epitelização se faz apenas das margens da mesma, pois não há anexos cutâneos remanescentes. A ineficiência do processo mitótico destas células nas etapas iniciais é devido à inexistência de substrato adequado na região da ferida, que somente é fornecido quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme (BALBINO et al., 2005). A fase proliferativa tem duração de 12 a 14 dias (HATANAKA & CURI, 2007).

A fase de remodelamento é marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo aumento na deposição e reorganização do colágeno e aumento da resistência da cicatriz, que adquire maior força tênsil. A maioria das células desaparece, observando-se apoptose de fibroblastos e células endoteliais (BALBINO et al., 2005; HATANAKA & CURI, 2007). A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. Inicialmente, a deposição de colágeno é feita de maneira aleatória, tendo como orientação a organização da fibronectina, e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Subsequentemente, essas fibras são digeridas,

ressintetizadas, rearranjadas conforme organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes (BALBINO et al., 2005).

Nesta fase, os eosinófilos aparecem e podem estar relacionados à produção adicional de fatores de crescimento (HATANAKA & CURI, 2007). Além de efetores imunes, os linfócitos são, também, fontes de fatores de crescimento. Eles são atraídos para a região da ferida em igual número aos monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são as células que predominam na região (PARK & BARBUL, 2004).

Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e tecido glandular sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz é pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipovascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares. Esta fase ocorre lentamente, podendo durar de meses a anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (BALBINO et al., 2005; HATANAKA & CURI, 2007).

3.2.3 Classificação das feridas e principais tratamentos disponíveis

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão. Pode ser causada por fatores extrínsecos (como a incisão cirúrgica e as lesões acidentais por corte ou trauma) ou por fatores intrínsecos (como as feridas por infecção, as úlceras crônicas, as causadas por alterações vasculares, defeitos metabólicos ou neoplasias) (CESARETTI, 1998).

Existem diversos sistemas de classificação de feridas. Borges et al. (2001) e Dealey (2001) descreveram as formas de cicatrização de feridas e as denominam: *de primeira intenção*, quando não há perda de tecido e as extremidades da pele ficam justapostas uma à outra; *de segunda intenção*, quando há perda de tecido e as extremidades da pele ficam distantes uma da outra, sendo necessária a formação de tecido de granulação, a contração e a reepitelização da lesão; ou *de terceira intenção*, quando há fatores que retardam a cicatrização de uma lesão inicialmente submetida a um fechamento por primeira intenção. O processo cicatricial por primeira intenção geralmente ocorre dentro do tempo fisiológico esperado e, como consequência, deixa cicatriz mínima; o de segunda intenção envolve extensa produção de tecido de

granulação, requer maior tempo de reparo e produz uma cicatriz significativa e o de terceira intenção, deve ser constantemente monitorado.

Em relação à extensão do defeito as feridas são classificadas como, *superficiais* (quando restritas à epiderme), de *perda parcial* (envolvendo epiderme e parte da derme) e de *perda total* da continuidade do tecido (comprometendo epiderme, derme completa e tela subcutânea, podendo atingir músculos, tendões e ossos). De acordo com o tempo necessário para o reparo tissular, estas, classificam-se em *agudas*, aquelas causadas por cirurgias ou traumas e com reparação em tempo adequado e sem complicações, ou *crônicas*, nas quais o reparo ocorre mais tardiamente, geralmente com complicações associadas e necessidade de intervenções mais sofisticadas do que os métodos convencionais (BRYANT, 1992; MANDELBAUN et al., 2003; BLANES, 2004).

Alguns autores propõem, ainda, uma subclassificação em feridas complexas. Estas seriam as feridas de difícil resolução, agudas ou crônicas, associadas a uma ou mais das situações seguintes: perda cutânea extensa, viabilidade dos tecidos comprometida (concomitante com isquemia e/ou necrose local), infecções agressivas e associação com doenças sistêmicas que causam prejuízo para os processos normais de cicatrização (como diabetes, vasculopatias, vasculites, etc) (HARDING et al., 2002; FERREIRA et al., 2006).

Durante séculos, o tratamento de feridas variou com o objetivo de melhores resultados cicatriciais em um menor tempo. Com relação à conduta, as feridas podem ser submetidas ao tratamento conservador ou cirúrgico. A conduta conservadora é adotada nos pacientes sem condições clínicas que indique tratamento cirúrgico, nas feridas pequenas e superficiais, e naquelas em estágios iniciais do seu desenvolvimento. A terapia conservadora compreende o uso de curativos e coberturas (carvão ativado, hidrocoloide, sulfadiazina de prata, entre outros), de debridantes tópicos (papaína, colagenase, alginato de cálcio, hidrogel), de emolientes e de medidas sócio-educativas (limpeza local da ferida e mudança dos hábitos de vida) (MANDELBAUN et al., 2003; BLANES, 2004).

O tratamento cirúrgico é indicado para as feridas extensas e/ou profundas, com exposição de tecidos nobres, relacionadas à superfícies ósseas de apoio, associadas com graves doenças sistêmicas ou infecções e nos casos de amputações. Os procedimentos cirúrgicos podem ser agrupados em debridamentos cirúrgico e enxertos de pele, isolados

ou associados à terapia por pressão negativa (sistema a vácuo), retalhos pediculados ou retalhos microcirúrgicos, e reimplantes (HARDING et al., 2002; FERREIRA et al., 2006; COLTRO et al., 2011).

Atualmente, o tratamento de feridas representa um tema de relevante preocupação. Urge a necessidade de qualificação, ampliando a abordagem para o conhecimento da anatomia da pele, para fatores responsáveis pela perda de sua integridade, para a fisiologia da cicatrização e para a fundamentação teórica e prática dos procedimentos associados ao déficit tegumentar. A literatura proporciona uma variedade de relatos com diferenças entre os graus de sucesso e falência de diferentes procedimentos, porém ainda não existe um protocolo padrão que defina a melhor maneira de acelerar o processo cicatricial de feridas cutâneas.

3.3 Células-tronco

A célula-tronco (CT) é definida como um tipo de célula indiferenciada, capaz de se multiplicar mantendo-se indiferenciada por longos períodos, tanto *in vitro* como *in vivo*, mas que diante de estímulos específicos pode diferenciar-se em células maduras e funcionais. Além disso, tem a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo que origina células precursoras com capacidade de diferenciação restrita a um determinado tecido, produz células indiferenciadas que repõe a população de células-tronco (ZAGO & COVAS, 2006) (FIGURA 4).

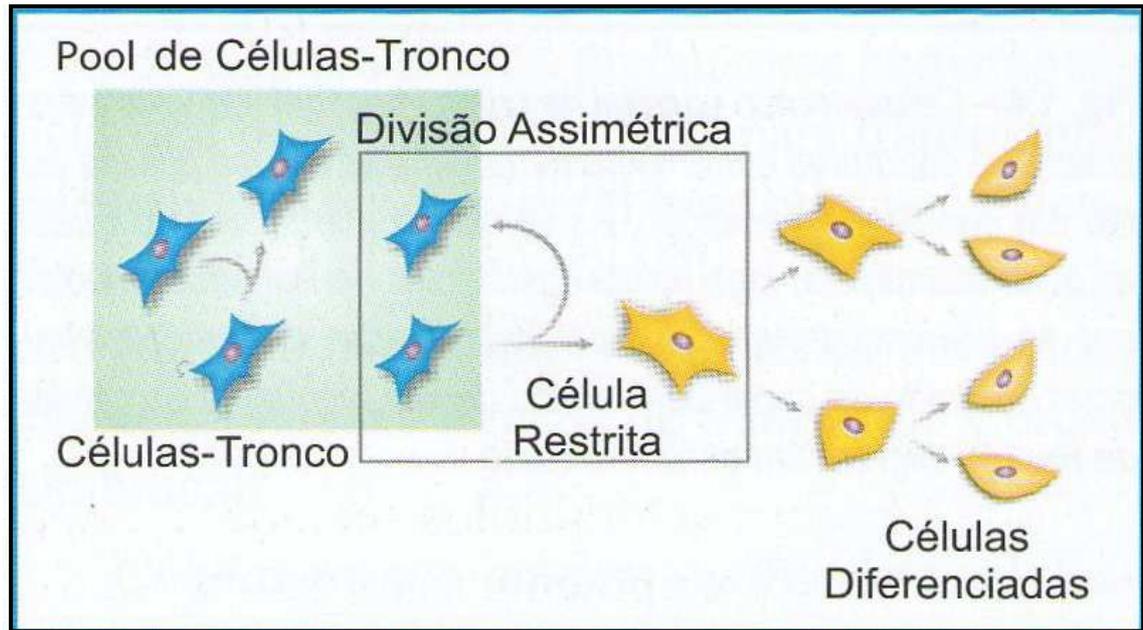


Figura 4 - Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco (Fonte: ZAGO & COVAS, 2006).

Com relação à potencialidade, as CT podem ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. Quanto à origem podem ainda ser classificadas como embrionárias ou adultas (OKAMOTO & SANTOS, 2004; CIRNE-LIMA, 2007; MORSCZECK et al., 2008).

As células-tronco derivadas de estágios iniciais de embriões e que possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares que compõem um organismo adulto, além dos anexos embrionários, são denominadas de *totipotentes*. Quando derivadas de um estágio embrionário mais avançado, o blastocisto, estas possuem a capacidade de originar células oriundas das três camadas germinativas embrionárias – mesoderme, ectoderme e endoderme – e são classificadas como *pluripotentes*. As células pluripotentes podem dar origem a qualquer tipo celular que compõe um indivíduo adulto; porém, nunca a um novo indivíduo, pois não possuem a capacidade de gerar os anexos embrionários (SLACK, 2000; CIRNE-LIMA, 2007; FONTANA, 2009). As células-tronco multipotentes estão presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células são denominadas de acordo com o órgão do qual derivam (GAGE, 2000) e têm sido alvo de estudo e trabalhos experimentais devido a sua plasticidade, a qual permite a diferenciação em

tecidos como fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrointestinal, coração e músculo esquelético, dentre outros (RIZZO et al., 2005; NAKAGE & SANTANA, 2006; ZAGO & COVAS, 2006; SASAKI, et al., 2008).

Até o presente momento, as células-tronco adultas, que podem ser obtidas de diferentes tecidos do indivíduo adulto, melhor estudadas, são as células-tronco mesenquimais (CTMs) (OKAMOTO & SANTOS, 2004; NAKAGE & SANTANA, 2006). Diversos órgãos e tecidos têm o seu compartimento de células-tronco mesenquimais, podendo ser isoladas da medula óssea, do tecido adiposo, rim, fígado, baço, pulmão, pâncreas, tendões, membrana sinovial, fluido amniótico, placenta, cordão umbilical e poupa dentária (NARDI & MEIRELLES, 2006; SEONG et al., 2010) (FIGURA 5).

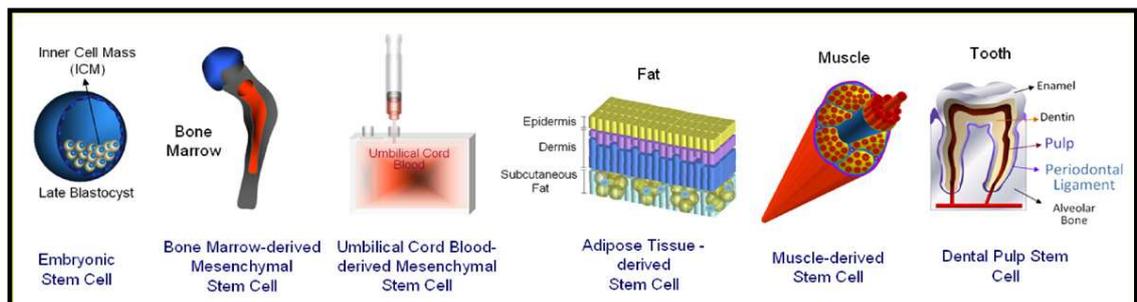


Figura 5 - Desenho ilustrativo dos diferentes sítios para obtenção de células-tronco (Fonte: SEONG et al., 2010).

Estas células foram descritas pela primeira vez por Friedenstein et al., em 1966, que observaram a presença de uma população celular peculiar em células mononucleares da medula óssea de camundongos. Essa população era representada por células com formato fibroblástico e apresentava a propriedade de formar colônias *in vitro*, sendo dessa forma denominadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F) (NARDI & MEIRELLES, 2006; ZAGO & COVAS, 2006; BYDLOWSKI et al., 2009; HWANG & CHOIN, 2010).

De acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISSCR), são características mínimas para a definição de CTMs: a) a propriedade de aderir ao plástico quando mantidas em frascos de cultura; b) expressão

dos marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e a expressão menor que 2% ou ausência de expressão dos marcadores de superfície celular CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA classe II e c) a capacidade, de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos após indução específica *in vitro* (OKAMOTO & SANTOS, 2004; DOMINICI et al., 2006; ZAGO & COVAS, 2006; CHEN et al., 2008).

Apesar de não serem imortais, as CTMs têm capacidade de se expandir até 50 vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e plasticidade. Entretanto, estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obter quantidades de CTMs com ausência de outros tipos celulares. (BYDLOWSKI et al., 2009).

A fração estromal do tecido adiposo é constituída de pré-adipócitos, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e também por células-tronco mesenquimais, que quando apropriadamente estimuladas, dão origem a osteócitos, condrócitos, e adipócitos. Apesar de ser a medula óssea a fonte rotineiramente usada, esta possui limitações como a quantidade de células colhidas do paciente, além da ocorrência de dor e morbidade decorrentes do procedimento de coleta, enquanto que, as CTMs derivadas do tecido adiposo são mais facilmente obtidas (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; YARAK & OKAMOTO, 2010).

Nos últimos anos, a expansão do conhecimento sobre a biologia das CTMs abriu perspectivas para sua utilização na medicina regenerativa e/ou reconstrutiva. Além do potencial de diferenciação, o potencial regenerativo das CTMs deve-se à secreção de um largo espectro de moléculas bioativas, como fatores de crescimento, que podem estruturar o microambiente de regiões injuriadas (CAPLAN, 2007). Outra característica importante para o processo de regeneração tecidual é a propriedade imunoreguladora apresentadas por estas células, as quais são capazes de modular a função imunológica de várias populações celulares tais como células apresentadoras de antígenos, células T, células B e células NK (RAMUSSON, 2006). Ademais, por não expressarem moléculas coestimulatórias, as CTMs apresentam limitada imunogenicidade (UCELLI & PISTOIA, 2006).

Dessa forma, características como o fácil isolamento, multipotencialidade, potencial regenerativo e imunomodulador favorecem o uso das CTMs para terapia celular de várias patologias o que é especialmente interessante para a medicina

regenerativa e a engenharia de tecidos (ZAGO & COVAS, 2006; KOLF et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009).

3.4 Plasma rico em plaquetas

As plaquetas são células anucleadas derivadas de fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos formados na medula óssea. Possuem alfa-grânulos contendo fatores de crescimento que desempenham papel importante na homeostase de locais lesados, iniciando e regulando alguns estágios da cicatrização tecidual (THORWARTH et al., 2006; FARRAG et al., 2007; FOSTER et al., 2009; PORCELLINI, 2009).

Os fatores de crescimento são peptídeos sinalizadores que regulam o metabolismo celular por meio da interação com receptores de superfície celular, das vias de sinalização intracelular e, finalmente, do aumento da transcrição de fatores de produção de proteínas que resultam na regulação de diversos eventos celulares essenciais como mitogênese, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz extracelular (ANTONIADES & WILLIAMS, 1983; GIANNOBILE, 1996; LIND, 1996; DAHLGREN et al., 2001; SCHLIEPHAKE, 2002). Entre estes fatores estão as principais isoformas do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) (MARX, 2001; THORWARTH et al., 2006; PORCELLINI, 2009).

O plasma rico em plaquetas (PRP) derivado de sangue autólogo é definido como um volume de plasma com uma concentração plaquetária acima dos níveis fisiológicos (MARX, 2001; GANDHI et al., 2006). É uma fonte autógena e de baixo custo de fatores de crescimento, obtido por separação e concentração de plaquetas (ANITUA, 1999; LIEBERMAN et al., 2002). Contém ainda, aminoácidos, sais, vitaminas, lipídios (KIERSZENBAUM, 2004) e algumas moléculas de adesão celular como fibrina, fibronectina e vitronectina em sua composição (MARX, 2001; FOSTER et al., 2009). Essas características tornam o PRP um hemoderivado capaz de atuar na proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia e angiogênese (MARX, 2001; THORWARTH et al., 2006) e assim, otimizar o processo de reparo tecidual (CROVETTI et al., 2004; FOSTER et al., 2009; BOSCH et al., 2011). Este produto tem sido utilizado em várias

áreas médicas, como cirurgias maxilofaciais, ortopédicas, medicina esportiva, reconstrução óssea, engenharia tecidual, cosmética e implantes dentários (ANITUA, 2006; BOSCH et al., 2011).

Inicialmente o PRP era obtido através de máquinas de plasmaférese e utilizava-se a trombina bovina para sua ativação. Porém, o interesse em facilitar sua obtenção e diminuir os custos fez com que surgissem equipamentos automatizados e diversas metodologias, inclusive com substituição da trombina bovina por trombina autóloga (KEYY & JACOBSON 2004). As máquinas automatizadas com seus “kits” tornaram simples a obtenção do PRP, porém os custos ainda são elevados (EFEOGLU et al., 2004). Recentemente alguns protocolos simplificados têm sido propostos para a produção de pequenas quantidades de PRP com o uso de centrífugas de bancada (ANITUA, 1999; MARX, 2004). Tais protocolos representam uma evolução da técnica inicialmente apresentada, em função do baixo custo de produção e da possibilidade de execução em ambiente ambulatorial ou de pesquisa (CARMONA et al., 2009).

Existem diversos métodos de obtenção de PRP (EVERTS et al., 2006), cada um com sua peculiaridade em relação à capacidade de concentração das plaquetas e liberação dos seus fatores de crescimento. Basicamente, o processo de centrifugação para o preparo do PRP deve ser estéril, capaz de separar as plaquetas das células vermelhas do sangue e promover seu sequestro sem nenhum tipo de dano ou lise que possa ativar a secreção antecipada dos FCs (MARX, 2001). Além disso, a quantidade de plaquetas obtida é estritamente dependente do tipo de protocolo utilizado (WEIBRICH et al., 2002).

De acordo com Marx (2001), para que se possa verdadeiramente concentrar plaquetas do sangue autólogo, o protocolo adotado deve utilizar uma técnica de dupla centrifugação. A primeira (chamada também de centrifugação pesada) separará as células vermelhas do plasma, o qual contém plaquetas, leucócitos e fatores da coagulação. A segunda centrifugação (chamada de centrifugação leve) refina a amostra, separando as plaquetas do plasma, juntamente com leucócitos e uma pequena quantidade de células vermelhas. Essa centrifugação produz o PRP, e o separa do plasma pobre em plaquetas (PPP). Protocolos de única centrifugação não produzem PRP, mas sim uma mistura de PPP e PRP que tem revelado baixas concentrações plaquetárias, fato que foi igualmente verificado nas pesquisas de Arora et al. (2009) e Nagata et al. (2010).

Não só o número de centrifugações é importante no preparo do PRP, mas também a força de rotação selecionada. Um aumento na força de rotação pode garantir maior concentração de plaquetas. Entretanto, é preciso considerar que as forças mecânicas demasiadamente elevadas para o preparo do PRP podem, também, ativar precocemente as plaquetas, levando à liberação dos fatores de crescimento e conseqüentemente à sua perda no sobrenadante durante o processo de centrifugação, comprometendo a eficiência terapêutica do PRP (MESSORA et al., 2009). O ' Neill et al. (2001) postulam que o PRP seja autólogo devido ao risco de rejeição e impossibilidade de secreção dos FCs.

Dentre os diversos tipos de anticoagulantes utilizados na coleta sanguínea para obtenção do PRP o citrato de sódio parece ser o mais indicado por preservar a integridade da membrana das plaquetas (MARX, 2000a; TRINDADE-SUEDAM et al., 2007). Além disso, é possível reverter seu efeito anticoagulante com a adição de derivados de cálcio à amostra, viabilizando o seu uso em transfusões sanguíneas e de plasma, além das demais aplicações clínicas, como os géis de PRP (KERR, 2003).

A ativação das plaquetas pode ser realizada por agentes fisiológicos (ex: trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina) e farmacológicos (ex: o ionóforo de cálcio, o cloreto de cálcio e os análogos de endoperóxido cíclico) (BLOCKMANS et al., 1995; CARMONA et al., 2007). Acredita-se que todos esses agonistas desencadeiam seus efeitos por meio da interação com receptores localizados na membrana plasmática das plaquetas (BLOCKMANS et al., 1995). Entretanto, é importante ressaltar que a ativação (FIGURA 6) das plaquetas deve ser realizada próximo ao momento da aplicação, de forma a assegurar uma adequada concentração dos fatores de crescimento (MAIA, 2008).

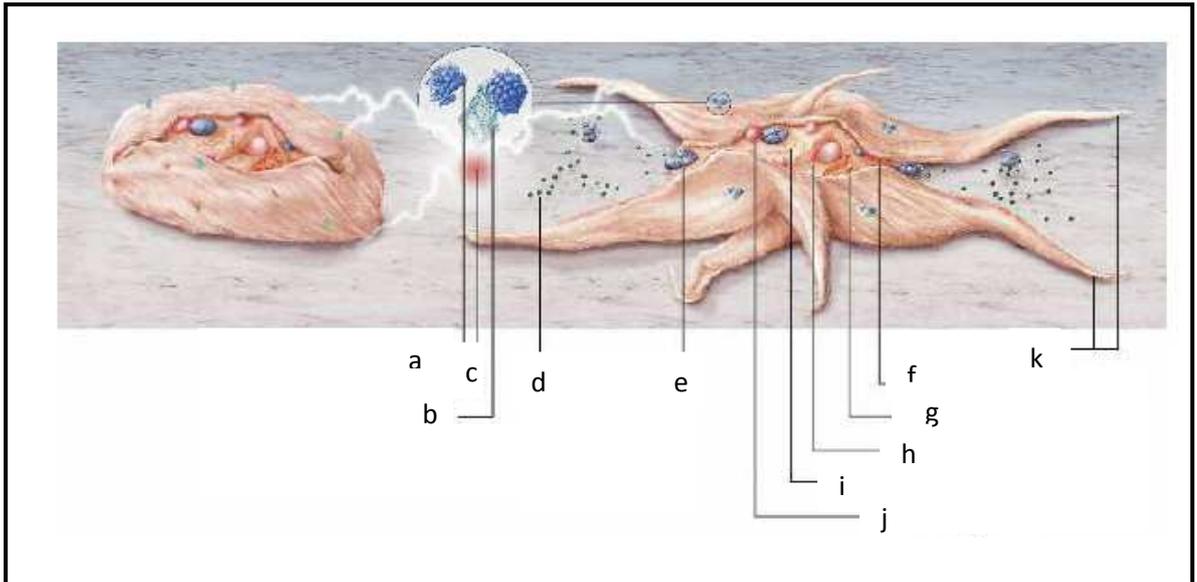


Figura 6: Figura esquemática das plaquetas em repouso e quando ativadas. Onde: (a) trombina; (b) receptor; (c) ativação da trombina; (d) fatores de crescimento; (e) grânulos- α ; (f) sistema tubular aberto; (g) mitocôndria; (h e i) citoesqueleto e membrana; (j) grânulo denso e (k) pseudópodes. FONTE: EVERTS et al., 2006 (modificada por GARCEZ, TNA. 2012).

O gel de PRP é uma variação na formulação do concentrado plaquetário obtido através da adição de trombina e gliconato de cálcio ao PRP. Estes ativam o sistema de coagulação, resultando na gelificação do PRP, o que facilita sua aplicação em diversas cirurgias (LINDERMAN et al., 2001; EFGOGLU et al., 2004).

A literatura pertinente demonstra uma relação linear entre o número de plaquetas e a produção de fatores de crescimento (MARX, 2001; EPPLEY et al., 2004). Comparações realizadas por testes de ELISA entre amostras de sangue basal e PRP demonstraram que este último apresentou aumento de 3,6 vezes na concentração do TGF- β 1; 5,1 vezes na concentração do PDGF e 6 vezes na concentração do VEGF (MARX, 2004; EPPLEY et al., 2004). Entretanto, Mazzuco et al. (2009) ressaltaram que pode haver diferenças nesta relação devido à variabilidade individual na produção e estocagem desses fatores. Outro fator que pode também ocasionar esta variação é a técnica de ativação do PRP a ser utilizada antes do procedimento cirúrgico (MAZZUCCO et al, 2009; WEIBRICH et al., 2002).

Para a maioria dos autores a concentração celular ideal de plaquetas no PRP deve ser superior a 1.000.000/ μ l (MARX, 2001; GONSHOR, 2002; EPPLEY et al., 2004; KEVY & JACOBSON, 2004); o que corresponde a um incremento ao redor de 4 a 5 vezes à encontrada no sangue humano sem nenhuma preparação. No entanto, Anitua et

al. (2004) postularam que concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L já seriam suficientes para alcançar algum efeito terapêutico.

Apesar do grande número de ensaios clínicos com a utilização deste biomaterial, até o momento não existe um modelo experimental definido e um protocolo estabelecido para sua produção, ficando, em geral, a critério de cada pesquisador estabelecer uma metodologia própria que possa ser exequível diante das condições de trabalho existentes.

3.7 Células-tronco e plasma rico em plaquetas como adjuvantes da cicatrização cutânea

3.7.1 Células-tronco mesenquimais

As CTMs secretam uma grande variedade de citocinas pró e antiinflamatórias e FCs, que contribuem para a modulação da resposta inflamatória, o restabelecimento do suprimento vascular e a reparação adequada do tecido, acarretando a homeostasia tissular e imunológica. Podem ainda, induzir as demais células presentes no nicho tecidual a secretarem outros fatores solúveis que estimulam a diferenciação, favorecendo o processo de reparo (MONTEIRO et al., 2010). No caso de terapias celulares com células-tronco, além do efeito estimulatório de regeneração, ensaios clínicos relatam diferenciação das mesmas em células do tecido residente (SILVA et al., 2009).

A infusão única de CTMs alogênicas derivadas da MO em modelo de feridas cutâneas em ratos, vinte e quatro horas após a excisão, ou múltiplas infusões por quatro dias subsequentes à excisão, não só reduziu o tempo de cicatrização como também aumentou a elasticidade do tecido associada ao aumento da deposição de colágeno na área da lesão. Além disso, nesse modelo a infusão de CTMs alogênicas foi mais eficiente em promover a reepitelização das feridas do que a infusão de fibroblastos segundo Mcfarlin et al. (2006).

No trabalho realizado por Goldenberg et al. (2006) foi avaliada a dinâmica da cicatrização de úlceras provocadas cirurgicamente em camundongos com CTMs

aplicadas topicamente. Os autores observaram uma diminuição da quantidade de CTMs na superfície da lesão a partir do 3º dia, devido à possível diferenciação das mesmas durante o processo de cicatrização.

Também com o intuito de avaliar o potencial terapêutico tópico das CTMs em úlceras crônicas isquêmicas e não isquêmicas, Volk et al., 2007, demonstraram que as CTMs foram mais efetivas na promoção da cicatrização das feridas do que células mononucleares obtidas da medula óssea. As CTMs não só aceleraram a formação de tecido de granulação, como também aumentaram a deposição de colágeno auxiliando a reepitelização através de mecanismos diretos como a diferenciação em miofibroblastos e indiretos com a produção de fatores como FGF, VEGF e PDGF.

Em estudo clínico Falanga et al. (2007a) comprovaram que CTMs contribuem significativamente para a cicatrização de úlceras crônicas de membros inferiores em pés de pacientes que apresentavam insuficiência venosa crônica e neuropatia diabética ou úlceras agudas após a remoção cirúrgica de alguns tipos de cânceres de pele. Em ambos os casos os pacientes foram tratados com aplicação tópica de CTMs autólogas entre as 2ª e 4ª passagens. Os autores demonstraram a formação de novas fibras elásticas, cerca de oito dias após o início do tratamento. Os pacientes do grupo portador de úlceras crônicas apresentavam um histórico prévio de insucesso com tratamentos de rotina e todos os indivíduos tinham úlceras persistentes por mais de um ano. Nesse grupo, o decréscimo do tamanho das úlceras e/ou a cicatrização completa puderam ser observados em torno de 16-20 semanas. Destacou-se o caso de uma paciente portadora de artrite reumatóide com úlcera venosa existente há mais de 10 anos, cuja ferida cicatrizou completamente nesse período.

Javazon et al. (2007) demonstraram que a aplicação tópica de CTMs da MO em úlceras de camundongos diabéticos db/db, diferentemente do observado nos grupos que receberam células mononucleares da MO e PBS, aumentou a reepitelização, a formação de tecido de granulação e a neovascularização através de mecanismos indiretos (efeito parácrino).

Neste mesmo contexto, com o objetivo de definir se as CTMs persistem no local da lesão após o tratamento e se teriam capacidade de originar novas estruturas, Falanga et al. (2007b) utilizaram um modelo animal de ferida cirúrgica em camundongos diabéticos db/db e CTMs que expressavam GFP. As CTMs foram capazes de penetrar na ferida por volta do 5º dia, porém, poucas células GFP+ foram encontradas na lesão

cicatrizada e as mesmas pareceram não ter se diferenciado em queratinócitos. Vale ressaltar o aparecimento de estruturas endoteliais, como vasos sanguíneos marcados positivamente por GFP, evidenciando a possível diferenciação das CTMs nessas estruturas e seu importante papel para o processo de neoangiogênese.

A injeção de CTMs GFP+ derivadas da MO de camundongos nas bordas de lesões cutâneas experimentais foi capaz de acelerar o processo de proliferação celular, angiogênese e reepitelização tanto em camundongos normais, quanto em camundongos diabéticos db/db, quando comparada à aplicação de fibroblastos dermais alogênicos neonatais ou de veículo controle, segundo estudos de Wu e colaboradores (2007). Estes pesquisadores demonstraram ainda a possível diferenciação das CTMs em queratinócitos na derme do tecido cicatrizado. Além disso, em um período mais tardio, foram observadas estruturas glandulares GFP+. Constataram ainda um aumento significativo da expressão de fatores de crescimento vasculares e endoteliais, evidenciando o potencial pró-angiogênico das CTMs.

Badillo et al. (2007) trataram úlceras de camundongo diabético (db/db) com CTMs isoladas a partir de fígado fetal e observaram ao 7º dia uma diminuição significativa do espaçamento entre as bordas da úlcera, além do aumento da formação de tecido de granulação e da presença de células CD31+ no local. Foi observado, também, aumento da expressão de EGF, TGF- β 1 e VEGF e da contractilidade do tecido neoformado, característico de um processo de deposição de colágeno eficiente no grupo de animais tratado com CTMs

Em 2008, Kwon et al. trataram úlceras em ratos diabéticos com CTMs isoladas de MO. Os autores observaram uma melhor reepitelização nos animais tratados associada ao aumento dos níveis de colágeno do tipo I e V no leito da ferida, bem como o aumento da expressão de fatores solúveis como TGF- β , EGF, VEGF e PDGF.

Chen et al. (2008) demonstraram, que o efeito parácrino das CTMs derivadas da MO de camundongos é capaz de aumentar a proliferação de macrófagos, células progenitoras endoteliais e a secreção de diversos fatores de crescimento importantes para o processo de cicatrização em modelo de ferida excisional em camundongos. A aplicação tópica do sobrenadante concentrado das culturas de CTMs nas lesões foi mais eficiente que a aplicação tópica do sobrenadante das culturas de fibroblastos dermais aumentando não só o número de macrófagos e células progenitoras endoteliais no local da lesão, mas também a quantidade de fatores de crescimento tais como VEGF e EGF.

Em estudo sobre a atuação do colágeno como fator regenerativo, as CTM de tecido adiposo foram utilizadas para o preenchimento de ríndes faciais. Concluiu-se que quando associadas ao ácido hialurônico são capazes de preencher sulcos profundos, com melhora progressiva do tônus da pele e diminuição das linhas de expressão, provendo a base para estratégias de regeneração e reparo de tecido mole (SILVA et al., 2009).

3.7.2 Plasma rico em plaquetas

A aplicação do PRP no local de uma lesão amplia a influência dos fatores de crescimento principalmente nos estágios iniciais do processo de reparação. Resumidamente, os fatores provenientes dos α -grânulos plaquetários induzem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização, deposição de matriz extracelular e de colágeno (EVERTS et al., 2006). Existem relatos do uso do PRP em cirurgias odontológicas, ortopédicas, oftálmicas, neurológicas, laparoscópicas, reconstrutivas, entre outras (ANITUA, 2006).

Entre os diversos fatores de crescimento, secretados ativamente pelas plaquetas e que atuam na cicatrização, encontram-se os três isômeros do fator de crescimento plaquetário (PDGF) – PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ e PDGF $\alpha\beta$ – dois fatores de crescimento transformadores β (TGF β) – TGF β 1 e TGF β 2 – o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento epitelial (EGF) (HENDERSON et al., 2003; CROVETTI et al., 2004; MARX, 2004; MAZZUCCO et al., 2004; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009).

O PDGF é o primeiro fator de crescimento a agir no processo de reparo. Seu efeito depende da presença de outros fatores de crescimento e sua principal função é estimular a mitose e a angiogênese, aumentando assim o recrutamento de células regenerativas (células-tronco mesenquimais, células osteoprogenitoras e fibroblastos). Outra função desempenhada por esse fator de crescimento é a ativação macrofágica para estimulação de produção de mais fatores de crescimento (PIERCE et al., 1991).

O TGF quando liberado pelas plaquetas ou secretado pelos macrófagos, exerce seus efeitos nos fibroblastos, células-tronco da medula óssea, células endoteliais e pré osteoblastos (GIBBLE & NESS, 1990; MARX et al., 1998; GRAGEDA, 2004).

Uma questão importante é o fato de o TGF, quando em concentrações excessivas, possuir efeitos adversos à regeneração tecidual. Assim, o TGF é capaz de antagonizar os

efeitos mitógenos de outros fatores de crescimento, como por exemplo, o PDGF, possuindo dessa forma, ação antiproliferativa quando em concentrações elevadas (MUSTOE, et al., 1987; PIERCE et al., 1991).

O VEGF tem como principal função aumentar a permeabilidade do microambiente promovendo proliferação, migração celular e angiogênese (SUZUMA et al., 1998).

Ainda, de acordo com Werner & Grose (2003), os fatores TGF β e EGF atuam sinergicamente, melhorando o acesso das células inflamatórias para a área da lesão, assim como na angiogênese, fibroplasia e reepitelização.

Liu et al. (2006) demonstraram aumento da proliferação de fibroblastos e da produção de colágeno proporcional ao aumento da concentração plaquetária no PRP.

Segundo Marx (2001) a atividade do PRP se dá no início da cicatrização e hemostasia. Após a ativação plaquetária ocorre a liberação dos fatores de crescimento. Estima-se que em 10 minutos ocorra a secreção de 70% e em uma hora, de 100% desses fatores. Após, eles sintetizariam quantidades adicionais de FC e em oito dias perderiam sua ação.

Sobre a sua aplicabilidade, não há consenso sobre a melhor apresentação (forma líquida ou gelificada). DeRossi et al. (2009) utilizaram gel de PRP no tratamento de feridas em cavalos submetidos a incisões cirúrgicas experimentais. Segundo esses autores, as feridas tratadas com PRP apresentaram diferenciação epitelial mais rápida e organização do colágeno da derme acelerada, quando comparado ao grupo controle (sem tratamento).

Balbo e sua equipe (2010) apresentaram os resultados de cinco anos de observações sobre o uso do gel de PRP em pacientes com perda tecidual resultante de trauma ou amputações. A recuperação referente aos tecidos moles atingiu taxas de 80-100% de sucesso. Nos pacientes que apresentavam perda óssea além do defeito em tecidos moles houve recuperação de 80% da morfologia original.

A pesquisa de Cervelli et al. (2009) combinou a terapia com PRP a enxertos de tecido adiposo em defeitos por úlceras crônicas em membros pélvicos com resultados efetivos e melhor qualidade de integração dos enxertos.

Em 2010, Vendramin et al. realizaram estudos histológicos em enxertos de pele com PRP na forma líquida, com gel de PRP e sem PRP em coelhos, avaliando a integração dos enxertos, intensidade de colagenização, resposta inflamatória e a

quantificação de fibroblastos e macrófagos. Houve aumento de 31,6% de fibroblastos, 57% de macrófagos, maior produção de colágeno e resposta inflamatória com a utilização do PRP. Os enxertos que utilizaram PRP na forma líquida demonstraram melhores resultados que os demais grupos, concluindo que o PRP melhora a cicatrização dos enxertos cutâneos, e seu uso na forma líquida, injetado sobre a ferida é mais fácil de ser produzido e, neste estudo, obteve melhores resultados quando comparados à forma gelificada.

3.7.3 Associação terapêutica CTM e PRP na cicatrização cutânea

Estratégias regenerativas baseadas no uso de CTM são uma grande promessa para procedimentos médicos. Além do uso combinado a enxerto de tecidos, as CTM podem ser associadas a fatores de crescimento, e/ou a arcabouços (sintéticos ou biológicos), em um processo chamado de bioengenharia tecidual (PORCELLINI, 2009).

Estudos recentes têm sugerido o potencial da utilização dos produtos biológicos do PRP (líquido ou a sua formulação em gel) na indução e migração de células-tronco para o tecido danificado, estimulando sua proliferação e, eventualmente, obtendo o reparo tecidual (MOROZ et al., 2009; SEONG et al., 2010). Oliva e colaboradores (2006) verificaram que a utilização do plasma rico em plaquetas, por ser uma fonte de fatores de crescimento combinados, foi efetiva na expansão da atividade proliferativa das células-tronco em cultura preservando a sua capacidade de diferenciação.

Em lesões cutâneas, parece haver indícios de que a ação conjunta dos fatores de crescimento resulta na sinalização para as células mesenquimais e epiteliais migrarem para o local lesado (DUSSE et al., 2008). Por outro lado, aplicações tópicas de fatores de crescimento isoladamente, incluindo fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto (FCF), para o tratamento de feridas complexas ou crônicas têm produzido resultados variados (MAIA & SOUZA, 2009; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 37 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da ordem *Lagomorfa*, da raça Nova Zelândia, sendo um doador macho e o restante fêmeas, com idade variando entre quatro e cinco meses e massa corporal entre dois e três quilogramas, provenientes de cabanhas cadastradas à Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA).

Quando da entrada na UEA, os animais foram pesados, identificados e medicados com dose única de ivermectina 1%¹ pela via subcutânea (SC), na dosagem de 0,3 mg.kg⁻¹. Após, foram alojados em gaiolas individuais sob temperatura e umidade controladas (18°C e 68%, respectivamente) e alimentação exclusivamente à base de ração comercial peletizada específica para a espécie e água *ad libitum*. Todos passaram por um período de adaptação, que variou de três a cinco dias, antes do procedimento cirúrgico.

Os animais foram mantidos e manipulados segundo normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Este projeto foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde está cadastrado sob o protocolo número 11-0359.

¹ Ivermectina Cherry, Laboratórios Cherry do Brasil LTDA, Bagé – RS, Brasil.

4.2 Coleta e processamento do tecido adiposo e obtenção das células-tronco mesenquimais

4.2.1 Lipectomia

Para a coleta do tecido adiposo foi utilizado um único doador da mesma espécie, macho, de três meses de idade, pesando 2,9 kg. O animal foi pré-medocado com cloridrato de tramadol² (5mg.kg⁻¹), midazolam³ (1mg.kg⁻¹) e quetamina⁴ (20mg.kg⁻¹) por via intramuscular (IM); induzido e mantido em plano anestésico com isoflurano⁵ e oxigênio 100%. Após cuidados específicos de assepsia foi realizada uma incisão cirúrgica longitudinal de cinco centímetros (5cm) na linha dorso medial em região interescapular e cervical a aproximadamente 5cm do occipital, na direção crânio-caudal., acima do local de maior acúmulo de tecido adiposo, para que fosse realizada lipectomia em bloco (FIGURA 7). Extraíu-se uma porção de tecido de aproximadamente 15 gramas.

A síntese foi realizada por redução do espaço morto com poliglactina 910⁶ de diâmetro 4-0, em padrão contínuo simples e dermorrafia realizada com fio monáilon⁷ de diâmetro 3-0, em padrão intradérmico. Como protocolo pós-operatório instituiu-se cloridrato de tramadol (3mg.kg⁻¹) SC, BID, cetoprofeno⁸ (2mg.kg⁻¹) SC, SID durante 3 dias e enrofloxacina⁹ (10mg.kg⁻¹) SC, BID durante 7 dias. As suturas de pele foram removidas dez dias após o procedimento cirúrgico.

O fragmento de tecido adiposo foi imediatamente depositado em um tubo estéril com tampa, de 50 mL contendo Soro Fetal Bovino (SFB)¹⁰ com solução de penicilina e

² Cloridrato de Tramadol, União Química, São Paulo – SP, Brasil.

³ Dormonid, Roche, São Paulo – SP, Brasil.

⁴ Cetamin 10%, Syntec do Brasil, Cotia – SP, Brasil.

⁵ Isoforine, Cristália, Itapira – SP, Brasil.

⁶ Poliglactina 910, Shalon, Goiânia – GO, Brasil.

⁷ Nylon, Shalon, Goiânia – GO, Brasil.

⁸ Ketofen 1%, Merial, Campinas – SP, Brasil.

⁹ Zelotril 10%, Agener União, Brasília – DF, Brasil.

¹⁰ Soro Fetal Bovino, Invitrogen – CA, USA.

estreptomicina¹¹ (PS) e encaminhado para o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA.



Figura 7 – Coleta do tecido adiposo em coelho Nova Zelândia para obtenção das CTMs. (A) Incisão de pele até exposição do tecido subcutâneo na região cervical; (B) exposição da fração de tecido a ser coleta. FONTE: GARCEZ & MÖRSCHBACHER, 2011.

4.2.2 Obtenção da cultura celular

No interior da capela de fluxo laminar o tecido foi transferido para uma placa de Petri e, com o auxílio de tesoura de Metzenbaum, seccionado. Os fragmentos foram lavados com PBS e transferidos para tubos Falcon de 50 mL acrescidos de solução de colagenase tipo I ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em DMEM 9mM HEPES) por um período de 1 hora a 37°C para promover a digestão do tecido. Após a completa digestão, a enzima colagenase foi inativada pela adição de meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM)¹² suplementado com 10% de SFB.

A suspensão de células obtida foi centrifugada por 5 min à 2000rpm, sendo desprezado o sobrenadante (fração adiposa) e o pellet formado (fração estromal), ressuspenso em meio DMEM suplementado.

Realizado o isolamento, as células foram cultivadas em DMEM contendo baixa concentração de glicose suplementado com 15mM HEPES 9mM, 15% de SFB e solução antibiótica de $100\text{units}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicilina e $100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina, a

¹¹ PS, Gibco – NM, USA.

¹² Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen – CA, USA.

37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Após transcorridas 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi aspirado e meio fresco foi adicionado. Quando a cultura celular apresentou confluência de 80%, as células aderentes foram removidas com solução de 0,05% tripsina-EDTA¹³ para posterior subcultivo em DMEM.

4.2.3 Congelamento/Descongelamento das células

As células-tronco mesenquimais em segunda passagem foram congeladas em SFB suplementado com 5% de dimetilsulfóxido e armazenadas em freezer -80°C. Cerca de uma semana antes do transplante, as células foram descongeladas e expandidas.

Células entre a terceira e a quarta passagem, foram dissociadas com solução de 0,05% tripsina-EDTA e ressuspensas em PBS na concentração 7×10^5 células em um volume final de 1 mL.

4.2.4 Caracterização celular

As CTMs foram caracterizadas por morfologia e diferenciações *in vitro*. Para tanto, foram realizados ensaios para a indução de diferenciação em linhagens condrogênicas e adipogênicas. Para a diferenciação condrogênica, foi utilizado meio DMEM 15 mm suplementado com 9 mm HEPES, 6,25 µg/mL de insulina, 10 ng/mL de TGF beta1 e 50 mm de ácido ascórbico 2-fosfato¹⁴ por 21 dias. A detecção da diferenciação foi realizada por coloração com Alcian Blue que possui afinidade pelos grupos aniônicos presentes nos glicosaminoglicanos da matriz extracelular. A diferenciação adipogênica ocorreu pelo cultivo das CTMs em DMEM 9 mm HEPES, 10^{-8} mol/L de dexametasona¹⁵, 5 µg/mL de insulina e 50µg/mL de indometacina¹⁶ e foi

¹³ Tripsina, Gibco – NM, USA.

¹⁴ Ácido Ascórbico 2-Fosfato, Sigma – MO, USA.

¹⁵ Dexametasona, Sigma – MO, USA.

¹⁶ Indometacina, Sigma – MO, USA.

detectada 21 dias após o início do ensaio de diferenciação por coloração com Oil Red¹⁷, a qual tem a propriedade de corar os vacúolos de gordura.

4.3 Procedimento Anestésico

Inicialmente, os coelhos foram escolhidos aleatoriamente pesados e pré-medicados com a associação de cloridrato de tramadol (2mg.kg^{-1}), midazolam ($0,2\text{mg.kg}^{-1}$) e quetamina (20mg.kg^{-1}) por via intramuscular (IM).

Com os animais sob sedação, realizou-se ampla tricotomia na região da veia jugular cervical para coleta de sangue para preparo do PRP e na região dorsal entre as escápulas até o final das costelas para preparo do campo cirúrgico e indução das lesões experimentais.

A anestesia foi induzida e mantida com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100% administrados através de máscara. Durante o transoperatório os animais foram acompanhados com auxílio de monitor multiparamétrico, para registro da frequência cardíaca, frequência respiratória, capnometria e oximetria.

4.4 Escolha e padronização dos protocolos de plasma rico em plaquetas

Devido à extensa oferta de protocolos e metodologias de obtenção de PRP optou-se por realizar o estudo da viabilidade e utilização do PRP em duas etapas.

Em um primeiro momento, uma revisão bibliográfica foi conduzida a fim de selecionar os protocolos que mais se adequassem aos objetivos deste estudo. Assim, três protocolos foram escolhidos e testados a fim de comparar: a capacidade de incremento (concentração plaquetária), o tempo necessário ao preparo, a praticidade de reprodução, a necessidade de equipamentos para a produção do material e à sua reprodutibilidade

¹⁷ Oil Red, Sigma – MO, USA.

em nosso laboratório. Os resultados obtidos após estas análises orientaram a escolha e adequação do protocolo proposto por Nagae et al., 2007.

4.4.1 Protocolo de obtenção de plasma rico em plaquetas líquido

Para a coleta da amostra de sangue, padronizou-se a venopunção da veia jugular, devido ao volume de sangue requerido, aproximadamente 15 mL. Assim, com os animais anestesiados conforme previamente relatado foi preparado o campo de punção e procedeu-se à coleta com agulha 25x7 mm acoplada em seringa de 10 mL preparada com 1 mL de anticoagulante à base de citrato de sódio. O procedimento foi realizado em duas etapas. O volume obtido foi armazenado em quatro frascos contendo 0,5 mL de citrato de sódio por tubo. O sangue foi encaminhado para Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA onde foi transferido para um tubo Falcon® de 15 mL para, em seguida, ser processado.

Do conteúdo sanguíneo total (sangue e anticoagulante medindo aproximadamente 17ml), transferidos para um tubo estéril de 50 mL, foi reservada uma amostra (1ml) para contagem plaquetária e demais valores celulares sanguíneos.

Todo procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar a fim de manter a assepsia da amostra cujo produto final foi aplicado nos animais.

O organograma apresentado na Figura 8 demonstra a sequência de procedimentos realizados após a coleta sanguínea em cada animal.

O protocolo proposto (FIGURA 9) preconizou a dupla centrifugação, sendo a primeira a 250 g durante 10 minutos. Ao final desta etapa, o tubo apresentava três camadas distintas formadas pelas hemácias – no fundo do tubo –, pela zona de névoa, composta pelos leucócitos e plaquetas maiores – camada intermediária – e pelo plasma – camada superior. Coletou-se o plasma e a zona de névoa e descartou-se o restante do volume correspondente à porção mais concentrada em hemácias. A porção coletada foi novamente centrifugada à 1000 g durante 10 minutos. Ao final da segunda centrifugação obteve-se a formação de um pellet (sedimentado ao fundo do tubo) e uma porção de plasma. Coletou-se este “pellet” e uma fração de 150 µL do plasma, que após

homogeneização, formaram o PRP. Este produto era acondicionado em um tubo tipo “ependorf” e encaminhando ao bloco cirúrgico para o transplante imediato.

A plaquetometria foi realizada no momento da coleta do sangue e após cada protocolo de concentração em todas as amostras, pelo método automático. A quantidade de plaquetas alcançadas em cada amostra e o valor basal (de referência) foram analisados.

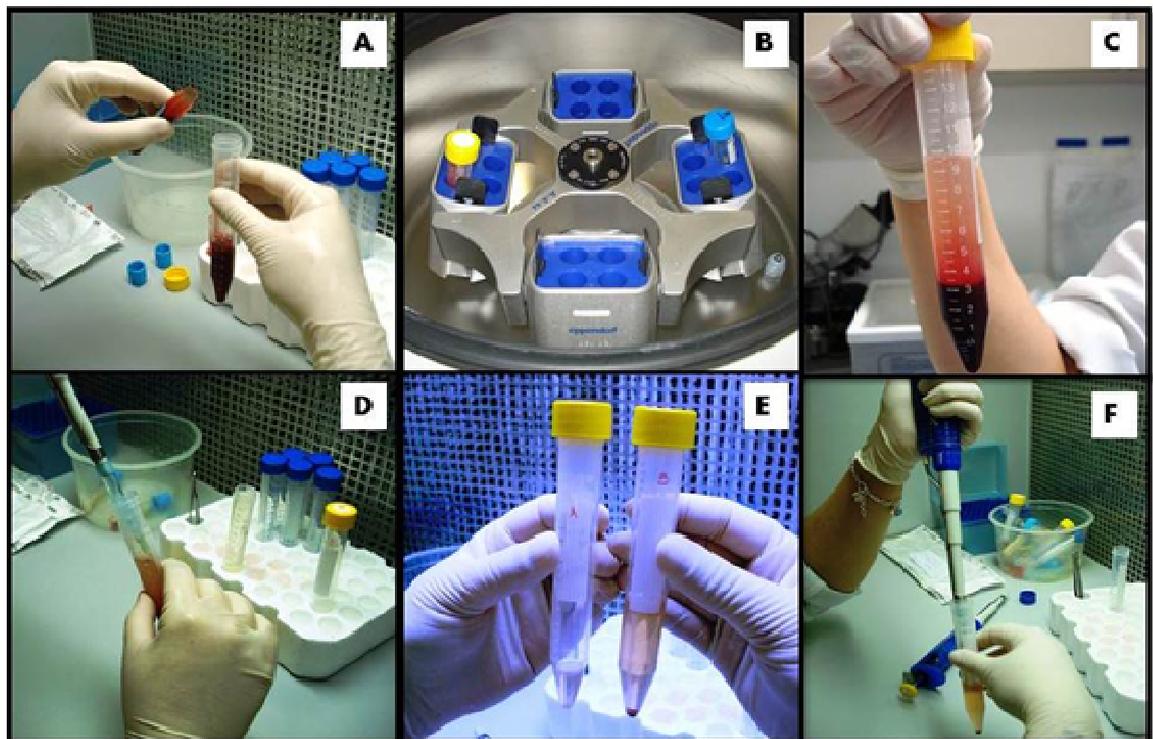


Figura 8: Sequência da preparação do PRP. (A) Transferência do sangue do tubo com anticoagulante citrato de sódio 3% para um tubo Falcon; (B) primeira centrifugação; (C) tubo Falcon após a primeira centrifugação apresentando três camadas distintas formadas pelas hemácias – no fundo do tubo –, pela zona de névoa, composta pelos leucócitos e plaquetas maiores – camada intermediária – e pelo plasma – camada superior; (D) coleta das duas camadas superficiais (plasma e zona de névoa) e transferência para novo tubo Falcon; (E) formação (ao final da segunda centrifugação) de um “pellet” (sedimentado ao fundo do tubo) em uma porção superior de plasma; (G) coleta do “pellet” e uma fração de 150 µL do plasma, que após homogeneização, formaram o PRP a ser utilizado nos experimentos.

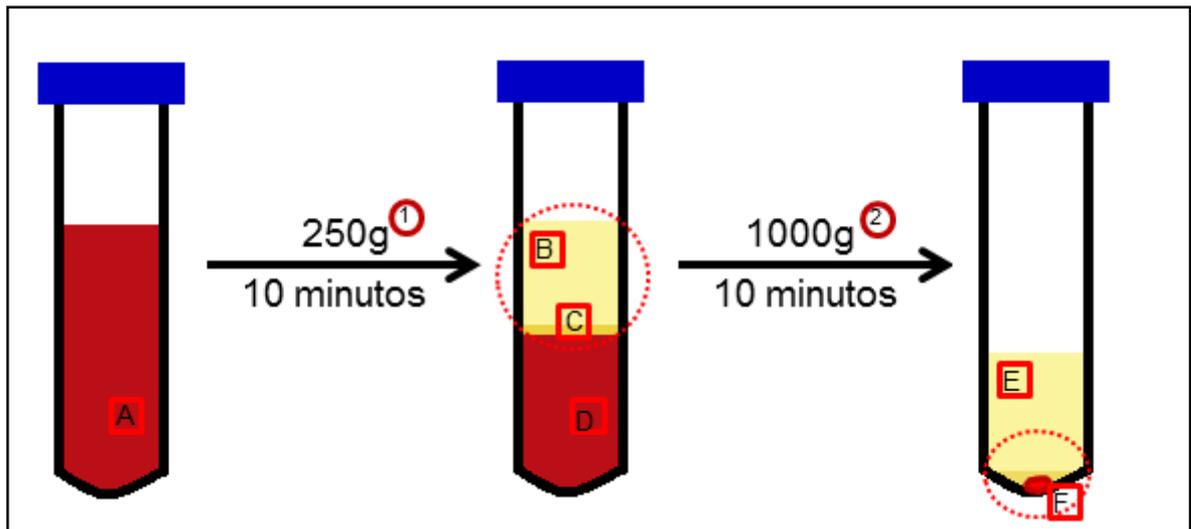


Figura 9: Esquematização do protocolo para obtenção do PRP. (A) sangue total; (1) primeira centrifugação do sangue total a 250 gravidades por 10 minutos; (B) fração plasmática; (C) zona de névoa; (D) hemácias; (2) segunda centrifugação das frações B e C a 1000 gravidades por 10 minutos; (E) fração plasmática final ou PPP (plasma pobre em plaquetas); (F) pellet e uma fração PRP.

4.4.2 Protocolo de obtenção de plasma rico em plaquetas em gel

Para a elaboração da fração em gel do PRP procedeu-se a todas as etapas anteriormente citadas (4.4.1 – Protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas líquido) até a obtenção do produto gerado pela segunda centrifugação (volume sobrenadante (plasma) e pellet precipitado). Então, preconizou-se a coleta do pellet, juntamente com 2 mL do sobrenadante. Esta fração foi usada para fornecer a trombina autógena, necessária à gelificação. Separou-se uma parcela (0,5 mL) para contagem plaquetária e o restante da amostra foi dividida em duas porções e colocada em placas de 24 poços, utilizadas como moldes circulares, e adicionados 150 µL de gliconato de cálcio para a coagulação e formação do gel (FIGURA 10). As amostras foram então enviadas ao centro cirúrgico para imediata utilização.



Figura 10: Etapa final do PRP na forma de gel. Disposição da fração PRP em moldes circulares e posterior adição de 150 μ L de gliconato de cálcio para a coagulação e formação do gel de PRP.

4.5 Procedimento Cirúrgico

Com o animal sob anestesia geral inalatória e posicionado em decúbito esternal, realizou-se a antisepsia do campo cirúrgico com gliconato de clorexidina 3%²⁰, seguido da colocação do campo plástico e confecção de uma janela para abordagem da região a ser acessada.

Com um molde circular de 1cm de diâmetro (trépano corneal 10.5) (FIGURA 11), delimitou-se duas áreas da pele da região dorsal próximo cerca de 2cm da borda escapular, sendo uma no antímero direito e outra no esquerdo, distantes uma da outra cerca de 6cm (FIGURA 12). A pele das áreas demarcadas foi removida e a profundidade da ferida incluiu a epiderme, derme, hipoderme até a superfície externa das fâscias musculares (FIGURA 13). Os eventuais sangramentos foram controlados por compressão local.

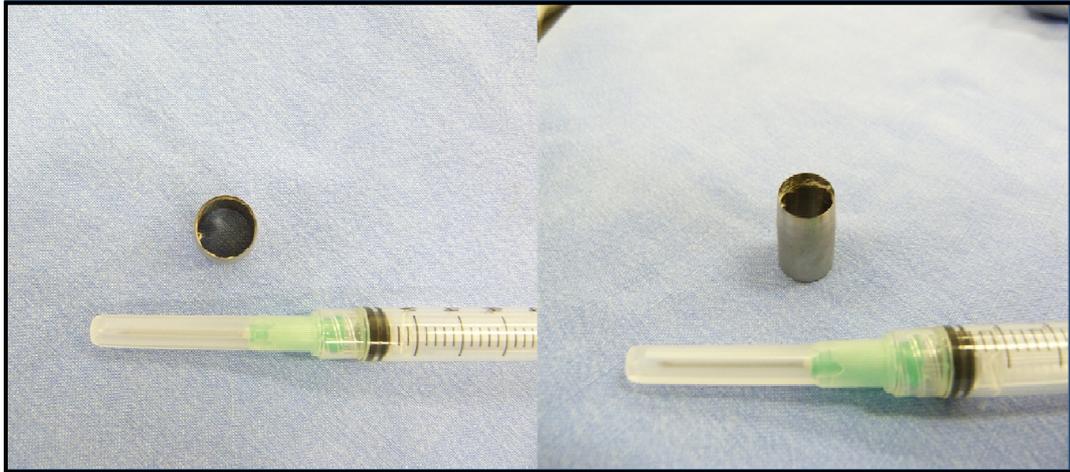


Figura 11: Apresentação do molde circular de 1cm de diâmetro (trépano corneal 10.5) utilizado para demarcação da área de lesão.

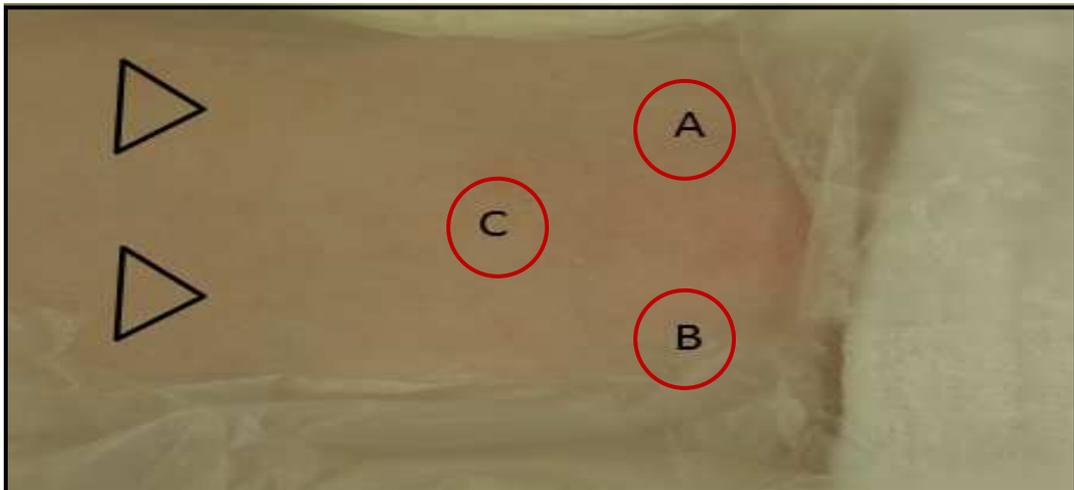


Figura 12: Localização das referências anatômicas e determinação do campo cirúrgico. Onde: (A) Região escapular esquerda; (B) Região escapular direita; (C) Coluna vertebral. Os Triângulos demarcam a área de indução das lesões experimentais.

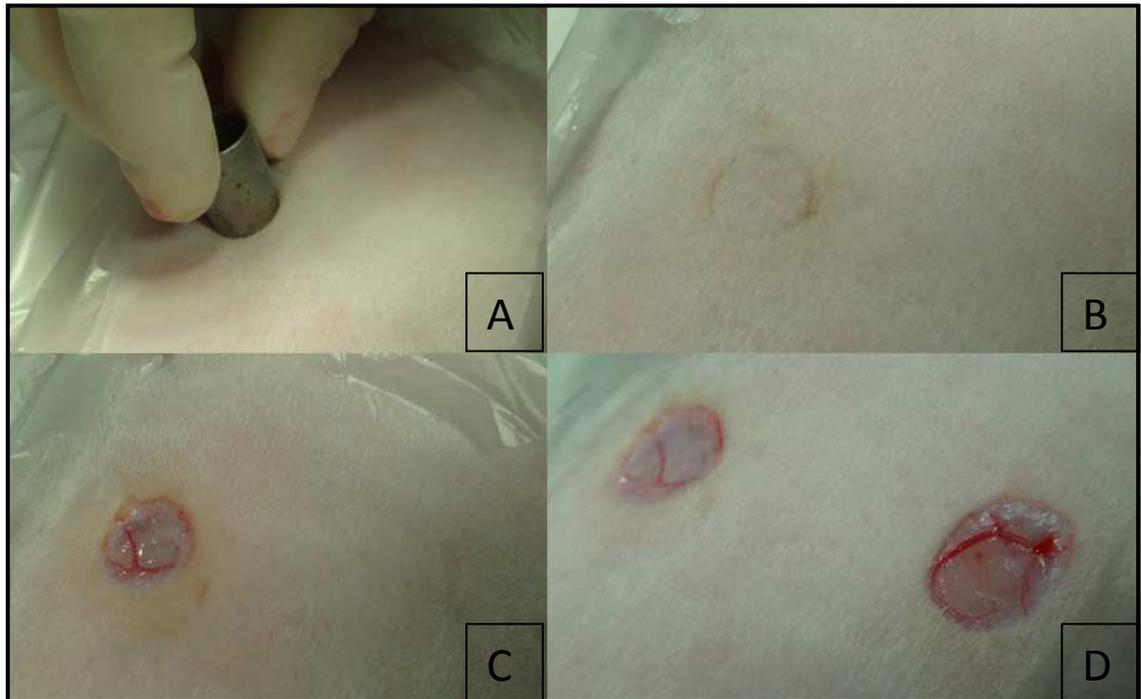


Figura 13: Sequência de indução das lesões experimentais. (A e B) Demarcação da área de excisão com um molde circular de 1cm de diâmetro (trépano corneal 10.5); (C) Excisão de fragmento circular de espessura completa (epiderme, derme, hipoderme) até a superfície externa das fâscias musculares; (D) aspecto final das lesões experimentais na região dorsal do tórax próximo cerca de 2cm da borda escapular, sendo uma no antímerno direito e outra no esquerdo, distantes uma da outra cerca de 6cm.

4.6 Procedimentos Terapêuticos

Os animais foram aleatoriamente divididos em seis (6) grupos perfazendo um total de seis animais por grupo: grupo controle (GC), grupo células-tronco mesenquimais (GCTM), grupo plasma rico em plaquetas líquido (GPRPL), grupo plasma rico em plaquetas gel (GPRPG), grupo CTMs associadas ao PRPL (GCTM+PRPL) e grupo CTMs associadas ao PRPG (GCTM+PRPG) (FIGURA 14).

GRUPO	TRATAMENTO
(GC) Controle	 *
(GCTM) Célula -tronco mesenquimal	 **
(GPRPLIQ) Plasma rico em plaquetas líquido	 ***
(GPRPGEL) Plasma rico em plaquetas gelificado	 ****
(GCTM+PRPLIQ) Associação célula-tronco mesenquimal e plasma rico em plaquetas líquido	 + 
(GCTM+PRPGEL) Associação célula-tronco mesenquimal e plasma rico em plaquetas gelificado	 + 

* Sem tratamento **Cultura de célula-tronco mesenquimal ***PRP na forma líquida **** PRP na forma gelificada.

Figura 14 - Representação dos grupos de acordo com a terapêutica realizada.

Imediatamente após a confecção dos defeitos, os animais receberam os tratamentos de acordo com o grupo que compunham (FIGURA 15).

Grupo Controle (GC): após a indução as lesões foram mantidas sem tratamento.

Grupo Plasma Rico em Plaquetas Líquido (GPRPL): foi injetado aproximadamente 0,25 mL de PRP em quatro pontos equidistantes nas bordas da lesão.

Grupo Plasma Rico em Plaquetas Gel (GPRPG): foi procedida a aplicação da fração PRP em gel de aproximadamente 2cm³ topicamente no leito da ferida.

Grupo Células-tronco Mesenquimais (GCTMs): foi injetado uma suspensão de CTM, nas bordas da lesão em quatro pontos equidistantes na concentração de 7×10^5 diluídas em 1 mL de PBS, na proporção de 0,25 mL por ponto de injeção.

Grupo Células-tronco Mesenquimais associadas ao Plasma Rico em Plaquetas Líquido (GCTMs+PRPL): neste tratamento, combinou-se a injeção de 0,25 mL de PRP em quatro pontos equidistantes nas bordas da ferida e após alguns minutos a injeção de 0,25 mL da suspensão de CTMs, em outros quatro pontos equidistantes, na concentração de 7×10^5 diluídas em 1 mL de PBS.

Grupo Células-tronco Mesenquimais associadas ao Plasma Rico em Plaquetas Gel (GCTMs+PRPG): neste tratamento, combinou-se a aplicação das CTMs, na concentração de 7×10^5 diluídas em 1 mL de PBS, e o posicionamento do PRP em gel (aproximadamente 2 cm³) no leito da ferida.

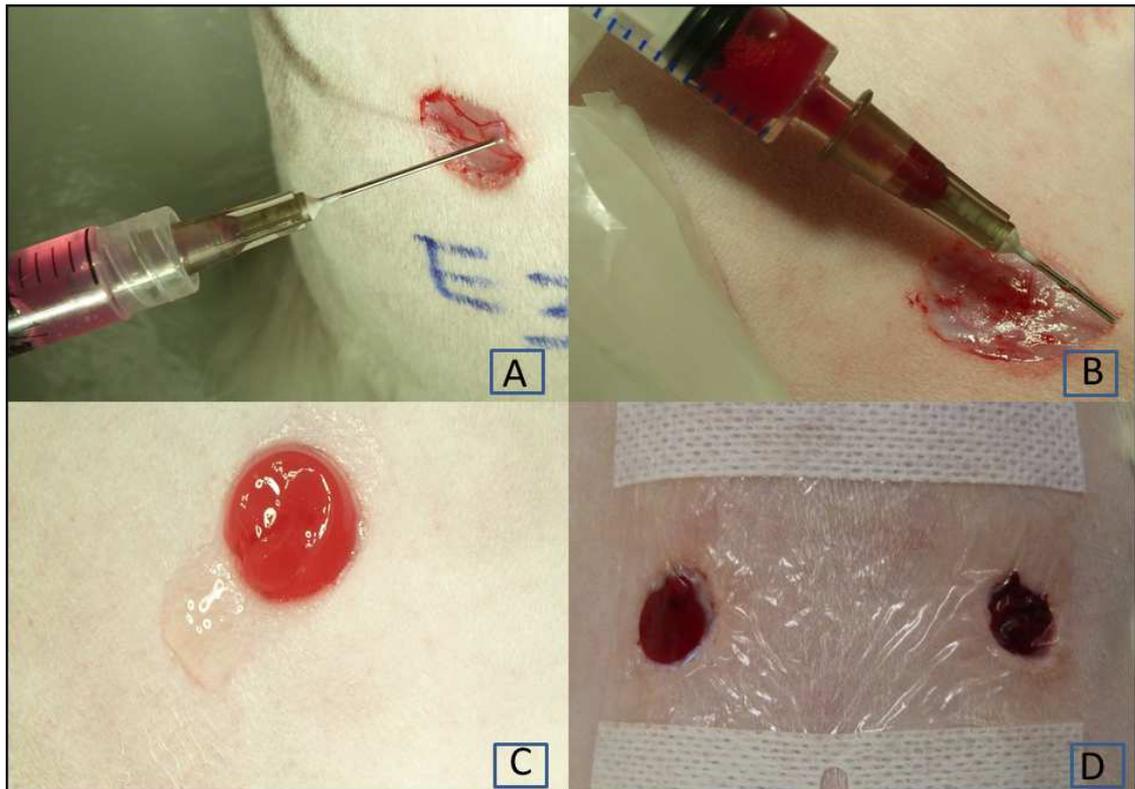


Figura 15: Demonstração dos procedimentos terapêuticos realizados após indução de ferida cutânea aguda em coelhos. (A) Injeção de células-tronco mesenquimais na concentração 7×10^5 ressuspensas em PBS em um volume final de 1 mL. (B) Injeção de plasma rico em plaquetas na forma de líquido em um volume final de 1 mL. (C) Plasma rico em plaquetas em formulação de gel aplicado no leito da ferida. (D) Aspecto das lesões após tratamento e curativo primário com Tegaderm®.

4.7 Procedimentos Pós-operatórios

Após a implementação da terapia determinada, as lesões foram cobertas por curativo não-aderente (Tegaderm®) e malha tubular durante as primeiras 24 horas para evitar o deslocamento das frações em gel de PRP do leito da ferida. Transcorrido este período as feridas ficaram descobertas até o final do período de observação.

Como protocolo pós-operatório os animais foram submetidos à administração de cloridrato de tramadol ($2 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), SC, BID, por três dias.

4.8 Obtenção das amostras

Decorridos os períodos preestabelecidos reoperaram-se os animais sob o mesmo protocolo anestésico descrito anteriormente, para remoção das áreas totais de lesão, incluindo 2 mm além da interface entre o tecido sadio e a cicatriz em toda extensão das bordas das feridas. Na cicatriz à esquerda do animal, foi realizada biopsia aos 7 dias de pós operatório e as áreas de lesão induzidas no antímero direito da região dorsal, aos 14 dias de pós operatório. Os fragmentos foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina e processados rotineiramente.

4.9 Método de Indução de Morte

Ao término do período de avaliação (14 dias), todos os coelhos foram eutanasiados através de aplicação intravenosa do propofol até constatar-se apnéia persistente (parada respiratória), seguida da administração do cloreto de potássio, pela mesma via, até a parada cardíaca, conforme o recomendado pelo código de ética para o uso de animais em pesquisas científicas.

4.10 Avaliação Macroscópica

Os animais foram avaliados diariamente e os dados macroscópicos colhidos através de tabela de parâmetros clínicos (coloração, aspecto das bordas, presença de crostas, presença de tecido de granulação, sinais de dor local, sangramentos e secreções), graduados de acordo com sua gravidade (gravidade: + a ++++) desenvolvida especialmente para o experimento (APÊNDICE 3).

4.11 Avaliação Morfométrica

As feridas foram mensuradas em duas direções, o maior comprimento (c) pela maior largura (l), com auxílio de paquímetro digital nos dias zero, dois, quatro, seis, sete, oito, 10, 12 e 14. A partir destes dados foi possível calcular a área da lesão em cada avaliação. A área de contração da ferida (C) foi calculada subtraindo-se a área inicial (A_1) determinada no dia zero (dia da indução da lesão), da medida da área da lesão obtida nos dias subsequentes de avaliação (dois, quatro, seis, oito, 10, 12 e 14) de forma que $C = A_0 - A_1$.

A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada a partir dos resultados prévios onde $TC = C \times 100 / A_1$.

4.12 Avaliações Microscópicas

Os fragmentos biopsiados nos sétimo e no 14º dias foram fixados em formol tamponado a 10% e após 48h as amostras foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos com espessura de 4-6 micras foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), para avaliação global dos cortes de tecido, e pelo Tricômico de Masson (TM), para avaliar a presença de fibras colágenas existentes nos locais de fibrose do interstício.

Nestas análises foram consideradas:

- angiogênese, observada pela presença do tecido de granulação, baseada na análise dos brotos vasculares e fibroblastos;
- infiltrado inflamatório, onde avaliou-se a presença e quantidade de células do infiltrado inflamatório como as mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos).
- intensidade de colagenização (avaliada pela quantidade de fibras colágenas).

Para a avaliação do perfil proliferativo foi utilizado imunohistoquímica com o anticorpo anti- Ki-67. Este marcador de proliferação celular é positivo em núcleos de células que estão comprometidos a entrar em mitose.

As lâminas foram examinadas por um observador cego. Foram utilizadas, para estas avaliações, variáveis categóricas, classificando-as em intenso, moderado e fraco, de acordo com os critérios acima.

4.13 Análise Estatística

Após tabulação dos dados, realizou-se a análise estatística a partir de testes não paramétricos de amostras independentes de Kruskal-Wallis para comparação entre os valores obtidos por plaquetometria, referentes à avaliação sobre o incremento plaquetário dos tratamentos realizados. A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk para normalidade e após, submetidos ao teste de modelos mistos. Pelo mesmo teste, comparou-se os resultados obtidos pelas análises histopatológica e imunohistoquímica. Para todos os testes considerou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Modelo Experimental

O modelo experimental adotado para este estudo (coelhos Nova Zelândia) mostrou-se adequado, cumprindo todos os objetivos aos quais foi desafiado. As etapas anestésicas e cirúrgicas transcorreram sem intercorrências. Para a lipectomia, houve necessidade de coleta de apenas um animal doador, demonstrando facilidade de obtenção de tecido adiposo em quantidade suficiente para isolamento, caracterização e expansão celular sem repercussões significativas para o animal. Quanto aos tratamentos, viabilizou a produção do PRP autólogo, e a confecção de uma amostra em volume adequado (aproximadamente 1 mL de produto final) para a execução da metodologia proposta. Ainda, permitiu a padronização das feridas e redução do número de animais necessários, pois, possibilitou a indução de duas lesões simétricas paralelas.

5.2 Coleta e processamento do tecido adiposo e obtenção das células-tronco mesenquimais

Para a coleta do tecido adiposo, a região acessada - linha dorso medial em região interescapular e cervical há aproximadamente 5 cm do occipital - possibilitou exérese de uma porção de tecido adiposo de aproximadamente 15 gramas, quantidade suficiente para a obtenção de células-tronco mesenquimais adiposo derivadas.

A cultura celular apresentou, em 24 horas, confluência de 80%. Após o descongelamento as células apresentavam-se viáveis. Na data prevista foram transplantadas células entre a terceira e a quarta passagem (FIGURA 16).

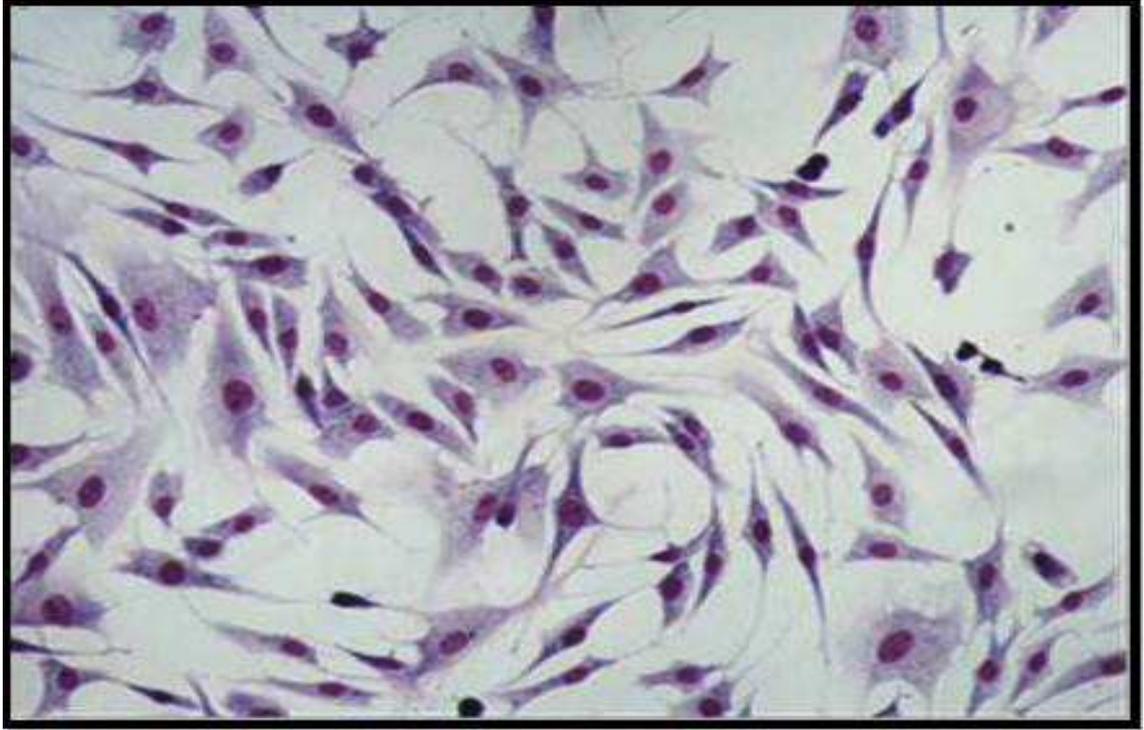


Figura 16 – CTMs derivadas do tecido adiposo de coelho Nova Zelândia coradas com Hematoxilina-Eosina e em aumento de 20X.

As CTMs, após os ensaios específicos, foram capazes de diferenciação *in vitro* nas linhagens condrogênicas e adipogênicas (FIGURA 17).

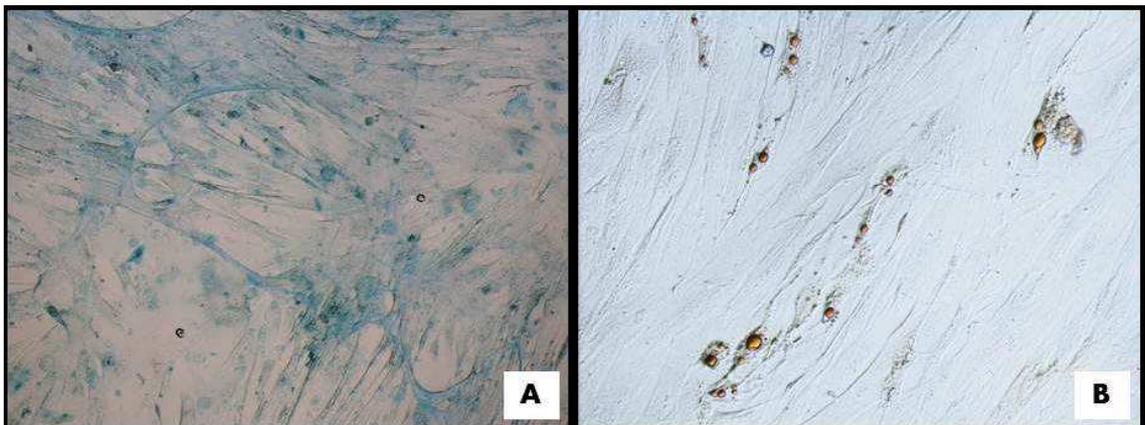


Figura 17 – Caracterização das MSCs a partir da gordura. (A) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue em aumento de 10X; (B) diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red em aumento de 20X.

5.3 Escolha e padronização dos protocolos de plasma rico em plaquetas

A padronização da veia jugular como local de punção para a coleta do volume sanguíneo estipulado, com os animais sob sedação, foi favorável. Possibilitou maior facilidade na manipulação e menor desconforto e estresse ao animal.

Estudo prévio da comparação do poder de concentração de três protocolos selecionados na literatura indicou a metodologia proposta por Nagae et al. (2007), como a mais adequada aos desafios propostos neste experimento. Assim, o protocolo utilizado para obtenção do PRP foi baseado no modelo proposto por estes autores.

Para todos os animais que receberam tratamento com PRP, tanto na sua forma líquida quanto na gelificada, foi analisada a plaquetometria basal, para posterior análise e registro do grau de incremento plaquetário alcançado com a concentração. Os dados estão mostrados na tabela 1. Esta avaliação foi realizada a partir de testes não paramétricos de amostras independentes de Kruskal-Wallis para um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 0.05.

Tabela 1: Médias e desvios padrão do incremento plaquetário obtido em cada grupo tratamento. O círculo vermelho destaca a média geral obtida pelo protocolo empregado.

GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
PRPLIQ	8,643	5,503
PRPGEL	5,6233	6,353
PRPLIQ+CTM	10,095	4,622
PRPGEL+CTM	7,451	4,729
Total	7,953	5,260

A média do incremento para os grupos foi 7,95 vezes mais plaquetas no concentrado do que o valor fisiológico (obtido por média geral dos valores basais dos animais). Não houve significância estatística sobre a diferença das médias obtidas entre os grupos.

Para a elaboração da fração em gel do PRP a utilização de 2 mL do sobrenadante para fornecer a trombina autógena foi uma medida essencial, além da adição de 150 μ L de gliconato de cálcio para a coagulação e formação do gel.

5.4 Procedimento Anestésico

O protocolo anestésico empregado foi adequado para as necessidades inerentes à intervenção proposta (rápida, não cruenta e de baixo nível alérgico). A recuperação pós-operatória dos coelhos após a suspensão do anestésico volátil foi adequada, assim como a analgesia, podendo-se constatar regresso às suas atividades logo que retornavam para o alojamento.

Apenas um animal foi a óbito durante os procedimentos. Neste animal realizou-se necropsia e foi constatado comprometimento pulmonar com acúmulo de secreção, consolidação e atelectasia em lobo esquerdo, portanto, por fatores pré-existentes ao procedimento anestésico cirúrgico.

5.5 Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram considerados de fácil execução e rápidos, levando em média, entre 20 e 25 minutos. Além disso, foram bem tolerados pelos animais, os quais permaneceram saudáveis durante todo o período experimental.

5.6 Procedimentos Terapêuticos

Não foram observados durante o estudo efeitos colaterais ou reações adversas que pudessem ser atribuídas à utilização do PRP e/ou CTM de tecido adiposo.

5.7 Procedimentos Pós-operatórios

A utilização do curativo não-aderente (Tegaderm®) para a cobertura das lesões durante as primeiras 24 horas foi efetiva em evitar o deslocamento das frações em gel de PRP. Apenas um animal retirou as frações gelificadas antes de um período pré-estabelecido de três dias. Este foi substituído durante a experimentação, e o tratamento repetido com a finalidade de manter-se o “n” proposto. Ainda, o protocolo analgésico escolhido mostrou-se eficiente em controlar a dor no pós-operatório para a espécie e intervenção.

5.8 Avaliação Macroscópica

Os animais foram avaliados diariamente e os dados macroscópicos colhidos através de tabela de parâmetros clínicos (coloração, aspecto das bordas, presença de crostas, presença de tecido de granulação, sinais de dor local, sangramentos e secreções) (FIGURA 18) foram analisados através de graduação de acordo com sua gravidade (gravidade: + a +++). No entanto, esta avaliação foi prejudicada pois, pela utilização de uma fração gelificada do PRP não foi possível padronizar seus resultados. Assim, esta avaliação foi utilizada apenas como controle da evolução das feridas e possíveis alterações como contaminação, exsudação excessiva, auto-traumatismo e sinais de dor no pós-operatório.

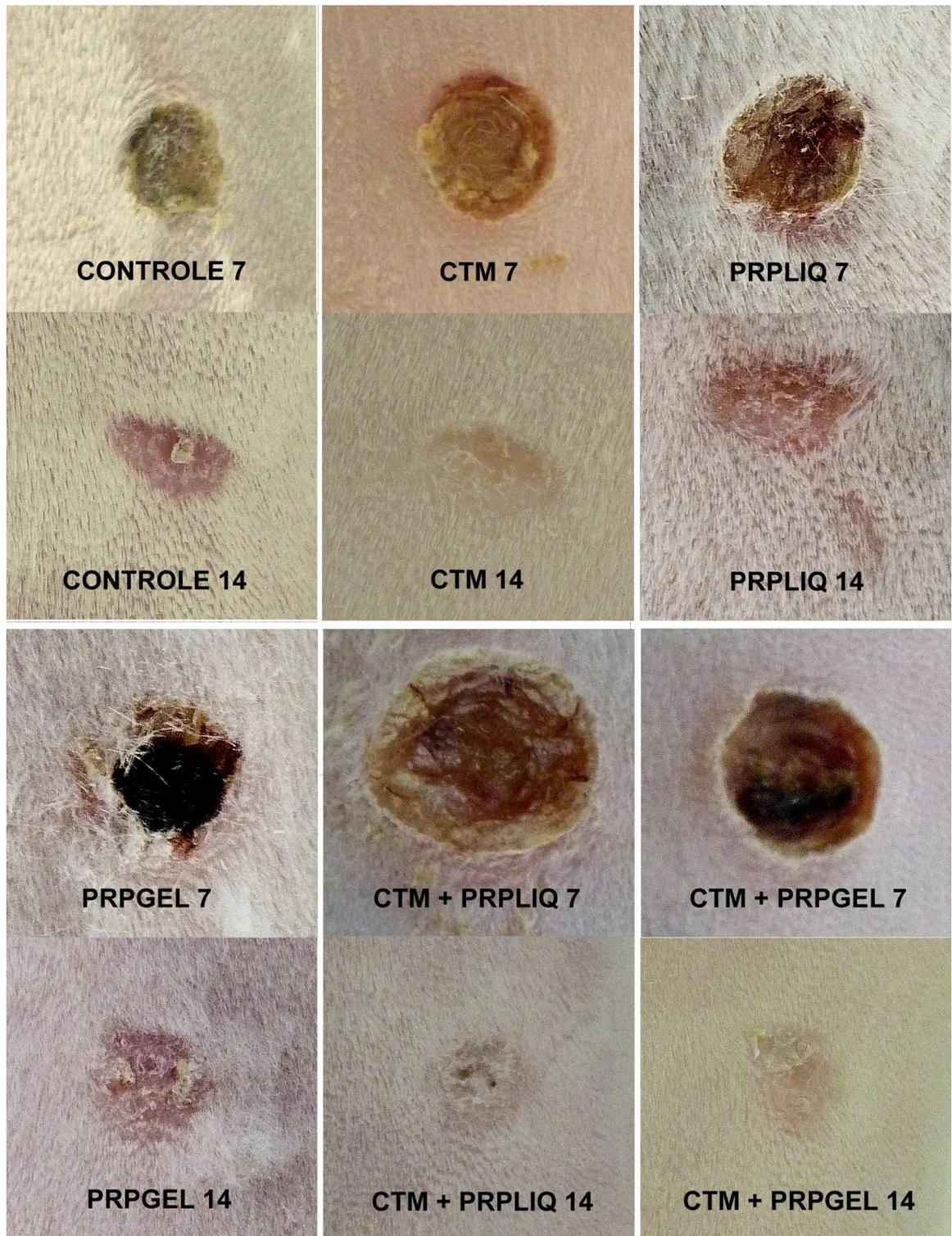


Figura 18: Avaliações clínicas. Aspecto das lesões nas avaliações clínicas aos sete e 14 dias de pós-operatório. Nota-se uma melhora na qualidade da cicatriz nos grupos tratados com células-tronco mesenquimais (GCTM) e suas associações (GCTM+PRPLIQ e GCTM+PRPGEL).

5.9 Avaliação Morfométrica

A partir das mensurações realizadas nos dias zero, dois, quatro, seis, sete, oito, 10, 12 e 14 foi calculada a área da lesão (maior comprimento pela maior largura) e a área de contração da ferida (C), subtraindo-se a área inicial (A_1) determinada no dia zero (dia da indução), da medida da área da lesão obtida nos dias subsequentes de avaliação (dois, quatro, seis, oito, 10, 12 e 14) de forma que $C = A_0 - A_1$. A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada a partir dos resultados prévios onde $TC = C \times 100 / A_1$. Os dados obtidos foram avaliados pelo teste Shapiro-Wilk para normalidade e após, submetidos ao teste de modelos mistos. Os resultados estão demonstrados nas tabelas (2 e 3) e figuras (19, 20 e 21) que seguem.

Tabela 2: Taxa de contração média por grupo. Relação da média e erro padrão sobre a taxa de contração obtida entre os grupos tratados. As letras a e b, marcam os grupos que obtiveram valores estatisticamente significantes nos testes empregados.

GRUPOS	MÉDIA	ERRO
C	48,094	4,233
CTM	34,146 ^b	3,224
PRPGEL	52,767 ^a	3,673
PRPGEL+CTM	49,761	1,589
PRPLIQ	45,126	1,312
PRPLIQ+CTM	41,564	2,543

A tabela 2 lista os dados de média e erro padrão entre as taxas de contração de cada grupo avaliado. Pode-se notar que a maior taxa foi alcançada pelo grupo tratado com plasma rico em plaquetas na sua formulação em gel, levando-se em consideração a média obtida no período experimental (entre os dias zero e 14). Houve significância estatísticas entre as médias encontradas nos grupos PRPGEL ^(a) e CTM ^(b), segundo os testes empregados.

Tabela 3: Taxa de contração. Relação da taxa de contração média considerando o grupo e o dia avaliados. Estão listados apenas os resultados que obtiveram relevância estatística.

DIA	RELAÇÃO ENTRE GRUPOS	Sig.*
2	C/CTM	0,001
2	PRPGEL/CTM	0
2	PRPGEL+CTM/CTM	0,001
2	PRPGEL/PRPLIQ+CTM	0
2	PRPGEL+CTM/PRPLIQ+CTM	0,044
4	C/CTM	0,006
4	PRPGEL/CTM	0
4	PRPGEL/PRPLIQ+CTM	0,005
4	PRPGEL+CTM/CTM	0
4	PRPLIQ/CTM	0
6	PRPGEL/CTM	0,001
6	PRPGEL+CTM/CTM	0,01
6	PRPLIQ/CTM	0,05

A tabela 3 mostra dados da média entre as taxas de contração de cada grupo em relação ao dia avaliado. Apenas os dados que demonstraram nível de significância menor que 0,05 nos testes estatísticos foram listados. Houve variação desses valores até o sexto dia de avaliações, no decorrer do processo cicatricial estas disparidades foram sendo anuladas e no tempo determinado para a última avaliação (14 dias), não houve diferença na taxa de contração entre os grupos tratados.

Essa evolução pode ser melhor acompanhada nas figuras que seguem.

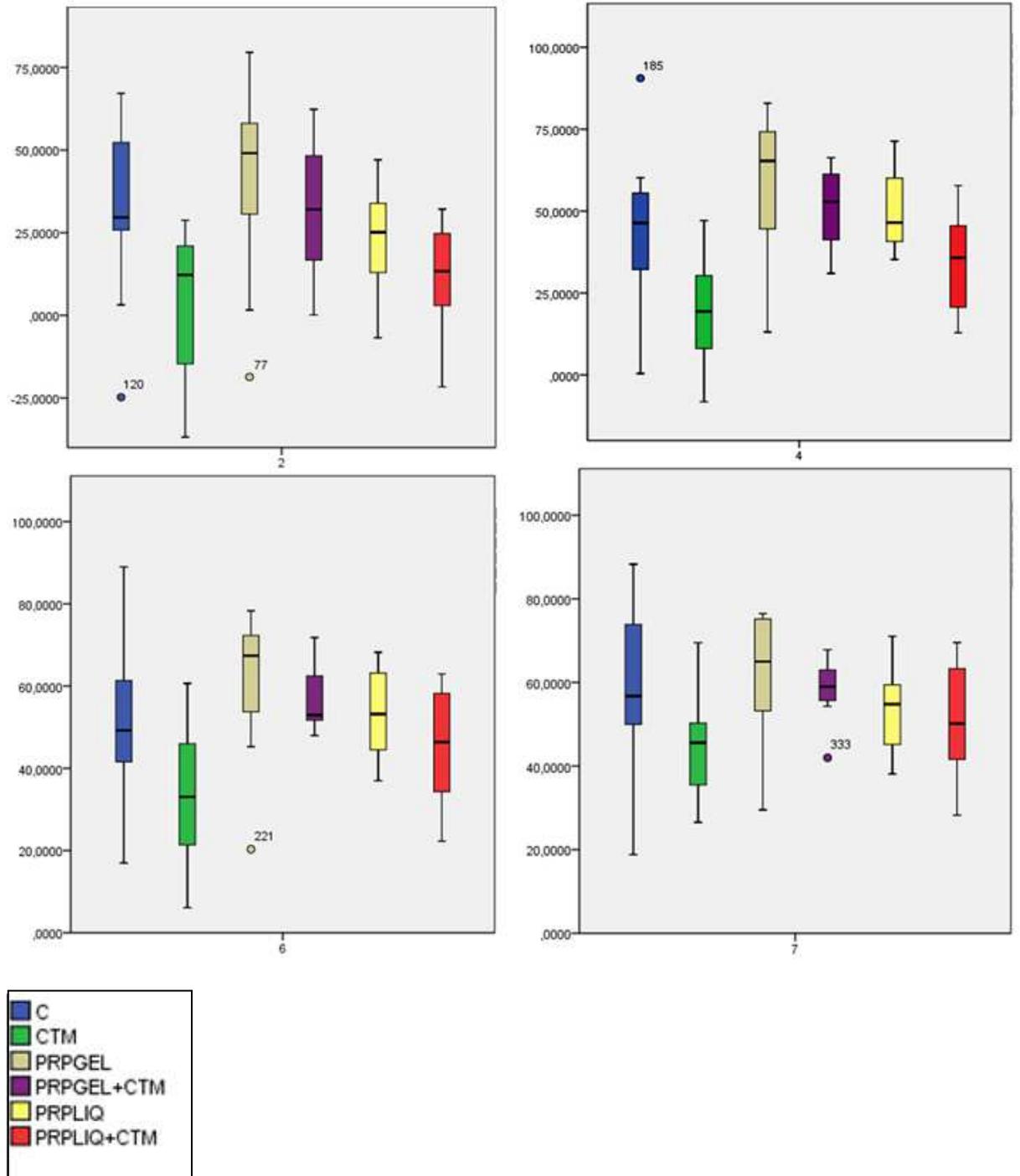


Figura 19: A figura demonstra a evolução em gráficos das médias obtidas sobre a relação taxa de contração média em cada grupo e o dia avaliados. Nesta figura estão abordados os dados obtidos nos dias dois, quatro, seis e sete. Nota: O eixo x representa o dia avaliado e o eixo Y a taxa de contração média em porcentagem obtida pelo grupo.

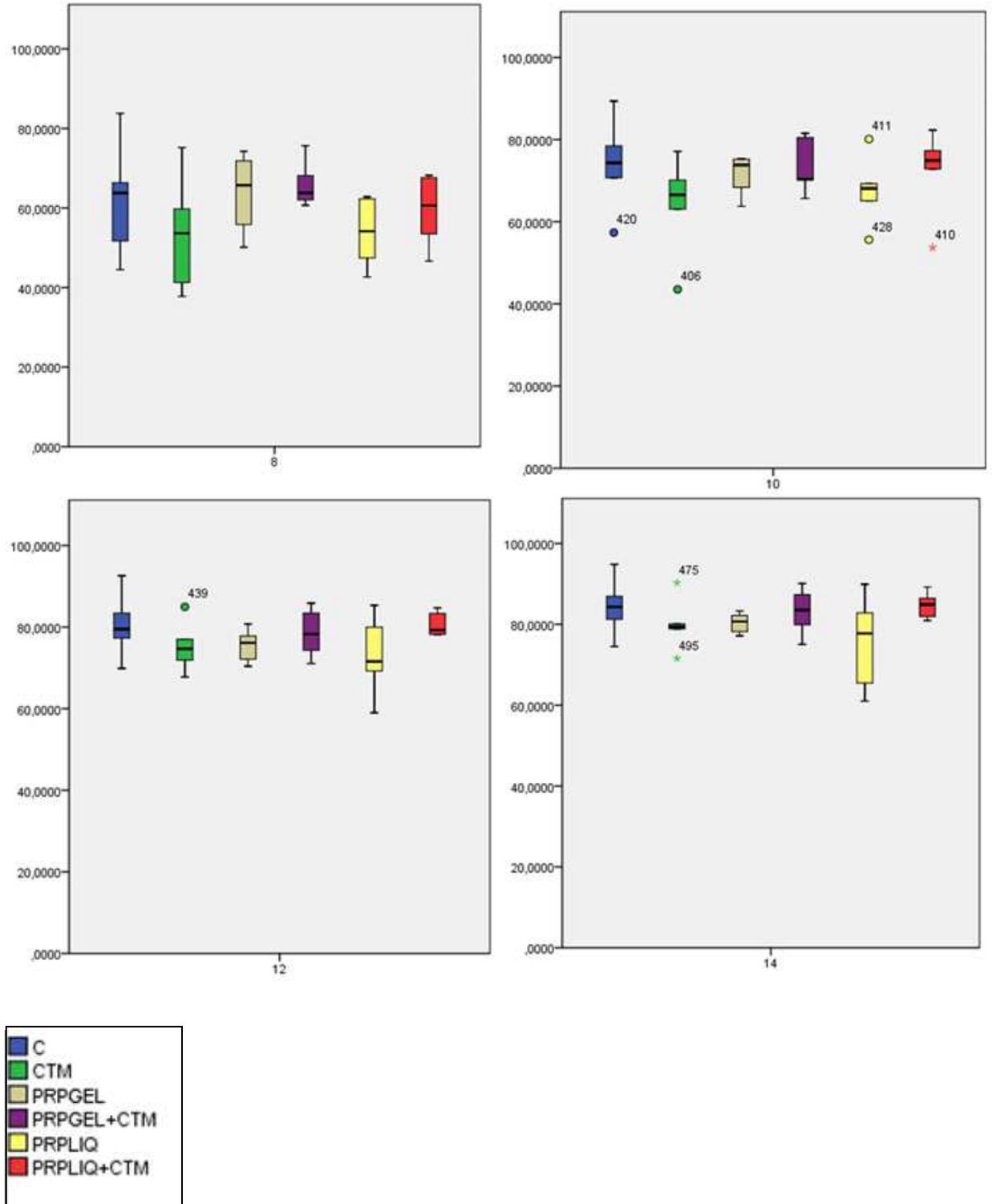
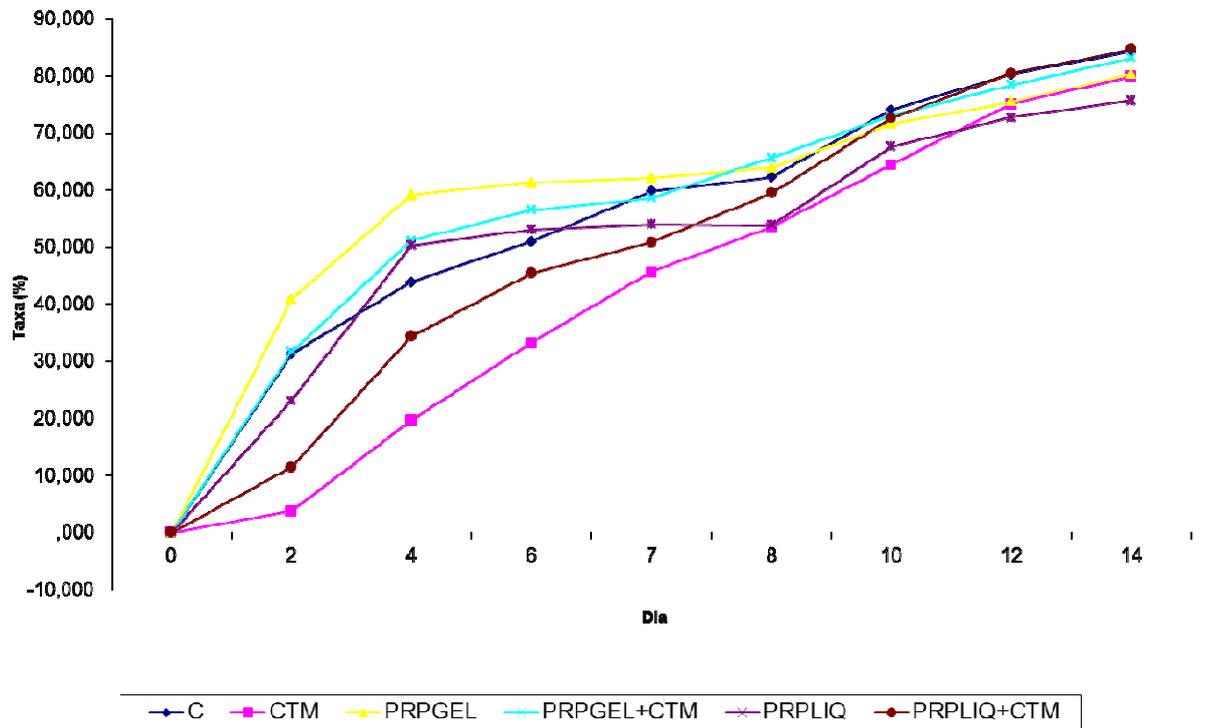


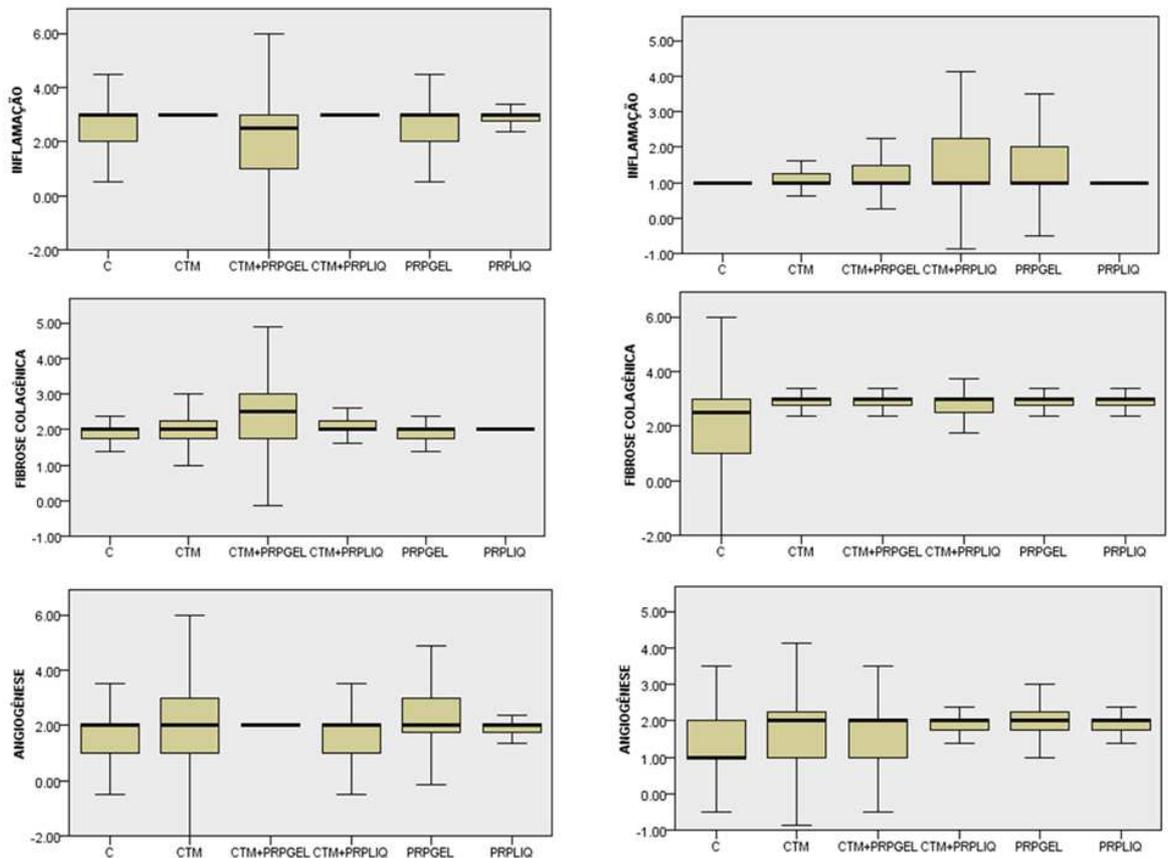
Figura 20: A figura demonstra a evolução em gráficos das médias obtidas sobre a relação taxa de contração média em cada grupo e o dia avaliados. Nesta figura estão abordados os dados obtidos nos dias oito, 10, 12, e 14. Nota: O eixo x representa o dia avaliado e o eixo Y a taxa de contração média em porcentagem obtida pelo grupo.



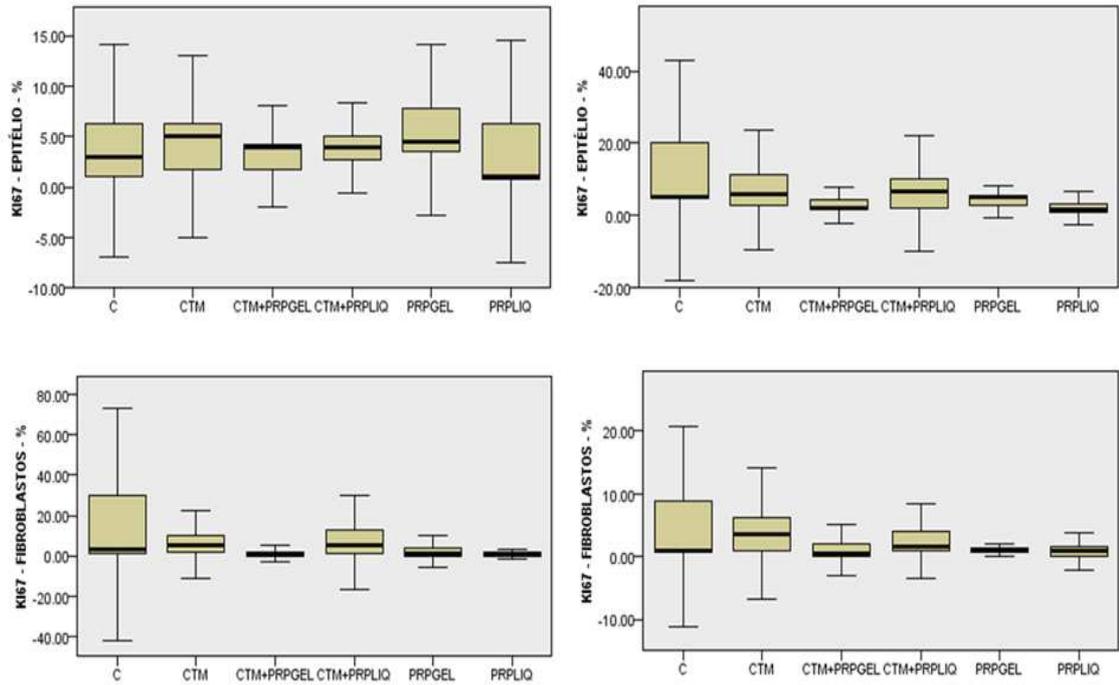
Figuras 21: Demonstração gráfica da evolução da taxa de contração média de cada grupo avaliado em relação ao tempo de observação. Nota-se que existe diferença nas avaliações iniciais (até o sexto dia), no entanto, ao final do tempo de avaliação proposto não há diferença entre os grupos.

5.10 Avaliações Microscópicas

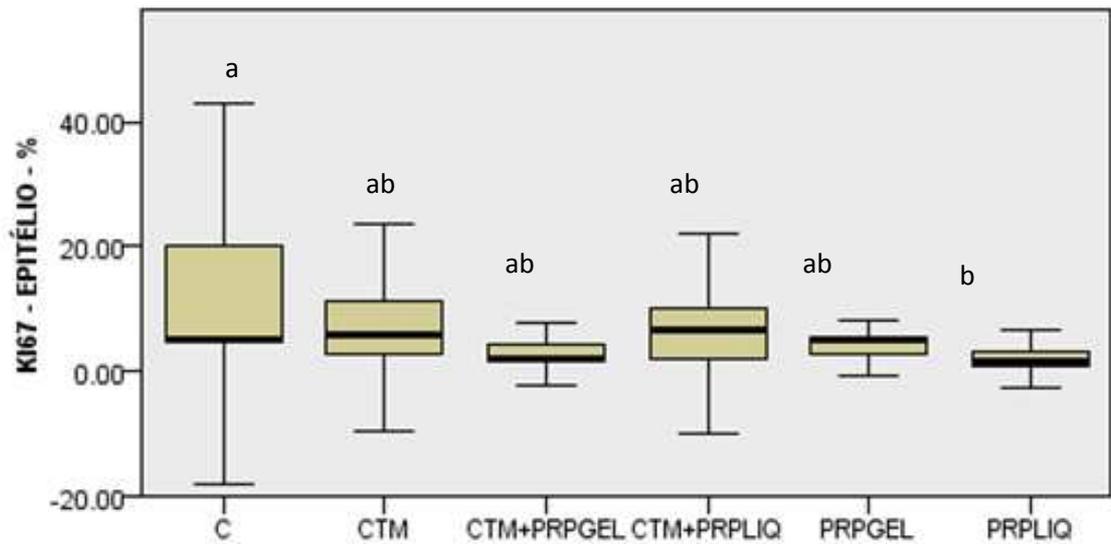
Os parâmetros histopatológicos - reação inflamatória, deposição de colágeno e angiogênese- não apresentaram diferença nas médias obtidas entre os grupos nos tempos avaliados (sete e 14 dias após a indução das lesões). A análise dos parâmetros imunohistoquímicos referentes à média em porcentagem de proliferação epitelial e fibroblástica revelou diferença significativa nas avaliações entre os grupos GPRPLIQ e GC aos 14 dias após a indução das lesões. Os dados estão demonstrados nas figuras que seguem.



Figuras 22: Demonstração gráfica da análise dos parâmetros histopatológicos (reação inflamatória, deposição de colágeno e angiogênese). Não houve diferença nas médias dessas avaliações entre os grupos nos tempos avaliados (sete e 14 dias após a indução das lesões).



Figuras 23: Demonstração gráfica da análise dos parâmetros imunoistoquímicos (porcentagem de proliferação epitelial e fibroblástica).



Figuras 24: Demonstração gráfica da análise dos parâmetros imunoistoquímicos (porcentagem de proliferação epitelial e fibroblástica). Houve diferença significativa nas médias dessas avaliações apenas entre os grupos GPRPLIQ e GC (a e b) na avaliação aos 14 dias após a indução das lesões.

6 DISCUSSÃO

O modelo experimental adotado (coelhos Nova Zelândia) atendeu às expectativas e necessidades do projeto, cumprindo todos os objetivos aos quais foi desafiado. Os ratos, camundongos e cobaios são animais mais agitados, apesar de terem como vantagem o pequeno porte e custos reduzidos de aquisição e manutenção. Em contrapartida, coelhos e cães, em geral são animais dóceis, mas com maiores custos associados (COHEN, 1986). Para esta pesquisa, além de facilitar a manipulação durante as coletas e avaliações, esta característica (docilidade) foi bastante relevante, pois em estudos sobre cicatrização é primordial que os animais sejam tranquilos o suficiente para que, somado à terapia analgésica, não causem interferência no processo cicatricial por automutilação.

Ademais, possuem porte físico adequado para experimentação cirúrgica (GOMES, 2008), característica importante tanto na fase de obtenção de tecido adiposo para o estabelecimento da linhagem celular, quanto no momento de indução das lesões experimentais. Para lipectomia em bloco o modelo proporcionou maior facilidade de obtenção de amostra de tecido adiposo em quantidade suficiente (>10 gramas) para cultivo e expansão celular a partir de um único doador, com pequenas repercussões para o animal (HOUSMAN et al., 2002).

A adoção deste modelo permitiu também, a padronização das feridas e redução do número de animais necessários, pois possibilitou a indução de duas lesões simétricas paralelas, diminuindo, assim, os vieses relacionados aos fatores individuais (como nível nutricional, possíveis co-morbidades não detectadas, entre outros), além dos anatômicos (como o padrão de feixes vasculares, elasticidade e distribuição das linhas de tensão cutânea) (PAVLETIC, 2010). Ainda, para efeito de padronização foram escolhidos animais de mesmo sexo e idade. A utilização de um doador de sexo oposto (macho) aos animais desafiados foi propositalmente adotada para possibilitar a marcação para posterior confirmação da enxertia e possível transdiferenciação celular. No entanto, esta etapa de verificação não pode ser realizada durante este experimento.

Sobre a terapêutica, estes animais apresentaram maior facilidade na obtenção da amostra sanguínea em volume adequado para a execução da metodologia escolhida. Este estudo objetivou a produção de uma alíquota de 1 mL de PRP a partir de 15 mL de sangue coletado, conforme estudos previamente realizados por Vendramin e colaboradores (2009) e semelhante ao proposto por Nagae et al (2007). Este volume de produto final atendeu aos requisitos para a aplicação e/ou preenchimento em um modelo de lesão circular de aproximadamente 10 mm.

A maior parte dos trabalhos conduzidos com células-tronco adultas tem empregado células-tronco mesenquimais extraídas da medula óssea (PEREIRA et al, 2008; HWANG & CHOIN, 2010). Entretanto, nosso estudo teve interesse na utilização do tecido adiposo, pois representa uma fonte acessível, abundante e com capacidade de se diferenciar em células progenitoras osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas (PEREIRA et al, 2008; MIZUNO, 2009), além de requerer um procedimento menos invasivo do que a aspiração da medula óssea (FRASER, 2006; WAN et al, 2008), gerando mínimo desconforto ao doador (ZUK et al., 2002) e pelo fato de estas células terem demonstrado eficiência no tratamento de lesões de pele e cirurgias plásticas em estudos recentes (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; NARDI, 2007; RIGOTTI et al., 2007; SÁNDOR & SUURONE, 2008).

O protocolo para a coleta do tecido foi semelhante ao realizado por Pereira e colaboradores (2008). A porção de tecido adiposo coletada foi efetiva na obtenção e isolamento de células-tronco mesenquimais. A partir de 15 gramas de tecido coletado procedeu-se ao isolamento de quantidade de células suficiente para a realização deste estudo e ainda foi possível armazenar células criopreservadas para utilizações futuras. Strem et al. (2005) também obtiveram alto índice proliferativo e afirmaram que o tecido adiposo contém de 100 a 1000 vezes mais células pluripotentes em um centímetro cúbico em comparação com material obtido por aspirado de medula óssea.

Nesta pesquisa, as células-tronco foram administradas na forma indiferenciada. Existem relatos de ensaio utilizando-as na forma diferenciada (HWANG & CHOI, 2010; SEONG, 2010), no entanto, desta forma, as células não poderiam realizar as importantes e potenciais funções de ação parácrina, por exemplo (CHEN et al., 2008). Ainda, as análises dos resultados histológicos das amostras de tecido não apontaram

qualquer alteração frente à formação neoplásica, preocupação levantada por Kempton (2009), pela capacidade de diferenciação celular deste tipo de tratamento.

A preparação de PRP em seres humanos é melhor conhecida, devido à grande utilização deste biomaterial em ensaios clínicos. No entanto, em animais experimentais somam-se dificuldades, principalmente no que tange ao volume reduzido de sangue disponível em algumas espécies (ratos, camundongos). A utilização do coelho como modelo experimental possibilitou a coleta de uma amostra de sangue suficiente para preparar PRP (aproximadamente 1 mL de produto final obtido a partir de 15 mL de sangue coletado), sem ser letal para o animal, produzindo assim, um hemoconcentrado autólogo, importante para a execução da metodologia proposta.

A grande preocupação em empregar um produto derivado do próprio animal foi devido à necessidade de se evitar possíveis reações imunológicas associadas aos antígenos de membrana plaquetários, os quais, poderiam levar a incapacidade de secreção dos fatores de crescimento e conseqüentemente à incapacidade de alcançar efeito terapêutico desejado. Estes cuidados foram também relatados em trabalhos de Santoso (2003) e Foster et al. (2009). Ainda, quanto à possibilidade de utilização clínica, o emprego de um produto autólogo evita problemas relacionados à transmissão de doenças infecto-contagiosas, importantes de serem consideradas tanto para humanos quanto para animais (VENDRAMIN et al., 2006).

Alguns autores preconizam a utilização da artéria central ou veia marginal da orelha para a coleta de sangue em coelhos (NATALINI, 2007; SIROIS, 2007), no entanto, durante as etapas iniciais deste estudo houve grande dificuldade na obtenção do volume adequado à metodologia proposta por estes acessos. Considerou-se que a dificuldade apresentada ocorreu devido ao baixo peso dos animais, média de 2,5 kg. Segundo O' Neill et al. (2001) o método pelo qual o PRP é recolhido afeta o volume do PRP e a concentração de plaquetas alcançada. Assim, a padronização da veia jugular como local de punção para a coleta, com os animais sob sedação, foi favorável para a obtenção do volume necessário, possibilitando maior facilidade na manipulação e menor desconforto e estresse ao animal.

A partir da comparação do poder de concentração de três protocolos selecionados na literatura, analisados previamente, optou-se por adaptar a metodologia adotada por Nagae et al. (2007). A escolha por uma determinada metodologia deve ser

feita com cautela e muitos detalhes precisam ser levados em consideração. Para alguns autores, o aumento no número de plaquetas em relação à quantidade de plaquetas do sangue periférico e os resultados biológicos obtidos por meio desse aumento são diretamente dependentes do método de centrifugação (MARX, 2001; WEIBRICH et al., 2002). Apesar das discrepâncias entre os protocolos, parece haver um consenso no que se refere à utilização de duas centrifugações. Pesquisas recentes têm demonstrado que essas obtêm maiores concentrações plaquetárias do que àquelas com uma única centrifugação (ARORA et al., 2009; NAGATA et al., 2010). Desta forma, todas as metodologias avaliadas no estudo sobre a obtenção do PRP realizadas anteriormente à execução deste projeto, consistiram em protocolos de dupla centrifugação.

Não só o número de centrifugações é importante no preparo do PRP, mas também a força de rotação selecionada. Um aumento na força de rotação pode garantir maior concentração de plaquetas. Entretanto é preciso considerar que as forças mecânicas demasiadamente elevadas podem, também, ativar precocemente as plaquetas, levando à liberação dos fatores de crescimento e conseqüentemente à perda deles no plasma sobrenadante durante o processo de centrifugação, comprometendo a eficiência terapêutica do PRP (FERRAZ et al., 2007; MAIA et al., 2008; MESSORA et al., 2009). Por haver impossibilidade de verificação e quantificação dos fatores de crescimento nesta pesquisa, a centrifugação do sangue a 250 g num primeiro momento e a 1000 g na segunda centrifugação, ambos por um período de 10 minutos, foi a metodologia escolhida, também por não alcançar forças consideradas problemáticas (>1600 g) para a viabilidade plaquetária e também não tão baixas a ponto de prejudicar o poder de concentração do protocolo.

O método de obtenção de PRP utilizado em nosso estudo foi capaz de oferecer concentração de plaquetas superior a $1.000.000.\mu\text{L}^{-1}$, obtendo uma média de incremento de 7,95 vezes o nível basal. Esta concentração é maior que a observada em outros protocolos como o de Anitua (1999), de Landesberg et al. (2000) e Vendrúsculo (2012) que não conseguiram chegar a um aumento de três vezes a concentração plaquetária no sangue do paciente. Além disso, foram superiores às concentrações obtidas pelos métodos automatizados, que alcançaram níveis um a quatro vezes os níveis fisiológicos segundo os relatos de Kevy & Jacobson (2004), estando, ainda, muito próximo ao

intervalo terapêutico proposto por Marx (2001) que preconiza concentrações entre três e cinco vezes à encontrada no sangue sem nenhuma preparação.

É importante considerar, em um estudo que se propõe a avaliar a eficácia do PRP isolado ou em associação com outros materiais, que a maioria dos sistemas utilizados na prática clínica é baseada na utilização de centrífugas desenvolvidas para diagnóstico e não para a obtenção de PRP, o que pode frequentemente contribuir para um produto final com nível de plaquetas inferior ao ideal. Apesar disso, a utilização da centrífuga vem ganhando credibilidade por ser um procedimento de fácil realização e com baixo custo em relação às demais técnicas (Carmona et al. 2009), necessitando de ajustes prévios de protocolo e familiaridade da equipe com a metodologia escolhida.

Sobre os aspectos referentes ao tempo necessário ao preparo, observou-se variação de 30 minutos a 40 minutos para a execução do protocolo de obtenção do PRP líquido e do PRP em gel, respectivamente. Esta característica é importante pois, para a utilização de um preparado autólogo, em pesquisas que avaliem a capacidade terapêutica do PRP, é factível que os animais objetos do estudo sejam mantidos sob anestesia durante o período necessário ao seu preparo. Assim sendo, o menor tempo despendido na confecção deve ser também um fator analisado. Nesta situação, a metodologia proposta conseguiu sincronizar as atividades de produção do PRP e indução das feridas experimentais, sendo que ao término destas etapas, o hemoconcentrado foi prontamente utilizado. Sobre este aspecto, não foram encontrados dados na literatura consultada passíveis de comparação.

Para estabelecer um protocolo barato, eficiente e reproduzível para uso na cirurgia plástica humana, Vendramin et al. (2009) estudaram a obtenção da trombina autóloga e adição de bicarbonato de cálcio para a formação do gel de plaquetas. No presente estudo, houve a necessidade de aumentar o volume de plasma pobre em plaquetas (2 mL de fração coletada) para obtenção da trombina necessária à gelificação do PRP. Após estas modificações, foi possível produzir um gel estável e de concentração plaquetária satisfatória. No entanto, esta forma de aplicação do PRP, por necessitar do processo de gelificação, tem a desvantagem de requerer maior tempo ao preparo da amostra e de materiais, aumentando os custos de produção. Já, a utilização na forma líquida através da injeção diretamente na ferida ativa as plaquetas por meio das

substâncias geradas pelo traumatismo da agulha de injeção no tecido e principalmente pelo trauma tecidual gerado na confecção da lesão (MAIA et al., 2008; VENDRAMIN et al., 2009).

Dentre os diversos tipos de anticoagulantes, o citrato de sódio foi o escolhido por preservar a integridade da membrana das plaquetas, sendo o mais adequado no preparo do PRP (MARX, 2004, TRINDADE-SUEDAM et al. 2007), além de ser possível reverter seu efeito anticoagulante com a adição de cálcio à amostra, viabilizando a produção do gel de PRP (KERR, 2003).

No que se refere aos procedimentos anestésicos, embora a intubação da traqueia seja mais adequada para manter a patência das vias aéreas e maximizar a concentração de oxigênio inspirado, esta, em coelhos é descrita como relativamente difícil, devido às particularidades anatômicas da espécie, como a pequena rima labial, protrusão da parte dorsal da base da língua e laringe oblíqua, que dificultam a visualização direta da abertura da glote, podendo lesionar a região da laringe em repetidas tentativas (GRUNT & MURISON, 2008). Dessa forma, a utilização da anestesia inalatória mantida através de máscara foi uma alternativa adotada (VILARDO, 2007). Assim, nas etapas de menor tempo cirúrgico previsto e nas quais a intervenção foi considerada menos cruenta e de menor nível algíco optou-se pela anestesia inalatória através de máscara, o que exigiu menor tempo de preparo, pois a etapa de intubação endotraqueal foi evitada. No entanto, para a coleta de tecido adiposo, por ser este um procedimento de maior potencial algíco e que demandaria maior tempo cirúrgico, o animal foi intubado e mantido em plano anestésico por esta via.

A inclusão de um relaxante muscular na medicação pré-anestésica assumiu um papel importante, considerando as particularidades das estruturas anatômicas citadas anteriormente. Assim, a combinação cetamina e midazolam produziu leve depressão cardiopulmonar e, analgesia, mas com bom relaxamento muscular (HEARD, 2007), associado ao suporte analgésico fornecido pelo cloridrato de tramadol, se mostrou favorável a ambos os procedimentos. Estes resultados estão de acordo com a maioria dos protocolos anestésicos utilizados nesta espécie, injetáveis e dissociativos, e não realizam a intubação endotraqueal (EL-BACKLY, 2008; HWANG & CHOI, 2010),

com a frequente utilização da cetamina em combinações com tranquilizantes (DUPRAS et al., 2001).

Apenas um animal foi a óbito durante os procedimentos anestésico-cirúrgicos. Este animal foi submetido à necropsia, onde se constatou comprometimento pulmonar prévio, com acúmulo de secreção, consolidação e atelectasia em lobo esquerdo pré-existentes ao procedimento. Segundo Brofbelt et al. (2008) os coelhos apresentam elevado índice de mortalidade - 1,39% - equivalente a um óbito em um total de 72 procedimentos anestésicos. Neste estudo, obteve-se taxa de 1,26%, equivalente a um óbito em um total de 79 procedimentos anestésicos. Considerou-se o fato decorrente de complicações pulmonares prévias. Como relataram Lipman e colaboradores (1997) e Natalini (2007), os coelhos podem aparentar normalidade clínica mesmo com doença respiratória significativa. E ainda, podem ser portadores subclínicos de pneumonias causadas por pasteurelose (VILARDO, 2007), suspeita levantada pelos pesquisadores deste estudo.

Ressalta-se que a possibilidade de monitoramento das funções vitais durante o transoperatório com auxílio de monitor multiparamétrico, para registro da frequência cardíaca, frequência respiratória, capnometria e oximetria, foi importante ferramenta de controle do plano anestésico adequado aos procedimentos realizados.

O tempo médio requerido para a intervenção cirúrgica variou entre 20 e 25 minutos e não foram constatadas intercorrências. A utilização do trépano de córnea para a demarcação da região a ser incisada foi satisfatória, pois possibilitou a padronização quanto ao aspecto das lesões. No entanto, mesmo com a sua utilização houve alguma variabilidade na determinação da área das lesões no momento imediato à sua realização, fato inerente à elasticidade da pele de cada indivíduo em estudo. A mesma dificuldade foi encontrada no experimento de Houssein et al. (2008). Em ambos os estudos, no entanto, não houve diferença que interferisse significativamente nas análises posteriores.

Quanto à instituição das terapias, considerou-se que a utilização do PRP em gel foi mais prática, uma vez que a estrutura tridimensional se adaptava ao leito lesional. Na administração tanto das células, quanto do PRP em forma líquida através de seringa (3 mL) e agulha (0.7X25 mm), houve a necessidade de injeção lenta e cuidadosa, devido à

consistência fluida dos preparados, para evitar o extravasamento e, conseqüentemente, perda do material. O protocolo de aplicação das células-tronco mesenquimais foi baseado em trabalhos semelhantes que avaliaram o potencial terapêutico desse grupo celular em lesões cutâneas (McFARLIN et al., 2006; WU et al., 2007; CHEN et al., 2008).

A utilização do cloridrato de tramadol (derivado opióide) como analgésico, aplicado por via subcutânea, na dosagem de $2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ BID, por três dias, se mostrou um método eficiente no controle da dor pós-cirúrgica, sem, contudo apresentar interferência no processo cicatricial, que poderia ter ocorrido com o emprego de drogas anti-inflamatórias (BALBINO et al., 2005). Os animais retomaram precocemente às atividades, não apresentando sinais de dor quando manipulados. Outro fator importante, que pode prever a eficiência do protocolo empregado é que não houve interferência por autotraumatismos nas lesões estudadas.

Embora seja notório que para que a cicatrização ocorra é necessário o equilíbrio da umidade do leito da ferida e que um leito ressecado ocasiona uma migração lenta das células epiteliais, sabe-se também, que o excesso de exsudato é prejudicial, pois pode provocar maceração das margens e da pele perilesional. Este exsudato poderia, ainda, facilitar a contaminação das lesões e deslocar as frações gelatinosas em momentos precoces. Devido a dados encontrados em trabalhos semelhantes, que apontaram taxas de 42% de reação inflamatória com exsudato abundante nesta espécie (BEHEREGARAY, 2011), optou-se por seguir as recomendações de Pereira e Bachion (2005) que aconselhou que, para incisões cirúrgicas, deve-se utilizar a oclusão do ferimento por no máximo 24 a 48 horas mantendo o curativo seco e realizando a troca quando necessário, de maneira que, após a implementação da terapia determinada, as lesões foram cobertas por curativo transparente de poliuretano, inerte e não-aderente (Tegaderm®) e malha tubular durante as primeiras 24 horas para evitar o deslocamento das frações em gel de PRP do leito da ferida. Transcorrido este período as feridas ficaram descobertas até o final da etapa de experimentação. Estas condições foram suficientes para controlar o edema e excesso de fluido inerente à espécie. Esta mesma cobertura foi utilizada por Lim & Yoo (2010) sem interferir no processo de fechamento das lesões.

Pesquisas que avaliam a aplicação de novos biomateriais e produtos natureza diversa mostram-se relevantes para o tratamento de feridas, pois buscam meios para acelerar o processo de cicatrização, minimizando os desconfortos do paciente, facilitando a prestação dos cuidados e diminuindo o tempo de internação e os custos hospitalares. Mesmo diante de uma vasta oferta de produtos que podem auxiliar o processo cicatricial, Wu e colaboradores afirmaram em 2007 que o melhor tratamento disponível atinge apenas taxas de 50% de cura e que esta pode, em muitos casos ser temporária. Assim, este estudo se propôs a testar uma associação terapêutica quanto a sua capacidade de afetar positivamente o tempo e a qualidade da cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas.

Por tratar-se de procedimentos ainda em fase experimental optou-se pela utilização de duplo controle, onde o GC foi instituído a fim de ter-se um grupo sem qualquer interferência medicamentosa (TREICHEL et al., 2011). Nos grupos GPRPGEL e GPRPLIQ objetivou-se contar com um segundo grupo-controle, com uso da terapia de forma isolada, ou não associada, e nas suas duas apresentações, na tentativa de excluir os fatores decorrentes de cada bioproduto. Este desenho experimental possibilitou a comparação não só das associações terapêuticas GCTM+PRPLIQ e GCTM+PRPGEL (objetivo maior deste estudo), mas também da atuação isolada de cada tratamento.

Os trabalhos publicados nesta área não costumam fornecer dados clínicos sobre a avaliação do processo cicatricial, restringindo-se às avaliações sobre a área lesional e características microscópicas (WU et al., 2007; CHEN et al., 2008; NAMBU et al., 2009; LIM & YOO, 2010). Neste trabalho pretendeu-se à avaliação das características macroscópicas, por serem dados importantes sobre o processo de evolução de uma lesão. No entanto, no decorrer da experimentação, notou-se a impossibilidade de padronização e avaliação fidedigna dessas características por prejuízo na visualização do leito cicatricial pela utilização do plasma na forma de gel. Além de impedir a visualização do tecido de granulação, este tratamento exigiu que a formação de crostas fosse mantida intacta, pois sua remoção poderia deslocar a fração gelatinosa. Assim, optou-se por não remover as crostas formadas, assim como também à não utilização de soluções para limpeza da lesão, na tentativa de padronização dos resultados. Os dados coletados sobre os parâmetros clínicos (coloração, aspecto das bordas, presença de

crostas, presença de tecido de granulação, sinais de dor local, sangramentos e secreções) foram colhidos, documentados e utilizados como controle da evolução das feridas e possíveis alterações como contaminação, exsudação excessiva, auto-traumatismo e sinais de dor no pós-operatório, importantes para o manejo dos animais nesta experimentação e em pesquisas futuras.

Apesar destas dificuldades, alguns dados puderam ser levantados, por exemplo, a ausência de exsudação excessiva, ao contrário do que foi encontrado por Behegaray (2011), fato este que atribuído à não oclusão da lesão. Além disso, foi clinicamente relevante a aparência da cicatriz obtida com o tratamento com as células-tronco mesenquimais, onde, pode-se perceber uma maior qualidade cosmética em todos os grupos nos quais foram utilizadas (como fonte única ou em associação) principalmente nas avaliações aos 14 dias. Estes achados foram também abordados por Sorrel e Caplan (2010) que relataram que as CTMs, além de acelerar o processo cicatricial podem produzir uma cicatriz de melhor qualidade estética e funcional.

Neste trabalho não foi possível observar o aspecto final da cicatriz, se com menor ou maior espessura de tecido fibrótico ou dados referentes à força de tensão nos diferentes grupos, uma vez que a retirada progressiva das amostras das feridas não permitiu tal avaliação. A título de informação, dois animais desta população foram mantidos como controles absolutos, nos quais o processo cicatricial foi completo aos 21 e 24 dias. A cicatrização completa das feridas foi considerada quando do encontro das margens, resultando na inibição da contração pelo contato (STREM et al., 2005).

Tendo em vista a constatação clínica de uma possível melhora no processo cicatricial das feridas tratadas com CTM, teria sido interessante a manutenção de um grupo para avaliação da qualidade da cicatriz obtida com este tratamento ao final de um período superior aos 14 dias avaliados. Segundo os achados de Stoff e colaboradores (2009) feridas tratadas com CTMs recuperaram 52% da resistência à tração normal da pele em comparação com uma restauração de 31% da resistência à tração no grupo não tratado. Resultado que correspondeu a uma deposição mais efetiva e organizada das fibras de colágeno. Em resumo, além do tempo necessário à cicatrização ter sido reduzido, houve um aumento consequente da função do tecido (LIM & YOO, 2010). Estes autores avaliaram as lesões aos 21 dias de tratamento.

Foi possível verificar que a utilização do PRP na forma de gel não prolongou a fase inflamatória nem gerou alterações deletérias, como presença de tecido necrótico e estímulo à reação tipo corpo estranho, preocupações prévias por ser este um biomaterial tridimensional inserido no leito lesional. No entanto, em estudo realizado por Silva (2007), com o propósito de avaliar a ação do PRP em falhas ósseas realizadas no crânio de coelhos, houve uma reação semelhante a do tipo corpo-estranho que atuou negativamente na fase inicial de reparação. Ainda, na análise histopatológica não se evidenciou vestígios do coágulo formado pela desidratação do PRP em gel, entretanto, não se pode afirmar que ela foi eliminada, reabsorvida ou, ainda, removida pelo animal. A literatura não apresenta informação conclusiva sobre o que ocorre com a esta fração após sua atividade nos tecidos.

Ao contrário dos achados de estudos anteriores demonstrando os efeitos benéficos das CTMs sobre a velocidade cicatricial (NAMBU et al., 2009; LIM & YOO, 2010), neste experimento os grupos tratados com células-tronco mesenquimais não obtiveram dados que indiquem uma possível melhora nos índices de fechamento da lesão em função do tempo ou nos resultados de análises histopatológicas.

Apesar de haver sinais de melhora na taxa de contração da ferida, ou seja, no tempo necessário para a cicatrização, para o grupo PRPGEL nos dias mais precoces do processo (avaliação aos dois, quatro e seis dias), ao final do tempo de experimentação não houve diferença sobre as taxas médias entre os grupos tratados. Sendo que, aos 14 dias - tempo determinado como final - todos os grupos apresentavam velocidade semelhante no fechamento da lesão. De fato, apesar de muitos autores terem relatado melhoras significativas na cicatrização tecidual e formação óssea usando o PRP, outros não observaram este benefício (MARX, 2001). O plasma rico em plaquetas autólogas coagulados com tromboplastina e cloreto de cálcio na espessura total feridas da pele não acelerou ou melhorou a qualidade da cicatrização em testes macroscópicos e histológico em feridas de cães, segundo Houssein et al. (2008). Assim como outros estudos também não puderam demonstrar a eficiência do gel de PRP no tratamento de feridas em diferentes modelos experimentais (MONTEIRO et al, 2009; KAZAKOS et al, 2009; SANDARI et al, 2010). Variações em algumas propriedades chave do PRP incluindo concentração plaquetária, o tipo do ativador da coagulação, podem alterar a qualidade do PRP (ANITUA, 2006).

De acordo com os dados obtidos nas análises morfométricas e em virtude do que a literatura pertinente tem demonstrado, talvez os eventos mais significativos para a cicatrização de feridas agudas com a utilização destas terapias ocorra em momentos mais precoces do que os avaliados neste estudo (sete dias), no que se refere aos eventos inflamatórios e de proliferação. Acredita-se, também, que os benefícios referentes à qualidade da cicatrização provenientes da utilização das terapias celulares, associadas ou não ao plasma rico em plaquetas, possam ser melhor evidenciados em avaliações superiores aos 15 dias, onde a produção de uma cicatriz de melhor qualidade cosmética poderia ser analisada pela organização da deposição de colágeno, pela quantidade de fibras tipo III e IV e também pela avaliação da força de tensão da cicatriz. Em 2009 Stoff e colaboradores obtiveram sucesso com o transplante de células mesenquimais na cicatrização de feridas. No entanto, naquele estudo, as feridas foram avaliadas por análise histológica e tensiometria aos 3, 7, 14, 21 e 80 dias após a manipulação. Além disso, as CTMs foram marcadas com um corante fluorescente (CM-dii). Seus resultados mostraram que as células transplantadas inibiram significativamente a formação de cicatriz e aumentaram a resistência à tração das feridas. Outros autores relataram a capacidade de diferenciação das CTMS em epiderme e anexos cutâneos, medindo assim, a capacidade de regeneração dérmica (LIM & YOO, 2010). Segundo Hedlung (2005) na fase de remodelagem, iniciada 17 a 21 dias após a lesão, as células-tronco podem contribuir com a produção de fibroblastos na pele, elevando a liberação de citocinas e desta maneira permitindo que o reparo cutâneo apresente uma cicatriz mais estética, em menor tempo.

A utilização de terapia celular associada aos diferentes *scaffolds* tem sido foco de muitas pesquisas. A possibilidade de uso do plasma rico em plaquetas (PRP) como um arcabouço em forma de gel para sustentação das células possui diversas vantagens: ser um material biológico, ser produzido com concentrado de plaquetas do próprio paciente que receberá o transplante, tratar-se de um material barato, além de rico em fatores de crescimento que estimulam a síntese de matriz extracelular e são importantes para diferenciação em muitas linhagens celulares (MOROZ et al., 2009). É sabido que as células-mesenquimais indiferenciadas, fibroblastos e macrófagos iniciam a formação do tecido e que a proliferação, diferenciação, modulação e coordenação destas células ocorrem através da interação de vários fatores de crescimento, coordenando a mitose

celular e a síntese protéica (MONTEIRO et al., 2010). Assim, além do potencial de aumentar a disponibilização de FCs locais, buscaram-se estratégias que objetivassem melhorar a retenção e sobrevivência das células transplantadas. Com isso, testou-se neste experimento o uso de PRP associada às CTMs, para promover uma ação de *scaffold* do PRP em relação às células transplantadas. Entretanto, os resultados obtidos nesta pesquisa não foram promissores com essa associação como adjuvantes do processo cicatricial cutâneo. Porém, para a confirmação da retenção celular as CTMs deveriam ter sido marcadas. A marcação das células-tronco permitiria o melhor entendimento da terapia, pois, é um método auxiliar na avaliação das técnicas de implante celular (AZEVEDO et al., 2006).

Especula-se, pelos dados obtidos que pode ter ocorrido um atraso na taxa de contração cicatricial pela forma em que as CTMs e o PRP líquido foram administrados, uma vez que se injetou um volume aproximado de 0,25mL em quatro pontos de uma lesão de aproximadamente 1 cm de diâmetro. No entanto, estudos realizados por Stoff et al. (2009), Templin et al. (2009) e Beheregaray (2011) utilizaram metodologia semelhante e Treichel et al. (2011) testaram frações ainda maiores (entre 1,25 a 3 mL) sem alterações que pudessem ser atribuídas ao volume injetado.

Pode também, ter ocorrido a incapacidade de secreção dos fatores de crescimento pelas plaquetas ou mesmo pela liberação precoce dos mesmos como citado por Eppley et al., 2004 e Lopez et al., 2007. A observação morfológica das plaquetas do PRP em esfregaço sanguíneo é recomendada como técnica para avaliar a qualidade do produto, pois, quando as plaquetas estão ativadas, elas mudam de forma, passando a apresentar pseudópodos citoplasmáticos (REBAR et al., 2003). Ou ainda, o material poderia ser submetido à citometria de fluxo, como realizado por Barroso et al. (2007), porém, de acordo com Landi e Marques Júnior (2003), a necessidade de mão de obra especializada e do citômetro de fluxo limita o emprego dessa técnica e a observação morfológica das plaquetas necessita de pessoal capacitado, além de atrasar o emprego do produto. Outra possibilidade que pode explicar a falha terapêutica com a utilização do PRP pode ser relacionada a incapacidade de ativação plaquetária pela trombina autóloga. Para verificar esta possibilidade Vendramin et al. (2006), sugeriram que quando se utiliza a trombina autóloga, a sua concentração seja medida por ensaio de atividade amidolítica. O fato de ser necessário quantificar a trombina e dispor de

equipamentos e material específico para isso, o que resulta em maior custo de produção e de etapas extras necessárias para a sua fabricação, segundo Vendrusculo et al., 2012, pode também, desencorajar sua utilização. Dessa forma, neste estudo, estes testes não foram realizados.

Ainda, especula-se a hipótese de uma sobrecarga de fatores de crescimento, com efeito inibitório dose dependente. Isso pode ser questionado pelo fato de o GPRPLIQ e sua associação, GCTM+PRPLIQ terem alcançado resultados insatisfatórios nas avaliações de taxa de contração em comparação a sua apresentação em forma de gel GPRPGEL e CTM+GPRPGEL. Os grupos derivados da utilização líquida alcançaram uma média de 8,64 (tratamento único) e 10,09 (tratamento associado), enquanto, nas formulações em gel esses valores caem para 5,62 (tratamento único) e 7,45 (tratamento associado) vezes os valores basais. Alguns estudos procuraram analisar a efetividade do PRP no sentido de potencializar o reparo, relacionando os resultados obtidos com as várias concentrações de plaquetas empregadas. Resultados tem mostrado que a efetividade do PRP pode seguir padrão concentração-dependente, ou seja, concentrações muito altas teriam efeito prejudicial (WEIBRICH et al., 2004), no entanto, ainda não há consenso sobre quais níveis de incremento seriam os ideais e a partir de qual valor o benefício se perde ou ainda, o produto se torna prejudicial ao processo cicatricial.

É importante colocar a dificuldade de comparação entre os dados obtidos na literatura e os resultados deste experimento, uma vez que nenhum dos artigos analisados obteve exatamente as mesmas condições experimentais. Existe uma grande discrepância entre os estudos, uma vez que não há ainda, protocolos bem definidos, com padronização de algumas variáveis, por exemplo: local e volume de produto injetado, área da lesão, tempo de análises, concentração de células, nível de incremento nos caso do PRP, modelo experimental, entre outros dados que se padronizados poderiam gerar resultados passíveis de comparação direta.

Os dados aqui levantados, sugerem principalmente que ainda há um considerável corpo de trabalho necessário para abordar questões básicas como: quais os melhores mecanismos de entrega de células para sítios de destino; quais são as funções celulares e moleculares destas células nos tecidos alvo; por qual mecanismo de cura estes

produtos atuam; qual o melhor período para as terapias serem implementadas; questões relativas à utilização destas terapias em longo prazo e à segurança na sua utilização; entre outros aspectos que ainda não podem ser completamente explicados. As respostas a estas questões básicas possibilitarão melhores abordagens para novos estudos com a terapia celular.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento e com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- 1) a associação CTM e PRP em suas frações terapêuticas (CTM+PRPGEL e CTM+PRPLIQ) não acelerou o processo de cicatrização de feridas cutâneas agudas, na avaliação morfométrica aos 14 dias de pós-operatório;
- 2) a aplicação local das CTMs e das frações de PRP quando utilizadas de maneira isolada também não conseguiu acelerar o tempo necessário ao processo cicatricial na avaliação morfométrica aos 14 dias de pós-operatório;
- 3) a utilização do PRP na sua forma líquida obteve menores índices de epitelização em relação ao controle nas avaliações histopatológicas aos 14 dias de pós-operatório;
- 4) à exceção do ocorrido com o grupo PRP líquido, os demais tratamentos não alteraram significativamente as fases inflamatória, proliferativa e inicial do remodelamento, segundo dados histopatológicos;
- 5) a terapia com as células-tronco mesenquimais promoveu cicatrizes esteticamente melhores na avaliação clínica, especialmente aos 14 dias de observação.

Sugere-se a necessidade de novos estudos e a primordial utilização de outras ferramentas diagnósticas para melhores subsídios de interpretação sobre os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

- ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation or future sites for implants. **International Journal of Oral Maxillofacial Implant**. v. 14, p. 529-535, 1999.
- ANITUA, E. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb Haemost**, v.91, n.1, p. 4-15, 2004.
- ANITUA, E. et al. New insights into an novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends Biotechnol**, v. 24, p. 227-234, 2006.
- ANTONIADES, H. & WILLIAMS, L. Human platelet-derived growth factor: structure and function. **Fed Proc**, v. 42, n. 9, p. 2630-2634, 1983.
- ARORA, N. et al. Platelet-rich plasma: a literature review. **Implant Dent**, v. 18, n. 4, p. 303-310, 2009.
- AZEVEDO, J. et al. Avaliação in vivo da distribuição das células autólogas mononucleares da medula óssea no tecido miocárdico infartado através da marcação com ^{99m}Tc-HMPA. **Revista da SOCERJ**, v.19, n.3, p.201-207, 2006.
- BADILLO, A. et al. Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. **Cell tissue research**, v. 328, p. 301-311, 2007.
- BALBINO, C.; PEREIRA, L.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v.41, n.1, p. 27-51, 2005.
- BALBO, R. et al. Platelet gel for the treatment of traumatic loss of finger substance. **Blood Transfus**, v. 8, p. 255-258, 2010.
- BANKS, W. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ª ed. Manole, São Paulo. 629p, 1992.
- BARROSO, C.; BENITO, J.; PUIG, A. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. **Rev. Esp. Cir. OralMaxilofac.**, v.29, p.240-248, 2007.
- BAUHMANN, H. & GAUDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v.15, p.74-80, 1994.
- BAUM, C. & ARPEY, C. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v.31, p. 674-686, 2005.
- BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre. 857p, 2008.
- BEHEREGARAY, W. **Células-tronco mesenquimais e eletroacupuntura na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos**. 2011. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- BYDLOWSKI S. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n.1, p. 25-35, 2009.
- BLANES, L. **Tratamento de feridas**. In: BAPTISTA-SILVA, J. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo, 2004. Disponível em URL:<http://www.baptista.com>.
- BLOCKMANS, D. et al. Platelet activation. **Blood Reviews**, v.9, n.3, p.143-156, 1995.
- BORGES, E. et al. **Feridas: como tratar**. Coopmed, Belo Horizonte. p.97-120, 2001.
- BOSCH, G., et al. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scandin J Med Sci Spor**, v. 21, n. 4, p. 554-561, 2011.
- BRYANT, R. **Acute and chronic wounds: nursing managment**. 2^a ed. Mosby, St Louis. p. 105-163, 1992.
- BRODBELT, C. et al. The risk of death: the Confidential Enquiry into Perioperative Small Animal Fatalities. **Vet Anaesth Analg**, v.35, p. 365-373, 2008.
- BRUNNER & SUDDARTH. **Tratado de Enfermagem Médico Cirúrgico**.10^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2005.
- CAPLAN, I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, v. 9, p. 641– 650, 1991.
- CARMONA. J.; López, C.; Prades, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías en caballos. **Arch. Med. Vet**, v. 41, p. 175-179, 2009.
- CARMONA, J.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses wiith osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **J. Equine Vet. Sci**, v. 27, n. 4, p. 167-170, 2007.
- CERVELLI, V. et al. Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 15, n. 4, p. 625-634, 2009.
- CESARETTI, I. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Pelle Sana**, v. 2, p. 10-12, 1998.
- CIRNE-LIMA, E. Stem Cells. **Revista HCPA**, v.27, n.3, p.66-73, 2007.
- CHEN , L.; TREDGET, E.; WU, P.Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. **Plos One**, v. 3, n. 4, 2008.
- CLARK, R. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.
- COHEN, C. The care for the use of animals in biomedical. **New Eng J Med**, v. 315, p. 865-870, 1986.

COLTRO, P. et al. Atuação da cirurgia plástica no tratamento de feridas complexas. **Rev Col Bras Cir.**, v. 38, n. 6, 2011. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

CROVETTI, G. et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfus Apher Sci**, v. 30, p. 145-151, 2004.

DAHLGREN, L.; Nixon, A.; Brower-Toland, B. Effect of Betaaminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes. **Am. J. Vet. Res**, v. 62, n. 10, p. 1557-1562, 2001.

DEALEY, C. Case study methodology in tissue viability. Part 2: A study to determine the levels of knowledge of nurses providing care for patients with leg ulcers in an acute hospital setting. **J Tissue Viability**, v. 11, n. 1, p.28-34, 2001.

DEROSSI, R. et al. Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas na cicatrização de feridas cirúrgicas na pele de cavalos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n.4, p. 276-281, 2009.

DOMINICI, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DUPRAS, J; VACHON, P; CUVELLIEZ, S; BIAIS, D. Anesthésie du lapin de Nouvelle-Zéland utilisant les combinaisons tilétamine-zolazépam et kétaminomidazolam avec ou sans xylazine. **Can Vet J**, v. 42, p. 455-460, 2001.

DUSSE, L. et al. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n.3, p. 193-197, 2008.

EFFEOGLU, C.; AKCAY, Y.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, 2004.

EL-BACKLY, R. et al. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. **Australian Endodontic Journal**, v. 34, n. 2, p. 52-67, 2008.

EMING, S.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p. 514-525, 2007.

EPPLEY, B.; WOODSELL, J.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implication for wound healind. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.114, p. 1502-1508, 2004.

EVERTS, P. et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. **Growth Factors**, v. 24, n. 3, p. 165-171, 2006.

FALANGA, V. et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. **Tissue Eng**, v. 13, n. 6, p. 1299-1312, 2007.

FARRAG, T. et al. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. **Laryngoscope**, v. 117, p. 157-165, 2007.

FERRAZ, M.; FERRIGNO, A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dogs, obtained through three centrifugations speeds. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.

FERREIRA, M. et al. Wounds complex. **Clinics**, v. 61, n.6, p. 571-578, 2006.

FONTANA, V. **Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**. 128f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FOSTER, T. et al. Platelet rich plasma: from basic science to clinical applications. **American Journal of Sports Medicine**, v.37, n.11, p.2259-2272, 2009.

FRASER, J. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 24, p. 150-154, 2006.

GAGE, F. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p.1433-1438, 2000.

GANDHI, A. et al. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. **Bone**, v. 38, p. 540-546, 2006.

GEORGE, G. **Wound management**. PJB Publications, Richmond, 1996.

GHOSH, K. & CLARK, R. Wound repair. *In*: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 3. ed. Elsevier/Academic Press, New York, p.1149-1166, 2007.

GIONNOBILE, W. Periodontal tissue engineering by growth factors. **Bone**, v. 19, p. 235-275, 1996.

GIBBLE, J. & NESS, P. Fibrin glue: the perfect operative sealant? **Transfusion**, v.30, p.741-747, 1990.

GOLDBERG, E. et al. Participation of mesenchymal precursor cells in wound healing on skin flap model. **Cell technologies and medicine**, v. 2, n. 3, p. 116-118, 2006.

GOMES, C. **Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular com auto-enxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental**. 76f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: Background and process. **Int. J. Periodont. Rest**, v. 22, n. 6, p. 547-557, 2002.

GRAGEDA, E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: review and a standardized research protocol. **Implant Dentistry**, v.13, p. 303-309, 2004.

GRINT, N. & MURISON, P. Research Paper. A comparasion of ketamine-midazolam and ketamine-medetomidine combinations for induction of anaesthesia in rabbits. **Vet Anaesth Analg**, v.35, p.113-121, 2008.

HARDING, K.; MORRIS, H.; PATEL, G. Science, medicine and future: healing chronic wounds. **BMJ**, v. 324, n. 7330, p. 160-163, 2002.

HARTLAPP, I. et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB Journal**, v.15, n.12, p. 2215-2224, 2001.

HATANAKA, E. & CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HEARD, D. Lagomorphs (Rabbits, Hares, and Pikas). *In*: WEST, G.; HEARD, D.; CAULKETT, N. **Zoo animal & wildlife immobilization and anesthesia**. Blackwell publishing, p. 647-654, 2007.

HENDERSON, J. et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. **Ear Nose Throat J**, v. 82, n. 8, p. 598-602, 2003.

HWANG, Y. & CHOIN, J. Addition of Mesenchymal Stem Cell to Scaffold of Plaquet-Rich Plasma Is Beneficial for the Reduction of the Consolidation Period in Mandibular Distraction Osteogenesis. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.68, n.5, p. 1112-1124, 2010.

HOUSMAN, T. et al. The safety of liposuction: results of a national survey. **Dermatologic Surgery**, v. 28, n. 11, p. 971-978, 2002.

HOUSSEIN et al. Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) Activated By Thromboplastin-D on the Repair and Regeneration of Wounds in Dogs. **IJVS**, v. 3, n. 4, 2008.

JAIN, N. The platelets. *In*: Jain NC. **Essentials of veterinary hematology**. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 105, 1993.

JAVAZON, E. et al. Enhanced epithelial gap closure and increased angiogenesis in wounds of diabetic mice treated with adult murine bone marrow stromal progenitor cells. **Wound repair and regeneration**, v. 15, p. 350-359, 2007.

KAZAKOS, K. et al. The use of autologous PRP gel as an aid inthe management of acute trauma wounds. **Injury**, v. 40, p. 801-805, 2009.

KERR, M. Plaquetas (trombócitos) e fatores de coagulação. *In*: **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. Roca, São Paulo, p. 45-59, 2003.

KEVY, S. & Jacobson, M. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **J Extra Corpor Technol**, v. 36, n. 1, p. 28-35, 2004.

EMPTON, L. et al. Assessment of axonal growth into collagen nerve guides containing VEGF-transfected stem cells in Matrigel. **The Anatomical Record**, v. 292, n. 2, p. 214-224, 2009.

KIERSZENBAUM, A. *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia*. Elsevier, 455p., 2004.

KOLF, C. et al. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. 204-213, 2007.

KUMAR, V. et al. Bases patológicas das doenças. 7. ed. Elsevier, Rio de Janeiro, p. 49-124, 2005.

KWON, D. et al. Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. **International Wound Journal**, v. 5, n. 3, 2008.

LANDSBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, p. 297-300, 2000.

LANDI, E. & MARQUES JÚNIOR, J. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.25, p. 39-46, 2003.

LAUER, G. et al. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wound. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 12-18, 2000.

LIEBERMAN, J.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. The role of Growth Factors in the repair bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84, n. 6, p. 1032-1042, 2002.

LIM, J. & YOO, J. Adipo-derived stromal cells and wound healing. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25. p. 746-751, 2010.

LIND, M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. **Acta Orthop Scand**, v. 67, n. 4, p. 407-417, 1996.

LINDERMANN, S. et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 α synthesis. **J Cell Biol.**, v. 154, n. 3, p. 485-490, 2001.

LIPMAN, N.; MARINI, R.; FLECKNELL, P. Anesthesia and Analgesia in Rabbits. In: FISH, R. et al. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**, American College of Laborator. Animal Medicine Series, p. 300-327, 1997.

LIU, H. et al. The Immunogenicity and Immunomodulatory Function of Osteogenic Cells Differentiated from Mesenchymal Stem Cells. **The Journal of Immunology**, v.176, p. 2864–2871, 2006.

LOPEZ, J. et al. Plasma rico en factores de crecimiento y regeneración ósea. **Dentum**, v. 7, p. 108-112, 2007.

MAIA, L. & SOUZA, M. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteo-articulares em animais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1279-1286, 2009.

MAIA, L. et al. Platelet-Rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: Histologic Evaluation. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 29, n. 8, p. 618-626, 2009.

MANDELBAUM; DI DANTIS; MANDELBAUM. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MARX, R. et al. Platelet-rich plasma growth factor enhancement for bone grafts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. **Philadelphia**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

MARX, R. Quantification of growth factor levels using simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, p. 300-301, 2000.

MARX, R. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dent.**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.

MARX, R. Platelet-rich-plasma: Evidence to support its use. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MAZZUCO, L. et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. **Transfusion**, v. 44, p. 1013-1018, 2004.

MAZZUCCO, L. et al. Not every PRP-gel is born equal evaluation of growth factor availability for tissue through four PRP-gel preparations: Fibrinet™, RegenPRP-kit™, Plateltex™ and one manual procedure. **Vox Sanguinis**, v. 97, p. 110-118, 2009.

McFARLIN, K. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, p. 471-478, 2006.

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

MESSORA, M. et al. Análise da eficiência do protocolo de dupla centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo experimental em coelhos. **RSBO**, v. 6, n. 3, p. 291-296, 2009.

MIZUNO, H. Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and regeneration: Ten Years of Research and Literature Review. **J Nippon Medical School**, v. 76, p. 56-66, 2009.

MONTEIRO, B.; NETO, N.; DEL CARLO, R. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MOROZ, A. et al. Gel de plaquetas: arcabouço 3D para cultura celular. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 43-45, 2009.

MORSCZECK C. et al. Somatic stem cells for regenerative dentistry. **Clin Oral Invest**, v. 12, p. 113-118, 2008.

- MUSTOE, T. et al. Accelerate healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-I. **Science**, v. 1, p. 1333-1336, 1987.
- NAGAE, M. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 111, p. 147-158, 2007.
- NAGATA, M. et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. **Eur. J. Dent**, v. 4, n. 395-402, 2010.
- NAKAGE, A. & SANTANA, A. Células-tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.
- NARDI, N. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na escola**, v. 2, n. 2, p. 25-29, 2007.
- NARDI, N. & MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.
- NAMBU, M. et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. **Ann Plast Surg**, v. 62, p. 317-321, 2009.
- NATALINI, C. **Teoria e Técnicas em Anestesiologia Veterinária**. Artmed, Porto Alegre, 296p., 2007.
- NWOMEH, B. et al. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 1998.
- OKAMOTO, O. & SANTOS, A. Perspectivas em terapia células: células-tronco. **Einstein**, v. 2, n. 4, p. 355-358, 2004.
- OLIVA, A. et al. Ex vivo expansion of bone marrow stromal cells by platelet-rich plasma: a promising strategy in maxillo-facial surgery. **International Journal of Immunology and Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 45-51, 2006.
- O'NEILL, E. et al. Autologous platelet-rich plasma isolated using the Haemonetics Cell Saver 5 and Haemonetics MCS+ for the preparation of platelet gel. **Vox Sang**, v. 81, p. 172-175, 2001.
- PARK, J. & BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 11-16, 2004.
- PAVLETIC, M. Atlas of Small Animal Reconstructive Surgery. 3 ed. Wiley-Blackwell, Iowa, 679p., 2010.
- PEREIRA, A. & BACHION, M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. **Rev Bras Enferm**, v. 58, n. 2, p. 208-213, 2005.

PEREIRA, I. et al. Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **Acta ORL**, v. 26, n. 3, p. 11-16, 2008.

PIERCE, G. et al. Role of platelet-derived growth factor wound healing. **Journal of Cell Biochemical**, v. 45, p. 319-326, 1991.

PORCELLINI, A. Regenerative medicine: A review. **Bras. Hematol. Hemoter**, v. 31, n. 2, p. 63-66. 2009.

RAMUSSON, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental cell research**, v. 312, p. 2169-2179, 2006.

REBAR, A. et al. Plaquetas. *In: Guia de hematologia para cães e gatos*. Roca, São Paulo, p. 131-156, 2003.

RIGOTTI, G.; et al. Clinical Treatment of Radiotherapy Tissue Damage by Lipoaspirate Transplant: A Healing Process Mediated by Adipose-Derived Adult Stem Cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 119, n. 5, p. 1409-1422, 2007.

RIZZO, D.; DEL CARLO, R.; SILVA, A. Matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca na artrodese vertebral dorsolateral lombar em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p.163-170, 2005.

ROH, C. & LYLE, S. Cutaneous Stem Cells and Wound Healing. **Pediatric Research**, v. 59, n. 4, 2006.

RUDIKN, G. & MILLER, T. Growth factors in surgery: review. **Journal of Plastic Reconstructive Surgery**, v. 97, p. 469-476, 1996.

SANDARI, K. et al. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on cutaneous regeneration and wound healing in dogs treated with dexamethasone. **Comp Clin Pathol**, v, 6, p. 56-67, 2010.

SÁNDOR, G. & SUURONE, R. Combining Adipose-Derived Stem Cells, Resorbable Scaffolds and Growth Factors: An Overview of Tissue Engineering. **Journal of Canadian Dental Association**, v. 74, n. 2, p. 805-809, 2008.

SANTORO, M. & GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental cell research**, v. 304, p. 274-286, 2005.

SANTOS, G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. *In: DUARTE, O. & DIOGO, D. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico*. Atheneu, São Paulo, p. 265-306, 2000.

SANTOSO, S. Human platelet alloantigens. **Transfus Apher Sci**, v. 28, p. 227-236, 2003.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 2581-2587, 2008.

SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 5, p. 469-484, 2002.

SEONG, J. et al. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 6, n. 5, p. 99-110, 2010.

SEPHEL, C. & WOODWARD, C. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E. et al. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 89-120, 2006.

SERHAN, C. & SAVIL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v.6, n.12, p. 1191-1197, 2005.

SILVA, A. **Plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais**. 2007. 32f. (Dissertação Mestrado Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, C. et al. Cultura autóloga de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para o tratamento de ríides faciais. **Rev Col Bras Cir**, v. 36, n. 4, 2009. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

SIROIS, M. **Medicina de animais de laboratório: princípios e procedimentos**. Roca, São Paulo, 344p., 2007.

SLACK, M. Stem cell in epithelial tissue. **Science**, v.287, n. 5457, p. 1431-1433, 2000.

SORREL & CAPLAN. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 30, p. 1-6, 2010.

STOCUM, L. Repair of skin wounds by fibrosis. **Regenerative Biology and Medicine**. Elsevier, New York, p. 21-39, 2006.

STREM, M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio Journal Medicine**, v. 54, p. 132, 2005.

STOFF, S. et al. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. **Exp Dermatol**, v. 18, p. 362-369, 2009.

SUZUMA, K. et al. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 39, n.6, p.1028-1035, 1998.

TEMPLIN, C. et al. Ex vivo expanded haematopoietic progenitor cells improve dermal wound healing by paracrine mechanisms. **Experimental Dermatology**, v. 18, p. 445-453, 2009.

TIZARD, R. *Imunologia Veterinária: uma introdução*. 8. ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 587p., 2008.

THEORET, L. The pathophysiology of wound repair. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 21, p. 1-13, 2005.

THORWARTH, M. et al. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. **Bone**, v. 38, p. 30-40, 2006.

TREICHEL, T. et al. Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 48, n. 1, p. 62-72, 2011.

TRINDADE-SUEDAMN, K. et al. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. **J. Oral Implant**, v. 33, n. 334-339, 2007.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 726-736, 2008.

VENDRAMIN, F. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.

VENDRAMIN, F.; FRANCO, D.; FRANCO, R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n. 2, p. 212-218, 2009.

VENDRAMIN, F. et al. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 25, n. 1, p. 4-10, 2010.

VENDRÚSCULO, P. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 106-110, 2012.

VILARDO, F. Lagomorpha (Coelho, Lebre, Lebre-Assobiadora). *In*: CUBAS, S.; SILVA, J.; CATÃO-DIAS, L. *Tratado de Animais Selvagens*, Roca, São Paulo, p. 419, 2007.

VOLK, S. et al. Stromal progenitor cell therapy corrects the wound-healing defect in the ischemic rabbit ear model of chronic wound repair. **Wound repair and regeneration**, v. 15, p. 736-747, 2007.

WAN, C. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 7, p. 29-33, 2008

WEIBRICH, G.; KLEIS, G; HAFNER, G. Growth factor levels in platelet rich-plasma and correlation with donor age, sex and platelet count. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, v. 30, p. 97-107, 2002.

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

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

WU, Y. et al. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. **Stem Cells**, v. 25, p. 2648–2659, 2007.

YARAK, S. & OKAMOTO, K. Celulas-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clinicas. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

ZAGO, A. & COVAS, T. **Células-tronco – A fronteira da Medicina**. Atheneu, São Paulo. 245p., 2006.

ZECHNER, W. et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 2003, n. 18, p. 15-22.

ZUK, P. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n.2, p. 211-228, 2001.

ZUK, P. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279–4295, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS. Garcez, T.N.A.

FICHA CONTROLE PRP

Animal:

Data coleta:

Hora coleta:

Volume coletado:

Grupo: () PRPL () PRPG () CTMs+PRPL () CTMs+PRPG

Hora final processamento:

Hora utilização:

Contagem inicial de plaquetas: $10^3/\text{mm}^3$

Contagem final de plaquetas: $10^3/\text{mm}^3$

Aumento: %

Número do Registro fotográfico:

Observações:

APÊNDICE 2 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS. Garcez, T.N.A.

FICHA CONTROLE CIRÚRGICO

Animal:

Data da indução:

Grupo: () C () CTMs () PRPL () PRPG () CTMs+PRPL () CTMs+PRPG

Protocolo Anestésico:

Exame da Ferida:

Sangramento: () Ausente () Pouco () Moderado () Acentuado

1) Extensão da Ferida D

Vertical _____cm

Horizontal _____cm

2) Extensão da Ferida E

Vertical _____cm

Horizontal _____cm

Número do Registro fotográfico:

Observações:

APÊNDICE 3 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS. Garcez, T.N.A.

FICHA AVALIAÇÃO MACRO FERIDAS

Animal:

Data da indução:

Ferida: () D () E

Grupo: () C () CTMs () PRPL () PRPG () CTMs+PRPL () CTMs+PRPG

1. Curativo: () ausente () presente mas não cobre a lesão () presente

2. Tecido Necrótico: () Não () Sim + () Sim ++ () Sim +++

3. Tecido de Granulação: () Não () Sim + () Sim ++ () Sim +++

Aspecto: _____ Localização: () Margens () Central () Generalizado

4. Sinais de Infecção: () Não () Sim + () Sim ++ () Sim +++

A) Exsudato: () Não () Sim

B) Característica: () Seroso () Sero Sanguinolento

() Sanguinolento () Purulento

C) Volume: () (O) Ausente () (+) Pouco

() (++) Moderado () (+++) Acentuado

D) Odor: () (O) Ausente () (+) Pouco

() (++) Moderado () (+++) Acentuado

5. Dor/Escore () (O) Ausente () (+) Pouco () (++) Moderado ()

(+++) Acentuado

6. () Hiperemia () Hiperpigmentação () Edema () Cianose () Crosta

A) Localização na lesão: () Margens () Central () Generalizado

B) Localizado ao redor da lesão ()

C) Grau: () (O) Ausente () (+) Pouco () (++) Moderado ()

(+++) Acentuado

7. Extensão: Vertical _____ mm

Horizontal _____ mm

8. Número do Registro fotográfico:

9. Observações:

Data:

Examinador:

APÊNDICE 4 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS. Garcez, T.N.A.

FICHA CONTROLE BIOPSIA 7d

Animal:

Data da indução:

Data da Biopsia:

Ferida: () D () E

Grupo: () C () CTMs () PRPL () PRPG () CTMs+PRPL () CTMs+PRPG

Protocolo Anestésico:

Pós-operatório:

1) Extensão da Ferida D

Vertical _____cm

Horizontal _____cm

2) Extensão da Ferida E:

Vertical _____cm

Horizontal _____cm

Número do Registro fotográfico:

Destino material:

Observações:

APÊNDICE 5 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS COMO ADJUVANTES DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS. Garcez, T.N.A.

FICHA CONTROLE BIOPSIA 14d

Animal:

Data da indução:

Data da Biopsia:

Ferida: () D () E

Grupo: () C () CTMs () PRPL () PRPG () CTMs+PRPL () CTMs+PRPG

Protocolo Anestésico:

Pós-operatório:

1) Extensão da Ferida D

Vertical _____cm

Horizontal _____cm

Número do Registro fotográfico:

Destino material:

Observações: