

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – MG

Andréa Aparecida dos Santos Mendonça

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS
NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
INDUZIDAS EM RATOS**

**ALFENAS/MG
2014**

Andréa Aparecida dos Santos Mendonça

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS
NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
INDUZIDAS EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências pela
Universidade Federal de Alfenas-MG.
Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann.

**ALFENAS/MG
2014**

Mendonça, Andréa Aparecida dos Santos.
Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em ratos / Andréa Aparecida dos Santos Mendonça. - 2013.

57 f. -

Orientador: João Adolfo Costa Hanemann.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.
Bibliografia.

1. Plaquetas. 2. Plasma Rico em Plaquetas. 3. Cicatrização. I. Hanemann, João Adolfo Costa. II. Título.

Andréa Aparecida dos Santos Mendonça

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS
NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
INDUZIDAS EM RATOS**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 10/02/2014

Profº. Dr. João Adolfo Costa Hanemann

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profª. Dra. Manuella Carvalho da Costa

Instituição: UFJF- Campus Governador Valadares

Assinatura: 

Profº. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedicatória

Ao meu marido, Marcos, pelo carinho, apoio, compreensão e, acima de tudo, pelo grande amor que sempre me alentaram durante estes anos que partilhamos juntos.

Aos meus irmãos, Aguinaldo, Márcia, Edson, Patrícia e Tatiana pelo carinho e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus filhos do coração, Amanda, Diego, Alessandro, Guilherme e Maria Luísa, por atribuírem vida à minha vida..... joias raras com que Deus me presenteou.

A Nina, amor incondicional e companheirinha de todas as horas.

Aos meus pais, Walter e Geralda, por me ensinarem a acreditar no futuro e a lutar por ele.

Agradecimentos

A Deus, fonte inesgotável de sabedoria e luz, que sempre guiou os meus passos.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, pela orientação, pela paciência, pelos valorosos ensinamentos e por acreditar no meu projeto tornando um sonho em realidade.

Ao Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo, pelo apoio constante e sugestões dadas para a melhoria deste trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado, Fernando, Juliane, Joseane e Márcio, por dividirem comigo seus conhecimentos.

À Marina Lara de Carli por ter desprendido parte do seu tempo para realização das fotos.

Aos professores do LABAInt, Antonella, Andréa, Deila, Júnior, Roberto, Manu, Tomaz, Marcia e Marisa, pelos ensinamentos valiosos para minha formação e crescimento profissional.

Aos colegas de laboratório Isabel, Vanusa, Fernando, Marilda e Neusa pela amizade e companheirismo que sempre marcaram nossa convivência.

Ao meu grande amigo Fabio Terra, por sua preciosa colaboração durante a realização deste trabalho.

Às colegas Valdete, Maria Helena e Patrícia pelas palavras ternas com que sempre me acolheram.

À UNIFAL-MG, instituição a qual devo toda minha formação e que agora me concede a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos coordenadores do curso de pós-graduação em Biotecnologias Aplicadas à Saúde pela atenção e incentivo.

E a tantos outros que me auxiliaram neste empreendimento.

RESUMO

O reparo de tecidos lesionados pode se dar por regeneração ou cicatrização, sendo que o início desse processo de cura ocorre pela ação de fatores de crescimento que atuam no sítio da lesão estimulando a quimiotaxia, fibroplasia e angiogênese tecidual. A utilização do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em lesões teciduais possui grande potencial terapêutico, pois estimula a cicatrização e a regeneração, desenvolve a neovascularização, reduz o processo inflamatório e o risco de infecções, além de fornecer uma rápida hemostasia ao local. Por meio da indução de feridas na região dorsal dos ratos, o presente trabalho avaliou o efeito do PRP na cicatrização de feridas cutâneas, mediante avaliação histológica. Foram utilizados 36 ratos *albinos Wistar*, no qual duas feridas foram feitas, no mesmo animal, na região mediana dorsal. Nada foi aplicado a uma ferida e a mesma foi preenchida apenas com o coágulo (Grupo Controle), enquanto que na outra aplicou-se o PRP (Grupo Experimental). Os animais foram eutanasiados no 2º dia (nove animais), no 4º dia (nove animais), no 7º dia (nove animais) e no 14º dia (nove animais) após o procedimento cirúrgico, e os espécimes foram processados para análise microscópica. Os resultados mostraram que nos períodos avaliados não houve diferenças histomorfológicas relevantes entre as feridas tratadas com o PRP e as controle e não houve diferenças estatísticas em relação às variáveis estudadas nos dois grupos.

Palavras-chave: Plaquetas; Plasma Rico em Plaquetas; Reparo tecidual.

Abstract

The repair of injured tissues can occur by regeneration or healing, and the beginning of this healing process takes place by the activity of growth factors at the injury site stimulating chemotaxis, angiogenesis and tissue fibroplasia. The use of Platelet Rich Plasma (PRP) in tissue lesions has great therapeutic potential because it stimulates healing and regeneration, promotes neovascularization, reduce inflammation and the risk of infection, as well as to provide rapid hemostasis at the injury site. Through the induction of wounds on the dorsal region of rats, we evaluated, by histological approaches, the effect of PRP on wound healing. We used 36 albino Wistar rats in which two incisions were made on the dorsal medial region. Nothing was applied to one of the wounds, and thus, it was only filled with the blood clot (Control Group); while the other wound received PRP (Experimental Group). Animals were euthanized on day 2 (nine animals), 4 (nine animals), 7 (nine animals), and 14 (nine animals) after the surgery procedure, and tissue samples were processed for macroscopic and microscopic analyses. Results failed to show significant morphometric differences between PRP-treated and control wounds.

Key words: Platelets. Platelet-rich plasma. Healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Indução da lesão.....	27
Figura 2 –	Feridas cirúrgicas realizadas no dorso dos animais.....	28
Figura 3 –	Aspecto cicatricial observado no 7 dia após a cirurgia.....	31
Figura 4 –	Fotomicrografia da ferida cirúrgica no grupo controle.....	32
Figura 5 –	Fotomicrografia da ferida cirúrgica no grupo tratado.....	32
Figura 6 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo controle, demonstrando a presença de pseudomembrana serofibrinosa e a crosta, 2 dias após a realização do experimento.....	33
Figura 7 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo tratado com o PRP, demonstrando a presença de pseudomembrana serofibrinosa e a crosta, 2 dias após a realização do experimento.....	33
Figura 8 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo controle, demonstrando a presença de infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares, 2 dias após a realização do experimento.....	34
Figura 9 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo tratado com o PRP, demonstrando a presença de infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares, 2 dias após a realização do experimento.....	34
Figura 10 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo controle, demonstrando a presença de pseudomembrana serofibrinosa, crosta e infiltrado inflamatório, 4 dias após a realização do experimento.....	35
Figura 11 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo tratado com o PRP, demonstrando a presença de pseudomembrana serofibrinosa, crosta e infiltrado inflamatório, 4 dias após a realização do experimento.....	35
Figura 12 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo controle, demonstrando a presença de vasos sanguíneos congestos, 4 dias após a realização do experimento.....	36
Figura 13 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo tratado com o	

	PRP, demonstrando a redução do infiltrado inflamatório, 4 dias após a realização do experimento.....	36
Figura 14 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo controle, demonstrando a presença de tecido de granulação imaturo, 4 dias após a realização do experimento.....	37
Figura 15 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo tratado com o PRP, demonstrando a presença de tecido de granulação imaturo, 4 dias após a realização do experimento.....	37
Figura 16 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo controle, demonstrando a presença de epiderme hiperplásica queratinizada, 7 dias após a realização do experimento.....	38
Figura 17 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo tratado com o PRP, demonstrando a presença de epiderme hiperplásica queratinizada, 7 dias após a realização do experimento.....	38
Figura 18 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo controle, demonstrando a presença infiltrado inflamatório, 7 dias após a realização do experimento.....	39
Figura 19 –	Fotomicrografia da pele de rato, grupo tratado com o PRP, demonstrando a presença de epiderme queratinizada e tecido de granulação, 14 dias após a realização do experimento.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Morfologia da pele.....	15
2.2	Morfologia da pele de roedores.....	16
2.3	Tipos de ferida.....	16
2.4	Processos de cicatrização.....	16
2.5	Plasma Rico em Plaquetas.....	18
2.6	Utilização do Plasma Rico em Plaquetas em feridas.....	20
3	PROPOSIÇÃO.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Obtenção dos animais.....	26
4.2	Preparação do PRP.....	26
4.3	Protocolo para indução da ferida e aplicação do PRP.....	27
4.4	Obtenção de lâminas.....	28
4.5	Análise microscópica.....	29
4.6	Análise estatísticas.....	29
5	RESULTADOS.....	31
5.1	Análise macroscópica.....	31
5.2	Análise microscópica.....	32
6	DISCUSSÃO.....	43
7	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
	ANEXOS.....	56

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo, indispensável para a vida humana e fundamental para o perfeito funcionamento do organismo. Como qualquer outro órgão, está sujeito a sofrer agressões oriundas de fatores patológicos intrínsecos e extrínsecos que irão causar o desenvolvimento de alterações na sua constituição como, por exemplo, as feridas cutâneas, podendo levar à sua incapacidade funcional. No Brasil, as feridas acometem a população de forma geral, independente de sexo, idade ou etnia, determinando um alto índice de pessoas com alterações na integridade da pele, constituindo assim, um sério problema de saúde pública (MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008).

A interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, pode ser causada por qualquer tipo de trauma físico, químico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque. Qualquer interrupção nas camadas da pele pode resultar no início de uma ferida culminando com a cicatrização que consiste na reparação e regeneração do tecido afetado. Respostas biológicas bastante complexas se manifestam através da proliferação celular que ocorre no interior da lesão, possibilitando a reposição do tecido normal por tecido conjuntivo fibroso no local de um traumatismo através de uma sequência de eventos moleculares a fim de restaurar o tecido destruído (BLANES, 2004; VITORETI; NASCIMENTO, 2005; VILLELA, 2007; BLANCK, 2008; CAETANO, 2008).

A reparação tecidual é um fenômeno de grande interesse para os profissionais da área da saúde, pois sua eficiência acelera o processo de reabilitação, com subsequente retorno mais rápido ao trabalho, atividades de lazer e o convívio social (SILVA, 2006).

O início do processo de cura pelo estímulo à proliferação e migração celular se dá pela ação de fatores de crescimento produzidos por macrófagos, fibroblastos, plaquetas, dentre outros (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2005).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena e de baixo custo de fatores de crescimento (FC), preparado a partir de pequena quantidade de sangue total retirado do próprio paciente, no período pré-operatório. O PRP apresenta em sua constituição o plasma, os leucócitos e as

plaquetas. No plasma estão contidos diversos fatores de coagulação, os leucócitos que conferem resistência natural aos agentes infecciosos e imunológicos, e as plaquetas que sofrem degranulação nos sítios de lesão liberando os FC que influenciam a divisão celular, a síntese de matriz e a diferenciação tecidual. Pelo menos três fatores são derivados dos grânulos plaquetários: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), cujas atividades são mitogênese, angiogênese, ativação de macrófagos e promoção de quimiotaxia; Fator de Crescimento Transformante beta (TGF- β), que está associado à proliferação de tecido periosteal e cartilaginoso e ossificação endocondral; e o Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF) que é mitogênico para as células da linhagem osteoblástica e estimulador da osteogênese a partir dos osteoblastos diferenciados (BARBOSA et al., 2008).

Acredita-se que o PRP bloqueia a expressão de fatores nucleares e a ação de moléculas pró-inflamatórias, como as interleucinas, atuando de forma anti-inflamatória e analgésica. Sua aplicação intralesional ou intra-articular reduz os sinais clínicos da osteoartrite, acelera a reparação e não apresenta nenhum tipo de efeito indesejável (YAMADA et al., 2012). O concentrado de plaquetas reduz o sangramento, a inflamação, a escarificação e o tempo de cicatrização acelerando a reparação das úlceras. A concentração de plaquetas no PRP para fins terapêuticos deve ser significativamente maior que a plasmática para proporcionar a liberação adequada de FCs no local do enxerto (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

Dentre as suas indicações, o PRP tem sido utilizado em cicatrização de úlceras de compressão e de grandes áreas expostas; na reparação e hemostasia de tecidos; nas osteossínteses e na recomposição de enxertos ósseos utilizados em traumatologia e odontologia; na cirurgia plástica estética; em áreas expostas da face e cruentas do contorno corporal; em cirurgia e traumatologia bucomaxilofaciais, dentre outras (UEBEL, 2006).

A fim de facilitar a sua aplicação nas feridas é adicionado ao PRP trombina e gluconato de cálcio que ativam o sistema de coagulação e formam um composto de consistência gelatinosa, podendo ser aplicado externamente, adicionado ao material implantado (medula óssea, por exemplo) ou injetado diretamente em uma lesão, como uma matriz de regeneração. Como efeito imediato, o PRP irá fornecer uma rápida hemostasia e adesão de tecidos formando um coágulo de fibrina semelhante a uma “cola de fibrina”,

aumentando a resposta fisiológica a um trauma e ultrapassando a deposição normal de fatores de crescimento e proteínas. O uso do PRP em feridas beneficia o aumento da reparação dos tecidos e uma menor taxa de infecção, dor e perda de sangue (PALLUA; WOLTER; MARKOWICZ, 2009).

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização histológica da pele humana

A pele humana é formada pela epiderme, derme e tecido conjuntivo subcutâneo (VITORETI; NASCIMENTO, 2005). A epiderme é a camada mais superficial, avascular, e é composta de cinco camadas: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e germinativa. Estas várias camadas são constituídas por células poliédricas justapostas, com pouca substância extracelular, organizadas em folhetos, que revestem a superfície externa e as cavidades do corpo. Constituem uma barreira contra a penetração de microorganismos e água. A camada córnea, mais superficial, proporciona proteção contra traumas físicos e químicos, pois é constituída por células escamosas, produtoras de queratina. Já a camada mais profunda, que faz limite com a derme, é a camada germinativa que apresenta células com capacidade de se multiplicar, possibilitando a reparação das células que se descamam na camada mais superficial. As outras camadas são intermediárias. A medida que a célula se diferencia, ela migra para a superfície e a quantidade de queratina em seu citoplasma aumenta (GUIRRO; GUIRRO, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A segunda camada da pele, localizada abaixo da epiderme, é a derme, sendo constituída por tecido conjuntivo propriamente dito, apresentando matriz extracelular e células como fibroblastos, células adiposas e leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e linfócitos). O tecido conjuntivo se dispõe em duas camadas: uma profunda ou reticular formada por conjuntivo denso e a outra superficial ou papilar constituída por conjuntivo frouxo. No processo de reconstrução tecidual é possível encontrar ainda os miofibroblastos que auxiliam no processo de contração das feridas (BORGIO, 2010).

O tecido subcutâneo é composto por tecido conjuntivo frouxo que une a derme aos órgãos subjacentes sendo responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas no qual se apóia, podendo apresentar uma camada variável de tecido adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2 Morfologia da pele de roedores

A pele de rato apresenta uma diferença importante em relação à humana que é a ausência de um limite definido entre derme papilar e reticular. Além disso, não apresenta tecido adiposo subcutâneo nem tela muscular subcutânea (SANTOS et al., 2006).

Apesar das diferenças acentuadas entre a pele humana e a do rato, a sequência têmporo-espacial do processo de inflamação/cicatrização das feridas cutâneas é a mesma em ambos, evidenciando etapas características como: inflamatória, proliferativa e de maturação (CORSI et al., 1994).

2.3 Tipos de feridas

Ferida pode ser definida como o resultado de ilimitada variedade de injúrias traumáticas, isquêmicas, cirúrgicas ou pressóricas que agridem a estrutura histo-fisiológica do tecido tegumentar (TAYAR; PETERLINE; PEDREIRA, 2007).

De acordo com Pereira (2006), as feridas podem ser classificadas em agudas, quando há ruptura da vascularização e imediato desencadeamento do processo de hemostasia com respostas vasculares e exsudativas, e crônicas quando há desvio no processo de cicatrização sendo caracterizada por resposta mais proliferativa do que exsudativa.

Um fator relevante na lesão epitelial é a profundidade da ferida, classificada como ferida superficial (envolvendo somente a epiderme), ferida com perda parcial (envolvendo a epiderme e porção superior da derme), e a perda total, com destruição da epiderme, derme, tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e osso (SANTOS, 2000).

2.4 Processos de cicatrização

Pesquisas na área da Biologia Celular e Molecular têm ampliado o conhecimento das etapas de cicatrização, que são: fase inflamatória (0-4 dias), fase proliferativa (3-14 dias) e fase de maturação que corresponde a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e regressão epitelial (GONÇALVES-FILHO et al., 2006).

Na fase inflamatória o estímulo que deflagra o processo de cicatrização é a lesão do endotélio vascular, com exposição de fibras subendoteliais de colágeno que promovem agregação e ativação plaquetária. O contato entre colágeno e plaquetas assim como a presença de trombina, fibronectina e seus fragmentos, resultam na liberação de citocinas e fatores do crescimento. O coágulo de fibrina formado localmente funciona como molde para as células, como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais. A ativação destes elementos celulares tem implicações fundamentais em vários aspectos da cicatrização das feridas, como debridamento, síntese do óxido nítrico e angiogênese (FERREIRA et al., 2006).

As principais células do processo de reparo são mastócitos, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos T, macrófagos fibroblastos e células endoteliais, que migram até o local da lesão pela corrente sanguínea, numa sequência organizada (BAGIO, 2009). A inflamação tem início logo após a lesão, sendo uma resposta natural do organismo ao trauma. Nesta fase o infiltrado inflamatório é composto por neutrófilos, que são os primeiros a migrarem para a área da lesão, neutralizando irritantes químicos e eliminando partículas estranhas. Logo após este período o infiltrado passa a ser composto por macrófagos que exercem a fagocitose sobre os agentes agressores e promove a morte dos microrganismos (RABELO, 2003).

A transmigração dos neutrófilos para a área lesionada é um fenômeno precoce do processo de reparo, ocorre quase que de imediato após sinalização dos neutrófilos retidos pelo coágulo, macrófagos residentes e células estromais (BALBINO; PEREIRA e CURI, 2005).

De acordo com Bennett e Schultz (1993) e Klein et al. (2002), o TGF- β , liberado pelos α -grânulos plaquetários, tem papel importante no recrutamento de macrófagos e fibroblastos e na estimulação da produção de colágeno. Os macrófagos participam ativamente na fase inflamatória, através do debridamento tecidual mediante fagocitose promovendo o clareamento da ferida e liberação de citocinas que estimulam a angiogênese e formação tecidual (CAETANO, 2008).

Ainda na fase inflamatória, os monócitos se transformam em macrófagos ativados que são as principais células efetoras do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Além desse papel na fagocitose de

fragmentos celulares, os macrófagos secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos. Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF), o Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β), o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

Na fase proliferativa ocorre a neoangiogênese, síntese de colágeno pelos fibroblastos e intensa migração celular promovendo a reepitelização. A matriz extracelular começa a ser substituída por tecido conjuntivo mais forte e elástico. No final desta etapa o leito da ferida estará preenchido por tecido de granulação (HATANAKA; CURI, 2007).

A última fase da cicatrização é marcada pela maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo depósito de proteoglicanas e colágeno. Com o processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local mediante emigração, apoptose e outros mecanismos de morte celular (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

Para propiciar e acelerar o processo de cicatrização utilizam-se coberturas, que se caracterizam como meios terapêuticos aplicados a uma ferida previamente limpa, cujo objetivo principal é a eliminação de fatores negativos que possam retardar a cicatrização. Os curativos podem ser subdivididos em primários, aqueles colocados diretamente sobre a ferida e na pele adjacente, e secundários quando instalados sobre o curativo primário (TAYAR; PETERLINI; PEDREIRA, 2007).

2.5 Plasma Rico em Plaquetas

Os primeiros trabalhos sobre o PRP datam das décadas de 1970 e 1980 quando foi largamente aplicado nos processos de cicatrização de úlceras de compressão e de grandes áreas expostas (UEBEL, 2006). O uso do PRP em procedimentos cirúrgicos teve início em 1997, com Whitman et al., em cirurgias

bucomaxilofaciais como uma alternativa a cola de fibrina por ser de origem autóloga e possuir fatores de crescimento. Em 1998, Marx et al. aprofundaram os estudos em reconstruções mandibulares observando um amadurecimento mais rápido do enxerto quando associado ao PRP.

O PRP é obtido através da centrifugação do sangue autógeno, resultando em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e fatores de crescimento (VENDRAMIN et al., 2006). Este componente pode ser obtido mediante uma (MACEDO, 2004; MESSORA et al., 2009) ou duas centrifugações (VENDRAMIN et al., 2006; CARMONA, 2006; BARBOSA et al., 2008).

A centrifugação única consiste em submeter o sangue à rotação de 5600rpm, durante seis minutos, ao final do que haverá a formação de três frações. A fração superior conterá o plasma pobre em plaquetas (PPP), a fração mediana o PRP e a fração inferior os eritrócitos. A fração superior contendo o PPP deve ser descartada. A fração mediana, rica em plaquetas, deve ser separada, juntamente com 1 a 2mm da fração inferior, para ser utilizada na região óssea a ser implantada (CAMARGO et al., 2002).

A centrifugação repetida em duas etapas foi utilizada por Oyama et al. (2004) com resultados igualmente positivos. O sangue colhido é centrifugado por 20 minutos e o plasma sobrenadante resultante, juntamente com 6mm da fração vermelha, é centrifugado a 400 rpm por 15 minutos. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante de coloração amarela é descartado, e o material resultante é utilizado para o enxerto.

De acordo com Carmona et al. (2006), a ativação das plaquetas pode ser realizada por agentes fisiológicos (trombina, tromboxano, fator ativador de plaquetas, ADP, colágeno, serotonina e epinefrina) e farmacológicos, como o cloreto de cálcio e os análogos de endoperóxido cíclico. Após a centrifugação, deve-se adicionar 0,3ml de gluconato de cálcio a 10%, para cada mililitro de plasma, e depois levar ao banho-maria por 15 minutos para a obtenção do gel que deverá ser colocado sobre a ferida cirúrgica (VENDRAMIN et al., 2006).

Segundo Vendrusculo et al. (2012), o PRP pode ser obtido basicamente por três técnicas: do tubo (manual), centrifugação (semiautomática) e por aférese (automática), variando o custo, facilidade de preparação, o volume de sangue necessário e a concentração de plaquetas obtida. No primeiro os custos são mínimos, o volume utilizado é pequeno e o PRP é facilmente obtido,

mas com pequena concentração de plaquetas. Na centrifugação os custos são baixos, porém é necessária a aquisição de uma centrífuga. O volume necessário é pequeno e também é de fácil obtenção, resultando em maior concentração de plaquetas. O último método é caro, pois são necessários equipamentos e “kits” específicos, o volume de sangue necessário é grande, porém se obtém altas concentrações plaquetárias e maior volume de PRP.

Whitman; Berry; Green (1997) descreveram um protocolo de obtenção do gel de PRP em substituição a cola de fibrina. Estes autores avaliaram o uso do PRP em várias cirurgias tais como reconstruções mandibulares, fissuras alveolares, fístulas oronasais e implantes osseointegrados. Anitua (1999) descreveu o protocolo de obtenção do gel de PRP em humanos, onde o gel foi aplicado a retalhos gengivais associados a enxertos ósseos ou não. Nas análises clínicas e histológicas concluiu-se que o PRP promoveu melhora na cicatrização em todos os pacientes quando comparados ao controle.

2.6 Utilização do PRP em feridas

Henderson et al. (2003) avaliaram o uso do gel de PRP em feridas causadas por queimaduras em suínos e os resultados obtidos demonstraram que o gel de PRP não acelerou a reepitelização, mas induziu uma resposta inflamatória intensa promovendo um espessamento do tecido de granulação. Mazzuco et al. (2004) verificaram que o gel de PRP acelera a cicatrização em feridas crônicas.

Uebel (2006) analisou a eficácia do PRP no aumento da integração e crescimento dos microimplantes capilares na cirurgia da calvície masculina, concluindo que nos microimplantes banhados no PRP houve aumento do número de folículos e conseqüentemente maior densidade capilar quando comparados aos microimplantes do tipo padrão.

Wilson; Barbieri; Mazzere (2006) investigaram o uso de PRP em defeitos ósseos em coelhos e concluíram que no grupo tratado com o PRP houve melhor cicatrização e adiantamento de fase de remodelamento. Barbosa et al. (2008) utilizaram o gel de PRP em fraturas em cães e através de análises radiográficas notaram que o PRP, associado ao enxerto ou isolado, apresentou precocidade e uniformidade de radiopacidade.

Rossi Júnior et al. (2008) examinaram a utilização de PRP em enxertos

ósseos para reparação de defeitos ósseos e observaram que o PRP foi um auxiliar importante e seguro nas cirurgias de enxertos maxilares.

Fresno et al. (2009) avaliaram a uso de PRP em enteroanastomose experimentais em suínos e notaram que no grupo tratado com PRP houve aumento de tecido fibroso e de granulação, e que isto poderia proporcionar melhor resistência na ferida.

Rezende et al. (2007) avaliou o uso de PRP em úlceras tróficas corneanas não responsiva aos tratamentos convencionais e afirmaram que o PRP reduziu o sangramento, a inflamação, a escarificação, o tempo de cicatrização e de fechamento das úlceras.

Scalfani et al. (2005) e Chandra et al. (2007), após estudarem a ação do PRP em feridas cutâneas em coelhos, demonstraram que o PRP acelerou a cicatrização tecidual e aumentou a resposta inflamatória nos locais tratados. DeRossi et al. (2009) estudaram o uso de PRP na cicatrização de feridas em equinos e verificaram que o seu uso acelerou em quatro vezes a reparação tecidual em relação ao grupo controle.

Crovetti et al. (2004) avaliaram o efeito do PRP em úlceras cutâneas crônicas chegando a conclusão que o PRP promoveu melhora e benefícios no tratamento de feridas cutâneas crônicas. Vendramin et al. (2006), ao utilizarem o PRP em cicatrização de feridas, observaram uma diminuição mais rápida no tamanho da lesão, bem como o desenvolvimento de um tecido de granulação de melhor qualidade, com uma vascularização mais intensa. Em casos de enxertos cutâneos, as regiões doadoras de pele que receberam curativo com PRP mostraram-se menos doloridas á primeira troca e com reepitelização da ferida mais rápida.

Pallua; Wolter; Markowicz (2009) avaliaram o uso de PRP em queimaduras e concluíram que o PRP pode promover algum grau de melhora em lesões agudas e crônicas, estimulando a cicatrização dérmica e aumentando a taxa de aderência em enxertos cutâneos

Maia et al. (2009) induziram tendinite através da collagenase em ambos os membros anteriores de seis equinos e trataram com PRP ou solução salina. Após avaliação histológica eles observaram que o grupo tratado com PRP apresentava o tendão flexor digital superficial mais organizado, com fibras de colágeno e fibroblastos melhor arranjados na matriz tendínea.

Dionyssious et al. (2012) avaliaram o efeito da aplicação intralesional de

PRP em úlceras crônicas e verificaram que o PRP tem efeito positivo no processo de cura, acelerando a taxa de cicatrização de feridas, com diminuição dos elementos da inflamação aguda, da dor local e infecção, presença intensa de fibroblastos e melhor organização das fibras colágenas.

De acordo com Dinato et al. (2001) e Everts et al. (2006), o PRP atua na modulação e aceleração dos processos cicatriciais, sendo esses efeitos decorrentes dos fatores de crescimento contidos nos alfa grânulos plaquetários. Dentre estes fatores, destacam-se o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) e citocinas, que agem sinergicamente, estimulando a angiogênese, melhorando o acesso de células inflamatórias para a área de lesão, assim modulando a resposta inflamatória e reparação tecidual.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Constitui-se proposição do presente trabalho:

- avaliar a eficácia do PRP na cura de tecido e no processo inflamatório de feridas induzidas na pele de ratos;
- analisar os diferentes padrões da resposta inflamatória e
- caracterizar o infiltrado inflamatório predominante nas feridas cirúrgicas nas condições propostas.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Animal Integrativa do Instituto de Ciências Biomédicas da Unifal-MG, após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unifal-MG, com o registro n.º 404/2012 (ANEXO A).

4.1 Obtenção dos animais

Foram utilizados 40 ratos albinos Wistar, machos, com peso corporal em média de 360 gramas e idade aproximada de cem dias, provenientes do Biotério Central da Unifal-MG. Durante o período experimental os animais foram mantidos no Laboratório de Biologia Animal Integrativa e alojados em gaiolas, com 5 animais em cada, com água e ração *ad libitum*, em um ambiente com ciclos de claro/escuro de 12 horas (12h com luz e 12h escuro) e boa ventilação. Após um período de adaptação de 10 dias, os animais foram então submetidos aos procedimentos experimentais.

4.2 Preparação do PRP

Foram escolhidos 4 animais aleatoriamente que foram utilizados como doadores de sangue. Estes animais foram anestesiados com Cetamin® , Syntec, São Paulo, Brasil,(30mg/kg de peso) e Anasedan®, Univet S.A, São Paulo, Brasil (6mg/kg de peso), por via intraperitoneal, o ventrículo esquerdo foi perfurado para a coleta de sangue intracardíaco. Para a obtenção do PRP, utilizou-se da técnica adaptada por VENDRAMIN et al. (2006). Foram coletados 3 ml de sangue que foi distribuído em tubos hermeticamente fechados contendo citrato de sódio 3,8% como anticoagulante. Os tubos foram centrifugados em centrífuga padrão, primeiramente por 10 minutos a 2400 rpm para a produção do plasma pobre em plaquetas. Este, por sua vez, foi submetido a uma segunda centrifugação por mais 15 minutos a 3600 rpm para originar o sobrenadante plasma rico em plaquetas. Para cada volume de solução contendo o PRP, foi misturada uma solução de mesmo volume contendo cloreto de cálcio a 10%. Os tubos foram então colocados em banho-maria a 37°C ate formar um gel. Este protocolo foi realizado momentos antes

de ser utilizado.

4.3 Protocolo para indução da ferida e aplicação do PRP

Os animais foram anestesiados com uma associação de com Cetamin® , Syntec, São Paulo, Brasil,(30mg/kg de peso) e Anasedan®, Univet S.A, São Paulo, Brasil (6mg/kg de peso), na mesma seringa, por via intraperitoneal. Em seguida, foram submetidos a uma tricotomia manual na região mediana dorsal, seguindo-se uma antissepsia com solução de PVPI a 10% (Figura 1).

Duas feridas foram feitas, no mesmo animal, na região mediana dorsal, com um punch de 6mm, tomando-se cuidado para que a distância entre elas não fosse menor que 2 cm. Nada foi aplicado a ferida do lado esquerdo sendo preenchida apenas com o coágulo (Grupo Controle), enquanto que na outra, após retirar o excesso de coágulo, aplicou-se o PRP (Grupo Experimental) (Figuras 1 e 2).

Após este procedimento, único, os animais receberam 0,1ml de Finador® e foram mantidos em gaiolas individualizadas, com ração e água *ad libidum* em um ambiente com ciclos de claro/escuro de 12 horas (12h com luz e 12 h escuro) e boa ventilação. Os mesmos foram monitorados sobre qualquer sinal de infecção ou desconforto durante o pré e pós-operatório até a eutanásia.



Figura 1: Indução da lesão utilizando-se um punch após tricotomia e antissepsia com PVPI na região mediana dorsal

Fonte: Do autor



Figura 2: Feridas cirúrgicas realizadas no dorso dos animais. O PRP foi sempre aplicado na ferida do lado direito (seta)
Fonte: Do autor

4.4 Obtenção das lâminas

Os animais foram eutanasiados com doses excessivas de Cetamin® , Syntec, São Paulo, Brasil e Anasedan®, Univet S.A, São Paulo, Brasil em quatro períodos diferentes: no 2º dia (nove animais), no 4º dia (nove animais), no 7º dia (nove animais) e no 14º dia (nove animais) do pós- operatório. Foi retirado um fragmento de tamanho superior ao da área da ferida, obtendo-se assim, amostras de tecido lesado e normal. Este material foi fixado em formaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4 0,1M por 24 horas, a 4°C. Em seguida o material foi lavado em água destilada abundante, desidratados em uma bateria de graduação crescente de etanol (70%, 90%, 95%, 100%), diafanizados em xilol e embebidos em parafina para microtomia semi-seriada (1:5) em 5 micrometros de espessura. Os cortes histológicos foram montados em lâminas revestidas com poli-L-lisina a

10% e submetidos as colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação histopatológica.

4.5 Análise microscópica

Os cortes histológicos foram observados em microscopia de luz, sendo os resultados expressos em diferentes graus, utilizando-se para tal os seguintes parâmetros: presença de epitélio, crosta, pseudomembrana, grau de queratinização, tecido de granulação, anexos, fibrose, vasodilatação e hiperemia, intensidade e localização do infiltrado inflamatório e as células inflamatórias.

A análise microscópica foi realizada por dois examinadores (o pesquisador responsável pelo trabalho e o docente orientador), sem o conhecimento prévio dos dados cirúrgicos, utilizando-se um microscópio óptico binocular (AxioLab- Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) contendo uma lente objetiva N-Achroplan de 40X/0,65, resultando num aumento final de 400X. Os pontos de discordância, quando existentes, foram reavaliados e estabelecidos por um consenso dos referidos examinadores. As estruturas analisadas foram anotadas em formulário próprio (ANEXO B) e posteriormente transferidas para um banco de dados numa planilha eletrônica do Microsoft Excel.

4.6 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizado o Teste Exato de Fisher para comparação das variáveis entre os grupos experimental e controle. Foi adotado nível de significância de 5%, ou seja, os dados foram estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise macroscópica

A análise macroscópica das feridas nos primeiros dias após as cirurgias revelou que os diâmetros das mesmas, quando aplicado o PRP, se mostravam bem reduzidos em relação ao grupo controle. Embora em ambos os grupos tenha sido observada a cicatrização das feridas, no grupo PRP este processo ocorreu mais rapidamente, como ilustrado na Figura 3.

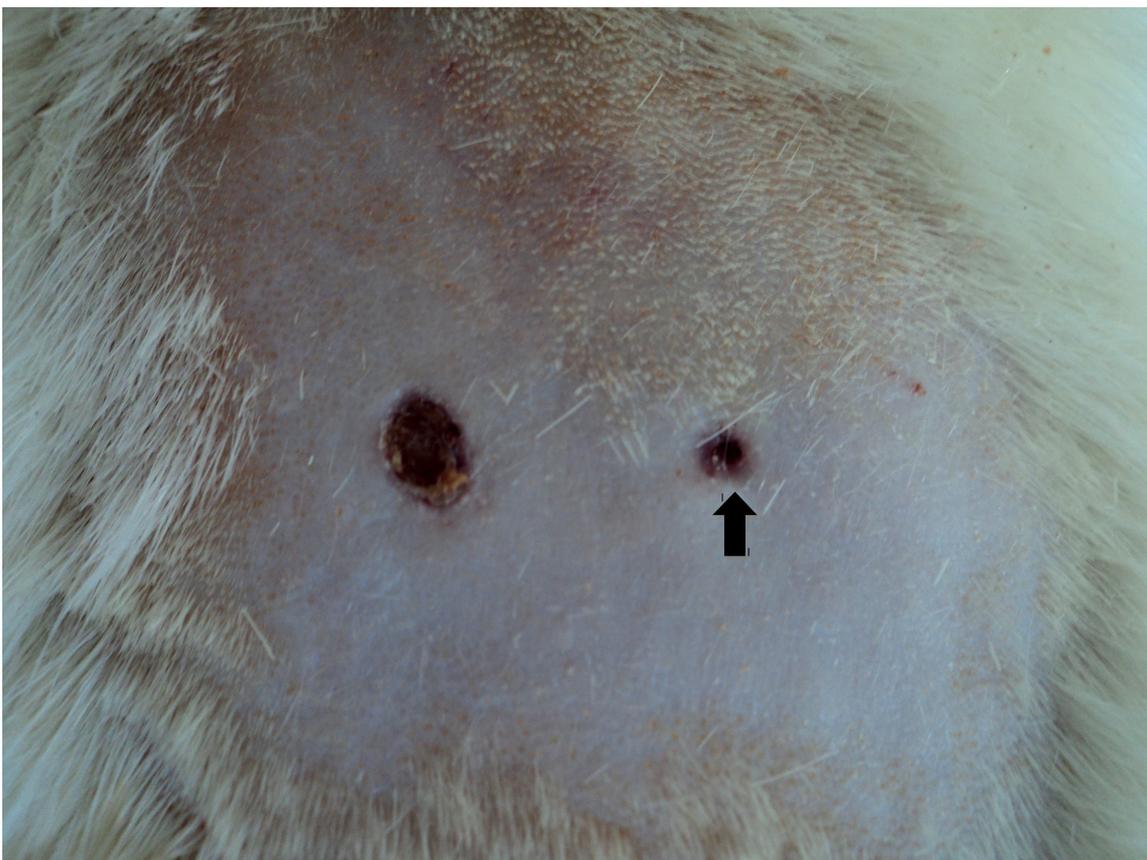


Figura 3: Aspecto cicatricial observado no sétimo dia após a cirurgia. A ferida em que foi aplicado o PRP apresentava menor diâmetro nesta ocasião (seta)
Fonte: Do autor

As feridas cirúrgicas evoluíram bem, sem sinais de infecção ou deiscência em todos os animais dos quatro grupos. A cicatrização foi completa, sendo possível observar o crescimento de pêlos na região cirúrgica, tendo sido difícil verificar o local do procedimento nos animais sacrificados com 14 dias.

5.2 Análise microscópica

A análise microscópica dos dois grupos no segundo dia pós-cirurgia demonstrou que, no Grupo PRP, a área da lesão apresentava-se menor em relação ao controle, confirmando assim o que foi verificado na análise macroscópica.

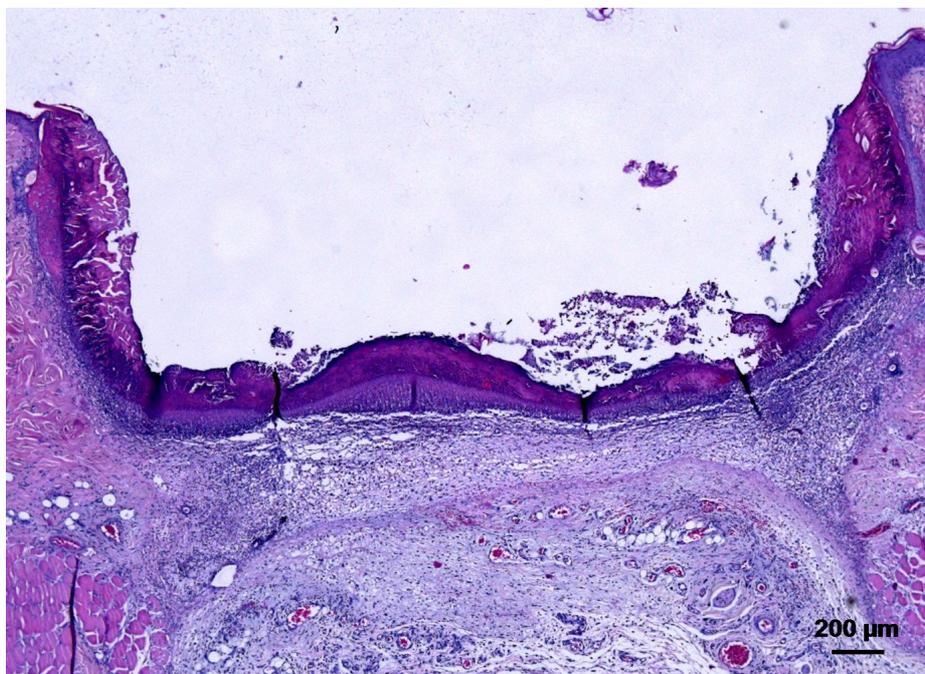


Figura 4: Fotomicrografia ilustrando a ferida cirúrgica de um animal do grupo controle. Notar a acentuada profundidade da ferida e o distanciamento das margens (H.E.)
Fonte: Do autor

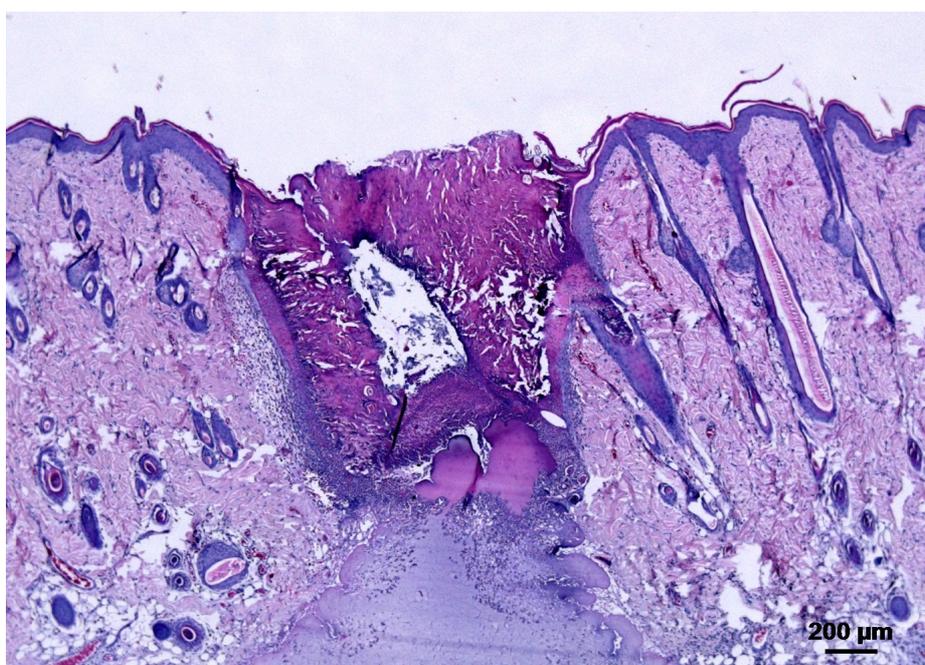


Figura 5: Fotomicrografia ilustrando a ferida cirúrgica de um animal em que foi administrado o PRP. Observa-se redução na profundidade e extensão da ferida cirúrgica (H.E.)
Fonte: Do autor

Em ambos os grupos observou-se ausência de epitélio na região lesionada, com presença de pseudomembrana serofibrinosa e crosta (Figuras 6 e 7).

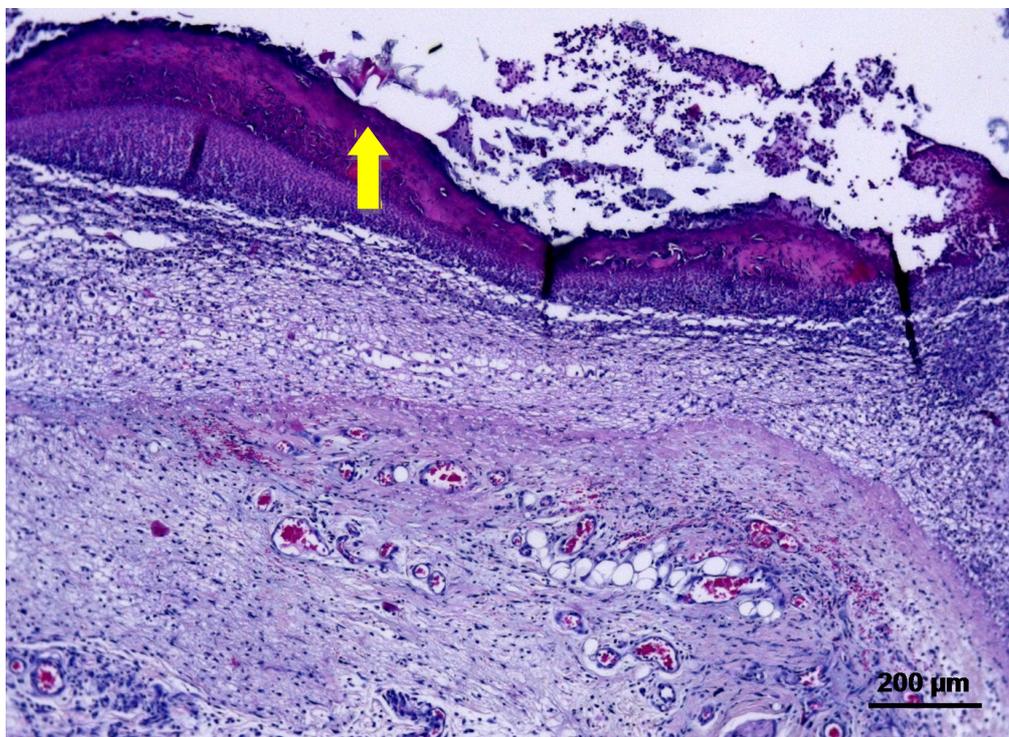


Figura 6: Nesta imagem verifica-se a presença de crosta superficial e, subjacente, pseudomembrana serofibrinosa (seta) revestindo a ferida cirúrgica dois dias após a realização do experimento no grupo controle (H.E.)

Fonte: Do autor

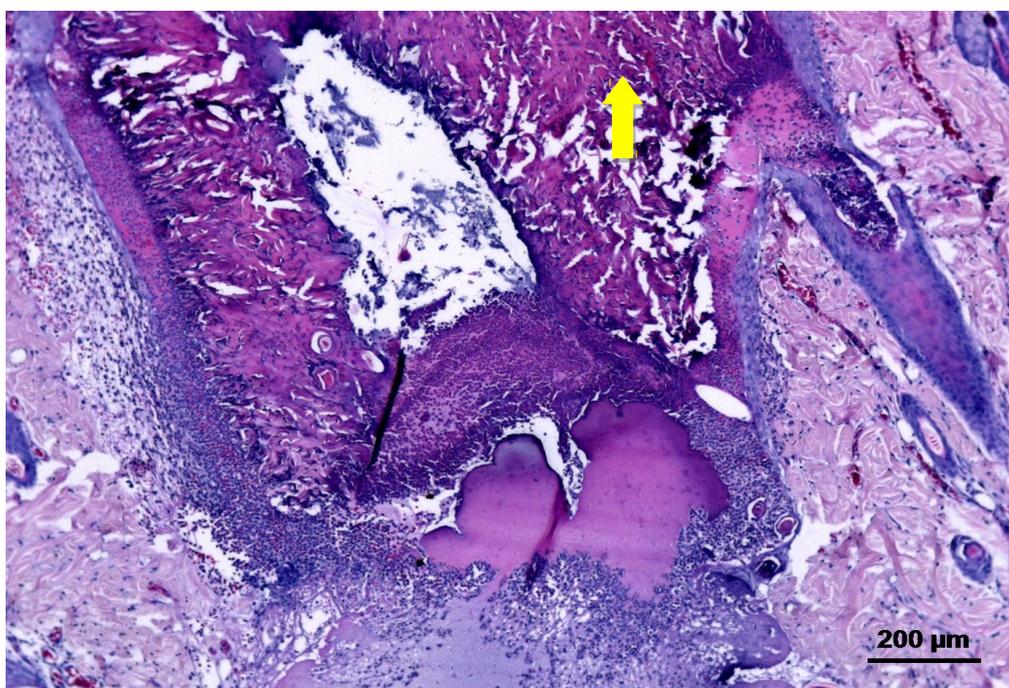


Figura 7: No grupo PRP, verificou-se também a presença de uma crosta espessa acompanhada de pseudomembrana (seta) aos dois dias após a cirurgia (H.E.)

Fonte: Do autor

Na região da derme, nos dois grupos observamos infiltrado inflamatório distribuído difusamente e intenso, com predomínio de polimorfonucleares (seta) (Figuras 8 e 9).

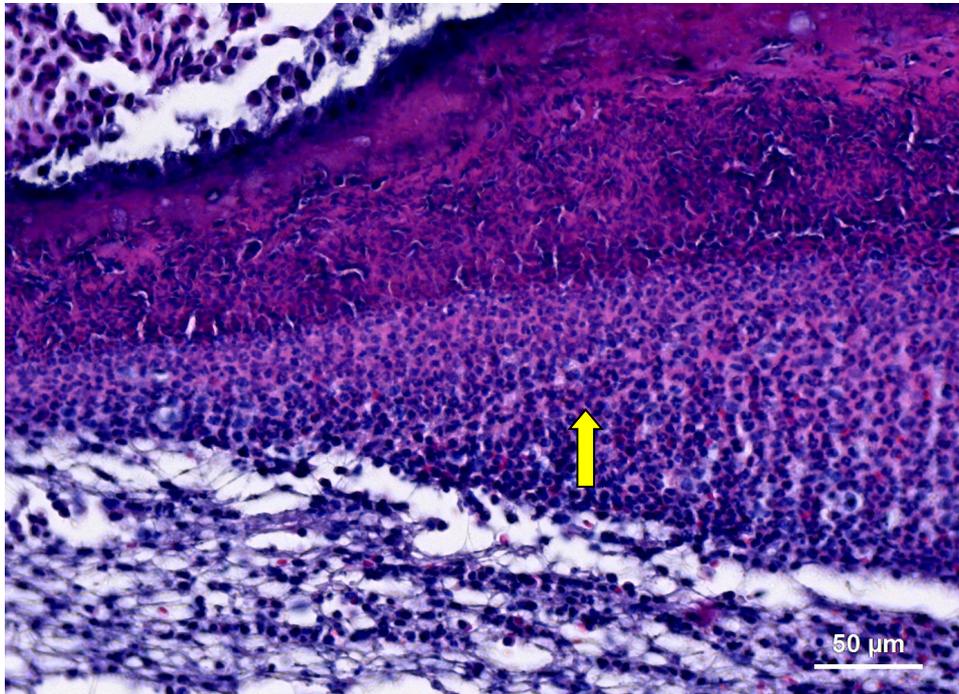


Figura 8: No grupo controle, o infiltrado inflamatório era intenso e constituído predominantemente de polimormonucleares (seta) (H.E.)
Fonte: Do autor

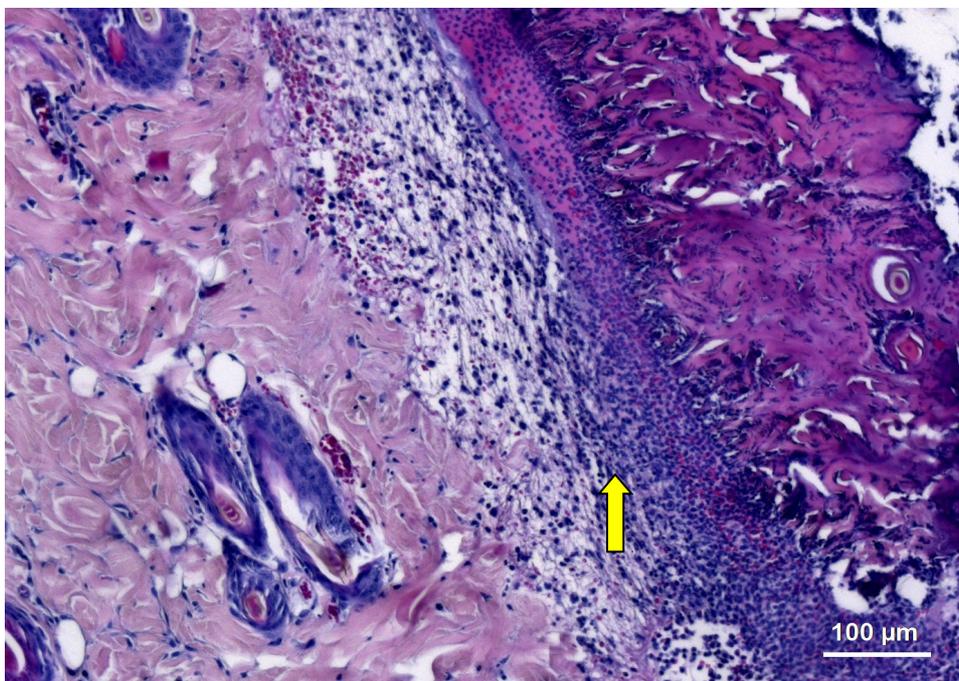


Figura 9: No grupo PRP, a ferida cirúrgica apresentava aos dois dias um infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta) porém de menor intensidade (seta) (H.E.)
Fonte: Do autor

No quarto dia pós-cirurgia, nos dois grupos, as feridas apresentavam-se recobertas por uma pseudomembrana serofibrinosa e por crosta de menor espessura. O infiltrado inflamatório era de intensidade moderada (Figuras 10 a 13).

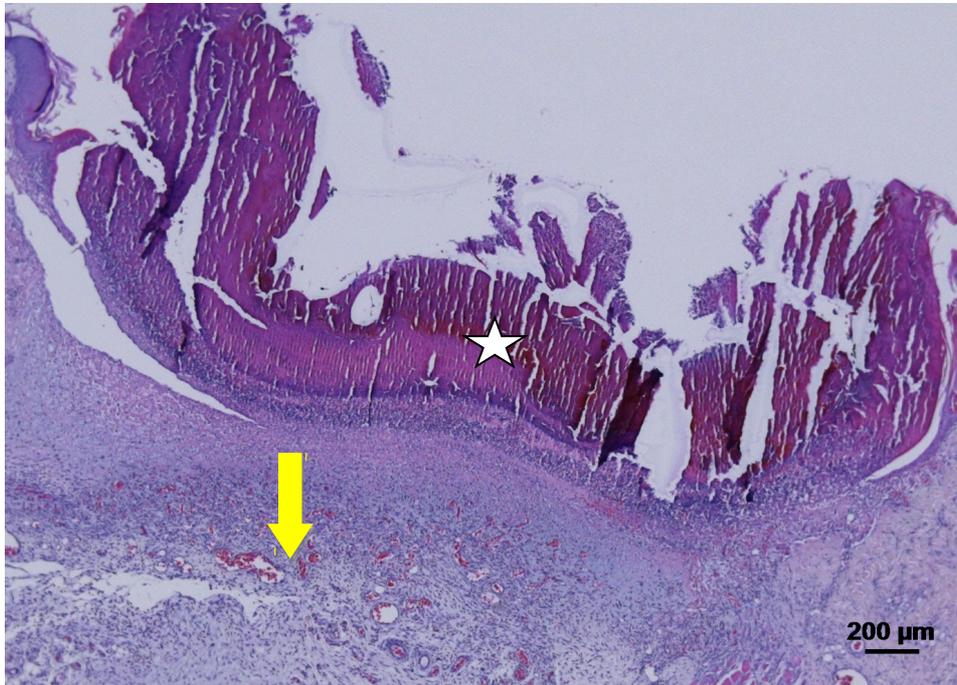


Figura 10: O grupo controle apresentou um maior número de vasos sanguíneos na derme e maioria destes se mostrava com hiperemia (seta). Aos quatro dias, a pseudomembrana também era menos espessa (estrela) (H.E.)
Fonte: Do autor

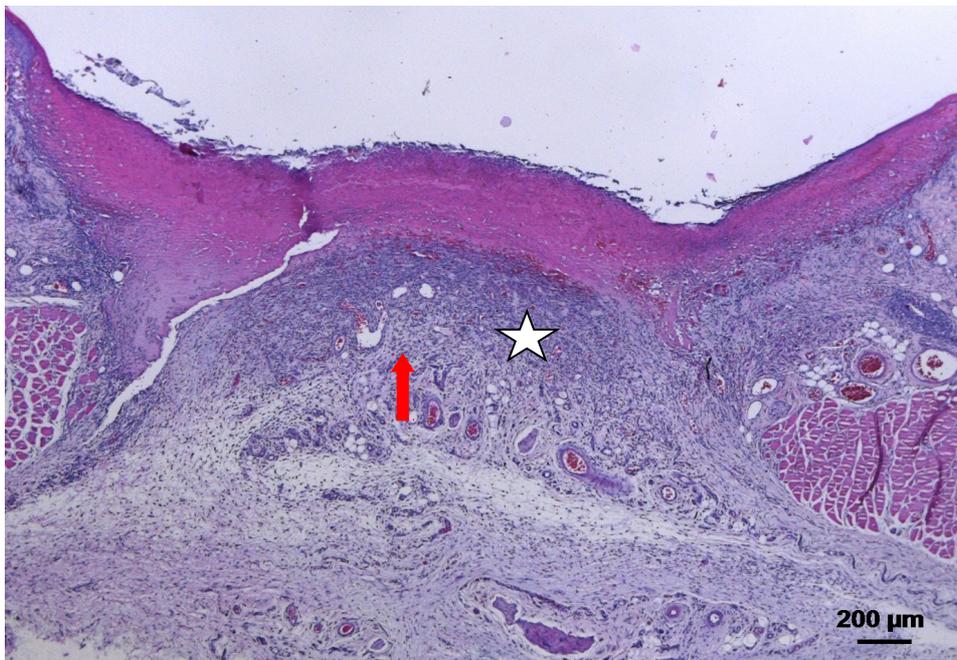


Figura 11: No grupo PRP, a ferida cirúrgica apresentava aos quatro dias um infiltrado inflamatório menos intenso (estrela) e o tecido conjuntivo apresentava um menor número de vasos sanguíneos hiperêmicos (seta) (H.E.)
Fonte: Do autor

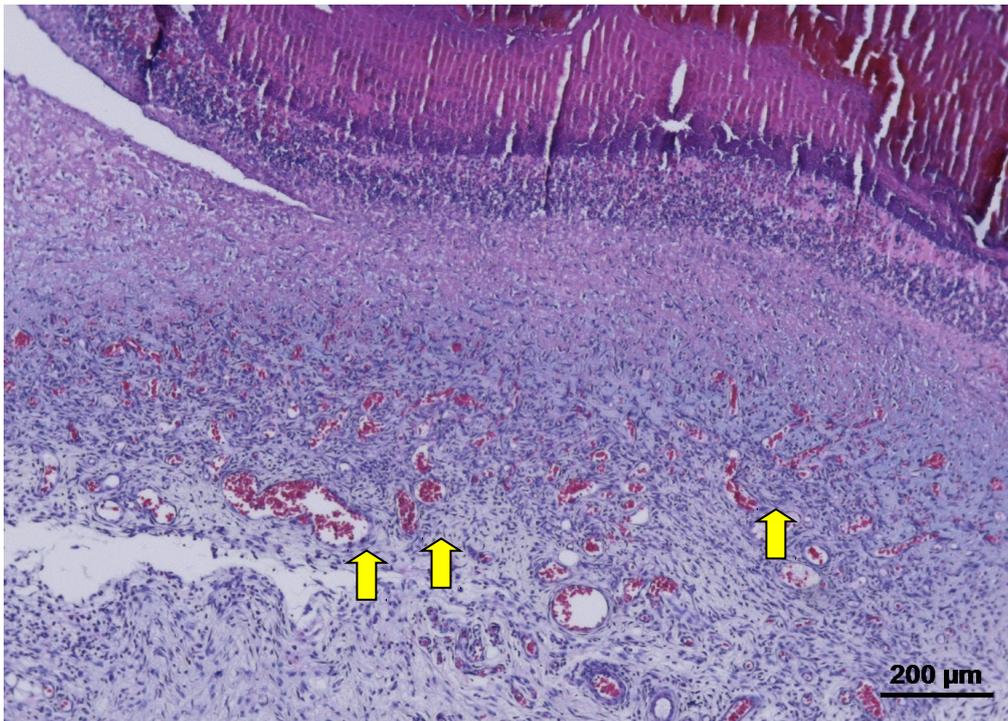


Figura 12: Nesta imagem notamos que o tecido conjuntivo apresentava um grande número de vasos sanguíneos hiperêmicos (seta) aos quatro dias no grupo controle (H.E.)
Fonte: Do autor

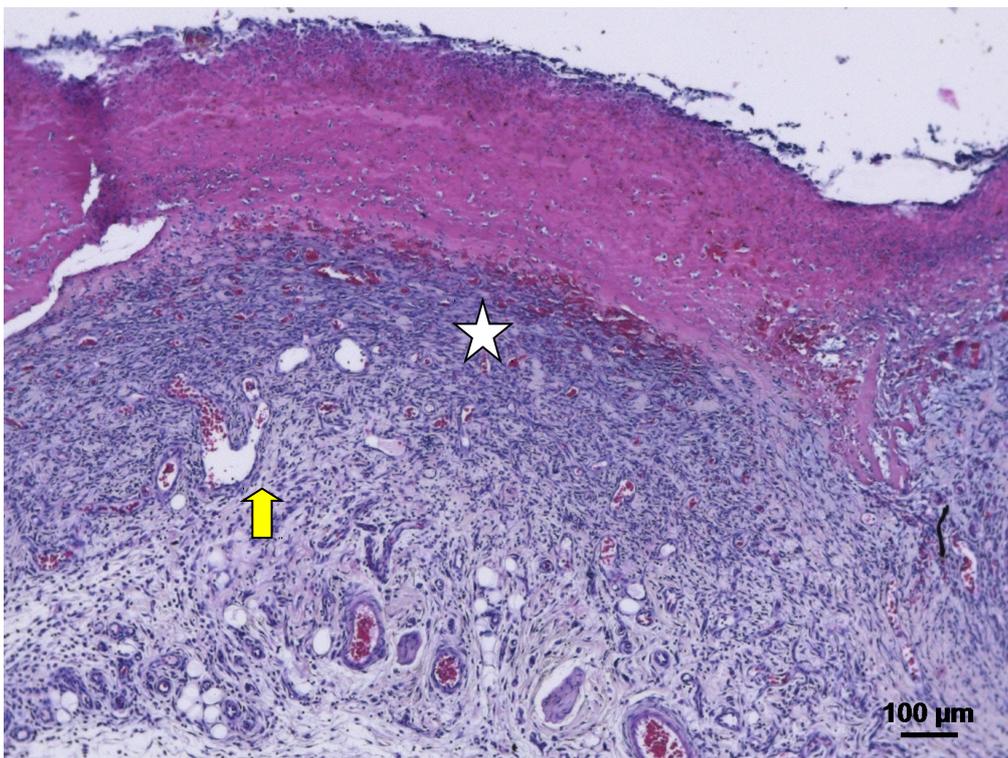


Figura 13: No grupo PRP, a ferida cirúrgica apresentava aos quatro dias uma redução do infiltrado inflamatório polimorfonuclear (estrela), os vasos sanguíneos eram de menor espessura e apresentavam hiperemia discreta (seta) (H.E.)
Fonte: Do autor

A derme reticular apresentava, aos quatro dias, tecido de granulação imaturo, constituído predominantemente por finas fibras colágenas e vasos sanguíneos (Figuras 14 e 15).

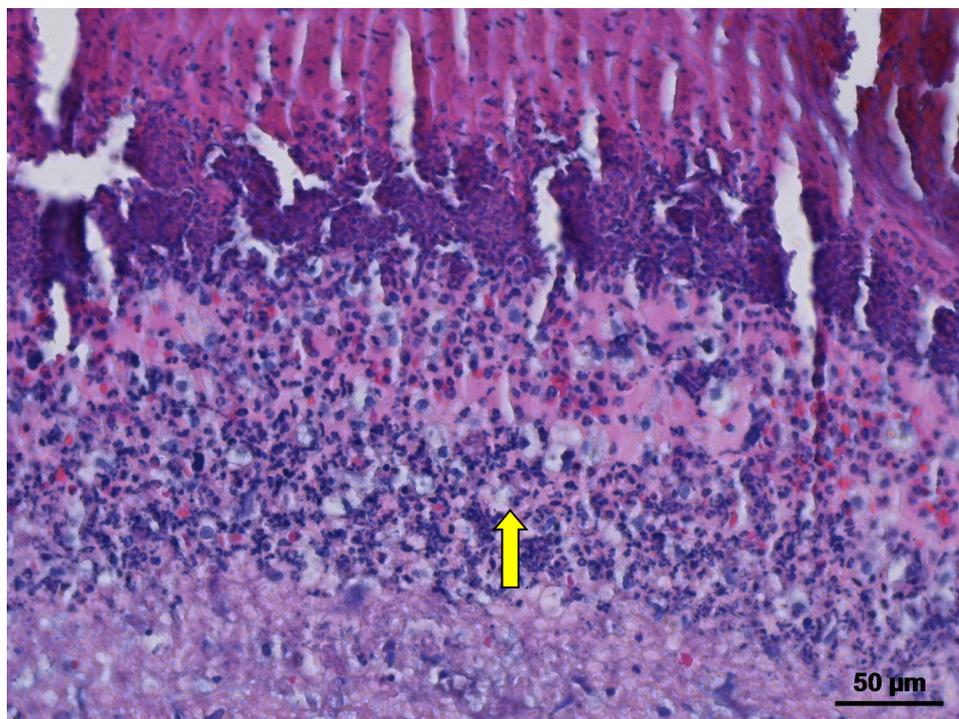


Figura 14: No grupo controle, o infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta) ainda estava presente, porém com intensidade discreta, após quatro dias da cirurgia (H.E.)
Fonte: Do autor

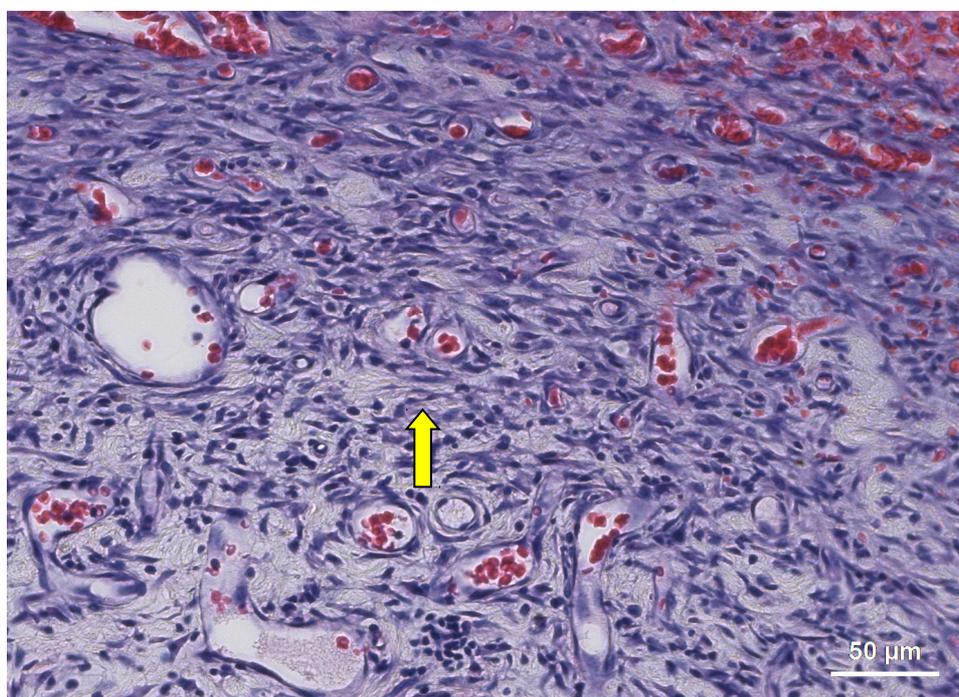


Figura 15: Aos quatro dias de pós-cirúrgico já foi possível identificar a formação de tecido de granulação imaturo (seta) em animais do grupo PRP (H.E.)
Fonte: Do autor

Após sete dias, em ambos os grupos estudados, observou-se uma epiderme hiperplásica queratinizada (seta) recobrendo toda a área da ferida (Figuras 16 e 17).

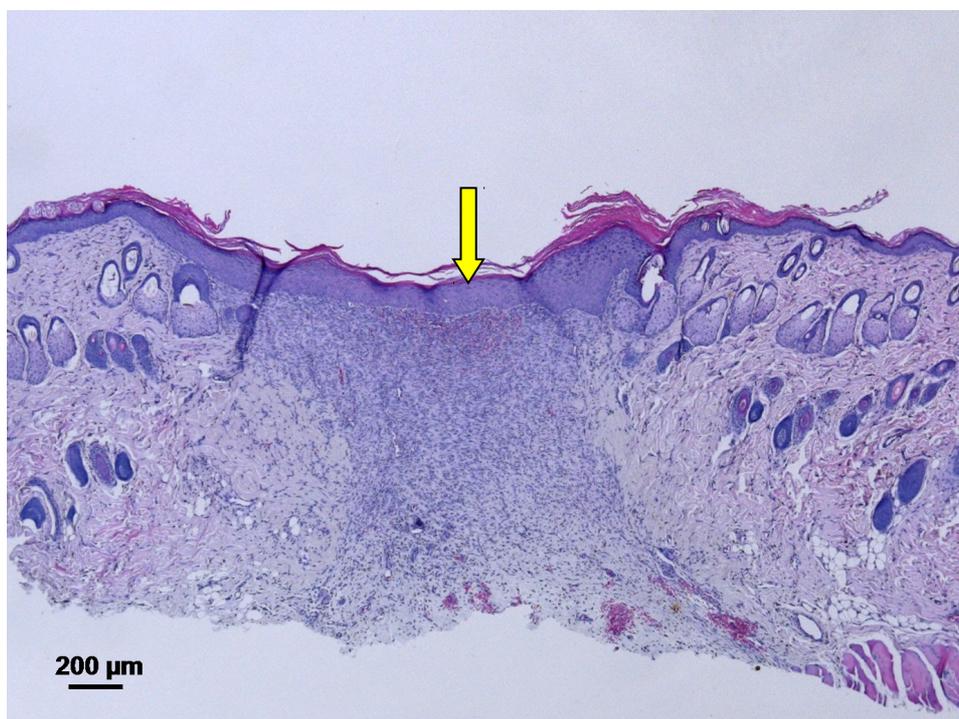


Figura 16: Epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado (seta) recobrendo toda a extensão da ferida cirúrgica de um animal do grupo controle aos sete dias (H.E.)
Fonte: Do autor

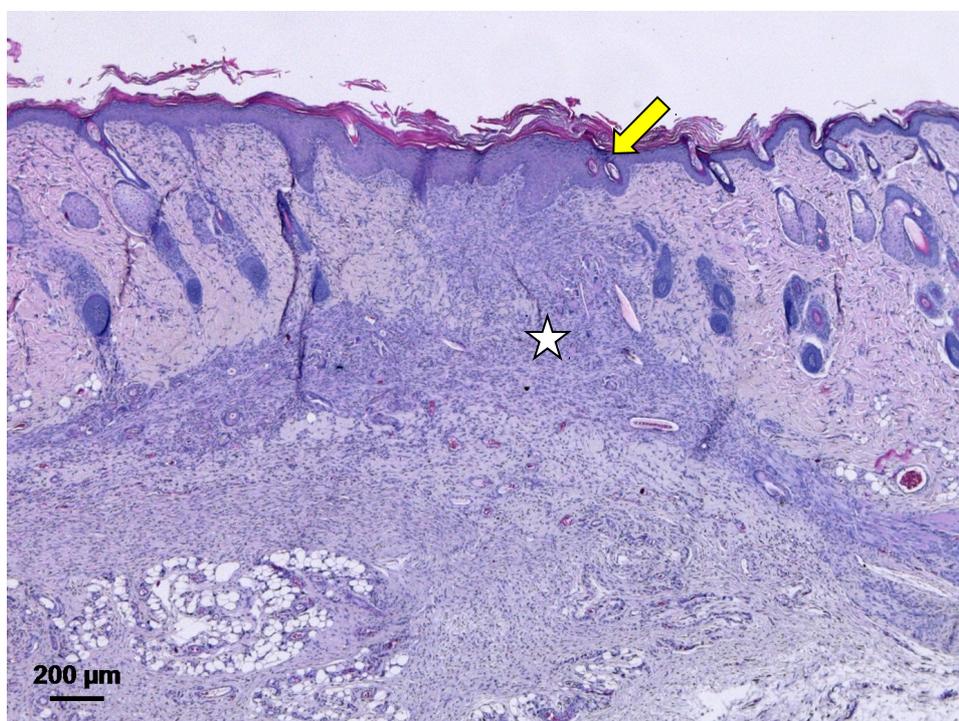


Figura 17: No grupo PRP, aos sete dias, o epitélio se mostrava hiperplásico (seta) e, no conjuntivo, o tecido de granulação (estrela) apresentava-se numa menor extensão (H.E.)
Fonte: Do autor

Em ambos os grupos experimentais, após sete dias da cirurgia, notamos a presença de infiltrado celular discreto e difuso (seta) formado predominantemente por linfócitos, macrófagos e, ocasionalmente, células gigantes multinucleadas. O tecido conjuntivo apresentava-se com inúmeros fibroblastos e um número reduzido de fibras colágenas (estrela) (Figura 18).

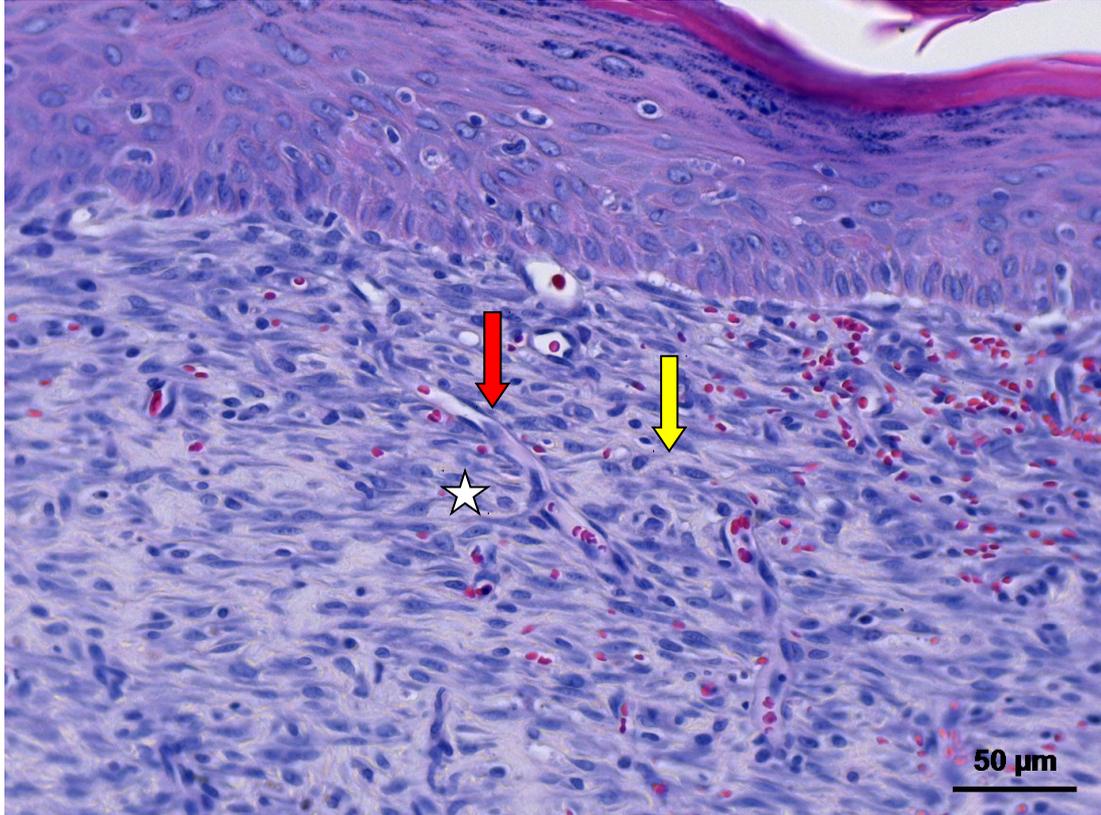


Figura 18: Grupo controle mostrando epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado com as suas camadas bem distintas e, no tecido conjuntivo, a presença de um discreto infiltrado inflamatório mononuclear (seta amarela) e o número reduzido de vasos sanguíneos (seta vermelha). Observa-se também um grande número de fibroblastos e fibras colágenas em menor quantidade aos sete dias (estrela) (H.E.)

Fonte: Do autor

No último dia analisado observamos que na região da lesão os dois grupos estão recobertos por uma epiderme íntegra queratinizada. Na derme, no grupo tratado o tecido de granulação estava mais rico em fibroblastos e as fibras colágenas estavam melhor organizadas se comparadas ao controle, embora os resultados estejam próximos. O grupo controle exibiu maior quantidade de vasos sanguíneos se comparados ao grupo PRP (Figura 19).

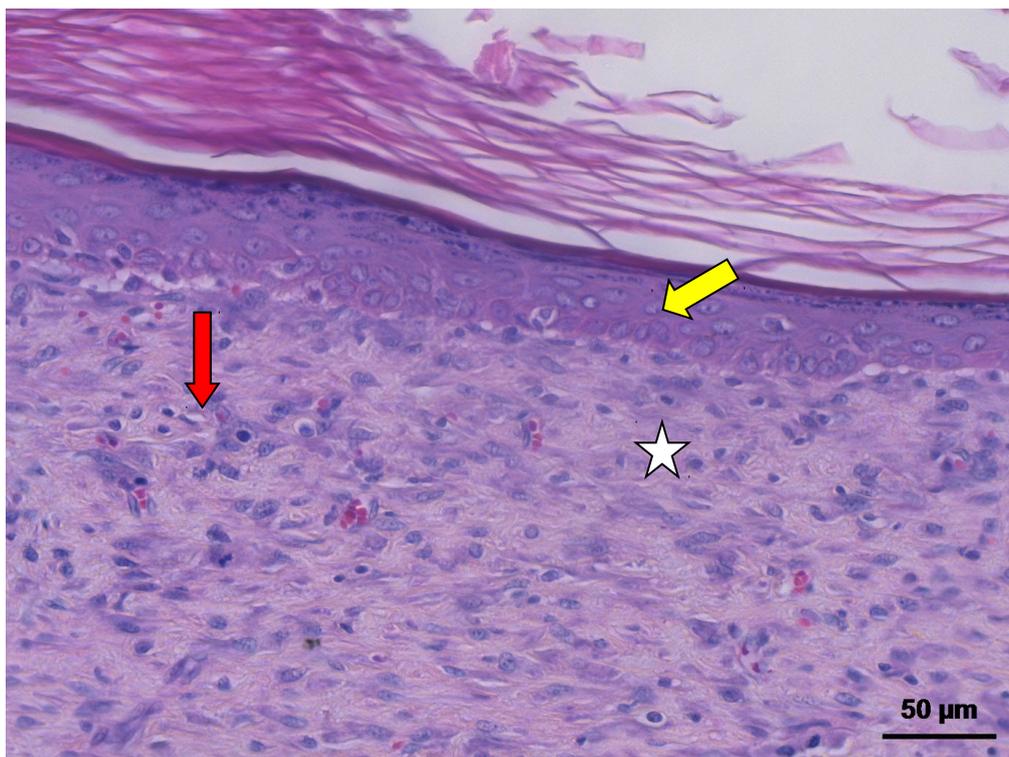


Figura 19: Aos 14 dias, o epitélio apresentava-se normal e hiperortokeratinizado (seta amarela). No tecido conjuntivo, fibras colágenas (estrela) eram mais abundantes e o infiltrado inflamatório (seta vermelha) discreto ou ausente em ambos os grupos estudados (H.E.)
Fonte: Do autor

Analisando a intensidade do infiltrado inflamatório nos diferentes períodos avaliados, verificou-se uma diminuição do infiltrado inflamatório nos dois grupos (controle e PRP), porém não houve diferenças estatisticamente significativas quando se comparou entre os grupos, conforme podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1 - Intensidade do infiltrado inflamatório

Dias valor	Controle n(%)	PRP n (%)	p-
2 dias			
Ausente	0 (0,0)	0 (0,0)	
Discreto	0 (0,0)	0 (0,0)	
Moderado	1 (11,1)	0 (0,0)	1
Intenso	8 (88,9)	9 (100,0)	
Total	9 (100,0)	9 (100,0)	
4 dias			
Ausente	0 (0,0)	0 (0,0)	
Discreto	4 (44,4)	2 (22,2)	0,619
Moderado	5 (55,6)	6 (66,7)	
Intenso	0 (00,0)	1 (11,1)	
Total	9 (100,0)	9 (100,0)	
7 dias			
Ausente	0 (0,0)	0 (0,0)	
Discreto	6 (66,7)	5 (55,6)	0,619
Moderado	2 (22,2)	4 (44,4)	
Intenso	1 (11,1)	0 (00,0)	
Total	9 (100,0)	9 (100,0)	
14 dias			
Ausente	9 (100,0)	9 (100,0)	
Discreto	0 (0,0)	0 (0,0)	
Moderado	0 (0,0)	0 (0,0)	1
Intenso	0 (0,0)	0 (0,0)	
Total	9 (100,0)	9 (100,0)	

Fonte: Do autor

Quanto às demais características, localização do infiltrado inflamatório, células presentes, vasodilatação e hiperemia e tecido de granulação, não foram observadas alterações estatisticamente significativas.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de materiais cirúrgicos bioativos é um dos grandes desafios de pesquisas clínicas que utilizam estes materiais objetivando regular a inflamação e acelerar o processo de cura (NAIK et al., 2013). Atualmente existem inúmeras opções para o tratamento tópico de feridas mas, apesar desta diversidade, existem poucas evidências quanto à eficácia para promover a cicatrização. Neste sentido, nosso objetivo foi avaliar se o uso do PRP acelera o processo cicatricial em úlceras cutâneas induzida em ratos, por meio de avaliação microscópica. Utilizamos o rato da linhagem Wistar, como modelo experimental, pela facilidade de obtenção, manuseio, acomodação e realização do procedimento cirúrgico e por ser também amplamente utilizado em outros estudos experimentais de cicatrização de feridas cutâneas (GARROS, et al., 2006; ALVES, et al., 2008).

A confecção das feridas e a forma de tratamento basearam-se nos mesmos princípios propostos por Molina-Miñano et al. (2009), com a confecção de mais de uma ferida na região central do dorso do animal proporcionando a análise da cicatrização de feridas, bem como, o estudo de curativos ou agentes tópicos para a cicatrização.

O coágulo sanguíneo humano consiste de 95% de hemácias, 5% de plaquetas e menos de 1% de leucócitos. Por outro lado, o coágulo sanguíneo obtido através do PRP contem 4% de hemácias, 95% de plaquetas e 1% de leucócitos possibilitando, assim, uma cicatrização mais rápida e eficiente de feridas cirúrgicas e uma regeneração óssea mais satisfatória (NAIK et al., 2013).

A utilização do plasma rico em plaquetas vem aumentando a cada dia na prática clínica, em diversas especialidades, por propiciar uma aceleração no processo de cicatrização tecidual. A aplicação de concentrados autógenos de plaquetas em uma área lesionada pode promover uma melhor hemostasia e acelerar o processo de reparação (PIETRZAK et al, 2007). Estas ações regenerativas do PRP são resultantes de três principais componentes. Num primeiro momento os fatores de crescimento e as citocinas liberadas do PRP são capazes de estimular a proliferação, migração e diferenciação de fibroblastos da derme e células endoteliais. O PRP aumenta o colágeno tipo I e a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), sugerindo que o PRP

tem também potencial para promover o remodelamento tecidual da pele. O segundo componente é a rede de fibrina que constitui a estrutura do gel de plaquetas, formando um arcabouço que auxilia e guia a migração de células mesenquimais derivadas das populações de células tronco residentes ou precursoras circulantes das margens da ferida. O terceiro componente é representado pelas propriedades antibacterianas dos fatores liberados pelas plaquetas e, provavelmente, pelos leucócitos presentes no PRP (KIM et al., 2012).

A ação do PRP em cicatrização de feridas já foi estudada em inúmeros trabalhos. Pacientes com úlceras crônicas, tratados com PRP, mostraram maior área de reparação comparados ao grupo de pacientes tratados somente com solução fisiológica 0,9% (ANITUA, 2007). Vendramin et al. (2006), ao utilizarem o PRP em cicatrização de feridas, observaram uma diminuição mais rápida no tamanho da lesão bem como o desenvolvimento de um tecido de granulação de melhor qualidade com uma vascularização mais intensa.

Corroborando com os autores acima Croveti et al. (2004) verificaram que o uso do PRP melhorou e proporcionou benefícios na cicatrização de feridas crônicas. Dados semelhantes também foram encontrados por Anitua (1999); Wilson; Barbieri; Mazzere (2006); Rezende et al. (2007); Scalfani et al. (2005); Chandra et al. (2007) e DeRossi et al., (2009) que em seus experimentos observaram que o PRP proporcionou fechamento da ferida e cicatrização mais rápida em comparação ao grupo controle. Em nosso estudo, observamos que, macroscopicamente, os grupos tratados com o PRP apresentaram um processo de reparação mais acelerado, com diminuição da área da lesão, em relação ao grupo controle, durante todos os períodos de observação.

A análise microscópica revelou que não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos PRP e controle dentre as variáveis estudadas: presença de epitélio, crosta, pseudomembrana, grau de queratinização, tecido de granulação, fibrose, vasodilatação e hiperemia, intensidade e localização do infiltrado inflamatório e as células inflamatórias nos períodos avaliados, 2, 4, 7 e 14 dias.

Observou-se também um processo inflamatório bem caracterizado, com os eventos da inflamação ocorrendo em intensidades diferentes para cada fase avaliada. No início, o infiltrado inflamatório se apresentava difuso e intenso com

predomínio de neutrófilos. Nos dias seguintes foi se tornando moderado com maior número de linfócitos e plasmócitos. Ao sétimo dia o infiltrado inflamatório já era discreto constituído por macrófagos e células gigantes multinucleadas e, por volta do decimo quarto dia, já estava ausente em ambos os grupos. Segundo Burnouf et al. (2013) a redução ou até mesmo a ausência de inflamação no pós-operatório têm sido relatadas com o uso de plaquetas, devido à ação dos fatores de crescimento encontrados nos grânulos plaquetários. A chegada de neutrófilos e macrófagos no local da ferida ocorre dentro de poucas horas após a injúria, sendo responsáveis por iniciar a fagocitose do tecido debridado. Após alguns dias, a fase proliferativa inicia-se e se caracteriza pela angiogênese, deposição de colágeno, formação de tecido de granulação, reepitelização e contração da ferida (AKHUNDOV et al., 2012).

A análise microscópica revelou que o processo de reepitelização teve início por volta do sétimo dia, nos grupos controle e PRP, onde verificamos uma epiderme queratinizada recobrando toda a área da lesão, o que também foi evidenciado por Santos et al. (2006). Na derme, observamos presença de vasos em maior número, tecido de granulação com células mononucleares e fibras colágenas imaturas e desorganizadas no grupo controle, resultado semelhante ao encontrado por Lyras et al. (2009) e por Beck et al. (2012) quando avaliou o efeito biomecânico e histológico do PRP no reparo do manguito rotador em ratos.

A fase proliferativa caracteriza-se pelos processos de fibroplasia, angiogênese, deposição da matriz extracelular e reepitelização. Ocorre uma intensa proliferação e migração celular, que atua no reparo dos tecidos epitelial e conjuntivo. O PRP atua na proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia e angiogênese, otimizando o processo de reparo tecidual (GARCEZ, 2012). A epiderme recupera sua espessura normal por volta do quinto dia após uma lesão com diferenciação de células superficiais que produzem uma arquitetura epidérmica madura com queratinização da superfície (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

Já a fase de maturação é representada um processo longo que tem início por volta do 14º dia podendo durar meses. Em nosso estudo só visualizamos o início desta fase, uma vez que nossos experimentos foram realizados até o 14º dia, onde observamos a lesão totalmente recoberta por um epitélio queratinizado e na derme feixes de fibras colágenas bem organizadas.

Conforme relatado por Maia et al. (2009), ao avaliarem o efeito do PRP em tendinites de cavalos encontraram neovascularização, melhor organização da matriz extracelular em relação a disposição das fibras de colágeno e dos fibroblastos e redução do número e tamanho destas células na fase de remodelação, sugerindo uma maior maturidade do tecido cicatricial.

Pela capacidade de estimulação proporcionada pelo PRP, promovendo uma reepitelização mais rápida com maior queratinização associada a uma menor resposta inflamatória, verifica-se que o PRP é mais um valioso instrumento para auxiliar e estimular a cicatrização de feridas. A partir das vantagens descritas na literatura sobre a utilização do PRP em lesões cutâneas, destacando-se a aceleração da cicatrização dos tecidos, a indução da integração dos enxertos e a redução do processo inflamatório, há a necessidade de se realizar mais estudos objetivando o aprimoramento da técnica, a maior aplicação na prática médica e odontológica e a melhor utilização nos procedimentos laboratoriais. Deve ser ressaltado ainda que o PRP pode ser obtido por um método de fácil execução e baixo custo, atendendo às necessidades de serviços públicos de saúde, e é uma técnica segura tanto do ponto de vista imunológico, por ser uma substância autóloga, quanto do ponto de vista carcinogênico, por não ter sido relatada qualquer anomalia estrutural nos tecidos neoformados após sua utilização.

Conclusão

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os experimentos, podemos concluir que:

a) não houve diferenças histomorfológicas relevantes entre as feridas tratadas com o PRP e as controle nos períodos analisados;

b) não houve diferenças estatísticas em relação às variáveis estudadas nos dois grupos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. **Patologia- bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AKHUNDOV K. et al. Development of a cost-effective method for platelet-rich plasma (PRP) preparation for topical wound healing. **Annals of Burns and Fire Disasters**. v. 25, n. 4, p. 207- 213, 2012.

ALVES, D. F. S. et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 35, n. 3, p. 188-193, maio/jun. 2008.

ANITUA E. Plasma Rich in Growth Factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **The international Journal of Maxillofacial Implants**. v. 4, n. 14, p. 529-535, jul./aug. 1999.

ANITUA, E. et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factors production by synovial fibroblasts from arthritic patients. **Rheumatology**, v. 46, n. 12, p. 1769-1772, 2007.

BAGIO, A. M. **Avaliação do potencial cicatricial do gel extrato tintura Mikania Laevigata associado ou não ao ultrassom terapêutico**. 2009. 50f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação)- Faculdade do Extremo Sul Catarinense-UNESC, Criciúma, 2009.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R., Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, jan./mar. 2005.

BARBOSA, A. L. T. et al., Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães, **Ciências Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, ago. 2008

BECK, J. et al., The biomechanical and histologic effects of platelet-rich plasma on rat rotator cuff repairs. **Am. J. Med**. v. 40, n. 9, p. 2037-2044, set. 2012.

BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.166, n.1, p.74-81, 1993.

BLANCK, M. **Enfermagem e úlceras por pressão: da reflexão sobre a disciplina às evidências nos cuidados.** Espanha: Imprensa Pelayo, 2008. p. 261-276.

BLANES, L. **Tratamento de feridas: cirurgia vascular: guia ilustrado.** 2004. Disponível em: < http://www.bapbaptista.com/feridas_leila.pdf >. Acesso em: 12 jan. 2011

BORGO, M. **Avaliação do processo de reparo de incisões realizadas em tecido cutâneo de ratos e submetidas a laser terapêutico.** 2010. 183 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BURNOUF, T. et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. **Blood Reviews.** v. 27, n. 2, p. 77-89, mar. 2013.

CAETANO, K. S. **Avaliação do tratamento de úlceras venosas crônicas com fototerapia (LEDs) e sulfadiazina de prata a 1%.** 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CAMARGO, P.M. et al. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **J Period Res,** v. 37, p. 300-306, 2002.

CARMONA, J.U. **Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse.** 2006. 91f. Tese (Doutorado em Medicina e Sanidade Animal)- Universidade Autônoma de Barcelona, 2006.

CHANDRA R. K. et al. Histologic effects of autologous platelet gel in skin flap healing. **Archives of Facial Plastic Surgery,** v. 9, n. 4, p. 260-263, 2007.

CORSI, R. C. C. et al. Cicatrização das feridas: revisão da literatura. **Ver. Bras. Cir.,** v. 84, n.1, p.17-24, 1994.

CROVETTI G. et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfus Apher Sci,** v. 24, p. 145-151, 2004.

DEROSSI R. et al. Effects of platelet-rich gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira,** v. 24, n. 4, p. 276-281, 2009.

DINATO, C.J. et al. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO C.J.; POLIDO D.W. **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p.315-342.

DIONYSSIOU D. et al. The effectiveness of intralesional injection of platelet rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers. An experimental and clinical study. **Int Wound J.**, 2012;(doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.00996.X).

EVERTS, P.A.M. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of ExtraCorporeal Technology**, Bloomsburg, v. 38, n. 2 p.174-187, 2006.

FERREIRA, E.C. et al Análise da cicatrização da bexiga com o uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (babaçu). estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 33, 2006.

FRESNO L. et al. Effects of platelet-rich plasma on intestinal wound healing in pigs. **The Veterinary Journal**, Barcelona, v. 185, n. 3, p. 322-327, set. 2009.

GARCEZ, T. N. A. **Células-tronco mesenquimais e Plasma rico em plaquetas como adjuvantes da cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelho Nova Zelandia**. 2012, 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

GARROS, I. D. et al. Extrato de *Passiflora adulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, n. 3, p. 55-65. jun. 2006.

GONÇALVES-FILHO, A. et al. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 3-8, jun. 2006.

GUIRRO, E.C.O.; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos-recursos- patologias**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2002.

HATANAKA, E.; CURI, R. Acidos graxos e cicatrização: uma revisão **Rev. Brasileira Farmacia**, v. 2, n. 88, p. 53-58, 2007.

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

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. **Hitologia basica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 488.

KLEIN, M.B.; YALAMANCHI, N.; PHAM, H. et al: Flexor tendón healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. **J Hand Surg Am.**, v. 27, p. 615-620, 2002.

KIM, D. H. et al. Recalcitrant cutaneous ulcer of comorbid patient treated with Platelet Rich Plasma: A case report. **J. Korean Med Sci**, v. 27, n. 12, p. 1604-1606, 2012.

LYRAS, D. N. et al. The effects of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. **Arch. Orthop. Trauma Surg**, v. 129, p. 1577-1582, nov. 2009.

MACEDO, A.P. **Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção**. 2004, 64f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

MAIA, L. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 3, p. 241-245, mar. 2009.

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

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

MENDONCA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MESSORA, M.E. et al. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009.

MOLINA-MIÑANO, F. et al. The use of plasm rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. **International Wound Journal**, v. 6, n. 2, p. 145-148, 2009.

MORAIS, G. F. C; OLIVEIRA, S. H. S; SOARES, M. J. G. O. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Texto Contexto Enferm**, v. 17, n. 1, p. 98-105, jan./mar. 2008.

NAIK, B. et al. Role of platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. **J. Conserv Dent**. v. 16, n. 4, p. 284-293, 2013.

OYAMA, T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **Am Assoc Oral Maxill Surg**, v. 62, p. 555-558, 2004.

PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1202-1205, 2007.

PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. **Science Direct.**, v. 36, p. 4-8, 2009.

PEREIRA, A. L. **Revisão sistêmica da literatura sobre produtos usados no tratamento de feridas**. 2006. 129 f. Dissertação - (Mestrado em Enfermagem)- Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2006.

PIETRZAK, W. S. et al. Plateled-rich and plateled- poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. **J. Craniofac. Surg**. v. 18, p. 559-567, 2007.

RABELO, S. B. **Efeito da fotoestimulação com laser de baixa potencia na cicatrização de feridas em ratos portadores de Diabetes induzidos**. 2003, 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Universidade Vale do Paraíba, São Jose dos Campos, SP, 2003.

REZENDE, M. S. V. M. et al. Uso do concentrado de plaquetas em doenças da superfície ocular. **Revista Brasileira de Oftalmologia**. Rio de Janeiro-RJ, v. 66, n. 4, p. 257-261, jul./ago, 2007.

ROSSI JUNIOR R, et al. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 20, n. 3, p. 295-300, set./dez. 2008.

SANTOS, V. L. C. G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte Y. A. O.; Diogo M. J. D. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 265-306.

SANTOS, M. F. S. et al. Evaluation of the use of raw extract of *Jatropha gossypifolia* L. in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, n. 3, p. 2-7, 2006.

SCALFANI, A. P. et al. Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. **Archives of Facial Plastic Surgery**. v. 7, n. 3, p. 163-169, maio 2005.

SILVA, C. R. **Efeito da corrente elétrica de baixa intensidade em feridas cutâneas de ratos**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)- Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

TAYAR, G.; PETERLINI, M. A. S.; PEDREIRA, M. L. G. Proposta de um algoritmo para seleção de coberturas, segundo o tipo de lesão aberta em crianças. **Acta paul. enferm.**, v. 20, n. 3, p. 284-291, 2007.

UEBEL, C. O. **Ação do plasma rico em plaquetas e seus fatores de crescimento na cirurgia dos microimplantes**. 2006. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina)- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

VENDRUSCOLO, C. P. et al. Plasma rico em plaquetas: Uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. **Vet. e Zootec**. v. 19, n. 1, p. 33-43, mar. 2012.

VILELLA, D. L. **Terapia tópica de úlceras crônicas de perna com plasma rico em plaquetas PRP: revisão sistemática da literatura**. 2007. 154 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem)- Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, 2007.

VITORETI, A. V. C.; NASCIMENTO G. K.. Recursos Terapêuticos Utilizados no Tratamento de Úlceras de Decúbito. **Fitness & Performance Journal**, v. 4, n. 1, p. 16-18, 2005.

WILSON, E. M. K.; BARBIERI, C. H.; MAZZERE, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 208-212,

2006.

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

YAMADA, A.L.M. et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: avaliação clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 2, p. 323-332, 2012.

ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 13 de abril de 2012.

de do maio

Prof. João Adolfo Costa Hanemann

Prezado Professor:

O projeto sob sua coordenação, registro nº 404/2012, intitulado "Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em ratos" está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG

ANEXO B

Mestrado em Biociências Aplicadas a Saúde
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA
CICATRIZAÇÃO
DE FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS EM RATOS

Andréa A. S. Mendonça
Orientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann

ANÁLISE MICROSCÓPICA	
01.	Espessura do epitélio normal:
02.	Queratinização do epitélio normal: 0() Não 1() Sim
03.	Grau de queratinização do epitélio normal 1() Normal 2() Hiperorto 3() Hiperpara
04.	Espessura do epitélio na área da lesão: 0 () ausente 1 () Normal 2 () Atrófico 3 () Hiperplásico
05.	Queratinização do epitélio na área da lesão 0 () Não 1 () Sim
06.	Grau de queratinização do epitélio na área da lesão: 0 () ausente 1() normal 2 () hiperorto 3 () hiperpara
07.	Pseudomembrana serofibrinosa 0 () Não 1() sim
08.	Crosta: 0 () não 1() sim
09.	Intensidade do infiltrado inflamatório: 0() Ausente 1() Discreto 2() Moderado 3() Intenso
10.	Localização do infiltrado inflamatório: 0 () ausente 1() Difuso 2() Subepitelial 3() Profundo
11.	Células inflamatórias presentes: Neutrófilos: 0 () não 1 () sim
12.	Célula Gigante multinucleada gigante 0 () não 1() sim
13.	Anexos: 0() não 1() sim
14.	Vasodilatação e hiperemia: 0() Não 1() Sim
15.	Tecido de granulação: 0 () ausente 1() Jovem 2() Maduro
16.	Fibrose: 0() Não 1() Sim