

JULIANA PEDROSO DE MENDONÇA

**ESTUDO HISTOLÓGICO DA AÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS, ASSOCIADO OU NÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA,
NA CICATRIZAÇÃO POR PRIMEIRA INTENÇÃO, EM RATOS *WISTAR*.**

CAMPO GRANDE
2009

JULIANA PEDROSO DE MENDONÇA

**ESTUDO HISTOLÓGICO DA AÇÃO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS, ASSOCIADO OU NÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA,
NA CICATRIZAÇÃO POR PRIMEIRA INTENÇÃO, EM RATOS *WISTAR*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.Dr. Rafael De Rossi
Co-orientadora: Profa. Dra Karine B. Brum

CAMPO GRANDE
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA PEDROSO DE MENDONÇA

**ESTUDO HISTOLÓGICO DA AÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS,
ASSOCIADO OU NÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA, NA CICATRIZAÇÃO POR
PRIMEIRA INTENÇÃO, EM RATOS *WISTAR*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Instituição _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____

*Dedico este trabalho à minha querida avó paterna **Irene Garcia da Silva** (in memoriam), que foi para junto de Deus durante a realização do mesmo, pelo amor, exemplo, alegria e apoio transmitidos em todos os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, fonte de vida e luz, pela saúde e pela vida maravilhosa que nos deu.

Aos meus pais *José Carlos Garcia de Mendonça e Eliane Maria Pedroso de Mendonça*, pelo exemplo, pela dedicação e por todo amor, graças a eles pude concluir mais esta vitória.

As minhas irmãs *Fabiana, Carla e Cristine* pela amizade, companherismo e carinho em todos os momentos de minha vida.

Ao meu amado namorado e colega de profissão *Adolfo Mateo Magariños Soares* pelo amor, paciência e ajuda nas cirurgias do experimento deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade de participar deste curso o qual me proporcionou grande crescimento científico e profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, pelo empenho e sabedoria como coordenador do Programa de Pós-Graduação.

À minha co-orientadora Profa. Dra Karine B Brum pela brilhante co-orientação, pelo incentivo e pela ajuda na leitura das lâminas e documentação fotográfica.

Ao cirurgião-dentista e amigo *Ariel Farias*, pelos conhecimentos sobre uso do laser e pelo empréstimo do aparelho de laser.

À médica veterinária *Elane Fabrício de Jesus*, pela amizade e participação durante as cirurgias nos animais da pesquisa.

Ao biotério da UFMS, em especial a responsável técnica e professora *Maria Araújo* e as funcionárias *Maria e Roseana* pelo cooperativismo e cuidado com os animais deste estudo.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica da Medicina Veterinária da UFMS, especialmente aos funcionários *Sebastião* e *Carmem* e ao *Prof. Newton*, pela elaboração das lâminas deste estudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo. Minha estima e sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!!!!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador *Prof. Dr. Rafael De Rossi* por sua amizade, paciência e seus grandes ensinamentos prestados durante a elaboração deste estudo, fundamentais e essenciais para a conclusão do mesmo.

“A única maneira de ter amigos é ser amigo.”

(Ralph Waldo Emerson, 1803-1882)

“Se você se sente só é porque constrói muros em vez de pontes.”

(Stanislaw Jerzy Lec, 1909-1966)

RESUMO

Mendonça, JP. Estudo histológico da ação do plasma rico em plaquetas, associado ou não ao laser de baixa potência, na cicatrização por primeira intenção, em ratos *Wistar*. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biológico do plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não ao laser de baixa potência em lesões experimentalmente induzidas em tecido cutâneo na cicatrização por primeira intenção em ratos. Foram utilizadas 24 ratas da linhagem *Wistar*, adultas, distribuídas em quatro grupos distintos: controle (C), PRP (P), laser (L) e associação de PRP com laser (PL). Os grupos foram então subdistribuídos por período de observação em três subgrupos com dois animais cada aos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Foi confeccionada na coxa uma lesão com *punch* e preenchida por gel de PRP nos grupos P e PL. Nos grupos C e L deixou-se a lesão ser preenchida por sangue próprio. As aplicações de laserterapia foram realizadas de forma pontual no dia e três dias subsequentes ao ato operatório, totalizando uma dosagem diária de 20 J/cm² nos grupos L e PL. Fez-se avaliação histológica semi-quantitativa de cortes corados pela hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, considerando-se os leucócitos presentes, o grau de colagenização e reepitelização. A avaliação estatística foi realizada através do teste exato de Fischer. Os resultados mostraram que o gel de PRP, isolado ou associado ao laser de baixa potência, não constituiu como fator decisivo para melhoras no processo de reparo.

Palavras-chaves: cicatrização de feridas; gel de PRP; laser de baixa potência; ratos.

ABSTRACT

Mendonça, JP. Histological study of platelet-rich plasma with and without low intensity laser in first intention healing of wounds in Wistar rats. Campo Grande; 2009. [Dissertation – Federal University of Mato Grosso do Sul].

The aim of this study was to evaluate the biological behavior of Platelet-Rich Plasma (PRP) associated or not to low intensity laser in first intention healing of experimentally induced wounds on cutaneous tissue of rats. 24 adult female Wistar rats were divided in four groups: control (C), PRP (P), laser (L) and PRP associated to laser (PL). During the observation period the groups were subdivided in three subgroups with two animals each, observed by 7, 17 and 21 days post-surgery. A lesion on the thigh was made with a punch and filled with PRP gel in the groups P and PL. In the groups C and L the lesion was filled with blood. The laser therapy was performed in a punctual way at 0, 1, 2 and 3 days post-surgery, with a total daily dose of 20 J/ cm² in the groups P and PL. Tissue sections were stained by hematoxylin-eosin and Masson's trichromic and submitted to semi-quantitative histological analysis to evaluate the number of leucocytes and the collagenation and reepitelization degrees. The results suggest that the proliferation of fibroblasts and the presence of collagen fibers at day 7 were greater in the group PL when compared to the other groups. This study showed evidences of the benefic effect of PRP associated to laser on wound healing, but further studies are needed.

Key words: wound healing, PRP gel, low intensity laser, rats.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos (HE e TM)..... | 48 |
| Tabela 2 – Intensidade da reação inflamatória medida pela quantidade de neutrófilos observados no processo de reparação tecidual nos períodos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, entre os grupos C, P, L e PL..... | 54 |
| Tabela 3 – Intensidade da reepitelização, observada no processo de reparação tecidual nos períodos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, entre os grupos C, P, L e PL..... | 55 |
| Tabela 4 – Observação histológica da presença da proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas nos animais dos grupos C, P, L e PL (seguimento 7, 14 e 21 dias), respectivamente..... | 59 |
| Tabela 5 – Observação histológica da presença da proliferação de fibroblastos, reepitelização e de fibras colágenas nos animais dos grupos C, P, L e PL (seguimento 7, 14 e 21 dias), respectivamente..... | 59 |
| Tabela 6 – Observação histológica da proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas, proliferação de fibroblastos, reepitelização e presença de fibras colágenas nos animais dos grupos C, P, L e PL (seguimento 7, 14 e 21 dias), respectivamente..... | 60 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Organograma. Efeito do laser e do gel de PRP sobre a cicatrização em lesões cutâneas experimentalmente induzidas, em ratos *Wistar*. Grupos experimentais (C, P, L e PL) e subgrupos (7, 14 e 21 dias de pós-operatório). 41
- Figura 2 – Aspecto do gel de PRP após realização do protocolo descrito por Anuita (2003) com modificações, pronto para o uso. 42
- Figura 3 – **A:** Rato *Wistar* sob efeito de anestesia. Membro posterior direito- antissepsia com álcool iodado a 2 %. **B:** Campo operatório delimitado com pano operatório estéril. 43
- Figura 4 – **A:** Membro posterior direito. Incisão realizada e régua mensurando 2 cm. **B:** Instrumento cirúrgico descartável *Punch* e fragmento removido do músculo quadríceps femural da face lateral da coxa direita. 44
- Figura 5 - Membro posterior direito, campo operatório protegido por pano estéril. Aspecto macroscópico da lesão circular com aprox. 6 mm de diâmetro, em tecido muscular de ratos *Wistar* 44
- Figura 6 – Membro posterior direito. **A:** Preenchimento da lesão com gel de PRP nos grupos P e PL. **B:** Aspecto da lesão logo após o preenchimento por gel de PRP. 45
- Figura 7 – Aparelho de laser de baixa potência (Kondortech®) com semicondutores de gálio e arsênio. 46
- Figura 8 – Rato *Wistar*, membro posterior direito após ato operatório. Sutura e pontos de aplicação do laser (em vermelho). 46
- Figura 9 – Intensidade da proliferação vascular nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL. 51
- Figura 10 - Fotomicrografia da pele de rato *Wistar*. Animal do grupo C demonstrando acentuada proliferação vascular (setas) no período de 7 dias de pós-operatório. HE, 40x. 51
- Figura 11 – Intensidade da presença de células agranulócitas nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL. 52

Figura 12 – Fotomicrografias dos grupos no período de 7 dias de pós-operatório. **A:** lâmina obtida do animal do grupo C em que se observa área focalmente extensa de quantidade acentuada de tecido de granulação (setas amarelas) e presença de crosta (seta preta). **B:** lâmina do animal do grupo PL. Notar área focalmente extensa de tecido de granulação (setas amarelas) e crosta (seta preta). **C:** lâmina do animal do grupo P em que se observa presença acentuada de infiltrado inflamatório (setas). **D:** lâmina do animal do grupo L. Notar presença moderada de infiltrado inflamatório (setas). HE. 40x.

..... 53

Figura 13 – Fotomicrografias dos grupos no período de 14 dias. **A:** lâmina obtida do animal do grupo P. Nota-se discreta área de tecido de granulação (seta). **B:** lâmina obtida do animal do grupo L (B) observa-se área discreta de tecido de granulação (setas). HE. 40x.

..... 53

Figura 14 – Intensidade da proliferação de fibroblastos nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL.

..... 55

Figura 15 – Fotomicrografias da pele de ratos *Wistar* aos 7 dias de pós-operatório. **A:** lâmina obtida do animal do grupo L. Notar ausência de reepitelização (seta). **B:** lâmina obtida do animal do grupo C. Notar a ausência de reepitelização e presença de crosta (seta). HE, 40x.

..... 56

Figura 16 – Fotomicrografias da pele de ratos *Wistar*, período de 21 dias de pós-operatório. **A:** lâmina de animal do grupo C. Observa-se total reconstituição do epitélio (seta). **B:** lâmina de animal do grupo L. Observa-se a reepitelização (seta). HE, 40x.

..... 56

Figura 17 – Intensidade da presença de fibras colágenas nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL

..... 57

Figura 18 –Fotomicrografias de pele e subcutâneo de ratos *Wistar* aos 7 dias de pós-operatório. **A:** lâmina do animal do grupo C. Notar discreta presença de fibras colágenas (setas). **B:** lâmina do animal do grupo P. Notar presença moderada de fibras colágenas (setas). **C:** lâmina do animal grupo L com moderada presença de fibras colágenas. **D:** lâmina do animal do grupo PL onde se observa presença acentuada de fibras colágenas. TM, 40x.

..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------|--|
| cm | centímetro |
| nm | nanômetro |
| mg/Kg | miligramas por quilograma |
| mm | milímetro |
| mil/mm ³ | mil por milímetros cúbicos |
| µl | microlitros |
| G | gravidades |
| W | watts |
| J/cm ² | joule por centímetro quadrado |
| mW | miliwatts |
| s | segundos |
| Al | alumínio |
| As | arsênio |
| He | hélio |
| Ne | neônio |
| Ga | gálio |
| PRP | plasma rico em plaquetas |
| GaAs | arseneto de gálio |
| HE | hematoxilina-eosina |
| TM | tricômio de Masson |
| FC | fator de crescimento |
| FCDP | fator de crescimento derivado de plaquetas |
| FCE | fator de crescimento epidérmico |
| PDAF | fator angiogênico derivado de plaquetas |

| | |
|---------------|--|
| FCT- β | fator transformador beta |
| FCT- α | fator transformador alfa |
| TGF- α | fator de crescimento transformador alfa |
| TGF- β | fator de crescimento transformador beta |
| PF-4 | fator-4 plaquetário |
| FGF | fator de crescimento do fibroblasto |
| IGF | fator de crescimento semelhante à insulina |
| DNA | ácido dexorribonucleico |
| ADP/ATP | adenosina tri-fosfato |
| DTM | disfunção têmporo-mandibular |
| LASER | amplificação da luz por emissão estimulada de radiação |
| UFMS | Universidade Federal de Mato Grosso do Sul |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|------------------|
| °C | Graus Celsius |
| % | por cento |
| ® | marca registrada |
| + | mais |
| α | alfa |
| β | beta |
| μ | micra |
| x | vezes |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 21 |
| 2.1 Fisiologia da Cicatrização | 21 |
| 2.2 Fatores de Crescimento..... | 25 |
| 2.2.1 Fatores de Crescimento Plaquetário | 26 |
| 2.3 Série Plaquetária | 30 |
| 2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)..... | 31 |
| 2.5 Laser | 35 |
| 3 OBJETIVOS | 39 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO | 40 |
| 4.1 Protocolo Anestésico..... | 41 |
| 4.2 Técnica de Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas | 42 |
| 4.3 Técnica Operatória..... | 43 |
| 4.4 Técnica de Aplicação do Laser | 46 |
| 4.5 Eutanásia e Preparação do Material | 48 |
| 4.6 Avaliação Histológica | 48 |
| 4.7 Análise Estatística..... | 49 |
| 5 RESULTADOS | 50 |
| 5.1 Avaliação Microscópica | 50 |
| 5.1.1 Proliferação vascular | 50 |
| 5.1.2 Células agranulócitas..... | 52 |
| 5.1.3 Células granulócitas..... | 54 |
| 5.1.4 Proliferação de fibroblastos | 54 |
| 5.1.5 Reepitelização..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.6 Presença de fibras colágenas | 57 |
| 5.2 Análise Estatística..... | 58 |
| 6 DISCUSSÃO | 61 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 67 |
| REFERÊNCIAS | 68 |
| APÊNDICE A | |
| APÊNDICE B | |
| ANEXO A | |

1 INTRODUÇÃO

Grandes avanços científicos foram verificados nas últimas décadas em relação à compreensão dos fatores envolvidos no processo de reparação tecidual. Mesmo com o aumento das pesquisas científicas e da descoberta de novos recursos tecnológicos a prevalência de feridas crônicas ainda é elevada. Apesar dos dados brasileiros serem pouco precisos, alguns autores estimam que aproximadamente 3% da população brasileira seja portadora desse tipo de lesão. No caso de pacientes portadores da diabetes essa proporção se elevaria para 10%, cerca de quatro milhões de pessoas seriam portadoras de lesões crônicas ou teriam algum tipo de complicação no processo cicatricial, conforme Maldebaum *et al.* (2003).

Há longo tempo existem tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização de feridas, o que demonstra a importância de protegê-la de forma a evitar sua complicação (GOGIA, 2003). Entre os principais recursos disponíveis, para auxiliar a cicatrização de feridas, utilizados atualmente estão: o laser de baixa potência e o plasma rico em plaquetas (PRP).

A terapia a laser tem se destacado através de diversos trabalhos científicos, por sua grande eficácia no processo cicatricial, recuperando o tecido lesado por induzir diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose, síntese de colágeno e reepitelização (GUIRRO & GUIRRO 2002). Um dos lasers de baixa potência utilizado é o de arseneto de gálio (GaAs) com o propósito terapêutico.

Vários estudos têm demonstrado lesões distróficas de pele tratadas com radiações laser de baixa intensidade, que aumenta significativamente o desenvolvimento da circulação sanguínea, regenera o tecido lesado, ativando sua cicatrização. O efeito da luz laser ativa o estímulo da proliferação de fibroblastos, com produção de fibras elásticas e colágenas (CATÃO, 2004).

O PRP é definido como uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, obtido por meio de processos laboratoriais, considerado rico em fatores de crescimento (FC) oriundos dos grânulos a-plaquetários. Representa uma nova biotecnologia,

devido ao crescimento tecidual interessar à engenharia de tecidos e à terapia celular, pois ajuda na cicatrização capacitando as células às mitoses e angiogênese (MARX, 2001).

Na odontologia o PRP tem sido bastante estudado e muitos trabalhos publicados na literatura mostram resultados bastante satisfatórios, principalmente em pequenos enxertos ósseos na região alveolar para futuros implantes dentários, em cirurgias periodontais e buco-maxilo-faciais. Na medicina a sua utilização ainda é pequena, porém os estudos existentes mostram um grande potencial em melhorar os resultados em diversos procedimentos ortopédicos, neurocirúrgicos e de cirurgia plástica, segundo Vendramin *et al.* (2006).

Considerando que a identificação de técnicas apropriadas que promovam a aceleração do processo cicatricial representam benefícios importantes no cuidado de pacientes achou-se pertinente a elaboração deste estudo que objetivou associar o laser de baixa potência com o PRP na busca por uma cicatrização mais rápida, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e minimizando custos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia da Cicatrização

A cicatrização é um processo dinâmico o qual envolve fenômenos fisiológicos que se comportam de forma harmônica a fim de garantir a restauração tissular. Inicialmente, deve ocorrer perda tecidual, a partir da qual os fenômenos fisiológicos voltam-se para o reparo da lesão (CLARK, 1993).

O reparo tecidual compreende diferentes processos, entre eles, inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como o colágeno, elastina e fibras reticulares. A síntese de colágeno é um processo rápido que tem seu início com a lesão intersticial e se estende até o final da fase de cicatrização, quando ocorre a remodelação dos tecidos (THOMAS, 1995).

Por ser um complexo processo sistêmico, a cicatrização exige do organismo a ativação, produção e inibição de grande número de componentes moleculares e celulares que, em seqüência ordenada e contínua patrocina todo o processo de restauração tecidual, de acordo com Meneghin & Vattimo (2003).

Segundo Brasileiro Filho (2004), a cicatrização é um processo pelo qual um tecido lesado é substituído por um tecido conjuntivo vascularizado. O primeiro passo seria a instalação de uma reação inflamatória, cujo exsudato de células fagocitárias reabsorveria o sangue extravasado e os produtos da destruição celular. Em seguida, ocorreria proliferação fibroblástica e endotelial que daria origem ao tecido conjuntivo cicatricial, que pode ser de dois tipos: primeira ou segunda intenção. A de primeira intenção seria mais rápida e levaria a formação de cicatrizes menores, sendo a fenda da ferida mais estreita e a destruição tecidual nas bordas menor. Já na cicatrização por segunda intenção a ferida seria extensa e com margens afastadas, formando um grande coágulo e caso ocorra uma infecção associada à reação inflamatória seria exacerbada. Em ambas a exsudação de fagócitos é intensa e forma-se abundante tecido de granulação.

Toda vez que o tecido cutâneo-mucoso sofre uma agressão, resultando em uma lesão, inicia-se o processo de cicatrização que nada mais é do que a cura da ferida por reparação e/ou regeneração desses tecidos. Não havendo qualquer obstáculo ou impedimento, este processo segue uma seqüência cronológica específica que pode ser esquematizada em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (SANTOS, 2000).

Santos (2000) explicou que a fase inflamatória ou exsudativa manifesta-se como sangramento controlado por meio de formação do coágulo, seguida das características típicas das reações inflamatórias agudas como dor, rubor, calor, edema e freqüentemente, perda da função local. Inicia-se no momento em que ocorre a lesão tecidual e se estende por um período de três a seis dias. A inflamação é uma resposta vascular e celular com propósito de remoção dos microorganismos, material orgânico e tecido desvitalizado. Após o trauma, os vasos sanguíneos e linfáticos sofreriam uma vasoconstrição transitória (através da endotelina) e de curta duração (cerca de cinco a dez minutos) para reduzir ou parar a perda sanguínea na área afetada, este efeito é produzido por aminas não-ativas entre elas a norepinefrina e a serotonina.

A norepinefrina é um vasoconstritor secretado pelos vasos sanguíneos e a serotonina, pelos mastócitos e plaquetas. Nesse período o organismo é estimulado a utilizar complexos mecânicos tais como a formação de trombos por meio da agregação plaquetária, a ativação do sistema da coagulação, o desbridamento da ferida e a defesa contra infecções visando a restauração tecidual. Esta fase ocorre com a finalidade de preparar o local afetado para o crescimento do novo tecido e se divide em três etapas distintas: trombocítica, granulocítica e macrofágica (GOGIA, 2003).

Durante a etapa trombocítica ocorre a ativação da cascata da coagulação devido à ação do fator IV e das plaquetas que aderem ao colágeno exposto na superfície interna do vaso sanguíneo. As plaquetas ativadas liberam substâncias biologicamente ativas como mediadores vasoativos, os fatores quimiotáticos e fatores plaquetários, cada um com funções diferentes. O número elevado de plaquetas agrega-se, formando o trombo. Durante este processo, a cascata de coagulação é induzida (Meneghin & Vattimo 2003).

A etapa granulocítica caracteriza-se pela atração dos granulócitos neutrofilicos por substâncias quimiotáticas. Concomitantemente à vasoconstrição transitória os leucócitos começam a agregar-se, devido à presença da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais da parede dos vasos. Este processo é chamado de marginação neutrofilica. Após a

vasoconstrição, os vasos não lesados dilatam e a permeabilidade capilar aumenta em resposta a substâncias químicas liberadas pelos tecidos danificados, o que leva ao extravasamento plasmático para a área lesada. Tampões de fibrina provenientes do plasma extravasado bloqueiam o fluxo linfático, fecham a ferida, localizam a reação inflamatória e evitam a disseminação de infecção. Como resultado da presença de todos esses elementos, dá-se a fagocitose das bactérias, a decomposição do tecido necrosado e a limpeza do local da lesão. À medida que os leucócitos polimorfonucleares morrem, suas enzimas intracelulares e restos celulares são liberados no local de lesão e tornam-se parte do exsudato ou pus (GOGIA, 2003).

Na etapa macrofágica os monócitos migram dos capilares para o local da lesão e são transformados em macrófagos. Os macrófagos são as células mais importantes no auxílio à fagocitose. Eles ingerem o material que não foi solubilizado pelos leucócitos polimorfonucleares. Quando chegam à área lesada, secretam substâncias biologicamente ativas como proteases – enzimas digestivas- como o ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio e ácido láctico. Os macrófagos liberam ainda substâncias vasoativas; e as plaquetas, além de estarem envolvidas na formação do coágulo, liberam fibronectina e fatores de crescimento dos quais os mais citados são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF ou FCDP), fator de crescimento epidérmico (EGF ou FCE), fator angiogênico derivado de plaquetas (PDAF), fator transformador β e α (FCT- β , FCT- α ou TGF- β , TGF- α), e o fator-4 plaquetário (PF-4). Estes fatores desempenham importante papel nas fases subseqüentes do processo de cicatrização, com mecanismos de estimulação e inibição de crescimento celular, sofisticadamente controlados (CLARK & SINGER, 1999).

Após a fase inflamatória começa a fase proliferativa, assim denominada porque a atividade predominante neste período é a mitose celular, e se estende aproximadamente por três semanas. A característica básica desta fase é o desenvolvimento do tecido de granulação, composto de uma matriz indefinida de colágeno, fibrina, fibronectina, ácido hialurônico e outras glicosaminoglicanas. Dentro dessa matriz, podem-se encontrar macrófagos, fibroblastos e os vasos sanguíneos recém formados. A formação neocapilar é estimulada por fatores angiogênicos secretados pelos macrófagos, que estimulam a migração e proliferação das células endoteliais dos vasos sanguíneos. Este processo ocorre, inicialmente, em um ambiente hipóxico que, por meio dos macrófagos, estimula a formação das citocinas e dos fatores de crescimento. Aos poucos, a concentração de oxigênio aumenta no leito da ferida

proporcionando ambiente favorável para a formação do tecido de granulação que cresce em direção as células basais, afirmaram Meneghin & Vattimo (2003).

As células epiteliais migram da periferia para dentro da área de lesão. Elas continuam a proliferar e situam-se sob múltiplas camadas de epitélio abaixo do coágulo e, posteriormente abaixo da crosta. A epitelização proporciona uma barreira protetora, a fim de evitar perda de fluido e eletrólitos e para reduzir as chances de infecção. À medida que o epitélio gradualmente se enfraquece, a crosta se afrouxa e descola da ferida, deixando uma cobertura fina e transparente sobre a pele (GOGIA, 2003). Com o aumento da perfusão tissular e da oxigenação, os fibroblastos são ativados para elaborarem o colágeno que será depositado no espaço da ferida (este tem sido encontrado já na ferida no segundo dia). Todo colágeno produzido é envolvido por glicoproteínas cuja função no processo de cicatrização ainda não está bem definida; mas há um movimento contínuo de síntese e lise do colágeno controlado por enzimas e fatores específicos uma vez que a membrana basal é continuamente reciclada e, portanto, é constitucionalmente dinâmica (SANTOS, 2000; DEALEY, 2005).

A atividade dos fibroblastos depende do suprimento local de oxigênio. A superfície da ferida tem uma tensão relativamente baixa de oxigênio, encorajando os macrófagos a produzir TGF- β e FGF, o que estimula o processo angiogênico. Alguns fibroblastos têm ainda outro papel, são fibroblastos especializados conhecidos como miofibroblastos, que tem capacidade contrátil e agem por extensão, retração e migram por meio da área de reparação tissular, arrastando as fibras colágenas em direção as células. Com isto, há uma redução do tempo de cicatrização, podendo ser responsável por até 80% do fechamento da ferida. Esta contração das margens da ferida começa cinco dias após a lesão e tem seu pico em duas semanas. Se a ferida não fecha em duas a três semanas após a lesão, a contração estaciona. A contração da ferida recompõe toda a lesão, resultando em uma ferida menor para ser reparada pela formação de cicatriz. A taxa de contração é proporcional à contração da rede de colágeno. A contração ocorre a uma taxa uniforme de cerca de 0,6 a 0,75mm por dia. O tamanho da ferida não afeta a taxa de contração, enquanto que o formato a afeta, segundo Dealey (2005).

A terceira e última fase do processo cicatricial é conhecida como fase de maturação ou reparadora e tem início por volta da terceira semana após a ocorrência da ferida e se estende por até dois anos, dependendo do grau, extensão e local da lesão. Durante a maturação a ferida fica menos vascularizada porque se reduz a necessidade de migração celular. A cicatriz formada durante a fibroplasia é uma estrutura densa e aumentada de fibras de colágeno, as

quais são altamente desorganizadas. Esta fase caracteriza-se pelas mudanças que ocorrem no tecido cicatricial, provocadas por dois processos simultâneos: a síntese realizada pelos fibroblastos e a lise coordenada pelas colagenases. As fibras de colágeno reorganizam-se de modo que, em vez de se depositarem de forma aleatória, dispõem-se em ângulos retos, às margens da ferida. As estruturas resultantes desses processos tornam-se mais bem organizadas à medida que sofrem maturação, pois o volume da cicatriz diminui gradualmente e a coloração passa, aos poucos, de vermelha para branca pálida, característica do tecido cicatricial. Se a taxa de degradação excede a taxa de produção, resulta em uma cicatriz mais amolecida e menor; se a taxa de produção excede a da degradação, resulta em uma cicatriz hipertrófica ou em quelóide (DEALEY, 2005; SANTOS, 2000).

A força tênsil também cresce na linha da ferida: três semanas após a lesão ter ocorrido já há aproximadamente 20% da força original do tecido; cinco semanas depois, 40%; e no final de oito semanas, mais de 70%; no entanto, a força original do tecido, antes de ser lesado, jamais será recuperada sendo no máximo de 80%, conforme Meneghin & Vattimo (2003).

2.2 Fatores de Crescimento (FC)

Em 1986, o prêmio Nobel foi atribuído a Cohen e Levi-Montaleini, por seus estudos relacionados com os fatores de crescimento epidérmico e nervoso, constituiu um marco na área de tratamento de feridas, estimulando na década de 90 o desenvolvimento de diversas pesquisas, laboratoriais e clínicas, acerca dessas novas substâncias bioativas, caracterizando a era ativa da restauração tissular (SANTOS, 2000).

Os fatores de crescimento (FC) são produzidos no leito da ferida e também sistemicamente à distância, onde podem ser inibidos ou estimulados dependendo da interação de outros fatores celulares. Os fatores de crescimento encontrados na via sistêmica, como o hormônio de crescimento (HCG), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o

fator de crescimento transformador β (TGF- β) têm mostrado boa atividade no processo de cicatrização de feridas, de acordo com Herdon *et al.* (1993).

Cada fator de crescimento tem uma ou várias atividades concretas fundamentais, e suas ações específicas em uma célula dependerão da circunstância da atividade celular. Para transmitir um sinal completo, uma vez liberado de uma célula que o fabrica, devem inter-relacionar-se com seu receptor correspondente. A ligação dos fatores de crescimento aos seus receptores específicos desencadeia uma ação biológica, transferindo esta reação extracelular em um acontecimento intracelular, ao transmitir um estímulo ao interior da célula (LIND, 1998).

Garg *et al.* (1999) destacaram que fatores de crescimento e de diferenciação fazem parte de uma classe de mediadores biológicos que exercem um papel crítico na estimulação e regulação do processo de cicatrização das feridas corporais. Eles, aparentemente regulam processos celulares chaves, tais como a mitogênese, quimiotaxia, diferenciação e metabolismo por atuarem em receptores específicos das células.

Os FC estimulam os fibroblastos agindo nas células epiteliais adjacentes às feridas, onde sofrem diferenciação e movem-se até a área cruenta das feridas nos processos reparadores. Promovem regeneração por atuarem na reepitelização, angiogênese e síntese da matriz extracelular. Como os fatores de crescimento se inter-relacionam, podem obter múltiplas combinações e as possibilidades para cicatrização são ilimitadas (LAMELLO, 1999).

Os fatores de crescimento ou polipeptídicos são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e/ou regeneração tecidual. Esses polipeptídeos são a chave para regular diversos eventos celulares tais como: síntese de DNA, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz óssea (BARBIERI & COSTA, 2004).

2.2.1 Fatores de Crescimento Plaquetário

Várias proteínas são derivadas das plaquetas e apenas alguns traços delas estão presentes no plasma. Entre essas proteínas, quatro têm uma importância funcional particular: fator de crescimento plaquetário (PF-4, *platelet factor-4*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*), β - tromboglobulina e trombospondina. Outras proteínas menos caracterizadas que podem ser específicas de plaquetas, incluem a β -lisina, o fator de permeabilidade vascular e o fator quimiotático (LEE, 1998). Há outros fatores de crescimento encontrados nas plaquetas conhecidos como: fator de crescimento transformador $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 2$ *transforming growth factor*), fator de crescimento similar a insulina (IGF, *insulin-like growth factor*) e fator de crescimento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), entre outros (MARX, 2001).

Embora haja vários fatores de crescimento, derivados de plaquetas ou não, os mais descritos na literatura para o tratamento de feridas são: PDGF, TGF, IGF e o EGF, que serão descritos a seguir.

2.2.1.1 Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas - PDGF.

Este fator pode ser derivado dos grânulos das plaquetas como também ser encontrado em macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas e muitas células tumorais. É uma glicoproteína formada por duas cadeias de aminoácidos A e B, que pode ser encontrada em três diferentes formas: PDGF- AB, PDGF-AA e PDGF- BB. Sua ação depende da ligação com seus receptores específicos. Dois tipos de receptores são conhecidos, o receptor α interage com todas as formas de PDGF e o receptor β que é específico para a forma PDGF-BB. A ativação celular ocorre por via sistêmica sob ação da enzima tirosinaquinase, como acontece com os EGFs, TGFs e o FGFs (Herdon *et al.* 1993).

O PDFG é um importante fator mitogênico do soro; estimula o crescimento de células endoteliais, células musculares lisas, células gliais e fibroblastos, sendo quimiotático para fibroblastos humanos. É também possível que regule a biossíntese de fosfolipídios e prostaglandinas em várias células. O PDGF de megacariócitos pode induzir a proliferação de

fibroblastos na medula óssea e pode mediar a resposta proliferativa nas lesões ateroscleróticas (LEE, 1998).

Estes fatores são conhecidos por favorecerem a angiogênese por meio da ativação dos macrófagos que secretam fatores induzindo células endoteliais a formarem novos capilares e também aumentam a quantidade de proliferação das células tronco presentes na medula óssea (VALE, 2002).

2.2.1.2 Fator de Crescimento Transformador - TGF.

O fator de crescimento transformador β é uma citocina multifuncional, que faz a regulação do crescimento e diferenciação de muitos tipos de células. Apresenta efeitos estimulantes nas células de origem mesenquimal e efeitos inibitórios em células de origem ectodérmica. O TGF- β estimula a produção de outros fatores de crescimento e retarda a síntese de peróxidos de hidrogênio da ferida, considerada uma das responsáveis pela destruição de fibroblastos. Este fator recebeu este nome, porque foi primeiramente isolado em tecidos transformados (sarcomas). Apresenta-se em quatro estruturas diferentes o TGF- β 1 (encontrado nos alfa grânulos plaquetários), TGF- β 2, TGF β 3 e TGF- α (é homólogo ao EGF, liga-se ao mesmo receptor - EGFR e possui atividade biológica igual *in vitro*) (ROBBINS & COTRAN, 2004).

Os ossos e as plaquetas contêm 100 vezes mais TGF- β que qualquer outro tecido do corpo humano, embora seja encontrado também nos macrófagos, linfócitos-T, células endoteliais, ceratinócitos, células musculares lisas e fibroblastos. O TGF- β 1 é sintetizado em praticamente todas as células, e todas as células expressam receptores para este FC, indicando que o mesmo afeta quase todos os processos fisiológicos (LIND, 1998).

2.2.1.3 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina - IGF.

Os FC similares a insulina (IGF) pertencem a um grupo de proteínas denominadas somatomedinas (Sm), produzidas principalmente pelo fígado. São subdivididas em IGF-I (Sm-C) e IGF-II. Estudos clínicos têm confirmado que a administração exógena de hormônio de crescimento mostra um significativo aumento na produção de IGF-I pelo fígado e por tecidos específicos, como o músculo esquelético e a cartilagem, podendo ter um efeito autócrino ou parácrino, conforme Herdon *et al.* (1993).

Duas somatomedinas têm sido determinadas, a somatomedina C é um peptídeo idêntico ao IGF-I, enquanto que o IGF-II é denominado como um peptídeo neutro. As somatomedinas são hormônios anabólicos com efeitos que incluem replicação celular, síntese de glicogênio, colágeno, proteína e glicosaminoglicanas, e transportam a glicose e os aminoácidos pela membrana celular. Receptores específicos de Sm têm sido identificados em diversos tipos de células, entre elas os fibroblastos e as células endoteliais. Entre suas principais funções estão a de estimular a síntese de colágeno, migração do ceratinócito e proliferação de fibroblastos, e também a de produzir efeitos endócrinos similares ao hormônio de crescimento (MC GRATH, 1990).

2.2.1.4 Fator de Crescimento Epidérmico - EGF.

O fator de crescimento epidérmico é um polipeptídeo composto de 53 aminoácidos e é encontrado nos fibroblastos e nas células epiteliais, predominantemente na glândula submandibular, nos rins adultos, leite, saliva, plasma, líquido amniótico e na urina. O EGF e o TGF- α têm sido identificados no leito da ferida após a ocorrência da lesão. Estudos em

animais indicam que o EGF é necessário para a formação do colágeno, desenvolvimento do tecido de granulação e aumento da epitelização, segundo Mc Grath (1990).

O EGF estimula a resposta mitogênica com o aumento concomitante de DNA e RNA em uma variedade de células epiteliais, hepatócitos e fibroblastos. É amplamente distribuído nas secreções e nos líquidos teciduais como suor, saliva, urina e conteúdos intestinais. Nas cicatrizações de ferimentos da pele, o EGF é produzido por ceratinócitos, macrófagos e outras células inflamatórias que migram para dentro da área. Promove ainda a migração celular e o crescimento de outras estruturas da pele que não possuem uma rápida proliferação, como os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e músculos eretores. Os estudos têm mostrado uma significativa resposta do EGF no tratamento de áreas doadoras de enxerto de tecido mole e em feridas causadas por queimaduras (HERDON *et al.*, 1993).

2.3 Série Plaquetária

As plaquetas ou trombócitos são fabricadas na medula óssea, como resultado da fragmentação dos megacariócitos, considerando-as assim, como sendo fragmentos do citoplasma destas células. Em geral, são produzidas 1000 a 3000 plaquetas a partir de cada megacariócito, e a referência em humanos é de 150 a 450 mil/mm³. Não possuem DNA e têm pouca capacidade de biossíntese e sua principal função é a hemostasia. Sob circunstâncias normais, sobrevivem de 7 a 10 dias na circulação sanguínea, de acordo com Silva *et al.* (1997).

As plaquetas não migram e não fazem diapedese nos tecidos e quando não ativadas apresentam uma forma discóide e possuem grânulos no seu citoplasma. Uma vez expostas ao vaso lesado elas degranulam e sofrem uma mudança em seu formato, apresentando-se de forma globular com projeções e pseudópodes, conforme Verrastro *et al.* (1996).

As plaquetas são anucleadas e têm citoplasma complexo, cujas organelas são indispensáveis as suas funções. A superfície plaquetária tem limites externos mal definidos e

é muito rica em mucopolissacarídeos, material glicoprotéico que a impede de aderir ao endotélio normal, e fosfolipídeos que desempenham vários papéis de ativação em múltiplas etapas do processo de coagulação sanguínea (GUYTON & HALL, 2002).

Santos & Santos (2004) ressaltaram que através do recurso da microscopia eletrônica é possível identificar o complexo sistema de canaliculos e microtúbulos das plaquetas denominado de sistema canalicular aberto, que se comunica com invaginações da membrana plasmática. Essas organelas estão intimamente ligadas aos mecanismos de atividade trombotodinâmica da coagulação, que seriam a emissão de pseudópodes, adesividade interplaquetária e conseqüente retração do coágulo que lhe dá estabilidade e ancora o citoesqueleto da rede de fibrina que, nos processos de cicatrização e recuperação tecidual servem para a migração de células formadoras de novos tecidos. Tais funções requerem muita energia e demandam a presença de íons cálcio, elas obtêm energia a partir do glicogênio abundante em seus citoplasmas e do cálcio presente no plasma.

As plaquetas contêm citoplasma complexo, cujas organelas são indispensáveis as suas funções e contém vários tipos de granulações secretoras como os grânulos alfa, os delta e os lâmbda. Os grânulos alfa são os mais abundantes das plaquetas, possuem fibrinogênio e fator de crescimento plaquetário, que estimula as mitoses no músculo liso dos vasos sanguíneos e a cicatrização de feridas. Já os grânulos delta armazenam ADP e ATP. Os grânulos menores, chamados de grânulos lâmbda, são lisossomos carregados com as enzimas usuais dessas organelas (Junqueira & Carneiro 2008).

Vendramin *et al.* (2006) afirmaram que as plaquetas atuam no processo de cicatrização de feridas e re-epitelização, liberam diversos FC que estimulam a angiogênese, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporcionariam um aumento da síntese de colágeno.

2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Lynch *et al.* (1989), descreveram o PRP como sendo um produto derivado do sangue autógeno obtido através de processo laboratorial, colhido em período pré-operatório e rico em fatores de crescimento derivados dos grânulos a-plaquetários. Eles estudaram o PDGF e o IGF-I em cães da raça *Beagle*, aplicados para estimular a regeneração periodontal. Os resultados mostraram que esses agentes de crescimentos foram mitogênicos e quimiotáticos para fibroblastos e osteoblastos.

Knighton *et al.* (1990) testaram o efeito tópico da aplicação de PRP em úlceras cutâneas. Obtiveram um tempo de cicatrização de 6 a 8 semanas com o PRP, enquanto o grupo controle foi de 15 semanas.

Em 1991, Lynch *et al.* avaliaram o processo de reparo ósseo em torno de 40 implantes de titânio de pressão, inseridos na mandíbula de 8 cães da raça *Beagle* em combinações com o PDGF/IGF-I, simultaneamente a instalação dos implantes. Os sítios dos implantes tratados com PDGF/IGF-I exibiram maior crescimento ósseo em torno dos implantes que nos grupos controle, tratados com gel de placebo. Os resultados demonstraram que essa combinação estimulou a neoformação óssea em torno dos implantes de titânio.

Becker *et al.* (1992) avaliaram a deposição óssea em torno de implantes de titânio comparando o uso de membrana de colágeno com a combinação PDGF/IGF-I. Nesse estudo, foram instalados 24 implantes em cães logo após as extrações, com alvéolos com extensa deiscência vestibular. Os resultados obtidos mostraram que a associação da membrana com o PDGF/IGF-I obtiveram sítios com alta taxa de densidade óssea e o dobro da área de crescimento ósseo em torno dos implantes, quando comparado à outra associação.

O gel de plaquetas é o produto final do PRP, derivado da centrifugação especial de sangue, com trombina e cloreto de cálcio. As plaquetas, uma vez ativadas pela trombina, liberam seus fatores de crescimento e começam a organizar-se para a formação do coágulo de fibrina. Trata-se de uma modificação autóloga da cola de fibrina, a qual foi descrita e utilizada em diversas ocasiões encontradas na literatura com aparente sucesso clínico. O gel de plaquetas é preparado por meio da coleta de sangue do próprio paciente, no período pré-operatório, quando possível na própria sala cirúrgica para diminuir riscos de contaminação. Cola de fibrina, selante de fibrina e gel de fibrina são sinônimos, sendo este um biomaterial que foi desenvolvido por meio da busca para a promoção de agentes hemostáticos e adesivos cirúrgicos, conforme Whitman *et al.* (1997).

Lind (1998) estudou a ação de vários fatores de crescimento (PDGF, TGF beta, IGF-I, etc) sobre a reparação óssea que foi avaliada *in vitro* e *in vivo*, sobre as células osteoblásticas, em osteotomias e na fixação de implantes ortopédicos. Concluiu que o conceito da fixação

biológica de implantes associados a fatores de crescimento era promissor, especialmente na melhora da reparação óssea.

O PRP tornou-se popular na comunidade da cirurgia oral e maxilo-facial após a publicação do artigo de Marx *et al.* (1998). Este estudo mostrou que combinando PRP com o osso autógeno dentro de defeitos ósseos mandibulares resultou em uma maturação radiográfica significativamente mais rápida e uma histomorfometria mais densa de osso. Os autores revelaram que a utilização do PRP é uma solução segura na utilização de fatores de crescimento em enxertos ósseos.

O PRP também seria conhecido por plasma autógeno de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas, ou ainda, gel de plaquetas (ANITUA, 1999). Por ser um produto orgânico, atóxico e não imunorreativo, tem sido utilizado para acelerar os caminhos da cicatrização da ferida cirúrgica a partir de vários fatores de crescimento nele presente.

Marx & Garg, (1999) afirmaram que o PRP possui uma preparação autógena que elimina a possibilidade da transmissão de doenças ou reações imunológicas, como ocorre nas preparações alógenas e xenógenas. Também afirmaram que seu uso em enxertos de maxilas severamente atróficas aumenta a taxa de sucesso da osseointegração.

Muitos dos FCs presentes no PRP têm sido isolados dos tecidos e caracterizados, os principais fatores envolvidos nos processos de regeneração e cicatrização são PDGF, TGF- β , EGF/TGF- α , IGF1 e FGF (MAN *et al.*, 2000).

Schimitz & Hollinger (2001) alertam para o insuficiente entendimento biológico da terapia clínica relacionada ao PRP. Entretanto reconhecem o grande potencial associado ao suplemento de fatores de crescimento na reparação de ferimentos, embora a efetividade do PRP nos enxertos ósseos não seja plenamente conhecida. Na opinião dos autores, as pesquisas básicas não são suficientemente consistentes em demonstrar a habilidade do PRP em promover reparação tecidual óssea segura.

Em 2001, Marx destacou que o PRP também é denominado plasma autógeno de plaquetas, gel de plaquetas, plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento e concentrado de plaquetas. Seria bem definido como sendo plasma autógeno com grande concentração de plaquetas, ou seja, com valores basais acima do encontrado na corrente sanguínea, portanto maior que 350.000/ μ l (valores normais: 150.000 a 350.000/ μ l). Os estudos científicos sobre cicatrização de tecidos moles e ósseos sugerem a utilização de PRP com mínimo de 100.000 plaquetas/ μ l, sendo que concentrações plaquetárias inferiores

não garantem aumento da taxa de cicatrização, e concentrações superiores não mostraram resultados melhores.

O gel de plaquetas é obtido através da adição de trombina e gluconato de cálcio ao PRP. Estes ativam o sistema de coagulação, resultando na gelação do PRP, o que facilita sua aplicação em diversas cirurgias e também ativam as plaquetas. Inicialmente o PRP era obtido através de máquinas de plasmaferese e utilizava-se a trombina bovina para sua ativação. O interesse em facilitar sua obtenção e diminuir os custos fez com que surgissem algumas máquinas automatizadas e diversos protocolos, inclusive com substituição da trombina bovina por trombina autóloga, de acordo com Lozada *et al.* (2001).

O PRP tem entre 1.000.000 e 1.500.000 plaquetas por microlitros. É um hemocomponente autógeno usado para liberar FCs em altas concentrações no local onde se pretende reparar um defeito ou uma lesão tecidual, levando à aceleração do processo cicatricial. Os fatores de crescimento estimulam principalmente a reepitelização, a angiogênese, a mitose celular, a síntese de colágeno, a quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e a produção linfócitos com a produção de interleucinas (MAN *et al.*, 2001).

Segundo Vale (2002) o PRP apresenta plaquetas com elevado potencial de agregação e alta concentração de fatores V e VIII, diminuindo o tempo de coagulação com maior eficiência quando comparado a outros hemoderivados e propiciou a formação de um trombo precoce mais estável, reduzindo a perda sanguínea pós-operatória. Esse concentrado de plaquetas foi usado em cirurgias cardíacas e exodontias de pacientes que fazem uso de anticoagulantes, objetivando reduzir risco de sangramento e evitar transfusões heterólogas. Em ambas as situações, a incidência de hemorragia pós-operatória diminuiu, não sendo necessária a transfusão de fatores de coagulação ou suspensão do uso de anticoagulantes.

Na opinião de Earl & Tara (2004) a preparação do PRP é relativamente simples, o sangue coletado do paciente submete-se a uma centrifugação, processo para concentrar as plaquetas. Assim as plaquetas são concentradas em um pequeno volume para que possa então ser adicionado a um enxerto. Quando o concentrado de plaquetas é ativado, uma estrutura gelatinosa é gerada e os fatores importantes do crescimento são liberados.

O uso do PRP é uma estratégia para ampliar e acelerar os efeitos dos FCs contido nas plaquetas, iniciadoras universais da cicatrização precoce, mostrando bons resultados obtidos em reconstruções ósseas, principalmente na área de implantodontia (KLONGNOI *et al.*, 2006). Pode ser usado sozinho ou associado a enxertos tanto ósseos como de tecido conectivo na reconstrução de defeitos ósseos ou periodontais.

Vendramin *et al.* (2006) estabeleceram um método eficiente e com custos reduzidos de preparação do PRP para utilização em cirurgia plástica. Realizaram 20 testes através de centrifugação de sangue e os resultados obtidos com a centrifugação de 300G por 10 minutos na primeira centrifugação e de 640G por 10 minutos na segunda, foram as maiores concentrações plaquetárias. Pôde-se concluir que, neste protocolo de obtenção o gel de plaquetas mostrou uma alta concentração plaquetária e FCs o que facilitou a utilização em cirurgia plástica, mostrando bons resultados na cicatrização de feridas e na integração de enxertos ósseos e cutâneos. As feridas crônicas apresentaram diminuição do diâmetro e desenvolveram um tecido de granulação de melhor qualidade.

Em 2007, Suaid *et al.* realizaram um estudo com nove cães com o objetivo de avaliar clinicamente a associação PRP com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial quando utilizado no recobrimento radicular de defeitos tipo retração gengival. Através da avaliação dos parâmetros de altura e largura da retração e altura do tecido queratinizado não observaram diferenças significantes entre o grupo associado ao PRP e o grupo não associado. Concluíram em seu estudo que não houve benefícios na adição do PRP no recobrimento radicular

Albuquerque *et al.* (2008) fizeram um levantamento bibliográfico com o objetivo de analisar sobre a efetividade do PRP, com foco na área de odontologia. Puderam concluir que, as propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial de melhorar a integração dos enxertos sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de gordura, bem como para estimular a cicatrização de feridas cirúrgicas. Dentro da literatura observaram que existem críticos que questionam a confiabilidade desse recurso, no entanto a maioria dos pesquisadores apresentou resultados clínicos bastante satisfatórios a favor de sua aplicação.

Almeida *et al.* (2008) publicaram um estudo onde analisaram 33 pacientes submetidos à ritidoplastia e lipoenxertia com o uso concomitante do plasma pobre em plaquetas (PPP) e PRP. Apresentaram uma análise qualitativa de casos clínicos que evidenciaram uma melhor integração da enxertia adiposa nos preenchimentos faciais quando do uso do PRP e melhor adaptação dos retalhos de ritidoplastia com o uso concomitante do PPP. Puderam concluir que os seus achados clínicos foram concordantes com a literatura internacional e os incentivaram a prosseguir no desenvolvimento de técnicas cada vez mais apuradas e seguras no tratamento de pacientes utilizando o PRP.

2.5 Laser

A palavra laser tem origem na língua inglesa e advém da abreviação de seu próprio significado (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, conforme Baxter (1998). Fenômeno que ocorre excitação dos elementos constituintes do material exposto à onda eletromagnética por corrente elétrica, proporcionando a emissão de fótons que amplificam a emissão de radiação.

Os lasers são classificados conforme sua potência e a capacidade de interação com os tecidos, em duas famílias: laser de baixa intensidade de energia (LILT – *Low Intensity Level Treatment*) e laser de alta intensidade de energia (HILT – *Hight Intensity Laser Treatment*). Os lasers de baixa intensidade mais utilizados na terapêutica são os de Hélio-Neônio (HeNe) e o de Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAlAs) (RIBEIRO, 1999).

Os vários tipos de lasers de baixa potência apresentam diferenças quanto ao comprimento de onda, quanto menor o comprimento de onda maior sua ação e poder de penetração. Os lasers podem ser contínuos ou pulsáteis. Sua potência é expressa em watts (W), variando de deciwatts a megawatts e a energia medida em joules por centímetro quadrado (J/cm^2), sendo igual à potência multiplicada pelo tempo de aplicação. A energia do laser é absorvida apenas por uma fina camada de tecido adjacente além do ponto atingido pela radiação, sendo por esta razão a recomendação atual para lasers com comprimentos de onda entre 640 a 940nm a aplicação deve ser pontual à lesão, de acordo com Baranauskas & Parizotto (1998).

O laser é um dispositivo composto por substâncias denominadas de meio ativo (gás, sólidos e líquidos), que quando excitadas por uma fonte de energia, geram luz. Assim, definimos a luz laser como sendo ondas eletromagnéticas não ionizantes com características especiais (SULEWSKI, 2000).

O uso de tratamento térmico como modalidade terapêutica tem sido aplicado há muitos anos para esterilização de feridas e controle de sangramento. O laser de gálio e alumínio (AsGaAl) é denominado de laser terapêutico graças à sua baixa potência, pois sua carga fotônica seria insuficiente para produzir efeito térmico, conforme Brown (2000).

Ainda em 2000, Bortolletto ressaltou que a grande vantagem do laser seria justamente a não interferência do efeito térmico, uma vez que a irradiação é acalórica. Atualmente recomenda-se o tratamento a laser logo no início do processo de inflamação, cuidando-se apenas com a dosagem aplicada.

As características especiais da luz laser, tais como: coerência, monocromaticidade e colimação, as diferenciam totalmente da luz natural. Na luz coerente todas as ondas são do mesmo comprimento, isto é, a uniformidade da luz; monocromática significa que a luz laser é pura e composta de uma única cor, e o efeito colimado apresenta todas as ondas sempre paralelas entre si, havendo mínima divergência, ou seja, são capazes de percorrer longas distâncias sem ocorrer dispersão, de acordo com Low & Reed (2001).

A terapia com laser de baixa potência, devido a luz monocromática, é capaz de alterar o comportamento celular sem provocar aquecimento significativo. O primeiro efeito catalogado foi sua ação bioestimuladora, porém a literatura menciona a sua capacidade de inibir a atividade celular. Contudo para se obter o efeito de bioestimulação é necessário uma densidade de energia de 1 a 4J/cm² e uma potência de 10mW a 90mW, segundo Montello (2002).

Azevedo & Magalhães (2003) lembraram que os lasers de baixa intensidade seriam usados com o propósito terapêutico, em virtude das baixas densidades de energias usadas e comprimento de onda capazes de penetrar nos tecidos. Muitos estudos têm demonstrado a utilização do laser de baixa intensidade em odontologia promovendo uma recuperação mais rápida e menos dolorosa, nos casos de estomatite aftosa recorrente (afta), úlceras traumáticas, lesões herpéticas, pericoronarite, gengivite, gengivoestomatite herpética primária, gengivoestomatite herpética secundária - Herpes Simples, hipersensibilidade dentinária, queilite angular, pericementite, síndrome da ardência bucal, alveolite, disfunção temporomandibular (DTM).

Estudos realizados por Reddy (2003), indicaram que o laser de arseneto de gálio (GaAs) foi efetivo na promoção do reparo e na melhora da cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Os resultados revelaram que o colágeno total foi aumentado 19% nas feridas tratadas com o laser HeNe e 14% nas feridas tratadas com GaAs. Seus achados nas análises biomecânicas e bioquímicas de feridas de ratos diabéticos demonstraram que o laser de HeNe foi superior ao GaAs na promoção do reparo das feridas. As diferenças entre eles poderiam estar atribuídas na interação fotoquímica com as células, onde a absorção de luz emitida pelo laser HeNe é de 632,8nm, e essa absorção iniciaria como componente da cadeia respiratória. Já a radiação emitida pelo GaAs seria de 904nm, o que implicaria numa absorção à nível de membrana mitocondrial, que seria durante a cascata de eventos moleculares o que levaria a resposta fotoquímica do tecido.

Todavia, além dos fatores inerentes do laser devemos observar as características peculiares de cada tecido, principalmente os que controlam as reações moleculares e

bioquímicas. Quando a luz laser incide em um tecido biológico, uma parte da luz é refletida e uma parte da luz remanescente que foi transmitida é espalhada dentro do tecido (que em alguns casos leva a danos em regiões distantes da área onde o feixe aparentemente se propaga), a parte da luz remanescente é absorvida, tanto pela água do tecido ou por algum outro cromóforo absorvedor, como a hemoglobina e a melanina. Finalmente uma parte da luz poderia ser transmitida ao longo de toda a espessura do tecido (BRUGNERA JÚNIOR *et al.*, 2003).

As propriedades terapêuticas dos lasers vêm sendo estudadas desde a sua descoberta, sendo a sua ação analgésica observada particularmente sobre as formas da dor crônica de diversas etiopatogenias, desde os receptores periféricos até o estímulo no sistema nervoso central. Portanto a terapia laser quando utilizada nos tecidos e nas células não é baseada em aquecimento, isto é, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim nos seguintes efeitos: fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos. Portanto, quando a luz laser interage com as células e tecido na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas, tais como: a estimulação de linfócitos, a ativação de mastócitos, o aumento na produção de ATP mitocondrial e a proliferação de vários tipos de células (CATÃO, 2004).

Enwemeka *et al.* (2004) destacaram que as três fases do reparo tecidual seriam positivamente afetadas pelo tratamento a laser, o efeito positivo estaria em aspectos conhecidos da inflamação tais como proliferação celular, degranulação e promoção de atividades de citocinas.

Vários são os mecanismos pelos quais o laser pode atuar na promoção da cicatrização tecidual. Segundo Ihsan (2005), o laser de baixa potência, aumenta a oxigenação tecidual, promovendo a expansão da microcirculação e estimulando a capacidade adaptativa. Em seu estudo o laser GaAlAs 904nm, quando aplicado na microcirculação mesentérica de ratos vivos, promoveu dilatação das arteríolas irradiadas seguida de aumento no fluxo sanguíneo arteriolar.

Em 2006, Rocha Júnior *et al.* realizaram um estudo com o objetivo de investigar o comportamento de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos *Wistar* submetidos ao tratamento com laser de baixa intensidade com dosagem de 3,8 J/cm² e potência de 15mW com tempo de aplicação de 15s. Evidenciaram aumentos da neovascularização e da proliferação fibroblástica e diminuição da quantidade de infiltrado inflamatório nas lesões cirúrgicas submetidas à terapia a laser. Seus resultados em conjunto sugeriram que a terapia a laser de baixa intensidade é um método eficaz no processo de modulação do reparo tecidual, contribuindo efetivamente para uma cicatrização tecidual mais rápida e organizada.

3 OBJETIVO

Verificar se o plasma rico em plaquetas (PRP) isolado ou associado ao laser de baixa potência arseneto de gálio (GaAs) atua na cicatrização por primeira intenção em ratos *Wistar*. Para tanto foram avaliados os aspectos histológicos: proliferação vascular, presença de células inflamatórias, proliferação fibroblástica, reepitelização e presença de fibras colágenas.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa refere-se a um estudo experimental, pelo qual foram formados grupos equivalentes e, portanto, ideais para comparação.

Foram utilizados 24 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem *Wistar*, fêmeas, adultas, com peso variando entre 193 e 303 gramas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Durante o experimento permaneceram alojadas em gaiolas de plástico contendo maravalha, ficando um animal por gaiola, em condições de temperatura (variando de 24°C a 28°C), iluminação e ventilação adequadas, com livre acesso à água e ração industrial própria para ratos (Nuvital®, Brasil). Respeitou-se o período de aclimação de sete dias antes do início do experimento.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS, em reunião no dia 21 de agosto de 2007 com protocolo nº 166/2007 (Anexo A). Foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tomando as medidas adequadas para minimizar o desconforto dos animais.

A documentação dos procedimentos cirúrgicos foi realizada através de fotografias com máquina digital Cyber-Shot modelo W110 de 7.2 mega pixels (Sony, China).

Os animais foram distribuídos por sorteio, em quatro grupos de seis: Grupo C (Controle) (n=6), Grupo P (Tratamento com PRP) (n=6), Grupo L (Tratamento com Laser) (n=6) e Grupo PL (Tratamento com PRP e Laser) (n=6). Cada animal foi identificado na cauda com numeração seqüencial para cada grupo.

Os grupos foram por sua vez distribuídos aleatoriamente em três subgrupos de acordo com o período de observação (7, 14 e 21 dias de pós-operatório), com dois animais em cada subgrupo. A Figura 1 mostra as divisões e subdivisões dos grupos do experimento em questão.

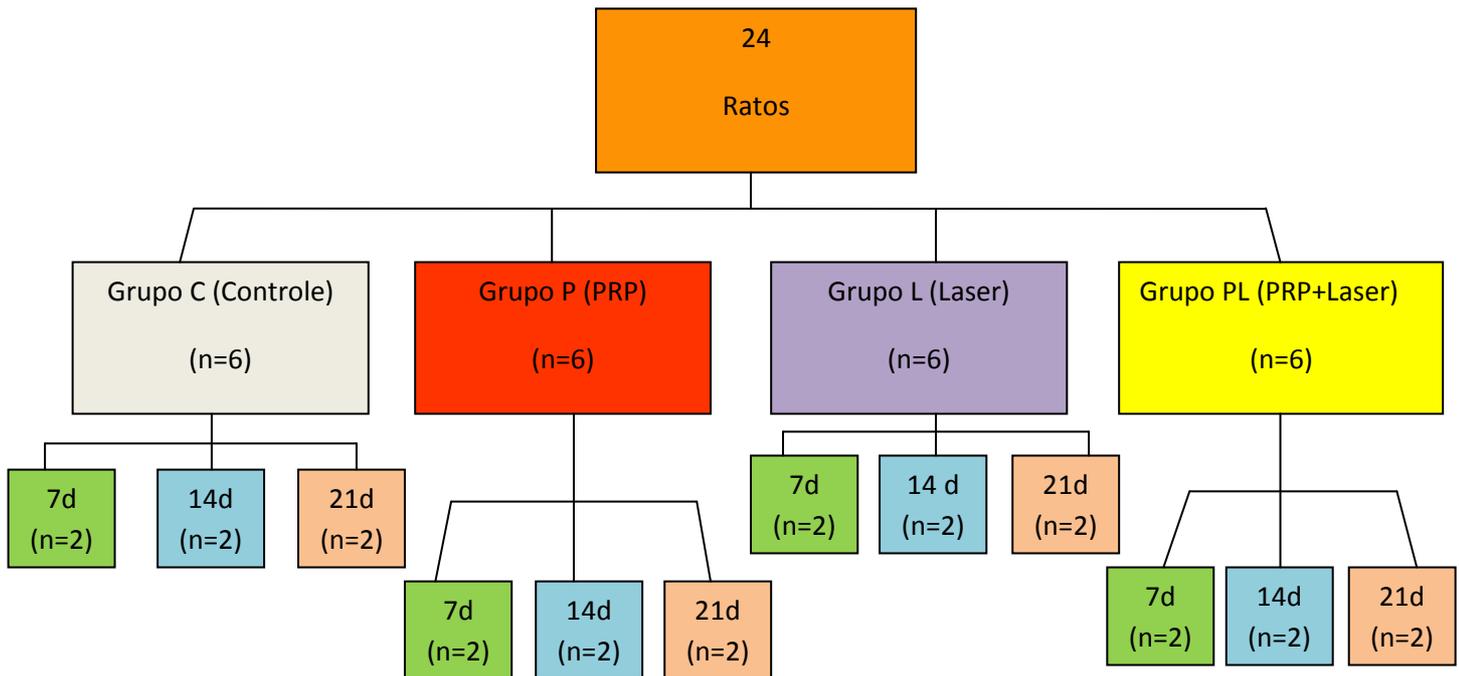


Figura 1- Organograma de distribuição dos grupos experimentais segundo o tratamento e tempo (em dias) de observação.

4.1 Protocolo Anestésico

Os animais foram pesados em balança digital e anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de ketamina a 5% (Vetanarcol®, König do Brasil Ltda.) na dose de 80mg/kg associado ao cloridrato de xilazina a 2% (Rompun®, Bayer S.A, Brasil) na dose de 10mg/kg (HOMES *et al.*, 1998). Somente após a obtenção do plano anestésico, constatada através do reflexo pupilar e do relaxamento muscular, realizou-se a tricotomia.

4.2 Técnica de Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas

Para a obtenção do PRP utilizou-se o protocolo para humanos descrito por Anitua (2003) citado por Macedo *et al.* (2004) com modificações. Para tanto, foram colhidos de 1 a 2 ml de sangue por punção cardíaca dos animais dos grupos P e LP, após anestesia, com seringa agulhada descartável e transportado para um tubo de polipropileno estéril de 1,8mL (BD Vacutainer®, Estados Unidos) contendo 0,10 mL de citrato de sódio 3.2% como anticoagulante. Após a homogeneização o tubo foi colocado na centrífuga (Fanem Ltda., Brasil) e centrifugado a 1800rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação foi possível distinguir duas camadas distintas no tubo, as hemácias ao fundo e o plasma sobrenadante. Removeu-se 500 μ L do plasma com pipeta graduada e depositou-se em tubo tipo Ependorf de plástico estéril e adicionou-se 150 μ L de gluconato de cálcio a 10% estéril (Ariston®, Brasil) e homogeneizou-se manualmente. A mistura foi colocada em banho-maria a 38°C e após 15 minutos obteve-se o gel de PRP, como se observa na Figura 2.



Figura 2 – Aspecto do gel de PRP após realização do protocolo descrito por Anitua (2003) com modificações, pronto para o uso.

4.3 Técnica Operatória

Após o procedimento anestésico os animais foram tricotomizados na face lateral da coxa direita com auxílio de lâmina de barbear estéril (Gillete®, Brasil), em extensão suficiente para permitir a visualização da área a ser abordada. Seguiu-se a antissepsia com solução de álcool iodado a 2% (Povidine®, Brasil) e o campo operatório foi limitado com panos operatórios esterilizados, como mostra a Figura 3.

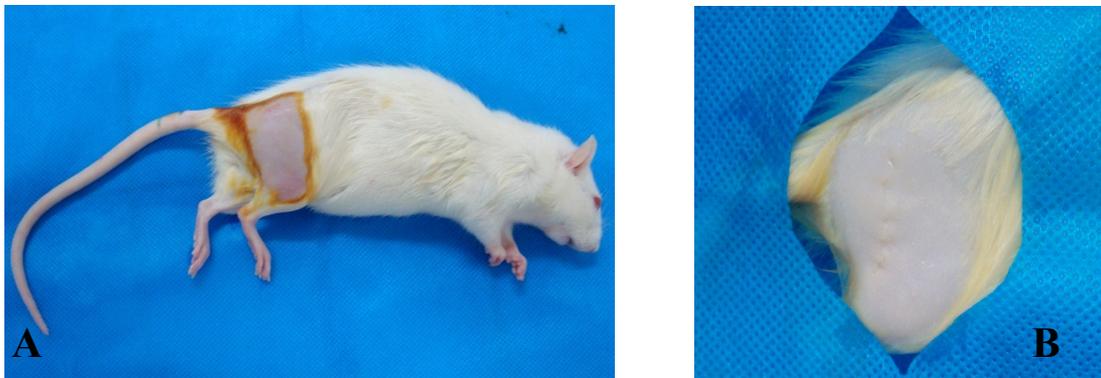


Figura 3 – A: Rato *Wistar* sob efeito de anestesia. Membro posterior direito- antissepsia com álcool iodado a 2 %. B: Campo operatório delimitado com pano operatório estéril.

Realizou-se uma incisão longitudinal com lâmina de bisturi n° 15 montada em cabo de bisturi n° 3 de 2 cm através da pele e dos tecidos conjuntivos subcutâneos até a profundidade do músculo quadríceps femural (Figura 4–A). Removeu-se um fragmento de tecido muscular utilizando-se um *punch* descartável de 5 mm de diâmetro interno (Kolplast®, Brasil) (Figura 4-B), causando uma lesão de 6 mm de diâmetro por 5 mm de profundidade (Figura 5) e deixou-se preencher com próprio sangue da ferida nos grupos C e L e em seguida suturou-se por pontos isolados simples com fio de *nylon* monofilamento de 4-0 (Shalon®, Brasil). Nos grupos P e PL a lesão foi preenchida com gel de PRP (Figura 6) e fez-se o mesmo padrão de sutura dos grupos anteriores.



Figura 4 – A: Membro posterior direito. Incisão realizada e régua mensurando 2 cm. B: Instrumento cirúrgico descartável *Punch* e fragmento removido do músculo quadríceps femoral da face lateral da coxa direita.



Figura 5 – Membro posterior direito, campo operatório protegido por pano estéril. Aspecto macroscópico da lesão circular com aprox. 6 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade, em tecido muscular de ratos *Wistar*.

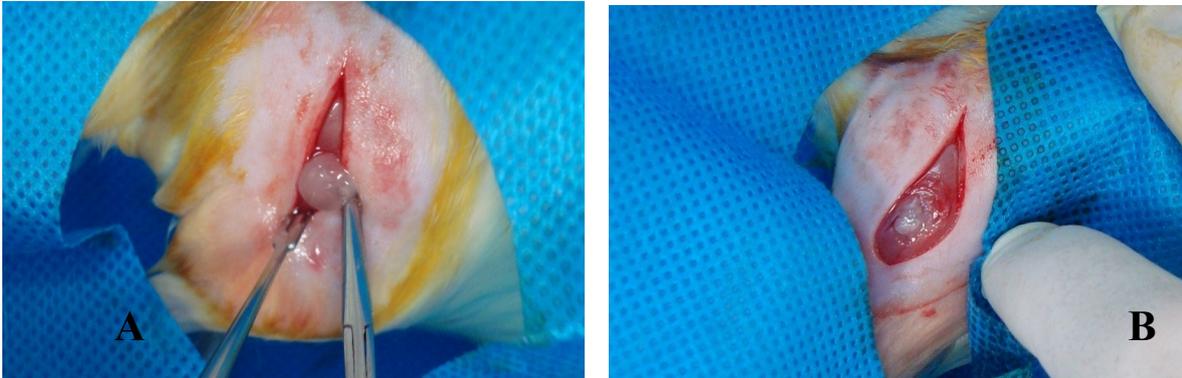


Figura 6 – Membro posterior direito. **A:** Preenchimento da lesão com gel de PRP nos grupos P e PL. **B:** Aspecto da lesão logo após o preenchimento por gel de PRP.

Após a cirurgia os animais foram devolvidos às suas gaiolas individuais e mantidos com rígido controle de limpeza ambiental. Durante o pós-operatório não houve administração de medicamentos via oral, apenas foi realizada limpeza da área da ferida cirúrgica com água oxigenada e curativo com solução iodada a 2% durante cinco dias. As suturas foram removidas após 7 dias.

4.4 Técnica de Aplicação do Laser

Foi realizada a aplicação do laser de baixa potência Arseneto de Gálio (GaAs) com o aparelho Laser Light 2 (Kondortech®, Brasil) (Figura 7), comprimento de onda 660nm e 30 mW/cm² de potência, com densidade de energia radiante de 4 J/cm² abrangendo cinco pontos equidistantes (um ponto central sobre a sutura, 2 pontos na extremidade e 2 pontos em suas laterais), como mostra a Figura 8.



Figura 7- Aparelho de laser de baixa potência (Kondortech®) com semicondutores de gálio e arsênio.



Figura 8- Rato *Wistar*, membro posterior direito após ato operatório. Sutura e pontos de aplicação do laser (em vermelho).

A dosagem total diária de aplicação do laser foi de 20 J/cm² através do método transcutâneo pontual e em contato, no dia do ato operatório e nos três dias subsequentes ao mesmo, nos grupos L e PL. A aplicação foi realizada sempre no mesmo horário e com os animais sob anestesia já descrita, o tempo de aplicação foi determinado automaticamente pelo aparelho em 1 minuto e 40 segundos para cada ponto.

4.5 Eutanásia e Preparação do Material

Nos tempos de 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico, dois animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia em câmara de dióxido de carbono depois de anestesiados. Após a eutanásia, realizou-se a tricotomia da área operada e, através de incisão com lâmina de bisturi nº 15, confeccionou-se um retalho abrangendo a totalidade da pele até o tecido muscular. O retalho foi colocado num frasco plástico pequeno com etiqueta de identificação contendo paraformaldeído a 10% permanecendo por 48h.

Os materiais foram enviados ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMS, para que pudessem ser processados rotineiramente para a técnica de inclusão em parafina, cortados a 4 μ e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM) e assim confeccionaram-se as lâminas para o estudo histológico.

4.6 Avaliação Histológica

As lâminas obtidas após coloração foram avaliadas por um mesmo examinador no Laboratório de Patologia da UFMS, sem que o mesmo soubesse qual lâmina pertencia a determinado grupo. A análise histológica foi realizada através de microscópio óptico convencional (Olympus BX41®, Japão), com as objetivas de 4x, 10x e 40x, acoplado à máquina digital (Motic®, Canadá) com auxílio do programa *Motic Images Plus (version 2.0)* para captura de imagens.

O critério de avaliação das lâminas, baseado no trabalho de Garros *et al.* (2006), para coloração em HE foi a presença do tecido de granulação de acordo com a intensidade em que os dados foram encontrados (forma de manifestação: ausente, discreto, moderado e acentuado) e para a coloração em TM foi a presença de fibras colágenas (forma de manifestação: ausente, discreto, moderado e acentuado). Todos estes dados foram transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para o achado

histológico conforme demonstrados na Tabela 1, e foram encaminhados para análise estatística.

Tabela 1 - Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos (HE e TM)

| Achados HE/TM | Ausente | Discreto | Moderado | Acentuado |
|---------------------------|---------|----------|----------|-----------|
| Proliferação vascular | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Células agranulócitas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Células granulócitas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Proliferação fibroblastos | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Reepitelização | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Colagenização | 0 | 1 | 2 | 3 |

A intensidade dos achados de HE e TM foi avaliada segundo os seguintes critérios:

Proliferação Vascular – foi considerada ausente, quando não se evidenciavam vasos no corte histológico; discreta, quando eram visualizados poucos vasos esparsamente situados, de forma isolada no contexto; moderada, quando apareciam com maior frequência e dispersos no campo óptico e acentuada, quando evidenciados com grande frequência, dispostos em todo contexto.

Células agranulócitas – foram classificadas como ausente, quando não eram visualizadas no campo óptico; discreta, quando evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado; moderada, quando apareciam com maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado; e acentuada, quando as células eram evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.

Células granulócitas – foram classificadas como ausentes, quando não eram visualizadas no campo óptico; discretas, quando eram visualizadas esparsamente, de forma isolada, com muitas áreas livres de infiltrados; moderada, quando já eram visualizadas formando agregados, porém com áreas adjacentes livres de infiltrados; acentuada, quando estas células apareciam com grande frequência, formando agregados densos, sem áreas livres de infiltrados.

Proliferação fibroblástica – foi classificada como ausente, quando não se evidenciava proliferação de fibroblastos; discreta, quando havia esparsos fibroblastos proliferados em meio a tecido conjuntivo frouxo; moderada, quando havia moderada quantidade de fibroblastos proliferados, constituindo pequenos feixes celulares multi-direcionalmente; e acentuada quando havia grande quantidade de fibroblastos proliferados constituindo agregados compactos de células arranjadas multi-direcionalmente.

Reepitelização – classificou-se como ausente, quando não havia epitélio visualizado no campo óptico; moderado, quando aparecia de forma incompleta ou parcial; acentuada, quando visualizado de forma total ou completa sobre o tecido conjuntivo.

Colagenização – classificou-se como ausente, quando não havia fibras colágenas depositadas; discreta, quando a deposição de fibras colágenas era em pequena quantidade, caracterizadas por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados; moderada quando a deposição de colágeno formava feixes de fibras eosinofílicas, espessas, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados; e acentuada, quando havia grande deposição de fibras colágenas, constituindo feixes de fibras espessas, compactamente arranjadas em meio aos fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.

4.7 Análise Estatística

Foi realizada através da estatística descritiva e do teste exato de Fischer.

5 RESULTADOS

O ato operatório de todos os animais transcorreu sem complicações. Não houve óbitos. Todas as ratas recuperaram-se bem da anestesia. As avaliações clínicas diárias mostraram adequada recuperação, com manutenção do estado geral, presença de atividade física e disposição para alimentar-se em todos os animais dos grupos do experimento.

As informações da avaliação microscópica foram submetidas à análise estatística descritiva e as variáveis analisadas, presença de proliferação vascular, células agranulócitas, células granulócitas, proliferação fibroblástica, reepitelização e presença de fibras colágenas entre os grupos (C, P, L e PL) e os períodos analisados (7, 14 e 21 dias) foram objetos de cálculos de frequência. Os dados obtidos foram apresentados sob forma de gráficos, figuras e tabelas.

5.1 Avaliação microscópica

5.1.1 Proliferação vascular

O primeiro achado histológico avaliado foi a proliferação vascular (Figura 9) que se encontrou acentuada no período de 7 dias para os quatro grupos avaliados (C, P, L e PL) (Figura 10). Aos 14 dias de pós-operatório houve uma redução da proliferação vascular para moderada no grupo P; nos grupos L e C para discreta; e o grupo PL mostrou ausência de proliferação vascular. Aos 21 dias de pós-operatório o grupo P permaneceu com discreta vascularização, sendo que nos demais grupos a quantidade de vasos sanguíneos foi considerada ausente.

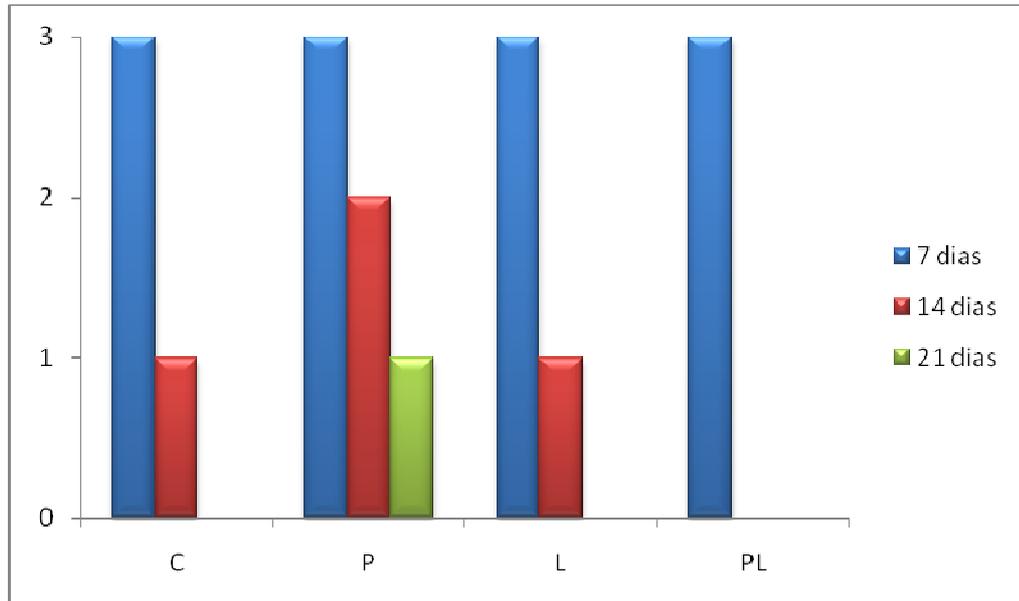


Figura 9: Intensidade da proliferação vascular nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL.

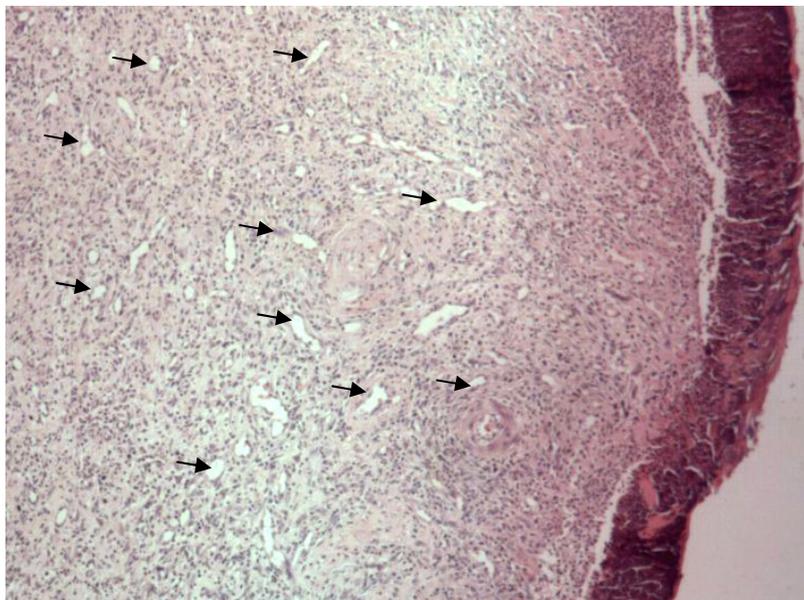


Figura 10 - Fotomicrografia de corte histológico de pele de rato *Wistar*. Animal do grupo C demonstrando acentuada proliferação vascular (setas) no período de 7 dias de pós-operatório. HE, 40x.

5.1.2 Células agranulócitas

Nos grupos C e PL houve presença acentuada dessas células no 7º dia de pós-operatório. No 14º e 21º dias de pós-operatório os grupos C, P e L comportaram-se de forma semelhante, com discreta presença de macrófagos. O grupo PL demonstrou ausência dessas células no 14º dia e presença muito discreta no 21º de pós-operatório (Figuras 11, 12 e 13).

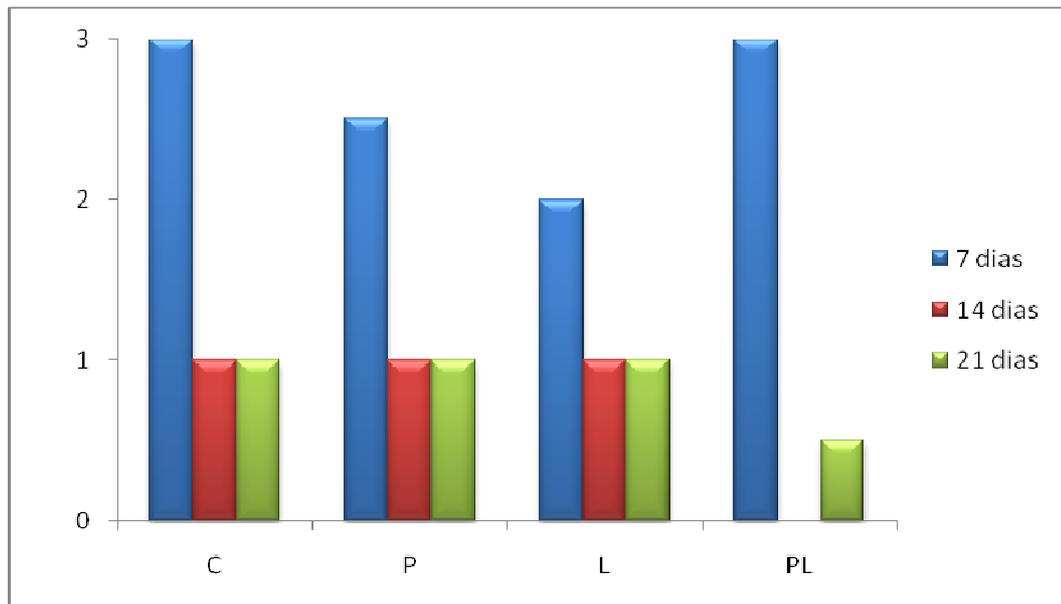


Figura 11: Intensidade da presença de células agranulócitas nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL.

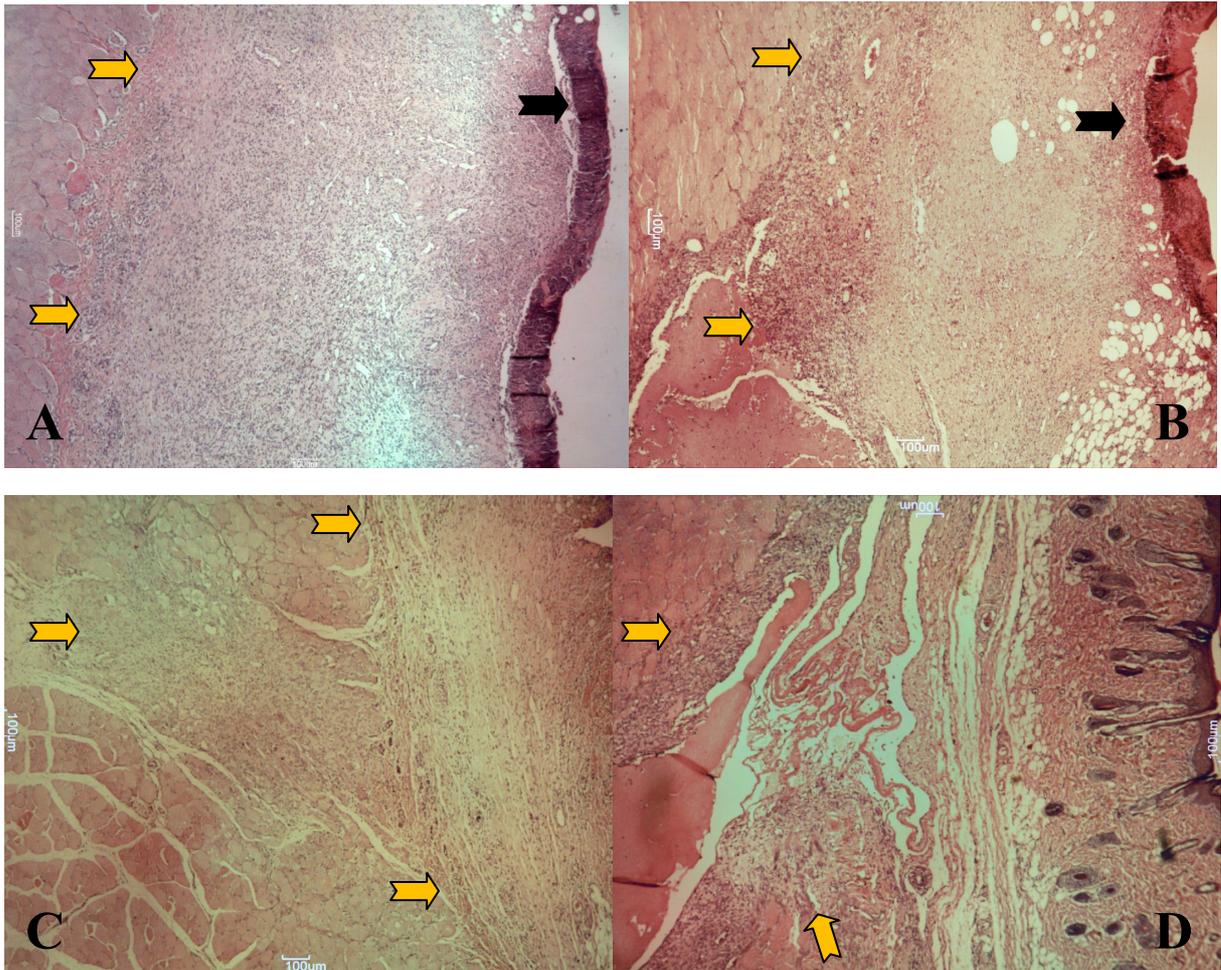


Figura 12 – Fotomicrografias dos grupos no período de 7 dias de pós-operatório. **A:** lâmina obtida do animal do grupo C em que se observa área focalmente extensa de quantidade acentuada de tecido de granulação (setas amarelas) e presença de crosta (seta preta). **B:** lâmina do animal do grupo PL. Notar área focalmente extensa de tecido de granulação (setas amarelas) e crosta (seta preta). **C:** lâmina do animal do grupo P em que se observa presença acentuada de infiltrado inflamatório (setas). **D:** lâmina do animal do grupo L. Notar presença moderada de infiltrado inflamatório (setas). HE. 40x.

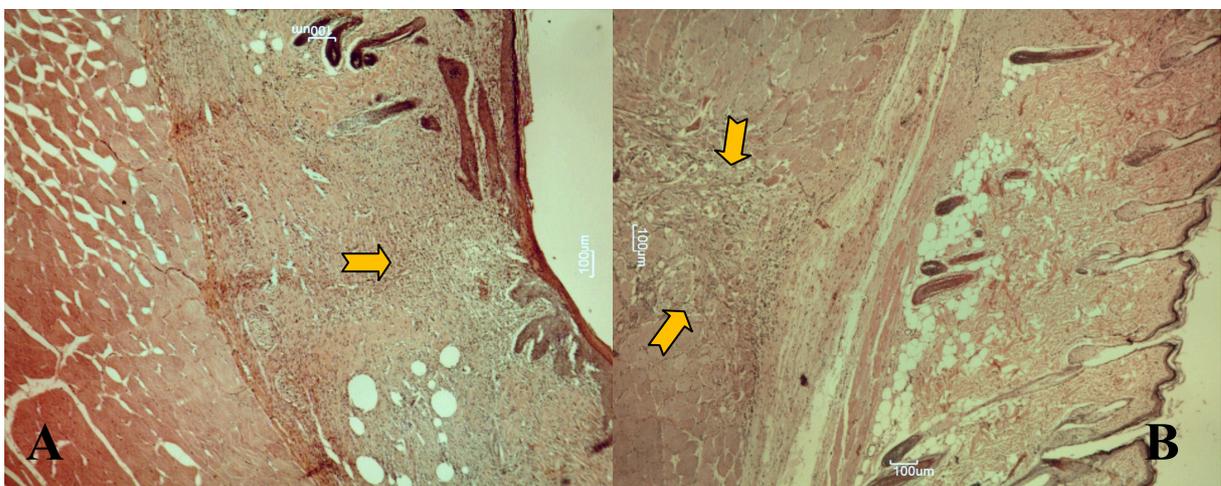


Figura 13 – Fotomicrografias dos grupos no período de 14 dias. **A:** lâmina obtida do animal do grupo P. Nota-se discreta área de tecido de granulação (seta). **B:** lâmina obtida do animal do grupo L, observa-se área discreta de tecido de granulação (setas). HE. 40x.

5.1.3 Células granulócitas

Os grupos se comportaram de forma semelhante em praticamente todos os períodos avaliados com relação à presença de células granulócitas. Somente no 7º dia o grupo L apresentou quantidade muito discreta de neutrófilos quando comparado aos demais grupos que apresentaram discreta presença dos mesmos. No 14º e 21º dias elas permaneceram ausentes em todos os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Intensidade da reação inflamatória medida pela quantidade de neutrófilos observados no processo de reparação tecidual nos períodos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, entre os grupos C, P, L e PL

| Dias de pós-operatório | Grupo C | Grupo P | Grupo L | Grupo PL |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| 7 | 1 | 1 | 0,5 | 1 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |

5.1.4 Proliferação de fibroblastos

Outro item no processo cicatricial averiguado foi a proliferação fibroblástica. No 7º dia de pós-operatório, ela foi moderada em todos os grupos, sendo que o grupo PL mostrou-se de moderado para acentuado. Não houve diferença do 7º para o 14º dia de pós-operatório entre os grupos C e P, já nos grupos L e PL houve indícios de aumento da proliferação de fibroblastos de moderada para acentuada no 14º, permanecendo iguais no 21º. O grupo P não demonstrou diferença entre os diferentes períodos analisados (Figura 14).

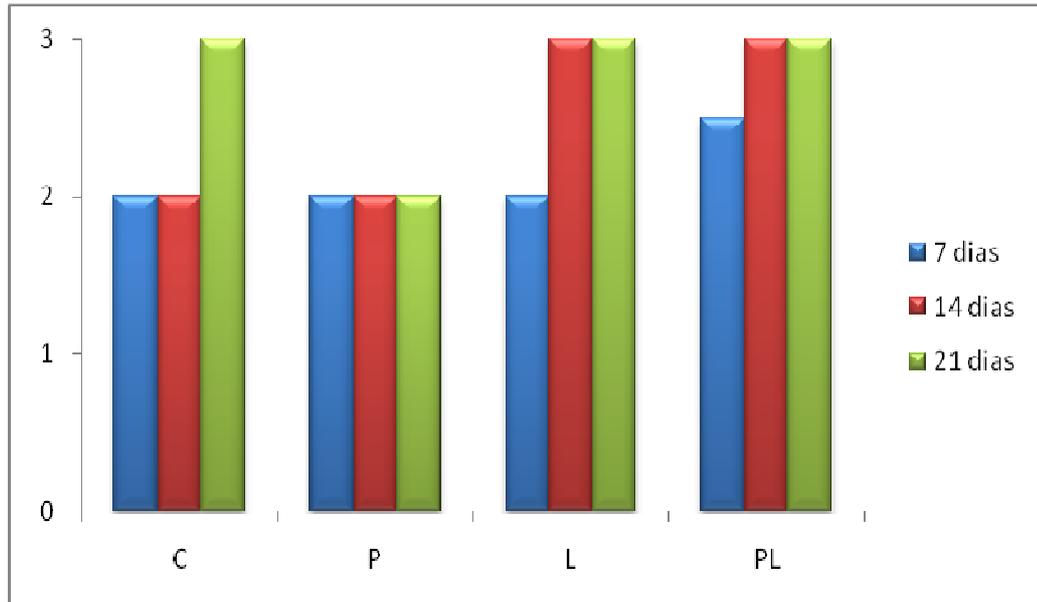


Figura 14: Intensidade da proliferação de fibroblastos nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL.

5.1.5 Reepitelização

A reepitelização foi similar entre os grupos em todos os períodos analisados, sendo ausente no 7º dia de pós-operatório e acentuada no 14º e 21º dias (Tabela 3 e Figuras 15 e 16).

Tabela 3 – Intensidade da reepitelização, observada no processo de reparação tecidual nos períodos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, entre os grupos C, P, L e PL

| Dias de pós-operatório | Grupo C | Grupo P | Grupo L | Grupo PL |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 21 | 3 | 3 | 3 | 3 |

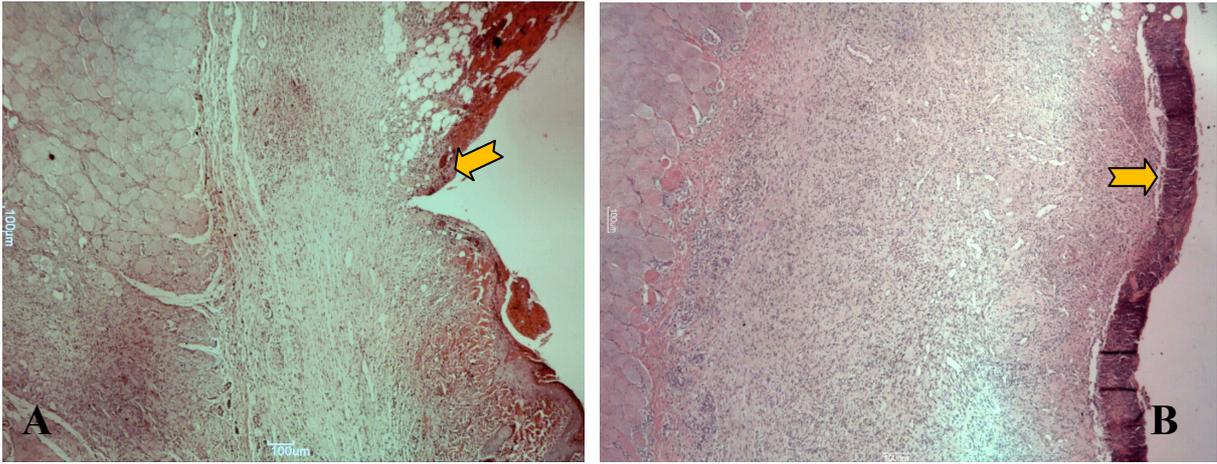


Figura 15- Fotomicrografias da pele de ratos *Wistar* aos 7 dias de pós-operatório. **A:** lâmina obtida do animal do grupo L. Notar ausência de reepitelização (seta). **B:** lâmina obtida do animal do grupo C. Notar a ausência de reepitelização e presença de crosta (seta). HE, 40x.

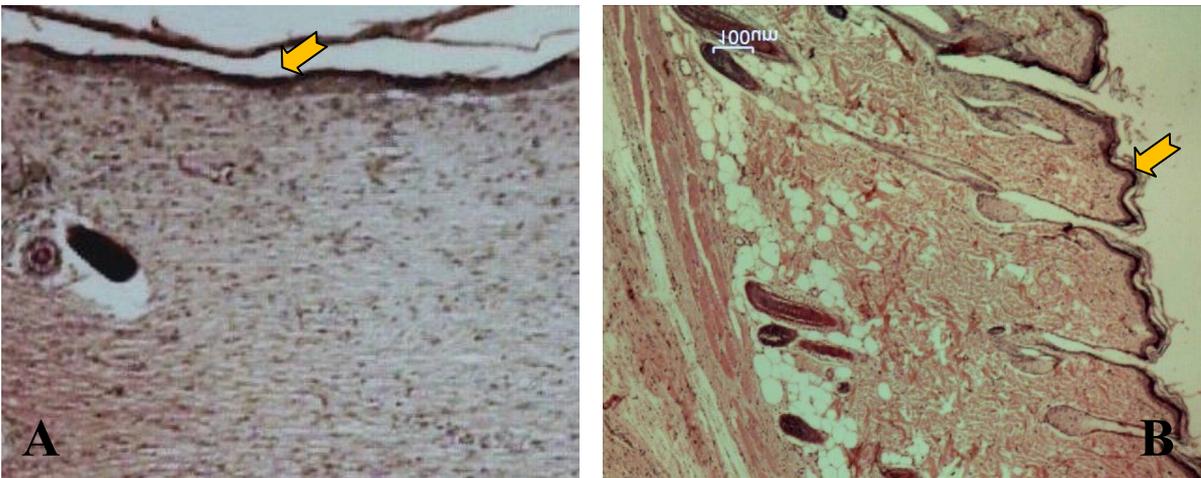


Figura 16- Fotomicrografias da pele de ratos *Wistar*, período de 21 dias de pós-operatório. **A:** lâmina de animal do grupo C. Observa-se total reconstituição do epitélio (seta). **B:** lâmina de animal do grupo L. Observa-se a reepitelização (seta). HE, 40x.

5.1.6 Presença de fibras colágenas

Com relação à presença de fibras colágenas no 7º dia de pós-operatório, os grupos P, L e PL mostraram-se aumentadas em relação ao grupo C, sendo que a associação dos tratamentos (PL) foi superior, mostrando-se acentuada. No 14º dia o grupo PRP, mostrou-se com maior quantidade de fibras colágenas que o grupo L, que permaneceu igual ao 7º dia. No 21º dia todos os grupos comportaram-se de forma semelhante atingindo quantidade acentuada de fibras colágenas (Figuras 17 e 18).

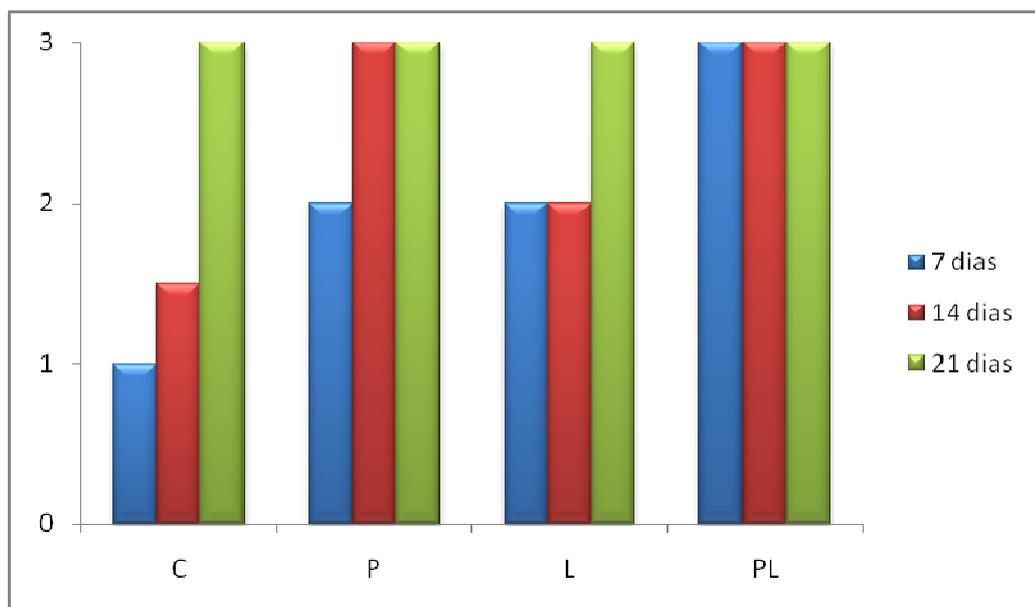


Figura 17: Intensidade da presença de fibras colágenas nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias) dos grupos C, P, L e PL

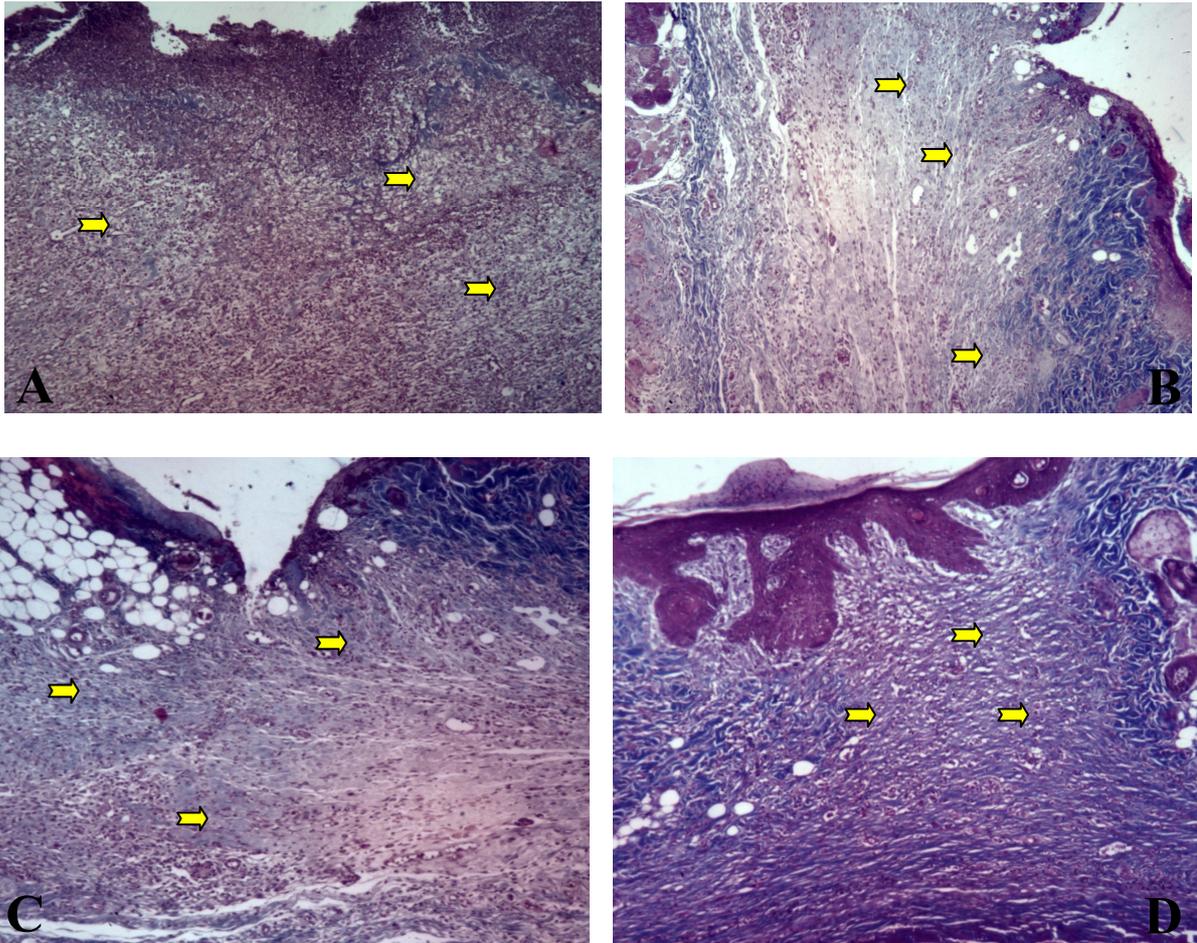


Figura 18– Fotomicrografias de corte histológico de pele e subcutâneo de ratos *Wistar* aos 7 dias de pós-operatório. **A:** lâmina do animal do grupo C. Notar discreta presença de fibras colágenas (setas). **B:** lâmina do animal do grupo P. Notar presença moderada de fibras colágenas (setas). **C:** lâmina do animal grupo L com moderada presença de fibras colágenas. **D:** lâmina do animal do grupo PL onde se observa presença acentuada de fibras colágenas. TM, 40x.

5.2 Análise estatística

Foi realizada através do teste exato de Fischer com grau de liberdade 5% onde se considerou estatisticamente significante os resultados de p maior ou igual a 0,05.

Tabela 4 – Observação histológica da presença da proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas nos animais dos grupos C, P, L e PL (seguimento 7, 14 e 21 dias), respectivamente.

| Grupos | 7 dias | 14 dias | 21 dias |
|---------------|---------------|----------------|----------------|
| C x P | p= 0,5152 | p= 0,6819 | p= 1 |
| C x L | p= 0,5152 | p= 1 | p= 1 |
| C x PL | p= 0,5152 | p= 1 | p= 1 |
| P x L | p= 0,5152 | p= 0,6819 | p= 1 |
| P x PL | p= 0,5152 | p= 0,6819 | p= 1 |
| L x PL | p= 0,5152 | p= 1 | p= 1 |

Teste Exato de Fisher

Tabela 5 – Observação histológica da presença da proliferação de fibroblastos, reepitelização e de fibras colágenas nos animais dos grupos C, P, L e PL (seguimento 7, 14 e 21 dias), respectivamente.

| Grupos | 7 dias | 14 dias | 21 dias |
|---------------|---------------|----------------|----------------|
| C x P | p= 0,2457 | p= 1 | p= 1 |
| C x L | p= 0,2457 | p= 1 | p= 1 |
| C x PL | p= 0,2457 | p= 1 | p= 1 |
| P x L | p= 0,5152 | p= 1 | p= 1 |
| P x PL | p= 0,5152 | p= 1 | p= 1 |
| L x PL | p= 0,5152 | p= 1 | p= 1 |

Teste Exato de Fisher

Tabela 6 – Observação histológica da proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas, proliferação de fibroblastos, reepitelização e presença de fibras colágenas nos animais dos grupos C, P, L e PL (seguimento 7, 14 e 21 dias), respectivamente.

| Tratamentos | C | | | P | | | L | | | PL | | |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 7d | 14d | 21d |
| Análises | SN |
| Proliferação vascular | 2 0 | 0 2 | 0 2 | 2 0 | 2 0 | 0 2 | 2 0 | 0 2 | 0 2 | 2 0 | 0 2 | 0 2 |
| Células agranulócitas | 2 0 | 0 2 | 0 2 | 2 0 | 0 2 | 0 2 | 2 0 | 0 2 | 0 2 | 2 0 | 0 2 | 0 2 |
| Células granulócitas | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 | 0 2 |
| Total | 4 2 | 0 6 | 0 6 | 4 2 | 2 4 | 0 6 | 4 2 | 0 6 | 0 6 | 4 2 | 0 6 | 0 6 |
| Proliferação fibroblastos | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 |
| Reepitelização | 0 2 | 2 0 | 2 0 | 0 2 | 2 0 | 2 0 | 0 2 | 2 0 | 2 0 | 0 2 | 2 0 | 2 0 |
| Presença de fibras colágenas | 0 2 | 1 1 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 |
| Total | 2 4 | 5 1 | 6 0 | 4 2 | 6 0 | 6 0 | 4 2 | 6 0 | 6 0 | 4 2 | 6 0 | 6 0 |

Legenda: S (sim). N (não). D (dias).

Teste Exato de Fischer

6 DISCUSSÃO

A reparação tecidual é um fenômeno essencial para a sobrevivência dos organismos. No homem, esta capacidade é limitada pelo potencial de resposta à agressão bem como da capacidade de recrutamento e multiplicação das células que compõem os tecidos. Desta forma, buscar mecanismos que permitam acelerar e garantir estes processos tem sido o caminho trilhado pelos pesquisadores nas últimas décadas (MARX, 2001; CATÃO, 2004; MALDEBAUM *et al.*, 2003).

A escolha dos ratos como animais de experimentação para este estudo baseou-se no fato de que estes animais permitem a obtenção de quantidades representativas de tecido para os mais variados procedimentos, possibilitando a padronização do experimento. Os ratos são de fácil manipulação em razão de sua docilidade, apresentam um custo relativamente baixo e requerem menor espaço para manutenção, são animais de rápida obtenção, uma vez que apresentam curto período de procriação e permitem um bom controle genético eliminando fatores como deficiências imunes (MORETTON *et al.*, 2000).

Contudo, Hämmerle *et al.* (1996) ponderam que a transposição dos efeitos obtidos em modelos experimentais realizados em animais deve ser feita com precaução, considerando-se as diferenças morfofisiológicas destes animais com humanos. Moretton *et al.* (2000), afirmaram que o metabolismo do rato é extremamente acelerado quando comparado ao dos seres humanos, sendo que um mês de vida do rato corresponde a 30 meses em humanos.

O processo de reparação tecidual apresenta várias fases com características próprias, que se desenvolvem concomitantemente (CLARK, 1993; THOMAS 1995; BRASILEIRO FILHO, 2004). Vários autores já avaliaram o emprego de recursos que influenciam o processo cicatricial com o intuito de acelerá-lo (LYNCH *et al.*, 1989; KNIGHTON *et al.*, 1990; REEDY, 2003; ENWEMEKA *et al.*, 2004). Entre os principais recursos disponíveis no Brasil para auxiliar a cicatrização de feridas estão o plasma rico em plaquetas (PRP) e o laser de baixa potência.

O PRP é um produto derivado da ativação dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas que promove um forte estímulo para a cicatrização (MARX, 2001). Foram identificados sete diferentes fatores de crescimento secretados ativamente pelas plaquetas e

que atuam na fase inicial da cicatrização (MAN *et al.*, 2000). São eles três isômeros do fator de crescimento plaquetário (PDGF) – PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ e PDGF $\alpha\beta$ – dois fatores de crescimento transformadores (TGF) – TGF β 1 e TGF β 2 – o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento epitelial (EGF) (LAMELLO, 1999; MARX, 2001). Os TGF ativam os fibroblastos para formação de protocógeno, que resulta na deposição de colágeno e cicatrização da ferida. Os PDGFs, associados ou não com os TGFs, aumentam a vascularização tissular, promovem a proliferação de fibroblastos, aumentam a quantidade de colágeno, estimulam a produção de tecido de granulação e melhoram a osteogênese (LEE, 1998; VALE, 2002). O VEGF estimula a angiogênese, a mitogênese e a permeabilidade vascular e o EGF induz o crescimento de tecido epitelial e promove também a angiogênese. Estas substâncias tornam a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a interação de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura (VENDRAMIN *et al.*, 2006).

Na década de 90 começaram os primeiros estudos com uso do PRP para acelerar a cicatrização em úlceras cutâneas (KNIGHTON *et al.*, 1990) e no processo de reparo ósseo em torno de implantes (LYNCH *et al.*, 1991). O PRP tornou-se popular na comunidade odontológica após o trabalho de Marx *et al.* (1998) em que estudaram o PRP associado ao osso autógeno dentro de defeitos ósseos mandibulares, e obtiveram resultados bastante satisfatórios. A grande maioria dos trabalhos revisados da literatura relaciona o PRP com a cicatrização óssea (LYNCH *et al.*, 1991; BECKER *et al.* 1992; LIND, 1998; MARX, 1998), acredita-se que este fato está na quantidade de defeitos ósseos que afetam a cirurgia construtiva de cabeça e pescoço e algumas áreas da Odontologia, principalmente a implantodontia (MARX, 2001).

Atualmente a medicina vem estudando o uso do PRP na cicatrização após cirurgia plástica (VENDRAMIN *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2008). Vendramin *et al.* (2006) encontrou resultados bastante satisfatórios com o uso do PRP na cicatrização de feridas crônicas de pacientes diabéticos e em feridas traumáticas com enxerto de pele parcial. Salientaram também que a obtenção do gel de PRP e fatores de crescimento pode ser feita de forma mais econômica e em locais sem muitos recursos tecnológicos, mas que disponham de uma centrífuga e materiais usualmente presentes em ambientes hospitalares como seringas, agulhas e tubos de coleta de sangue.

O presente estudo concorda com a afirmação anterior, pois mesmo com recursos simples e até precários como a centrífuga para separação do sangue e outros aparelhos como o de banho-maria com termômetro adaptado, foi possível desenvolver o gel de PRP. Porém foi imprescindível o treinamento de pessoal e a utilização de materiais como seringas, agulhas, luvas entre outros sempre estéreis e descartáveis. Foi necessário aproximadamente um mês para aprendizado e ajuste de um protocolo para obtenção do gel de PRP, pois todos descritos na literatura eram adaptados para humanos, coelhos ou cães e não existia até o momento um protocolo adaptado para ratos.

A preparação do PRP em si é muito simples, ao alcance de qualquer profissional que disponha de uma centrífuga com regulagem de velocidade. Como o PRP é uma preparação autógena, não há risco de contaminação, inclusive de infecções no local operatório, desde que durante a manipulação, sejam respeitados os princípios da técnica asséptica. Além disso, o PRP pode ser associado a enxertos ósseos autógenos ou alógenos e a materiais substitutivos, demonstrando bons resultados clínicos, mais promissores que os resultados obtidos com os estudos experimentais. Ainda assim, as experimentações que os presentes autores relataram de sua prática sinalizaram para os benefícios desse concentrado de fatores de crescimento como coadjuvante a outros tratamentos (VENDRAMIN *et al.*, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2008).

Pesquisas envolvendo o princípio de ação do laser vêm sendo desenvolvidas desde o início do século, mas só em 1960, o primeiro laser foi empregado com sucesso (GUIRRO & GUIRRO, 2002). A laserterapia tem tido uma amplificação na sua utilização nas últimas três décadas, na Europa Ocidental e Rússia e nos últimos dez anos nos Estados Unidos e Canadá. Seu êxito está relacionado às respostas que induz nos tecidos, como redução do edema e diminuição do processo inflamatório, entre outras (LOW & REED, 2001; MONTELLO, 2002; AZEVEDO & MAGALHÃES, 2003).

Das múltiplas aplicações do laser em medicina, pode-se tirar proveito dos seus efeitos fisioterápicos, baseando-se em sua ação vasodilatadora pré-capilar e capilar. Tais efeitos melhoram a circulação sanguínea, aumentam a oxigenação dos tecidos, o aporte de nutrientes e a retirada de catabólitos e promovem modificações na pressão hidrostática, favorecendo a reabsorção de edemas. Além disso, inibem a síntese de prostaglandinas, elevando o limiar de dor, estimulam a produção de endorfinas e atuam positivamente sob a regeneração tecidual pelo aumento do metabolismo (CATÃO, 2004).

Desde que os lasers foram considerados bioestimuladores, passaram a ser utilizados experimentalmente e clinicamente para estimular a cicatrização de feridas abertas e cirúrgicas, na cicatrização óssea, nos processos inflamatórios e nas compressões nervosas (AZEVEDO & MAGALHÃES, 2003).

O comprimento de onda e a densidade de energia são fatores preponderantes para o sucesso da terapia no que se refere à cicatrização (LOW & REED, 2001; MONTELLO, 2002; AZEVEDO & MAGALHÃES, 2003). Para avaliar o efeito dos raios laser sob feridas deve-se levar em consideração, sexo, idade, história pessoal, antecedentes familiares, tipo, tamanho e localização anatômica da ferida, tratamentos anteriores realizados, medicamentos usados, presença de dor, entre outros (SULEWSKI, 2000; BRUGNERA JUNIOR *et al.*, 2003; ROCHA JÚNIOR *et al.*, 2006).

Recomenda-se que a laserterapia deve ser realizada após a preparação e demarcação da área a ser tratada, através de uma caneta de forma pontual ou em varredura, podendo-se realizar sessões diárias ou em intervalos de 2 a 4 dias. A área a ser tratada deve ser dividida em cm² e o raio deve incidir por 15 a 30 segundos, diretos e perpendicularmente ao centro da área assim concebida. Além da forma pontual ou em varredura a aplicação da radiação pode-se dar em forma centrípeta (BARANAUSKAS & PARIZOTTO, 1998; LAMAS, 1999; MONTELLO 2002).

Entre as contra-indicações do laser estão às aplicações em pacientes com neoplasias, mulheres gestantes e sobre placas epifisárias abertas. Dentre as precauções, evitar a incidência direta nos olhos do aplicador e do paciente e os quais devem estar protegidos por óculos de segurança (LAMAS, 1999).

Para análise histológica do presente estudo, foram utilizados dois tipos de coloração: hematoxilina- eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). A primeira para observação dos elementos celulares e a última para estudo das fibras colágenas.

A fase inicial da cicatrização é chamada de inflamatória e é vital para o processo de reparação, ocorre aumento da permeabilidade capilar. Com aumento da permeabilidade capilar ocorre à migração de células (macrófagos e linfócitos principalmente) para a ferida, que com o acúmulo de plasma, constituem o exsudato inflamatório (GARROS *et al.*, 2006). Estas costumam aparecer próximo ao terceiro dia da resposta inflamatória, sendo que os macrófagos substituem amplamente os neutrófilos (ROBBINS & COTRAN, 2004). Os linfócitos estão intimamente ligados aos processos imunológicos humorais e celulares, os

macrófagos têm a capacidade de capturar partículas que variam de 2 a 10 μ m (SANTOS & SANTOS, 2004). No estudo em questão, o grupo PL demonstrou ausência dessas células no 14^o dia e presença muito discreta no 21^o de pós-operatório, acredita-se que esta diferença estaria relacionada à característica individual de cada animal.

As células granulócitas apresentam característica nuclear variada e sua nomenclatura depende do tipo de grânulos que aparecem no citoplasma quando coradas por corantes pantintoriais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). As células granulócitas avaliadas neste estudo foram os neutrófilos, cuja principal função é a de localizar os focos inflamatórios (são os primeiros leucócitos a chegar ao local onde há um agente agressor e são predominantes na inflamação aguda, na maioria das vezes) e capturam bactérias e toxinas, processo conhecido por fagocitose (SANTOS & SANTOS, 2004). Os neutrófilos constituem as principais células granulócitas do processo de cicatrização por primeira intenção (ROBBINS & COTRAN, 2004). No 14^o e 21^o dias de pós-operatório do presente estudo, elas permaneceram ausentes em todos os grupos, sendo que no 7^o dia foi discreto para todos os grupos, o que sugere que esteja relacionado com a ausência de contaminação por infecção.

Segue-se então a fase proliferativa ou de fibroplasia. A proliferação endotelial, processo fundamental no mecanismo de cicatrização, depende da presença de macrófagos, que promovem a neo-angiogênese devido às suas interações com prostaglandinas e tromboxanes. Em contigüidade aos capilares rompidos, originam-se brotos endoteliais que proliferam rapidamente, formando cordões sólidos, entremeando-se com fibroblastos que se canalizam permitindo o fluxo sanguíneo. O conjuntivo recém formado intensamente vascularizado constitui o tecido de granulação (ROBBINS & COTRAN, 2004). No presente estudo não houve diferença entre os grupos no quesito proliferação vascular aos 7 dias, o que foi dentro do esperado pois a neovascularização máxima da cicatrização encontra-se próximo ao quinto dia. A estatística realizada através do teste exato de Fischer mostrou um comportamento inferior do grupo PRP aos 14 dias.

O fibroblasto é considerado uma célula reguladora por apresentar a dupla função de síntese e reabsorção de colágeno, procurando manter o equilíbrio quantitativo e qualitativo desta proteína (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). No presente estudo houve tendência maior da proliferação de fibroblastos do grupo PL quando comparado aos demais grupos no período de 7^o dia de pós-operatório. Aos 14^o dias, os grupos PL e L demonstraram presença

acentuada de fibroblastos quando comparados aos grupos C e P. Estes resultados sugeriram um aumento da proliferação de fibroblastos no grupo PRP associado ao laser (PL).

Durante a segunda semana de cicatrização ocorre acúmulo contínuo de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocítico, edema e vascularidade aumentados desaparecem por completo. Nesse momento, o longo processo de empalidecimento começa a ser efetuado pelo acúmulo aumentado de colágeno dentro da cicatriz incisional, acompanhado da regressão dos canais vasculares (ROBBINS & COTRAN, 2004). Em relação ao colágeno, o grupo PL mostrou presença acentuada aos 7º e 14º dias em relação aos demais grupos, presume-se que houve uma cicatrização mais rápida neste grupo.

A epiderme recupera sua espessura normal por volta do 5º dia após uma lesão em cicatrização por primeira intenção, ocorre diferenciação de células superficiais que produzem uma arquitetura epidérmica madura com queratinização da superfície (ROBBINS & COTRAN, 2004). Os resultados de todos os grupos com relação à presença da reepitelização não corroboraram com este fato, demonstrando completa reepitelização somente aos 14º dias. Acredita-se que esta diferença esteja relacionada com a associação da primeira com segunda intenção na cicatrização da epiderme, pois alguns animais do estudo apresentaram-se sem suturas antes dos sete dias de pós-operatório.

7 CONCLUSÃO

Considerando os resultados e a metodologia empregada, constatou-se que:

O PRP utilizado isoladamente em defeitos de tecido mole no processo de reparo por primeira intenção em ratos *Wistar*, aos 14 dias promoveu uma cicatrização menos satisfatória. Nos tempos de 7 e 21 dias, o PRP isolado ou associado ao laser de baixa potência, promoveu um processo de cicatrização com qualidades e quantidades iguais. Neste estudo o PRP não constituiu um fator decisivo para melhoras no processo de reparo.

REFERÊNCIAS¹

Anuita E. Plasma rich growth factors: preliminary results of use in preparation of futures sites for implants. *Int Oral Maxillofac Surg.* 1999; 14: 529-51.

Albuquerque DP, Oliveira TMF, Maranhão AWA, Milhomens JAF, Gusmão ES. Aplicação clínico-cirúrgica do plasma rico em plaquetas – estudo revisional. *Odontol Clín Cient.* 2008; 7(2): 119-122.

Almeida ARH, Menezes JA, Araújo GKM, Mafra AVC. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. *Rev Bras Cir Plást.* 2008; 23(2): 82-8.

Azevedo LR, Magalhães AC, Dias A. O uso do Laser no tratamento de lesões Bucais. *JBC;* 2003, 42: 496-498.

Baranauskas V, Parizotto NA. Structural analysis of collagen fibrils after HeNe laser photostimulated regenerating rat tendon. In: 2º Congress World Association for Laser Therapy; 1998 Sep 2-5; Kansas City. Proceedings. p.66.

¹ Estilo Vancouver (1979), atualizado em fevereiro de 2007.

Barbieri CMO, Costa PI. Fatores de Crescimento Derivados das Plaquetas Humanas (PDGF) – Obtenção e Perspectiva de Aplicação Clínica. In: Pontual MAB, Magini RS, *et al.* Plasma Rico em Plaquetas PRP e Fatores de Crescimento – Das pesquisas científicas à Clínica Odontológica. São Paulo: Santos Editora Ltda; 2004.p. 121-144.

Becker W, *et al.* A comparison of membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. J. Periodontol.; 1992, 63 (11): 929-940.

Bortolletto, R. Efeito da radiação do laser de baixa potência no potencial de membrana de mitocôndrias em células “in vitro”. 2000.115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, 2000.

Brasileiro Filho, G. Patologia Geral, 2^oed, São Paulo; Guanabara Koogan. 2004; 62-65.

Brown DH. The versatile contact ND: YAG. Laser in head and neck surgery. An in vivo and clinical analysis. The Laryngoscopia, 2000; 110: p.854-66.

Brugnera Junior A, Santos AECG, Bologna ED *et al.* Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003.

Catão MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. RBPO; 2004, p. 10-12.

Clark RAF. Biology of dermatol wound repair dermatological clinics. Journal Invest Dermatol. v.1, n.4, p.647-661, 1993.

Clark RI, Singer A. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. N Engl J Med.; 1999, 341(10): 738-46.

Dealey C. The care of wounds: a guide for nurses, 2^a ed. Malden: Blackwell 2005.

Earl GF, Tara LA. Platelet-rich plasma: ready or not. Journal of Oral Maxillo Facial Surgery. 2004; 62: 484-88.

Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of low power lasers in tissue repair and pain control: A meta-analysis study. Photomedicine and Laser Surgery; 2004, 22: 323-29.

Garg A, Valcanaia T, Stevão E. A utilização de plasma enriquecido de plaquetas (PEP) para aumentar o sucesso do enxerto ósseo, com finalidade implantodológica. Rev Bras Implant.; 1999, 6: 49-53.

Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. Acta Cir Bras. [periódico na internet] 2006; 21 Supl 3: 55-65. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>

Gogia PP. Feridas: tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: Revinter; 2003.

Guirro RRJ, Guirro EC. Fisioterapia Dermato-funcional: fundamentos, recursos e patologias. 3ª ed. São Paulo: Manole, cap.5, 2002.

Guyton AC, Hall JE. Fisiologia humana. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Hämmerle CH, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. A novel model system for the study of experimental guided bone formation in humans. Clin Oral Implants Res 1996;7(1):38-47.

Herdon DN, Nguyen TT, Gilpin B. Growth factors: local and systemic. Arch Surg.; 1993, 128: 1227-1232.

Homes DD, Hrapkiewicz K, Medina L. Rats. Clinical Laboratory Animal Medicine and Introduction. Second Edition. Iowa State University Press/Ames; 1998. p.41.

Ihsan MFR. Low level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. Photomedicine and Laser Surgery; 2005, 23: 289-94.

Junqueira LC, Carneiro J. Células do Sangue. In: Histologia Básica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008. p. 221-36.

Klongnoi B.; *et al.* Lack of beneficial effect of the plasma platelet-rich in the increase of sinus using a fluorohydroxyapatite or a bone autogenous : a study explorative. J Clin Periodontol; 2006, 33: 500-4.

Knighton DR *et al.* Simulation of repair in chronic, non healing cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. Surg Gynecol Obst.; 1990, 170: 56-58.

Lamello SG. Suturas. In: Younes RN, Buolini D. Bases fisiopatológicas da cirurgia. São Paulo: Lemar; 1999.

Lee R et al. Wintrobe: hematologia clínica. São Paulo: Monole; 1998.

Lind M. Growth factor stimulation of bone healing: effects on osteoblasts, osteomyelitis and implant fixation. Acta Orthop Scand.; 1998, 69: 1-37.

Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. Journal of Clinical Periodontology. 1989; 16: 545-8.

Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH. Effects of the platelet-derived growth factor/Insulin-like growth factor I combination on the bone regeneration around titanium dental implants results of a pilot study in the beagle dogs. J. Periodontol. 1991; 62 (11) 710-716.

Lozada JL, et al. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I – Background and processing techniques. J Oral Implantol. 2001; 27(1): 38-42.

Low J; Reed, A. Eletroterapia explicada princípios e prática. São Paulo: Manole, 2001. p. 389-409.

Macedo AP, *et al.* Protocolo de Obtenção e Aplicações Clínicas do PRP. In: Pontual MAB, Magini RS, *et al.* Plasma Rico em Plaquetas PRP e Fatores de Crescimento – Das pesquisas científicas à Clínica Odontológica. São Paulo: Santos Editora Ltda; 2004.p. 189-230.

Maldebaum SH, Santis EP, Maldebaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.78, p.521-22, set/out. 2003.

Man D, Harvey P, Jill E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet- poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. Plas. and Reconstr.Surg. 2000; 27: 229-39

Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. Plast Reconstr Surg. 2001; 107(1): 229-39.

Marx RE. Platelet rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? Int J Oral Implant.; 2001, 10(4): 225-228.

Marx RE, Garg AK. Bone graft physiology with use platelet-rich plasma. The Sinus Bone Grafts. Colorado: Quintessence Books, 1999. p.183-189.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt, R.M. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998; 85: 638-46.

Mc Grath MH. Peptide growth factors and wound healing. Clin Plast Surg.; 1990, 17(3): 421-36.

Meneghin P, Vattimo MFE. Fisiologia do processo cicatricial. In: Jorge AS, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional no tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu; 2003.p.31-42.

Montello, M.S.A.G. Efeito da terapia com laser de baixa potência (HeNe e AsGa) na dermatite induzida por óleo de cróton em orelha de camundongo. 2002. 220f. Dissertação (Mestrado em engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002.

Moretton TR, Brown JrCE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. J Biomed Mater Res, 2000; 52(3):528-33.

Ribeiro MS. Workshop: Utilização clínica do Laser. FDCTO-USP 1999. p. 25-27.

Reedy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible HeNe and infrared GaAs lasers on healing impaired diabetic rat wound. *Lasers in surgery and Medicine*. 2003; 33: 344-351.

Robbins SL, Cotran RS. Tecido de Renovação e Reparação: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. *Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 7º Ed, 2004. p. 91-124.

Rocha Júnior AM, Andrade LCF, Oliveira RG, Aarestrup FM, Farias RE. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(2): 150-56.

Santos VLCGS. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte YAO, Diogo MJD. *Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico*. São Paulo: Atheneu; 2000, p.265-306.

Santos MD, Santos MDD. O sangue e a medula óssea. In: Pontual MAB, Magini RS, *et al*. *Plasma Rico em Plaquetas PRP e Fatores de Crescimento – Das pesquisas científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Santos Editora Ltda; 2004.p. 3-44.

Schimitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J. Oral Maxilli Fac Surg.*, v.50, p.119-121, sep.2001.

Suaid FF, Santamaria MP, Carvalho MD, Souza HW, Sallum EA, Nocitti Júnior FH. Avaliação clínica da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em retrações gengivais criadas em cães. *Rev Periodont.* 2007; 17(01): 68-75.

Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. *Dent Clin North Am*, v.44, n.4, p. 717-52, 2000.

Thomas DW, Oneill ID, Harding KG. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53: 442-7.

Vale GNVB. Plasma rico em plaquetas: aplicação na Odontologia: revisão bibliográfica [monografia]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Rev Col Bras Cir.* 2006; 33 (1): 24-28.

Verrastro T. Hemostasia. In: Lorenzi TF, Netsow. Hematologia e hemoterapia: fundamentos da morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Atheneu; 1996, p.181-91.

Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet-gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J. Oral Maxillofac Surg.; 1997, 55: 1294-9.

APÊNDICE A – Dados dos Achados Histológicos

A) Coloração em HE – avaliar os principais componentes do tecido de granulação nos grupos C, P, L e PL, nos diferentes períodos de observação (7, 14 e 21 dias).

7 dias

| | Controle | PRP | Laser | PRP + Laser |
|-----------------------------|----------|-----|-------|-------------|
| Proliferação vascular | 3-3 | 3-3 | 3-3 | 3-3 |
| Células agralunócitas | 3-3 | 2-3 | 2-2 | 3-3 |
| Granulócitos | 1-1 | 1-1 | 0-1 | 1-1 |
| Proliferização fibroblastos | 2-2 | 2-2 | 2-2 | 2-3 |
| Reepitelização | 0-0 | 0-0 | 0-0 | 0-0 |

14 dias

| | Controle | PRP | Laser | PRP + Laser |
|-----------------------------|----------|-----|-------|-------------|
| Proliferação vascular | 1-1 | 2-2 | 1-1 | 0-0 |
| Células agralunócitas | 1-1 | 1-1 | 1-1 | 0-0 |
| Granulócitos | 0-0 | 0-0 | 0-0 | 0-0 |
| Proliferização fibroblastos | 2-2 | 2-2 | 3-3 | 3-3 |
| Reepitelização | 3-3 | 3-3 | 3-3 | 3-3 |

21 dias

| | Controle | PRP | Laser | PRP + Laser |
|-----------------------------|----------|-----|-------|-------------|
| Proliferação vascular | 0-0 | 1-1 | 0-0 | 0-0 |
| Células agralunócitas | 1-1 | 1-1 | 1-1 | 0-1 |
| Granulócitos | 0-0 | 0-0 | 0-0 | 0-0 |
| Proliferização fibroblastos | 3-3 | 2-2 | 3-3 | 3-3 |
| Reepitelização | 3-3 | 3-3 | 3-3 | 3-3 |

B) Coloração em Tricrômico de Masson (TM) avaliar a presença de fibras colágenas:

| Período de Observação | Controle | PRP | Laser | PRP + Laser |
|------------------------------|-----------------|------------|--------------|--------------------|
| 7 dias | 1-1 | 2-2 | 2-2 | 3-3 |
| 14 dias | 1-2 | 3-3 | 2-2 | 3-3 |
| 21 dias | 3-3 | 3-3 | 3-3 | 3-3 |

Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos de HE e TM

- Ausente= 0
- Discreto= 1
- Moderado= 2
- Acentuado= 3

APÊNDICE B

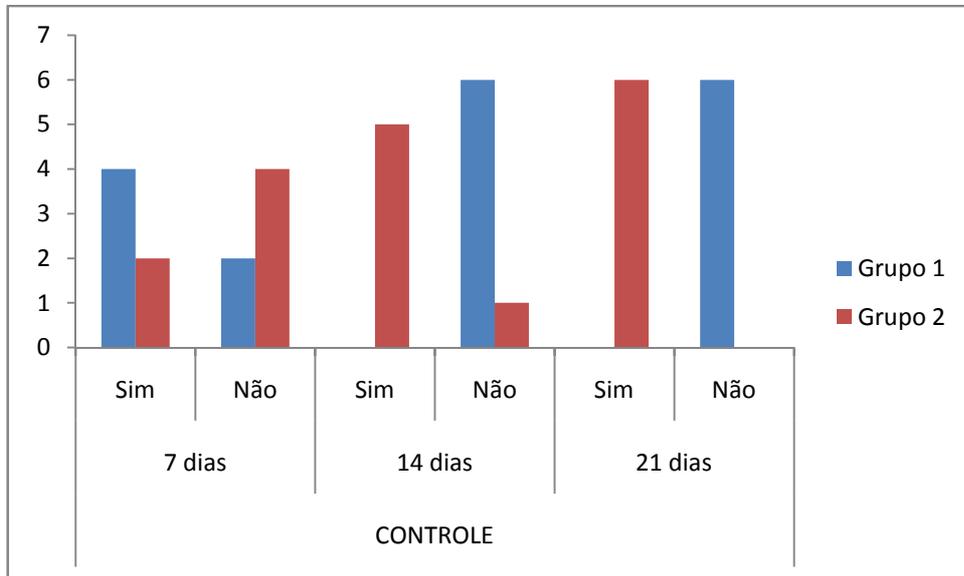


Figura 19: Análise do grupo Controle nos diferentes períodos de observação (7,14 e 21 dias) com relação ao grupo 1 (proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas) e grupo 2 (proliferação de fibroblastos, reepitelização e presença de fibras colágenas), após teste exato de Fischer.

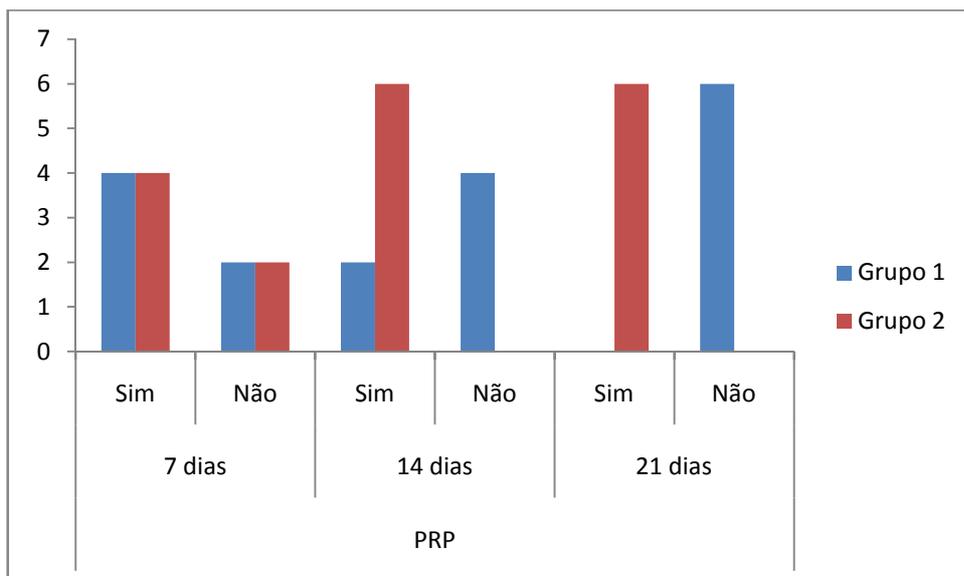


Figura 20: Análise do grupo PRP nos diferentes períodos de observação (7,14 e 21 dias) com relação ao grupo 1 (proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas) e grupo 2 (proliferação de fibroblastos, reepitelização e presença de fibras colágenas) após teste exato de Fischer.

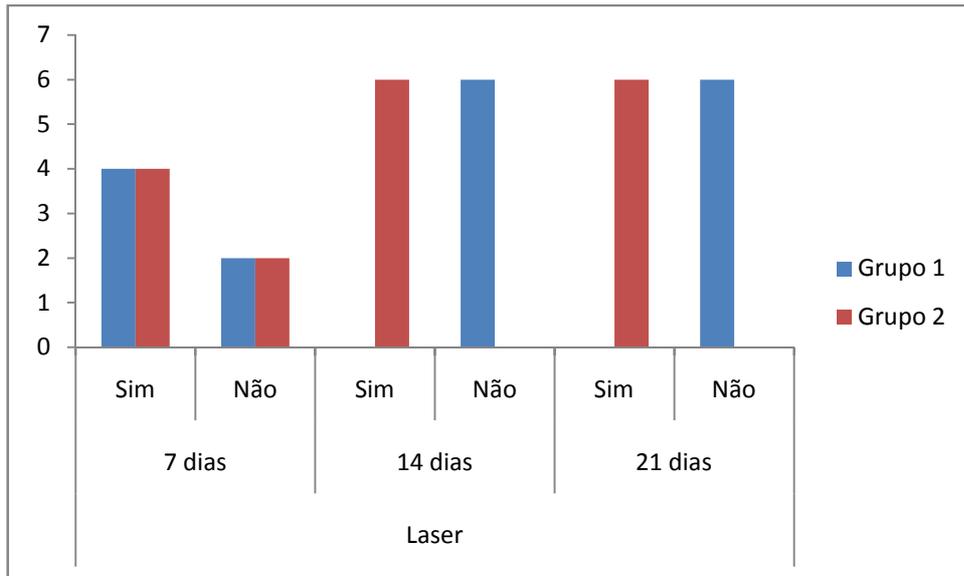


Figura 21: Análise do grupo Laser nos diferentes períodos de observação (7,14 e 21 dias) com relação ao grupo 1 (proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas) e grupo 2 (proliferação de fibroblastos, reepitelização e presença de fibras colágenas) após teste exato de Fischer.

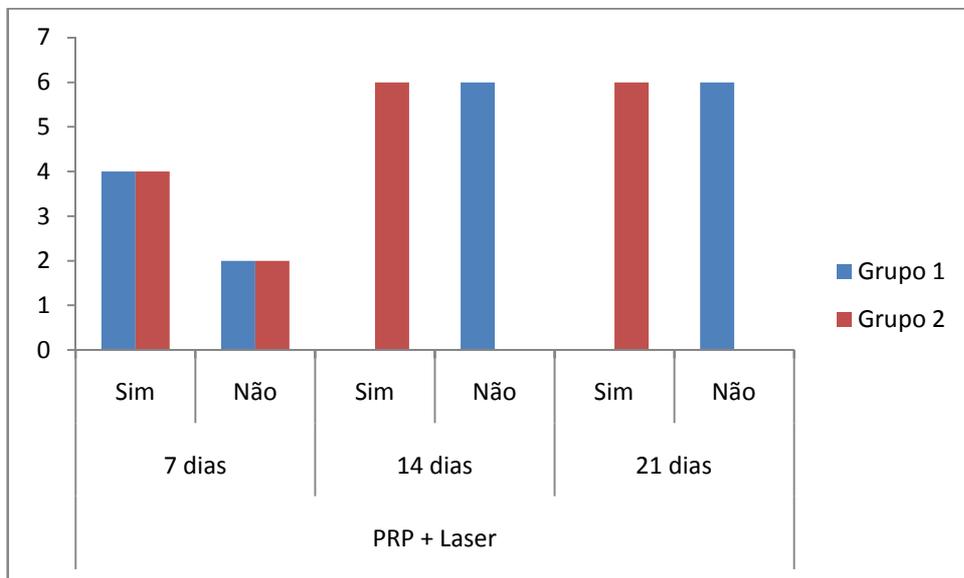


Figura 22: Análise do grupo PRP+Laser nos diferentes períodos de observação (7,14 e 21 dias) com relação ao grupo 1 (proliferação vascular, células agranulócitas e granulócitas) e grupo 2 (proliferação de fibroblastos, reepitelização e presença de fibras colágenas) após teste exato de Fischer.