

Reparo tecidual com plasma rico em fibrina em defeitos de tecido mole: estudo em coelhos

Tissue repair with fibrin-rich plasma in soft tissue defects: a study in rabbits

Junior de Marco¹, Phillippe Geraldo Teixeira De Abreu Reis², Alessandro Batista da Costa Carmo³, Manoel Lages Neto⁴, Jorge Luiz de Mattos Zeve⁵, Jurandir Marcondes Ribas Filho¹

RESUMO

Introdução: O plasma rico em fibrina (PRF) é biomaterial de origem autóloga que acelera o processo de cicatrização de tecidos moles e duros. Esse concentrado plaquetário, também tem outras vantagens como simplicidade de técnica, rápida obtenção, baixa morbidade e baixo custo.

Objetivo: Avaliar os efeitos do PRF no reparo de tecidos moles em defeitos não críticos na região de dorso nasal de coelhos.

Método: PRF foi produzido a partir de sangue venoso coletado de 15 coelhos. Dois defeitos não críticos, em envelope suprapariosteal com cerca de 15mm de diâmetro foram criados no dorso nasal de cada animal. Todos foram tratados de forma diferenciada; o primeiro foi preenchido com membrana de PRF (grupo caso) e o segundo apenas divulsionado e suturado bordo a bordo (grupo controle). Os animais foram submetidos à eutanásia na 2^a, 4^a e 6^a semanas de pós-operatório. Foram realizadas análises histológicas e histomorfométricas das peças anatómicas colhidas.

Resultado: No grupo controle após 2 semanas, o epitélio estratificado ortoqueratinizado exibiu entre 8-10 camadas de estratificação e, na área condizente ao leito cirúrgico, não foi encontrada a presença de glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos. O grupo caso apresentou 6-7 camadas de estratificação, sendo possível observar a presença de anexos cutâneos na área da operação. Após 4 semanas o grupo referente ao controle encontrava-se com epitélio estratificado exibindo entre 6-7 camadas de estratificação, e discreta neoformação de anexos cutâneos. O grupo PRF encontrava-se com 5-8 camadas de estratificação e apenas 1 pequena porção da área operada não havia a presença dos anexos. Em 6 semanas o grupo controle apresentava a pele com aspecto usual, entretanto exibia quantidade menor de anexos cutâneos quando comparada à região não operada. O grupo caso apresentou de 7-9 camadas de estratificação e intensa quantidade de anexos cutâneos.

Conclusão: PRF mostrou ser material promissor para a aceleração do reparo de tecidos moles.

PALAVRAS-CHAVE: Fatores de crescimento. Plasma rico em fibrina. Reparo tecidual.

ABSTRACT

Introduction: Fibrin-rich plasma (PRF) is an autologous biomaterial that accelerates the healing process of soft and hard tissues. This platelet concentrate also has other advantages such as technical simplicity, rapid production, low morbidity and low cost.

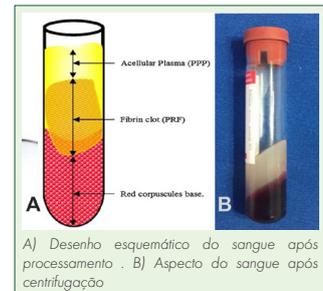
Objective: To evaluate the effects of PRF on soft tissue repair in non-critical defects in the nasal dorsum region of rabbits.

Method: PRF was produced from venous blood collected from 15 rabbits. Two non-critical defects, in a suprapariosteal envelope with approximately 15 mm in diameter, were created on the nasal dorsum of each animal. All were treated differently; the first was filled with PRF membrane (case group) and the second was simply divulsed and sutured edge to edge (control group). The animals were euthanized in the 2nd, 4th and 6th weeks postoperatively. Histological and histomorphometric analyses of the anatomical specimens collected were performed.

Result: In the control group, after 2 weeks, the orthokeratinized stratified epithelium exhibited 8-10 layers of stratification and, in the area corresponding to the surgical bed, the presence of sebaceous glands, sweat glands and hair follicles was not found. The case group presented 6-7 layers of stratification, and it was possible to observe the presence of cutaneous appendages in the area of the operation. After 4 weeks, the control group had stratified epithelium exhibiting 6-7 layers of stratification and discrete neoformation of cutaneous appendages. The PRF group had 5-8 layers of stratification and only 1 small portion of the operated area did not have the presence of appendages. After 6 weeks, the control group presented the skin with a normal appearance, however, it exhibited a smaller amount of cutaneous appendages when compared to the non-operated region. The case group presented 7-9 layers of stratification and an intense amount of cutaneous appendages.

Conclusion: PRF proved to be a promising material for accelerating soft tissue repair

KEYWORDS: Growth factors. Platelet-rich fibrin. Tissue repair.



A) Desenho esquemático do sangue após processamento. B) Aspecto do sangue após centrifugação

Mensagem Central

A terapêutica a partir do uso de bioengenharia tecidual ou de substâncias que proporcionem fatores de crescimento tecidual possui inúmeras aplicabilidades em cirurgia ortopédica e oro-maxilo-facial, seja na recomposição de tecido duro, ou em moles que necessitem de preenchimento. Constitui abordagem terapêutica fundamental em áreas de reconstruções de deformidades craniofaciais que possuem tamanho crítico em loci perdidos por cistos ou tumores.

Perspectiva

A capacidade da regeneração tecidual proporcionada pelo plasma rico em fibrina (PRF) mimetiza o processo reparador desencadeado pelo plasma rico em plaquetas (PRP), i.e., o acúmulo de plaquetas remanescente quando ativada pelo próprio colágeno da área a ser enxertada promove sítios de adesão plaquetária, condição que favorece a degranulação das plaquetas. Como consequência desta interação plaqueta / colágeno ocorre cascata de eventos que culminam em liberação de citocinas, e fatores de crescimento, em perneo ao coágulo de fibrina. Nesta pesquisa, pôde-se evidenciar que o PRF melhora o processo de cicatrização.

¹Instituto Presbiteriano Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil;

²University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, Estados Unidos;

³Hospital São Mateus, Cuiabá, MT, Brasil;

⁴Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, Brasil;

⁵Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins, Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum | Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001 | Recebido em: 29/07/2024 | Aceito em: 22/10/2024 | Correspondência: juniordemarco@live.com | Editor Associado: Ronaldo Mafia Cuenca⁶

Como citar:

de Marco J, Reis PGTA, CarmoABC, Lages Neto M, Zeve JLM, Ribas Filho JM. Reparo tecidual com plasma rico em fibrina em defeitos de tecido mole: estudo em coelhos. BioSCIENCE. 2024;82:e074

INTRODUÇÃO

A terapêutica a partir do uso de bioengenharia tecidual ou de substâncias que proporcionem fatores de crescimento tecidual possui inúmeras aplicabilidades clínicas em cirurgia ortopédica e oro-maxilo-facial, seja na recomposição de tecido duro, ou em tecidos moles que necessitam de preenchimento. Constitui abordagem terapêutica fundamental em áreas de reconstruções de deformidades craniofaciais que possuam tamanho crítico em loci perdidos por cistos ou tumores.^{1,2} Reconstrução tecidual ideal deve combinar material com "scaffold" biocompatível a elementos celulares, que não promova reação do enxerto vs. hospedeiro e que também proporcione ambiente tecidual que mimetize a histofisiologia da homeostase comum e a morfostase do local a ser regenerado.³

Supõe-se que o uso imediato de substâncias autólogas que proporcionem síntese e secreção de fatores de crescimento poderia ser considerado técnica plausível na reconstrução de defeitos. Young e Medawar⁴ revelaram sucesso no reparo de nervos periféricos de animais selados com plasma sanguíneo.⁵ Este estudo, por sua vez, parece ter sido pioneiro no uso da técnica de selante de fibrina na cirurgia geral. O produto usado nas operações proporcionados por Helena Matras consistia em mistura de fibrinogênio e trombina, formando coágulo local que recobria a área ferida. A evolução natural deste método transformou os selantes históricos em concentrados plaquetários quando as plaquetas foram adicionadas à fórmula. Os primeiros protocolos desta combinação de plasma rico em plaquetas foram denominados de autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). O teor plaquetário baseou-se na premissa de que plaquetas ativas são responsáveis por secretar inúmeros fatores de crescimento os quais, em hipótese podem promover diferenciação celular, bem como proporcionar níveis de formação de matriz extracelular adequada. Apesar de sua hipótese atrativa, inúmeras pesquisas descrevem que o uso apenas do PRP pode não ter efeito desejado, causando por vezes impacto negativo na área a ser regenerada, como exemplo efeito mielofibrótico-símile na área intraóssea.⁶

Esses efeitos contraditórios acerca do PRP motivaram Choukroun et al.⁷ a desenvolver uma segunda geração dos concentrados plaquetários, denominado de Plasma Rico em Fibrina (PRF). Nesta instância, com a centrifugação do sangue periférico, a formação e fracionamento fisiológico do coágulo, agora, são ativados sem a necessidade de uso prévio de anticoagulantes, o que faz do PRF alternativa plausível ao crescimento.

Apesar dos bons resultados demonstrados por Choukroun et al.⁷ e outros autores,⁸ ainda faz-se necessário estudos adicionais em outros centros de pesquisa para pautar o real efeito do PRF no processo cicatricial.

O objetivo desta pesquisa foi analisar os efeitos do plasma rico em fibrina (PRF) no reparo de defeitos não críticos realizados em derme na região de dorso nasal de coelhos, induzidos por cicatrização em primeira intenção e comparar esses resultados com os efeitos da cicatrização de pele em primeira intenção, sem uso de biomateriais.

MÉTODO

Este trabalho foi realizado na Faculdade Evangélica Mackenzie - FEMPAR. Ele aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUAs/FEMPAR), protocolo no. 3211/2017 e seguiu os princípios éticos na experimentação animal, preconizados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Utilizou-se 15 coelhos brancos, fêmeas, adultos, da raça Nova Zelândia, sem doenças prévias, com idade variando entre 350-370 dias e com peso que entre 2450-3500 g. Todos foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com a utilização de 2 áreas cirúrgicas diferentes, as quais receberam diferentes tratamentos, um utilizado PRF (n=15) e outro considerado controle (n=15). Ainda, os animais de ambos os grupos foram alocados em 3 subgrupos correspondentes ao período da eutanásia (2^o, 4^o ou 6^o semana pós-operatória). Vale ressaltar que, para cada coelho, os tempos de eutanásia estipulados foram determinados por randomização-sorteio afim de que não houvesse viés. Os animais foram mantidos em biotério próprio da IES, identificados e pesados. Foram mantidos à temperatura ambiente, alimentados com ração de origem industrial própria para a espécie (Presence Coelhos) e água ad libitum. Estabeleceu-se ciclo dia e noite normal e jejum de 12 h anterior às anestésias.

Os animais foram anestesiados através da administração de solução estéril de cloridrato de quetamina a 5% na proporção de 60 mg/kg e xilazina na proporção de 10 mg/kg. A anestesia foi considerada efetiva quando o animal apresentava-se imóvel ao manuseio.

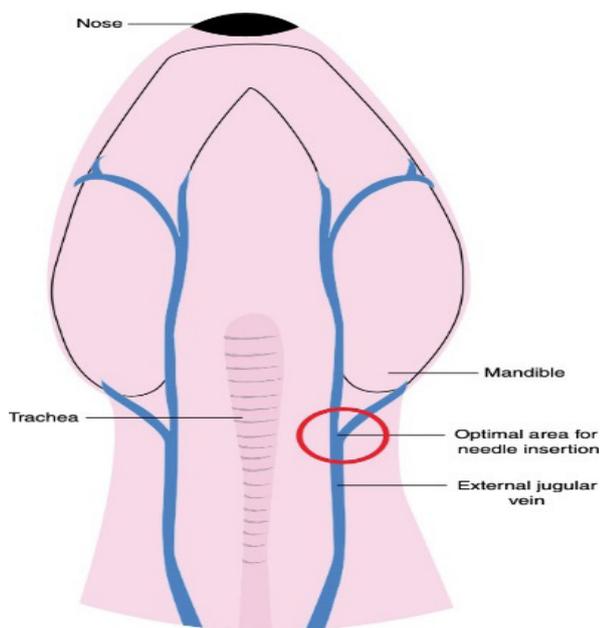
Técnica para obtenção da amostra de sangue venoso periférico

Realizou-se tricotomia do pescoço. Como a veia jugular externa é localizada lateralmente à linha mediana e superficialmente à veia jugular interna e artéria carótida, para localizá-la foi realizada palpação do pescoço para localização da traqueia. Lateralmente a ela, indo em direção à mandíbula, a veia jugular externa se bifurca na veia maxilar e na veia linguofacial. A veia jugular externa normalmente se localiza entre a traqueia e o ângulo da mandíbula (Figura 1). Para obtenção da amostra de sangue foi puncionada a veia jugular externa, com a utilização de um scalp no 23.

Após a punção conectou-se tubo vacuete 9ml permitindo a coleta do sangue. Foram retirados cerca de 6 ml de cada coelho e transferidos imediatamente para a centrífuga.

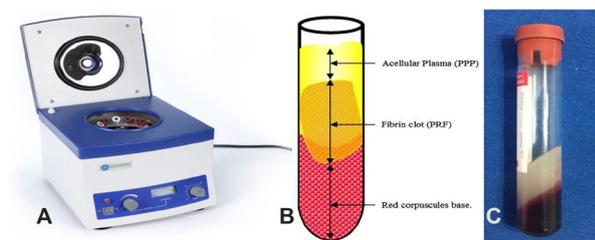
Obtenção do PRF

Para obtenção do plasma rico em fibrina foi utilizado método simplificado. A produção foi feita simultaneamente aos procedimentos cirúrgicos. Segundo o protocolo proposto, obteve-se o PRF através de técnica de centrifugação, com a utilização de centrífuga comum (Figura 2A). Esta centrífuga permite a colocação de até 12 tubos de 15 ml que podem ser centrifugados simultaneamente.



Fonte: Nelson et al.⁹

FIGURA 1 — Desenho esquemático ilustrando local ideal da punção



Fonte: Naik et al.¹⁰

FIGURA 2 — A) Centrifugadora analógica Montserrat modelo 80-20b; B) desenho esquemático do sangue após processamento; C) aspecto do sangue após centrifugação

Os tubos foram centrifugados à 1800 rpm por 10 min. Após esta centrifugação estabeleceu-se 3 níveis distintos (Figura 2B), onde a parte inferior era constituída por camada composta por glóbulos vermelhos; a camada intermediária por concentrado PRF propriamente dito - que resultava na formação de andaime tridimensional de fibrina -, e a superior por plasma pobre em plaquetas (Figura 2C).

Procedimento cirúrgico

Foi realizada a tricotomia na região do crânio estendendo-se até a região dorso nasal de cada coelho (Figura 3A), seguida por antissepsia com escovas contendo PVPI degermante, seguindo-se para lavagem com soro fisiológico 0,9%, secagem, e, por fim, nova antissepsia com a utilização de PVPI tintura. Campos cirúrgicos estéreis adaptados à região cobriam a área dos procedimentos iniciais.

A área cirúrgica, previamente foi infiltrada por 1 ml de lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000. Duas incisões foram realizadas na região dorso nasal supraperiosteal em formato de envelope, expondo a região subcutânea. Após a incisão foi realizada divulsão, separação atraumática dos tecidos através dos planos naturais de clivagem, onde um dos defeitos recebeu a membrana de PRF (Figura 3B), previamente removida dos tubos com

auxílio de pinça anatômica, e após ambos os defeitos foram suturados bordo a bordo com pontos simples (Figura 3C).



FIGURA 3 — A) Tricotomia da área a ser operada; B) membrana de PRF pronta para uso; C) defeito recebendo a membrana de PRF notando-se abaixo caso já suturado

Pós-operatório

Concluído o procedimento anestésico-cirúrgico, os animais foram colocados isoladamente em suas gaiolas e em sala própria para a recuperação anestésica; eram mantidos no mesmo local e nas mesmas condições do pré-operatório, recebendo 50 mg de cefazolina sódica por 3 dias; a ampola de 1 g foi diluída para 20 ml e 0,1 mg de morfina por dia durante 3 dias; a ampola de 10 mg foi diluída em 10ml.

Obtenção das peças anatômicas

Os coelhos sofreram eutanásia através da administração endovenosa rápida de tiopental sódico a 2,5%, na proporção de 10 mg/kg. As eutanásias ocorreram em 2, 4 e 6 semanas do pós-operatório (5 coelhos em cada subgrupo). Foi realizado 1 retalho de espessura total envolvendo as 2 incisões cirúrgicas realizadas previamente, para obtenção das peças anatômicas.

Preparo das peças anatômicas e análise histológica

As peças cirúrgicas obtidas foram mergulhadas em solução formalina a 10% por 48 h, e cada peça foi hemisseccionada, de modo a obter plano de corte no centro do defeito para que toda extensão da área a ser estudada fosse avaliada. Após, as peças cirúrgicas seguiram para processamento de inclusão e emblocamento em parafina. Obtidos os blocos, realizou-se cortes seriados com espessura de 5mm, e estes foram corados com H&E.

Método para análise histomorfométrica

Foram selecionados todas as extensões dos campos referentes ao centro do defeito. As imagens foram observadas em microscópio de luz acoplado à câmera de captura de imagem para obtenção de imagens digitais. Imagens da câmera de Neubauer foram obtidas com finalidade de estabelecer graduação à mensuração linear para as imagens da amostra. No programa Paint (Windows, Microsoft) as escalas foram estabelecidas com ícone Pincel. Acionando tamanho das barras, foi definido a partir do quadriculado visualizado na câmara, a mensuração para cada objetiva. Baseado neste princípio, estabeleceu-se a escala de 0,2 mm para objetiva de 4x e 50 µm para aumento de 10X e 40X (Figura 4). Uma legenda com barras e valores correspondentes foi adicionada às imagens obtidas das amostras, nos respectivos aumentos, e as imagens

foram analisadas através da delimitação de área correspondente a 0,5 mm².

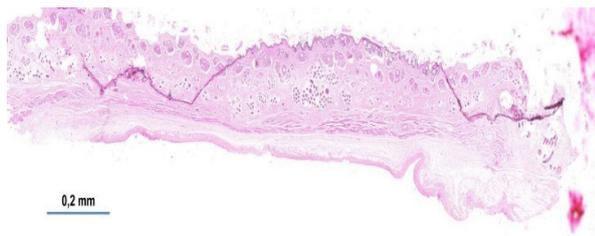


FIGURA 4 — Estabelecimento da escala com auxílio dos programas de imagem

Os parâmetros histomorfométricos foram analisados com auxílio de programa de análise de imagens - Image Tool 2.00. Cinco imagens contendo áreas de enxerto foram capturadas, mensuradas no programa Paint e salvas em JPEG.

Neste programa, com o arquivo contendo imagem em JPEG aberto, o primeiro passo foi informar a ele o padrão de escala da foto. O ícone "settings" foi selecionado, seguido de "calibrite spatial measurements" (para calibrar em micrômetros o espécime a ser analisado). Após esta seleção, o ícone "área" era escolhido e aplicado. Através do ícone "área" foi selecionado o perímetro de osso maduro, osso imaturo, fibrose e área medular. A cada estrutura pré-determinada selecionada o programa nos fornecia, através de planilha, a respectiva área em mm². Após a seleção da área, o marcador "cont and tag" foi utilizado para mensurar o volume tecidual até atingir média de 2 mm² presentes em cada campo. Os dados dos campos histológicos analisados foram alocados em planilha do programa Microsoft Excel, fornecendo números finais em área, bem como a porcentagem de cada estrutura analisada.

Dados como esclerose, infiltrado neutrofilico, mononuclear e fibroblastos, foram quantificados por escore células contabilizados na área cirúrgica determinados da seguinte forma: Escore 0 - de 0 a 1%; Escore 1 - entre 1 a 25; Escore 2 - entre 25 a 50%; Escore 3 - maior que 50% de células contabilizados na área cirúrgica. A Tabela 2 na seção de resultados demonstra o valor MODA (maior frequência) determinada para cada parâmetro averiguado.

Análise estatística

As variáveis consideradas nas análises histomorfométricas do estudo foram: área de fibrose, área de fibras grossas e finas, área de anexos cutâneos, área de angiogênese. Média e desvio-padrão são mostradas na Tabela 1. Para comparação dos tratamentos, referente a cada parâmetro estudado e dentro de cada semana de estudo, foi considerado o modelo de análise de variância para medidas repetidas ou o teste não paramétrico de Friedman, seguindo-se a análise de variância com fonte de variação ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

RESULTADO

Análise qualitativa

Controle 2 semanas

Na análise microscópica do fragmento de pele referente ao grupo controle em 2 semanas pós-operatório foi verificado tratar-se de fragmento revestido por epitélio estratificado ortoqueratinizado exibindo entre 8-10 camadas de estratificação. Córion, derme papilar e reticular foram identificadas, além de áreas compatíveis com tecido de granulação tardia, compostas por rica vascularização, tecido conjuntivo denso e discreta presença de células inflamatórias mononucleares. Contudo, na área condizente com a região do leito cirúrgico, não foi identificada presença de glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos. Discreta quantidade de células mononucleares eram vistas nos cortes. A hipoderme não apresentava alterações (Figuras 5A e 5B)

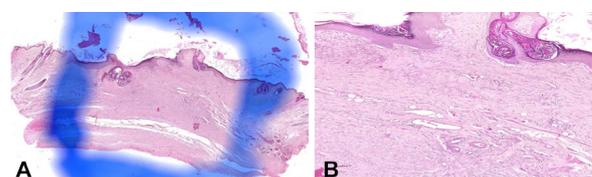


FIGURA 5 — A) Cortes em magnificação de 40x identificando fragmento de pele sem alterações com a área demarcada correspondendo à área compatível com o leito cirúrgico; B) magnificação em 100x onde se nota epitélio e tecido de granulação tardia em área referente a leito cirúrgico, contudo há ausência de anexos cutâneos.

PRF 2 semanas

Em 2 semanas pós-operatório, nos espécimes que receberam o PRF foi verificado fragmento de pele revestido por epitélio estratificado ortoqueratinizado exibindo entre 6-7 camadas de estratificação. Córion, derme papilar e parte da derme reticular foram compostas por tecido conjuntivo denso não modelado, permeando conteúdo celular fusiforme compatível com fibroblasto. Nas bordas e nas áreas de derme reticular da área cirúrgica foram notadas presença de anexos cutâneos, e na derme localizada perifericamente ao leito cirúrgico foi identificada a presença de hiperplasia glandular sem atipias ou características displásicas. Área de edema (e) entre fibras em porção inferior de derme reticular finalizam o quadro histológico averiguado nos espécimes (Figura 6).

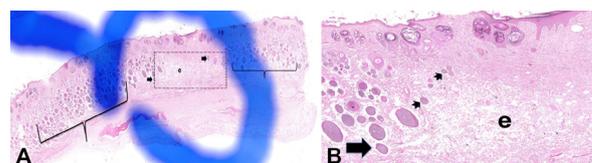


FIGURA 6 — A) Magnificação em 40x, revela a área do edema (e) demarcada, cuja área é demarcada por retângulo tracejado. Na área das chaves observa-se hiperplasia de anexos cutâneos, especialmente glândulas sudoríparas e presença glandular (setas) nas áreas de bordas cirúrgicas; B) magnificação 100x, além dos detalhes identificados em 40x, mostram-se áreas sugestivas de neoformação glandular (cabeça de seta) extendendo-se a área não edematosa da derma reticular

Controle 4 semanas

Na análise microscópica do fragmento referente ao controle em 4 semanas pós-operatório, pouca diferença foi notada entre 2-4 semanas. No período pós-operatório vigente foi verificado fragmento revestido por epitélio estratificado ortoqueratinizado exibindo entre 6-7 camadas de estratificação. Na derme reticular foram identificadas áreas compostas por tecido conjuntivo denso, com maior densidade de fibras colágenas (Figuras 7A e 7B - área demarcada) pelas quais encontravam-se discreta neoformação de anexos cutâneos (setas). A hipoderme não apresentou alterações.

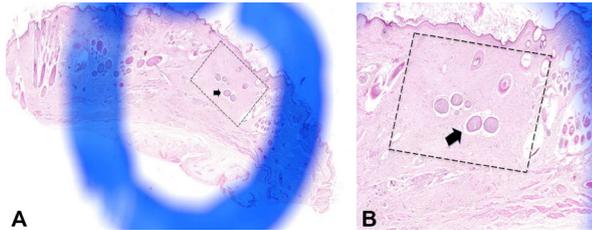


FIGURA 7 — A) Magnificação 40x demonstra quadro histológico referente ao grupo controle 4 semanas. Verifica-se na parte demarcada por linha tracejada a área de fibrose local em derme reticular e porção de hipoderme. Nota-se a presença de abertura glandular em área fibrótica em discreta quantidade (seta); B) revela em aumento de 100x, detalhes da área fibrótica e glândulas sem presença de atipias.

PRF 4 semanas

Nos espécimes que receberam o PRF foi verificado, em 4 semanas do pós-operatório, fragmento de pele revestido por epitélio estratificado ortoqueratinizado, exibindo entre 5-8 camadas de estratificação. Córion, derme papilar e parte da derme reticular foram compostas por tecido conjuntivo denso não modelado, e sem características de fibrose permeando conteúdo celular fusiforme compatível com fibroblasto. Apenas discreta área referente ao leito cirúrgico, não apresentava presença de anexos cutâneos (Figuras 8A e 8B); no entanto, maior porção referente a área lesionada o quadro histológico era compatível com fragmento de pele de características usuais.

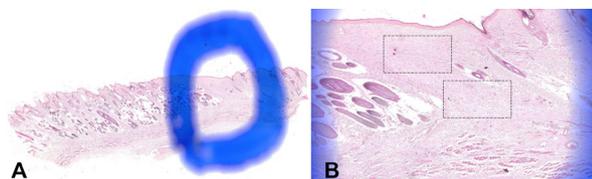


FIGURA 8 — A) Fragmentos de pele em espécimes tratado com PRF em 4 semanas com quadro histológico usual, sem fibrose de aspecto patológico; B) área demarcada em tracejado identifica área com ausência de anexos cutâneos

Controle 6 semanas

Na análise microscópica do fragmento referente ao controle em 6 semanas pós-operatório, identifica-se fragmento de pele com aspectos usuais. No entanto, neste período a derme mostrava menor quantidade de anexos cutâneos quando comparada às áreas que

não foram submetidas a condição cirúrgica. Não se identificou fibrose ou outras condições que pudessem dar subsídios de condição patológicas nas áreas analisadas (Figuras 9).

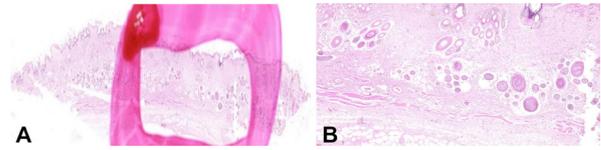


FIGURA 9 — Em A=40x e B=100x verifica-se aspectos de tecido conjuntivo denso, sem alterações patológicas em permeio a presença, embora menor quando comparado as áreas não cirúrgicas, de anexos cutâneos.

PRF 6 semanas

Os espécimes que receberam terapia de PRF, demonstraram, na sexta semana pós-operatória, fragmento de pele revestido por epitélio estratificado ortoqueratinizado exibindo entre 7-9 camadas de estratificação. Córion, derme papilar e parte da derme reticular foram compostas por tecido conjuntivo denso não modelado, de aspecto usual permeando intensa quantidade de anexos cutâneos. Não foram averiguadas presença de atipias celulares neste período (Figuras 10).

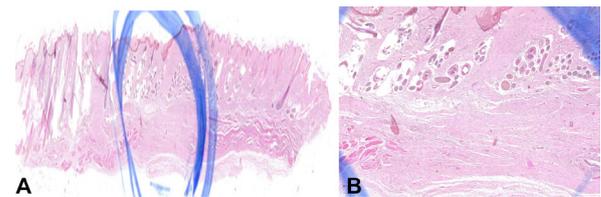


FIGURA 10 — Demonstram respectivamente em A=40 e B=100x as áreas cirúrgicas de espécimes do grupo controle e verificam-se aspectos de tecido conjuntivo denso, sem alterações patológicas em permeio a presença de anexos cutâneos.

Análise qualitativa

TABELA 1 — Demonstrativo da área de fibrose, fibras, angiogênese anexos cutâneos nas áreas cirúrgicas

Período analisado	Parâmetro	Grupo		p
		Controle	PRF	
2 semanas	Área de fibrose (mm ²)	17,16 ± 3,04	11,88 ± 2,35	p=0,0031
	Área de fibras finas	2,93 ± 0,11	3,56 ± 0,89	p=0,0521
	Área de fibras grossas	15,36 ± 2,56	8,79 ± 1,99	p=0,0020
	Área de anexos cutâneos (mm ²)	-	1,82 ± 1,99	p<0,0001
	Área de angiogênese/vascular	3,78 ± 0,68	4,22 ± 0,72	p=0,0632
4 semanas	Área de fibrose (mm ²)	9,03 ± 1,84	7,98 ± 1,06	p=0,005
	Área de fibras finas	1,02 ± 0,04	1,96 ± 0,01	p=0,0622
	Área de fibras grossas	7,90 ± 2,01	6,06 ± 1,83	p=0,0245
	Área de anexos cutâneos (mm ²)	2,56 ± 1,37	2,81 ± 1,85	p=0,0664
	Área de angiogênese/vascular	1,04 ± 0,77	1,36 ± 0,64	p=0,0666
6 semanas	Área de fibrose (mm ²)	4,32 ± 0,96	3,39 ± 0,71	p=0,0318
	Área de fibras finas	0,88 ± 0,03	0,44 ± 0,08	p=0,0732
	Área de fibras grossas	3,68 ± 2,01	2,09 ± 1,83	p=0,0222
	Área de anexos cutâneos (mm ²)	3,21 ± 1,87	4,81 ± 1,85	p=0,0332
	Área de angiogênese/vascular	1,04 ± 0,77	1,36 ± 0,64	p=0,0666

TABELA 2 — Escore em moda referente a esclerose, infiltrado inflamatório e fibroblastos

Período analisado	Parâmetro	Grupo	
		Controle	PRF
2 semanas	Esclerose	2	2
	Neutrófilos	1	0
	Mononuclear	2	1
	Fibroblastos	2	2
4 semanas	Esclerose	1	0
	Neutrófilos	1	0
	Mononuclear	1	0
	Fibroblastos	2	2
6 semanas	Esclerose	0	0
	Neutrófilos	0	0
	Mononuclear	0	0
	Fibroblastos	2	2

DISCUSSÃO

Descrita por Choukroun et al.⁷ o PRF não é - como muitos autores estipulam - apenas uma “cola de fibrina”; muito menos, também, pode ser considerado concentrado plaquetário clássico. Ele se constitui por matriz cicatricial autóloga, definida como concentrado de plaquetas sobre intensa e importante malha membranosa de fibrina e, segundo alguns autores, esse composto possui alto potencial regenerativo.

A capacidade da regeneração tecidual proporcionada pelo PRF mimetiza o processo reparador desencadeado pelo PRP, i.e., o acúmulo de plaquetas remanescente quando ativada pelo próprio colágeno da área a ser enxertada promove sítios de adesão plaquetária, condição que favorece a degranulação das plaquetas. Como consequência desta interação plaqueta / colágeno ocorre cascata de eventos que culminam em liberação de citocinas, e fatores de crescimento, em permeio ao coágulo de fibrina. Sobrepujante a este efeito plaquetário, Ehrenfest, Rasmussen e Albrektsson¹¹ adiciona que a intensa densidade do coágulo de fibrina atua como matriz biológica curativa que serve como scaffold que sustenta a migração celular, bem como incita a proliferação celular dentro da matriz de fibrina, constituindo os primeiros estágios da cicatrização.

Dentro desta perspectiva, Gassling et al.¹² perfizeram estudo onde compararam o crescimento de células periosteais humanas em membranas de PRF quando comparadas ao controle utilizando membranas comerciais de colágeno. O estudo avaliou a viabilidade celular e a proliferação celular. Os resultados mostraram que ambas as membranas apresentaram células viáveis; contudo, os autores indicaram maior proliferação celular nos espécimes em que o PRF foi inserido.

Ainda, Gassling et al.¹² propuseram o uso de membrana de fibrina para cultura de osteoblastos. Esse estudo comparou a compatibilidade e a proliferação celular entre fibrina e membranas comerciais de colágeno. Seus resultados mostraram maior proliferação celular por parte da membrana de PRF, bem como maior diferenciação celular no teste da fosfatase alcalina, incitando a ideia que o PRF seria plausível biomaterial para reparo, tanto na semântica de crescimento, quanto na diferenciação celular.

Em análise histomorfométrica global das imagens do presente estudo, observou-se que a média da concentração de colágeno da área das feridas apresentou aumento estatisticamente significativo, especialmente em análise focado em fibras grossas já em 2 semanas, diminuindo o período de neoformação de tecido de granulação nos espécimes que receberam PRF. Nossos achados estão de acordo com o processo normal de cicatrização, onde o esperado - na fase de fibroplasia da ferida - é o aumento da síntese de colágeno, e os resultados demonstrados aqui corroboram com a hipótese de que o PRF proporciona, de fato, rápida maturação regenerativa, sem a presença de deiscência ou fibrose patológica.

Apesar de que alguns autores tenham sugerido que o PRF apresenta cicatrização mais acelerada do que o controle do PRP, não foram encontradas diferenças com significância estatística nas comparações de fibras finas e escore de fibroblasto. Esse viés pode revelar falso negativo no presente estudo uma vez que a contabilização de células fibroblásticas estão demonstradas em escore, o qual estipula faixa de valores, minimizando valores reais de células por/mm².

Segundo Cieslik-Bielecka et al.¹³ importante variável que proporciona efeito positivo do PRF em comparação ao controle, é a ideia que este biomaterial - o PRF - produz arquitetura da matriz de fibrina. Essa estrutura característica da matriz que tem sido considerada a responsável maior pela capacidade terapêutica do PRF, muito embora plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento exerçam papéis importantes. Nesta temática, Choukroun et al.⁷ indicaram que a matriz de fibrina faz com que feridas abertas e infectadas se beneficiem com a utilização de PRF, por ser capaz de regular processo de imunidade local, além de guiar a migração do epitélio celular em sua superfície, estimular os fibroblastos a produzir colágeno, promover a angiogênese. As membranas de PRF protegem, portanto, as feridas abertas, que cicatrizam por segunda intenção, como as do presente estudo, e aceleram sua cicatrização. O papel fibroblástico já foi bem discutido em parágrafos prévios. Contudo, os resultados descritos aqui também corroboram com a melhora da regulação imune, demonstrada pela minimização do conteúdo celular neutrofílico e mononuclear, e também pela migração epitelial.

O contexto de migração e proliferação epitelial parecem fornecer reflexão importante nesta pesquisa. De fato, como perfizemos estudo com cicatrização em primeira intenção, a análise do epitélio de revestimento tornou-se variável nula quanto à migração e neoformação; contudo, os efeitos do PRF na área de epitélio que formam os anexos cutâneos na submucosa, parecem ser intensos.

No presente estudo foi demonstrado ocorrer proliferação epitelial de glândulas sudoríparas e folículos pilosos periféricamente à área onde o defeito foi produzido. Os resultados histológicos observados neste estudo sugerem que migração e neoformação de novos anexos cutâneos se intensificavam em 4 semanas do pós-operatório, condição que parece minimizar em

6 semanas, onde a quantificação de anexos é similar, quando se compara ao controle. A extrapolação desses resultados parece sustentar hipótese estética, uma vez que o PRF diminuiria o efeito de inflamação local, criaria tecido subcutâneo com anexos mais próximo de área sem trauma, minimizando perda de folículos, ou diminuindo efeito da produção de alopecia local de forma mais rápida.

Angiogênese, imunidade e cobertura epitelial são, segundo Choukroun et al.⁷ as 3 importantes etapas da cicatrização e da maturação dos tecidos moles. Foi demonstrada aqui que a membrana de PRF foi capaz de apoiar o desenvolvimento desses 3 fenômenos, simultaneamente embora a angiogênese não tenha sido estatisticamente diferente. Similarmente ao que foi contabilizado aos fibroblastos, a neoangiogênese ou a presença de conjuntura vascular foi realizada por escore. Aqui a faixa de percentual dentro de uma mesma categoria de escore é ampla, o que minimizaria o efeito real angiogênico. Além do mais, foi considerado presença vascular apenas abertura e luz vascular revestidas por endotélio. Contudo, vasos estrangulados ou microvascularização não são concebíveis de análise por meio de histoquímica convencional. Assim, é sugestível complementação desses resultados com uso de técnicas de imunohistoquímica, com uso de anticorpos anti CD31, CD34 ou mesmo VEGF para que resultado mais acurado possa ser obtido.

Embora algumas particularidades tenham aqui sido consideradas como vieses, pode-se sugerir que o PRF melhora o processo de cicatrização quando comparado ao controle.

CONCLUSÃO

O PRF se mostrou material promissor para a aceleração do reparo de tecidos moles (derme) quando realizado por primeira intenção, tendo visto que quando usado ocorreu neoformação dos anexos cutâneos com apenas 2 semanas de pós-operatório, enquanto o grupo controle apresentou discreta formação dessas estruturas com somente 4 semanas.

Contribuição dos autores

Conceituação: Junior de Marco, Jurandir Marcondes Ribas Filho

Metodologia: Phillippe Geraldo Teixeira De Abreu Reis

Administração do projeto: Alessandro Batista da Costa Carmo

Redação (esboço original): Manoel Lages Neto, Jorge Luiz de Mattos Zeve

Redação (revisão e edição): Todos os autores

REFERÊNCIAS

1. Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhang J, Nouri K, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res*. 2003;21(4):622-9. [https://doi.org/10.1016/s0736-0266\(02\)00238-3](https://doi.org/10.1016/s0736-0266(02)00238-3)
2. Goudy S, Lott D, Burton R, Wheeler J, Canady J. Secondary alveolar bone grafting: outcomes, revisions, and new applications. *Cleft Palate Craniofac J*. 2009;46(6):610-2. <https://doi.org/10.1597/08-126.1>
3. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater*. 2009;8(6):457-70. <https://doi.org/10.1038/nmat2441>
4. Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves: measurement of the rate of regeneration. *Lancet*. 1940;236:126-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)07978-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)07978-8)
5. Matras H. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1982;40(10):617-22. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(82\)90108-2](https://doi.org/10.1016/0278-2391(82)90108-2)
6. Giovanini AF, Zanella JM, Depraet L, Felix AO, Xavier S, Steffens JP, et al. Platelet-rich plasma (PRP) impairs the craniofacial bone repair associated with its elevated TGF- β levels and modulates the co-expression between collagen III and α -smooth muscle actin. *J Orthop Res*. 2011;29(3):457-63. <https://doi.org/10.1002/jor.21263>
7. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):56-60. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011>
8. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):37-44. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>
9. Nelson EA, Keller GL, Mitchell TW, Pennypacker B, Rebbeck P, Rogers IT. A jugular bleeding technique in rabbits. *Lab Anim*. 2010;39(1):17-22. <https://doi.org/10.1038/labon0110-17>
10. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR. Role of Platelet-rich fibrin in wound healing: a critical review. *J Conserv Dent*. 2013;16(4):284-93. <https://doi.org/10.4103/2F0972-0707.114344>
11. Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
12. Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Acil Y, Wilfgang J, Becker T. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(5):543-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01900.x>
13. Cieslik-Bielecka A, Choukroun J, Odin G, Dohan-Ehrenfest DM. L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1266-77. <https://doi.org/10.2174/138920112800624463>