

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**Gabriela Gallo**

**Cicatrização de feridas cutâneas: uso da membrana de látex natural  
isolada e associada à fibrina rica em plaquetas em ratos Wistar**

**Araçatuba - SP**  
**2020**

**Gabriela Gallo**

**Cicatrização de feridas cutâneas: uso da membrana de látex natural isolada e associada à fibrina rica em plaquetas em ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim

Araçatuba - SP  
2020

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G172c Gallo, Gabriela.  
Cicatrização de feridas cutâneas: uso da membrana de látex natural isolada e associada à fibrina rica em plaquetas em ratos Wistar / Gabriela Gallo. - Araçatuba, 2020  
49 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba  
Orientadora: Profa. Suely Regina Mogami Bomfim

1. Ferimentos e lesões 2. Epiderme 3. Regeneração  
4. Hevea 5. Plaquetas I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, meus pais Iraci e Jorge, sendo base, me apoiaram para que realizasse meus sonhos, que me proporcionaram estrutura para ter o conhecimento acadêmico que tenho hoje.

Ao Marcos, que além de companheiro se mantendo sempre ao meu lado, com amor, carinho e apoio me incentivou nos dias difíceis sempre com paciência, e também como colega de trabalho dividindo essa batalha comigo.

A minha orientadora professora Dra. Suely Regina Mogami Bomfim, que proporcionou ampliação do meu crescimento profissional e pessoal em todos os momentos, nos tranquilos e difíceis, me aconselhou sempre e me acolheu com muito carinho junto à universidade, laboratório e em sua própria residência. Sou imensamente grata pela orientação, pelo afeto e compreensão ao longo do tempo que estivemos juntas.

Agradeço aos meus colegas de pesquisa e aos amigos do laboratório, aos alunos: Marisol Madrid, Bruno Liu, Vitória Gabriel, Caroline Utike, Mayla Abas, Gabrielle Campos e Júlia Costa; as residentes: Gabriela Ribeiro e Nathalia Lopes; aos técnicos: Pedro, Esaú e Flávia; e os Drs. Breno Almeida e Luís Narciso, por estarem sempre dispostos e se ofertando de inúmeras maneiras para a conclusão deste trabalho.

Meu agradecimento especial aos meus colegas de pós-graduação: Murilo Ferraz, Élen Almeida, Sthephano Pamboukian, Carlos Eduardo Siqueira, Izabella Pazzoto, Amanda Pinatti, Carolina Cardoso, Cristiane Cantiga e Natália Machado, por contribuírem enormemente para este trabalho e também por dividirem minhas angustias, ouvirem meus desabafos nas diferentes fases de experimentação, por me aconselharem, animarem e apoiarem, obrigada!

Aos professores Prof. Carlos Antonio de Miranda Bomfim, Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra, Prof. Paulo Sergio Patto dos Santos, Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles e Prof. Paulo Cesar Ciarlini, por dividir seus conhecimentos, pelos ensinamentos e pela oferta doando espaço, material e uso de equipamentos em seus laboratórios. Igualmente aos professores do Departamento de Ciências

Básicas da FOA-UNESP por todos os ensinamentos no decorrer do período, e aos professores que participaram das bancas avaliadoras, pelos apontamentos que somaram em muito ao meu trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação e biblioteca, Cristiane Lui, Lilian Pinheiro, Valéria Zagatto, Claudio Matsumoto, Ana Claudia Manzatti por todo suporte durante este processo.

Ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela oportunidade e concessão da bolsa de estudo de mestrado.

Agradeço a todos pela conclusão desta etapa.

**"Nossa tarefa deve ser a de nos libertarmos desta prisão,  
aumentando nosso círculo de compaixão para abraçar  
todas as criaturas vivas".**

Albert Einstein

Gallo G. Cicatrização de feridas cutâneas: uso da membrana de látex natural isolada e associada à fibrina rica em plaquetas em ratos Wistar [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2020.

## RESUMO

Devido à alta incidência de feridas e lesões de pele, a busca científica tem se focado no desenvolvimento de coberturas e substitutos epidérmicos alternativos às técnicas de enxertia que possuam a mesma função de evitar a exposição de feridas às variações externas. O látex natural derivado da *Hevea brasiliensis* estimula o processo de cicatrização, assim como a fibrina rica em plaquetas (PRF). A associação desses dois compostos tem como finalidade oferecer um suporte estrutural e estímulo à migração epitelial, associado à proteção e menor desidratação do leito cicatricial. No presente estudo, investigamos a resposta de reparo cicatricial em feridas agudas de espessura total em ratos Wistar, submetidos a três diferentes tratamentos: membrana de látex associada à PRF (ML+PRF), apenas a membrana de látex (ML) e controle com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril em. A avaliação macroscópica foi realizada por mensuração, posteriormente a amostra tecidual foi coletada e submetida à coloração com Hematoxilina & Eosina e *Picrosirius Red* para análise histológica. Para análise estatística, as variáveis quantitativas foram determinadas por ANOVA (pós-teste de Tukey) e as variáveis semiquantitativas determinadas pelo teste de Friedman (pós-teste de Dunn), sendo considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Como resultados houve diminuição significativa no diâmetro da ferida e melhor reepitelização em relação aos controles, assim como houve estímulo à deposição de colágeno tipo I, que gera resistência tecidual. Não foram observadas complicações quanto ao uso dessa associação, portanto auxilia no reparo da pele em tratamento de feridas agudas de espessura total em ratos Wistar hígidos.

**Palavras-chave:** Ferimento. Epiderme. Regeneração. Hevea. Plaquetas.

Gallo G. **Healing of skin wounds: use of natural latex membrane isolated and associated with platelet-rich fibrin in Wistar rats.** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2020.

## **ABSTRACT**

Due to the high incidence of wounds and skin lesions, scientific research has focused on the development of alternative epidermal coverings and substitutes to grafting techniques that have the same function of preventing the exposure of wounds to external variations. The natural latex derived from *Hevea brasiliensis* stimulates the healing process, as well as platelet-rich fibrin (PRF). The association of these two compounds aims to provide structural support and stimulate epithelial migration, associated with protection and less dehydration of the healing bed. In the present study, we investigated the healing repair response in acute full-thickness wounds in Wistar rats, submitted to three different treatments: latex membrane associated with PRF (ML + PRF), only the latex membrane (ML), and control with a solution of 0.9% sodium chloride sterile. The macroscopic and microscopic evaluations were performed by measurement, followed by tissue sample collection and staining with Hematoxylin & Eosin and Picrosirius Red for histological analysis. For statistical analysis, quantitative variables were determined by ANOVA (Tukey's post-test) and semi-quantitative variables were determined by Friedman's test (Dunn's post-test), being considered significant when  $p < 0.05$ . As a result, there was a significant decrease in the wound diameter and better re-epithelialization concerning the controls, as well as the deposition of type I collagen, which generates tissue resistance. No complications were observed regarding the use of this association. Therefore, it assists in skin repair in the treatment of acute full-thickness wounds in healthy Wistar rats.

Keywords: Wounds. Epidermis. Regeneration. Hevea. Platelets.



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema de modelo cirúrgico de ferida excisional de espessura total em ratos para avaliar os componentes da cicatrização de feridas in vivo. Nas feridas A e B aplicaram-se a ML+PRF e ML respectivamente, e as feridas C e D, preenchidas com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril, tratamento controle 19
- FIGURA 2 - Membrana de látex natural de *Hevea brasiliensis*. A biomembrana é confeccionada por “casting”, depositando-se 3 mL de látex sobre placa circular, por no mínimo 24 horas para procedimento de secagem gerando uma membrana com raio de 5 cm. 20
- FIGURA 3 - Punção da veia gengival mandibular (*labialis mandibularis*), via de acesso para coleta de sangue em ratos. A coleta permitiu a obtenção de 800 µL de sangue periférico, em um único evento de amostragem e sem trauma aparente para os animais. Estes se encontravam em plano anestésico por sevoflurano como agente inalatório, administrado via vaporizador calibrado a 2% 21
- FIGURA 4 - A- Secção com tesoura cirúrgica do terço final da fibrina rica em plaquetas (PRF) depois de retirada do tubo, permitindo a separação de grande parte das hemácias sedimentadas durante a centrifugação. B- PRF obtida colocada sobre gaze seca estéril para a promoção da drenagem parcial do soro hiperagudo 22
- FIGURA 5 - Fotomicroscopia de esfregaço sanguíneo de rato linhagem Wistar macho evidenciando a morfologia plaquetária normal sob o aumento de 1000X (seta preta), as plaquetas são encontradas entre as hemácias (seta branca), corante hematológico comercial (NEWPROV®- PA205, Brasil) 23
- FIGURA 6 - Confeção das quatro feridas de 5 mm de diâmetro respeitando 1,5cm para evitar contato entre os tratamentos ML, ML+PRF, C1 e C2 (controles) no tempo experimental 0. Para minimizar a cicatrização por contratura e mimetizar a ação de contenção da membrana de látex (seta branca), foram fixados anéis de silicone (seta preta) atóxico estéreis de fabricação própria ao redor da ferida, centralizados e distantes dos bordos 24
- FIGURA 7 - Quantificação de colágeno imaturo após coloração com PSR submetido à luz polarizada pelo programa Leica Application Suite v 4.12, em fragmento de pele de rato, linhagem Wistar, submetido à confecção de ferida aguda de espessura total. As marcações representam a quantificação numérica dos tons de verde obtidos dentro de uma faixa de coloração específica para colágeno tipo III 27

FIGURA 8 - Fotografias digitais obtidas dos animais controle (C1 e C2) e tratados (ML+PRF e ML), no decorrer do tempo experimental (03, 07, 14 e 21 dias) através da intersecção dos eixos, dias e grupos, conseguimos acompanhar a evolução da cicatrização evidenciando melhor aspecto de cicatrização nos grupos tratados com a associação de coberturas

29

FIGURA 9 - A a D - Gráficos de barra representando os valores em milímetros obtidos mediante mensuração dos diâmetros das feridas dos animais controle (C1 e C2) e tratados (PRF+ML e ML) ao longo do curso temporal (A – 3dias, B – 7dias, C – 14 dias e D – 21 dias). As variáveis numéricas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e submetidas ao teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis

30

FIGURA 10 - A a D - Gráficos de barra representando os valores em milímetros obtidos mediante mensuração dos diâmetros das feridas ao longo do curso temporal (A - Controle (C1), C - Controle (C2), B - ML+PRF e D – ML. As variáveis categóricas foram verificadas pelo teste de Kruskal-Wallis

30

FIGURA 11 - A a D - A análise microscópica das seções histológicas coradas em HE dos animais controle (C1 e C2) e tratados (ML+ PRF e ML) que permitiu a obtenção dos dados, mediana, mínimo e máximo da avaliação semiquantitativa, via pontuação em escala de 0 a 4. Dados expressos em gráficos de ponto representando as diferenças entre os tratamentos determinadas pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn e significância quando  $p < 0,05$  ao longo do curso temporal (A – 3dias, B – 7dias, C – 14 dias e D – 21 dias)

32

FIGURA 12 - Fotomicroscopia (DM 4000 B, Leica, câmera - DFC 500, Leica) de pele de rato Wistar aos 3 dias de evolução pós-confecção de ferida aguda de espessura total, sendo o A animal controle 1, zona da ferida cirúrgica com pobre proliferação tecidual e seta preta mostrando carente proliferação epitelial, B animal submetido ao tratamento com ML+PRF exibindo alta taxa de reepitelização (seta preta) recobrendo tecido de granulação e rede de fibrina decorrente da PRF (seta branca). C animal controle 2, \* zona da ferida cirúrgica sem proliferação tecidual e seta preta mostrando proliferação epitelial diminuída, D animal submetido ao tratamento com ML exibindo zona ativa de reepitelização (seta preta) em direção ao tecido de granulação e migração celular difusa

34

FIGURA 13 - A a D - Gráficos de barra representando média e desvio-padrão obtidos pela da avaliação quantitativa via fotomicroscopia das seções histológicas dos animais controle (C1 e C2) e tratados (ML+PRF e ML) coradas com PSR sob luz polarizada e analisadas pelo programa Leica Application Suite v 4.12. Valores expressos em porcentagem obtidos pela deposição de colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) sendo as diferenças entre os tratamentos determinadas por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey com significância quando o  $p < 0,05$  35

FIGURA 14 - Fotomicroscopia em luz polarizada de pele de rato Wistar aos 21 dias de evolução pós-confecção de ferida aguda de espessura total, sendo o A animal controle 1, B animal submetido ao tratamento com ML+PRF exibindo maior intensificação na coloração vermelha na área da ferida, \* zona da ferida cirúrgica. C animal controle 2, D animal submetido ao tratamento com ML exibindo maior intensificação na coloração vermelha na área da ferida, \* zona do ferida cirúrgica. As imagens foram adquiridas sob luz polarizada (DM 4000 B, Leica, câmera - DFC 500, Leica) 36

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores de média e desvio-padrão totais da contagem plaquetária (sangue periférico) obtido da veia gengival mandibular de ratos Wistar durante o experimento	23
TABELA 2 - Escala de avaliação semiquantitativa com pontuação 0 a 4, adaptado de Gal et al. (2008)	26
TABELA 3 - Mediana da pontuação dos grupos CI, CII, ML e ML+PRF na escala de avaliação histológica semiquantitativa	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Do inglês, Analysis of variance. Significado "Análise de variância"

°C - Célsius, escala de grau

bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epitelial

et al. - Do Latim, et alii. Significado "e outros"

FC - Fatores de crescimento

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

HE - Hematoxilina & Eosina

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

KGF - Fator de crescimento de queratinócitos

LD - Linha de delimitação

ML – Membrana de látex natural

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas

PRF - Fibrina rica em plaquetas

PSR - Picrosirius red

TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformador  $\beta$

TG- Tecido de granulação

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1 Delineamento experimental.....	19
3.2 Confeção das biomembranas de látex.....	20
3.3 Confeção da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) .....	21
3.4 Contagem plaquetária.....	22
3.5 Ferida cirúrgica e cuidados pós-operatórios.....	23
3.6 Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas.....	25
3.7 Análise histológica.....	25
3.7.1 Preparação das lâminas histológicas.....	25
3.7.2 Análise semiquantitativa (HE) .....	25
3.7.3 Análise quantitativa (Picrosirius red) .....	26
3.8 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS .....	28
4.1 Avaliação clínico-cirúrgica e mensuração macroscópica.....	28
4.2 Caracterização histológica semiquantitativa.....	31
4.3 Análise quantitativa de colágeno.....	35
5 DISCUSSÃO .....	37
6 CONCLUSÃO .....	41
REFERÊNCIAS.....	42

# 1 INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, a pele possui como função a separação do meio ambiente externo e o corpo, determinando um ponto de interação entre os mesmos. Ao mesmo tempo em que propicia uma barreira de defesa, ela contém uma porção fluída que permite sua regulação e troca com o ambiente externo, constituindo um ponto chave na homeotermia. No adulto, a pele íntegra mantém a homeostase, promove a regeneração de pelos, participa no sistema imunológico e síntese hormonal (vitamina D), fornece a percepção sensorial exógena e excreta substâncias endógenas; refletindo assim a saúde geral do indivíduo de acordo com sua aparência (FUCHS, 2016). O tecido tegumentar é a primeira linha de defesa do organismo, conferindo proteção contra a colonização de patógenos e danos provindos do mundo externo (KIM *et al.*, 2019). Analisando suas camadas a termos histológicos estão presentes 2 divisões: a epiderme, porção mais externa e constituída principalmente por queratinócitos, e a derme, subjacente à epiderme (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014).

Sendo um epitélio estratificado, a epiderme possui em sua camada mais interna a porção basal, rica em matriz celular e fatores de crescimento e a única com potencial proliferativo dentre os estratos (FUCHS, 2016). Abaixo da epiderme se localiza a junção dermo-epidérmica, composta por filamentos de ancoragem e fibrilas de colágeno que a delimitam. Na sequência encontra-se a derme, uma camada constituída por um sistema vascular, inervação, glândulas sudoríparas e, principalmente, pelos fibroblastos. Essas células são responsáveis pela produção de colágeno principalmente do tipo I, elastina, outras glicoproteínas e proteoglicanos (LOSQUADRO, 2017; WOODLEY, 2017). Os fibroblastos possuem alto perfil de atividade na pele, promovendo ativamente a síntese e remodelamento da matriz extracelular por meio da produção, secreção e inibição de metaloproteinasas e outras proteínas (RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019). Após a injúria tecidual os fibroblastos geram efeitos estimulantes nos queratinócitos e induzem a proliferação epidérmica a partir da liberação de fatores de crescimento de queratinócito (WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007).

O reparo tecidual, precedido pela perda da integridade cutânea, é tomado como um processo complexo que ocorre em diferentes etapas que, mesmo

sequenciais, sofrem sobreposição umas das outras. Essas etapas são compostas pelas fases de hemostasia, inflamatória, proliferativa e de remodelação (XU *et al.*, 2018). Evidências corroboram com o emprego de biocurativos nos diferentes tecidos moles e feridas complicadas, resultando na melhora e remissão do quadro clínico e acelerando o reparo tecidual (GUINOT *et al.*, 2014; PINTO *et al.*, 2018; STEENVOORDE *et al.*, 2008). Recentemente e de maneira progressiva, a pesquisa científica busca uma concepção mais profunda sobre as interações celulares na cicatrização da pele e as influências de fatores de crescimento e citocinas. Desde os primórdios, o foco principal é a necessidade de um fechamento rápido da pele, de maneira simples e preconizando a antisepsia do local da lesão (REINKE; SORG, 2012).

Ao decorrer da vida passamos por inúmeras tentativas de quebra da barreira epitelial, devido a condições como traumas, queimaduras e patologias crônicas, em que há perda de todas as camadas e formação de feridas profundas. Quando a integridade da pele se perde, respostas abruptas são desencadeadas para reestabelecer sua totalidade, evitando a perda sanguínea súbita, a entrada de microrganismos indesejáveis e promovendo uma reestruturação lentificada para formação de um reparo mais permanente (PARFEJEVS *et al.*, 2018).

O reparo tecidual consiste em diferentes etapas que acontecem sequencialmente com sobreposição umas às outras, sendo elas as fases de hemostasia, inflamatória, proliferativa e de remodelação (XU *et al.*, 2018). As primeiras 72 horas após a descontinuidade epitelial se caracterizam por mesclar as fases de hemostasia e inflamatória, já que se fundem eventos vasoconstritores onde o dano ao endotélio e a exposição dos componentes sanguíneos ao tecido epitelial desencadeiam a cascata inflamatória. Há recrutamento celular e formação do coágulo sanguíneo por ativação plaquetária e liberação de seus grânulos. Assim, a agregação das plaquetas aos leucócitos é amplificada e os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento locais são elevados, constituindo uma alteração característica da fase inflamatória (GAUGLITZ *et al.*, 2011; SZPADERSKA *et al.*, 2003). Nas primeiras horas após a lesão já acontece migração inicial de queratinócitos estimulados pelas mudanças na tensão de oxigênio devido a vasoconstrição local (WOODLEY *et al.*, 2015). Cabe aos neutrófilos inicialmente,



com suas espécies reativas de oxigênio e proteases, o controle antimicrobiano e liberação no leito seus mediadores (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), aumentando a resposta inflamatória, o reparo tecidual e a diferenciação de monócitos em macrófagos (VEGF e IL-8).

A limpeza é realizada pelos monócitos teciduais, assim como a modulação da fase inflamatória tardia e proliferação tecidual, também por meio de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007). A fase de proliferação acontece entre 3 a 10 dias, nela há predomínio da formação de neovasos que vão permeando o tecido de granulação recém-formado. A partir do vigésimo primeiro dia, o processo cicatricial é concluído com a fase de remodelamento, caracterizada pelo ajuste da apoptose celular, maturação do colágeno e retração pelos miofibroblastos (WANG, 2018). Diferente do que ocorre nas feridas mais profundas em fetos, nos adultos, anexos como pelos ou glândulas dificilmente se recuperam após o processo cicatricial final (REINKE; SORG, 2012).

Nas distintas etapas do processo cicatricial existe a influência dos fatores de crescimento (FC). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) atua na angiogênese. Os fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), básico de fibroblastos (bFGF), epidérmico (EGF), semelhante à insulina (IGF) e os da família do fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) auxiliam no crescimento e diferenciação celular (XU *et al.*, 2018). Devido às suas propriedades e explorando a potencialidade desses fatores estimulantes, inúmeras técnicas atuais em medicina regenerativa da pele utilizam terapias que enfocam biomateriais e fontes celulares de diferentes tecidos capazes de proporcionar altos níveis de fatores de crescimento, agentes anti-inflamatórios ou células-tronco. Estes agentes modificadores da resposta biológica geram curativos temporários, “scaffolds” e substitutos dérmicos (VYAS; VASCONEZ, 2014).

Atualmente são tomadas diferentes condutas para o tratamento dos variados tipos de feridas. Na cirurgia plástica, por exemplo, ainda há predomínio dos enxertos autólogos, que são limitados pela disponibilidade de pele (SORG *et al.*, 2017). Em um aspecto mais diversificado, há investimento em várias abordagens de engenharia tecidual, como as técnicas atuais em medicina regenerativa que utilizam terapias baseadas em biomateriais apropriados e fontes celulares de diferentes

tecidos (sangue, medula óssea, etc.) contendo altos níveis de agentes modificadores da resposta biológica (BHARDWAJ *et al.*, 2015; SORG *et al.*, 2017).

Para tratamento da ferida cabe o preparo adequado do local, diminuindo a carga bacteriana e remoção do tecido inviável. O aporte vascular tende a se manter estável assim que houver controle do edema, para que se mantenham os níveis de oxigênio e nutrientes. Os traumatismos locais também devem ser minimizados para que haja uma cicatrização ideal.

Os benefícios da utilização do látex para o reparo tecidual são suas propriedades angiogênicas, baixo custo e poucos riscos de disseminação de patógenos, o que gera uma vasta aplicabilidade do ponto de vista social e médico (ROSA *et al.*, 2019). Estudos vêm demonstrando a aplicabilidade do látex natural, assim como a de outros materiais derivados de plantas. O látex derivado da seiva da *Hevea brasiliensis*, conhecida popularmente com seringueira, explana resultados promissores, auxiliando na reepitelização *in vivo* e viabilizando a atividade migratória e proliferativa *in vitro* (LEITE *et al.*, 2020). Foi constatado seu fácil manuseio, eficácia e custo-benefício. Por possuir ação de desbridamento e angiogênese, também permite uma cicatrização de maior velocidade (ANDRADE *et al.*, 2011). Rosa e colaboradores (2019) ainda elucidam propriedades favoráveis ao uso do látex natural na regeneração tecidual, como sua compatibilidade e capacidade de adaptação ao tecido, possibilidade do emprego de suturas, elasticidade e impermeabilidade; características benéficas na aplicabilidade em feridas de pele.

A fibrina rica em plaquetas (PRF), material biocompatível e biodegradável, é uma opção de fácil processamento gerada a partir da coleta e centrifugação de sangue autólogo e sem necessidade de aditivos. Durante o processo de centrifugação, a ausência de anticoagulante desencadeia uma cascata de coagulação que causa ativação plaquetária decorrente do contato do sangue com a parede do tubo de coleta, formando uma matriz tridimensional de fibrina, onde estarão contidas inúmeras plaquetas, leucócitos, citocinas e FC (SORG *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2018). As plaquetas com seus grânulos-alfa ricos em IGF-1, TGF- $\beta$ , PDGF entre outros, que sofrerão liberação lenta dentro da PRF. Tal característica de liberação lenta é consequência da capacidade da rede de fibrina de conter uma maior celularidade e proteínas em sua trama (DOHAN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2013).

Para melhoria da técnica de obtenção do PRF, foi demonstrado que se diminuindo a velocidade e controlando-se o tempo de centrifugação (força G), a concentração dos fatores de crescimento é otimizada, em parte devido a um maior número de leucócitos retidos na rede de fibrina formada (LEE *et al.*, 2014). As concentrações dos fatores atingem um pico de liberação entre 7 a 14 dias pós-confecção, com níveis significativos por até 28 dias (DOHAN *et al.*, 2006). Tal propriedade é interessante para a aplicação do PRF em feridas profundas.

O modelo de roedores para feridas possui a vantagem da simplicidade, reprodutibilidade e praticidade em relação à técnica, materiais e manejo. Os tecidos são coletados com facilidade para análises histomorfométricas, imunológicas ou moleculares, além de permitir acesso fácil à ferida para administração de agentes tópicos (drogas, células, biomateriais) para estudo do reparo (WANG *et al.*, 2013)

Com base nessa colocação e nos fatos expostos, essa modalidade de biocurativos atuaria no reparo epitelial por associação de uma cobertura que mantém um microambiente ideal e de efeito angiogênico associada a derivados plaquetários ricos em fatores de crescimento que potencializariam a cicatrização de feridas com um estímulo maior e mais efetivo ao reparo e regeneração local.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo do projeto de pesquisa é testar a hipótese de que a associação do látex natural derivado da *Hevea brasiliensis* em forma de biomembrana com a fibrina rica em plaquetas potencializa a regeneração e o reparo da pele no tratamento de feridas agudas de espessura total em ratos da linhagem Wistar.

### 2.2 Objetivos Específicos

Para atingir a meta final proposta, houve emprego das estratégias descritas, baseadas nos grupos e por comparação dos mesmos.

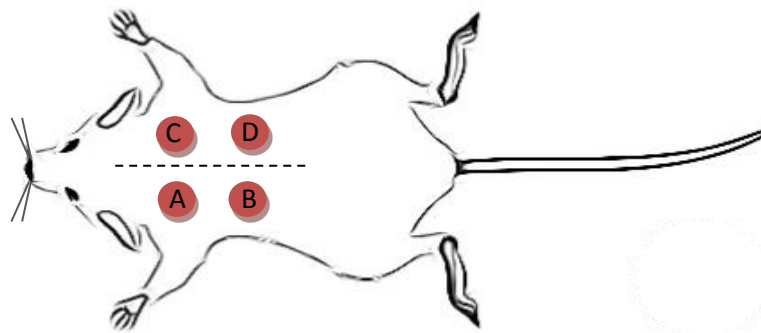
- Determinar a cicatrização da ferida por meio da mensuração macroscópica ao longo do tempo experimental das lesões cirúrgicas produzidas.
- Avaliar o reparo tecidual a nível celular por meio da avaliação das camadas por análise histológica.
- Avaliar a infiltração celular, inflamatória e resposta angiogênica local por análise histomorfométrica.
- Tipificar e quantificar a formação de colágeno no leito cicatricial.
- Ponderar a aplicabilidade de ratos machos linhagem Wistar como modelo de feridas agudas excisionais profundas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (nº 00918-2019), conduziu-se o experimento com 20 espécimes de ratos machos (*Rattus norvegicus: var.albinus, Rodentia, Mammalia*), com peso variando de 600 a 750 g, da linhagem, com 6 meses de idade. Os animais foram mantidos em ambiente controlado ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) com umidade relativa entre  $55\pm 10\%$ , ciclo claro-escuro de 12h/12h e com livre acesso à água e ração comercial (Labina, Purina Brasil) por sete dias para aclimação e durante o período experimental. Posteriormente, de maneira aleatória, por amostragem sem reposição e indivíduos identificados por letras e números aleatórios, os animais foram submetidos à confecção de quatro feridas (A, B, C e D) de espessura total que receberam os tratamentos: A) ML+PRF; B) ML; C) Controle 1 (simétrica a A); D) Controle 2 (simétrica a B). As feridas utilizadas para controle foram preenchidas com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril, mantendo a simetria entre os tratamentos e os controles (Figura 1). Aos 3, 7, 14 e 21 dias após confecção das feridas, os animais foram eutanasiados e posteriormente realizada análise histológica.

**FIGURA 1** - Esquema de modelo cirúrgico de ferida excisional de espessura total em ratos para avaliar os componentes da cicatrização de feridas *in vivo*. Nas feridas A e B aplicaram-se a ML+PRF e ML respectivamente, e as feridas C e D, preenchidas com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril, tratamento controle.

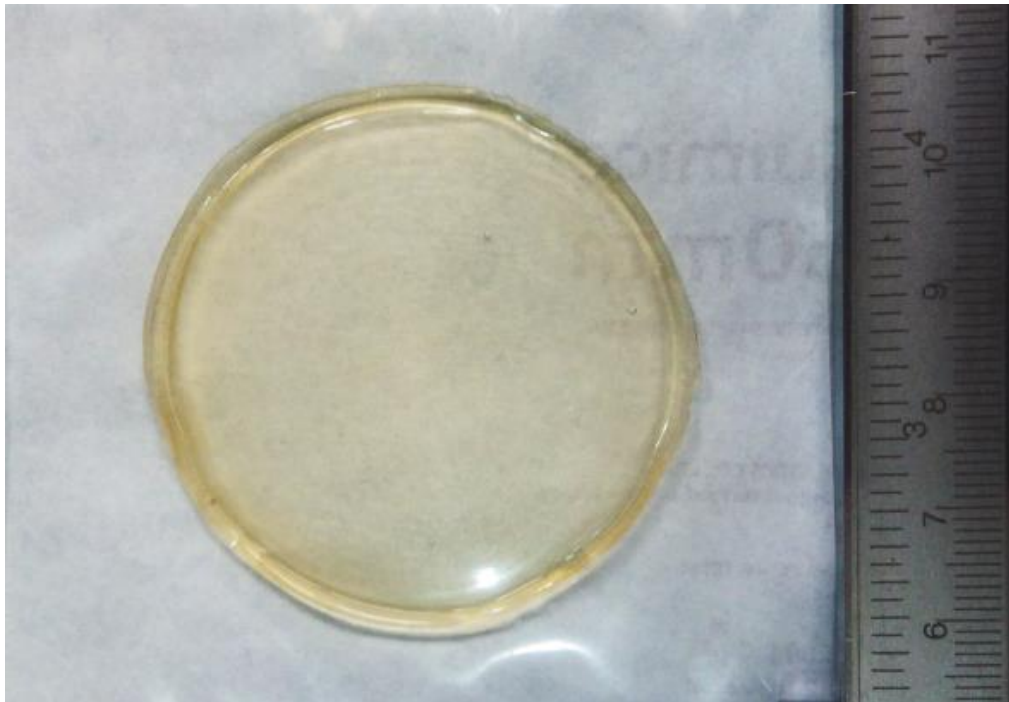


Fonte: Autor, 2020.

### 3.2 Confeção das biomembranas de látex

A confecção das biomembranas seguiu o protocolo de Gemeinder (2016). Resumidamente, o látex natural de *Hevea brasiliensis* foi adquirido comercialmente (BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda., Guarantã, SP) e mantido em estado líquido pela adição de amônia com pH 10,0. O material foi centrifugado a 8000 x g com a finalidade de reduzir proteínas presentes no látex capazes de ocasionar reações alérgicas. A biomembrana foi confeccionada por “casting”, depositando-se 3 mL de látex sobre uma placa circular de 5cm, por 24 horas para a obtenção da membrana em sua consistência padrão (Figura 2).

**FIGURA 2** - Membrana de látex natural de *Hevea brasiliensis*. A biomembrana é confeccionada por “casting”, depositando-se 3 mL de látex sobre placa circular, por no mínimo 24 horas para procedimento de secagem gerando uma membrana com raio de 5cm.

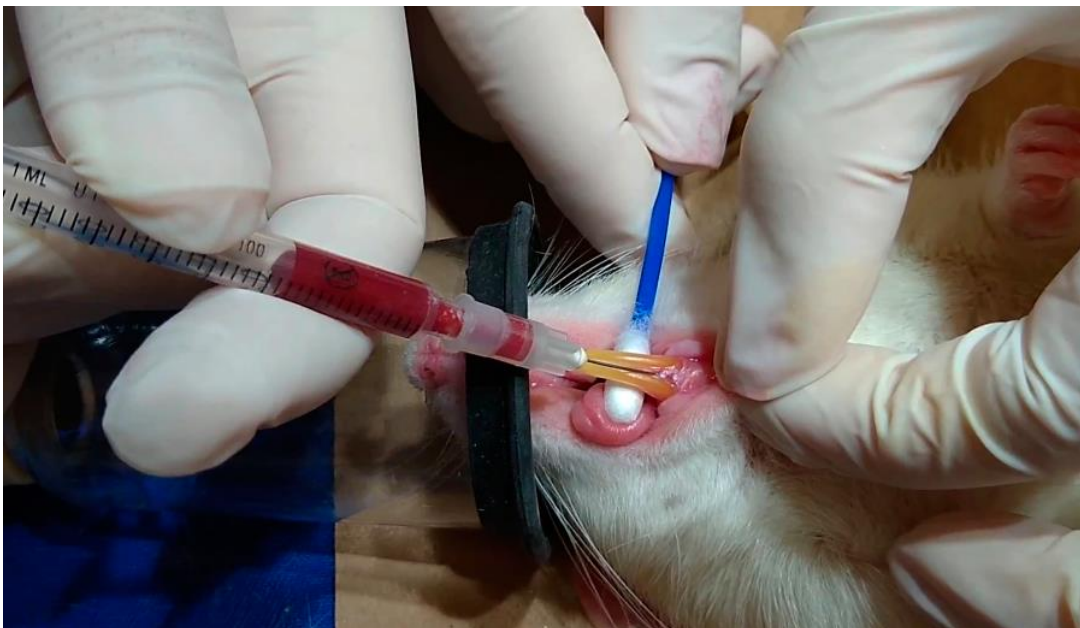


Fonte: Autor, 2020.

### 3.3 Confeção da Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

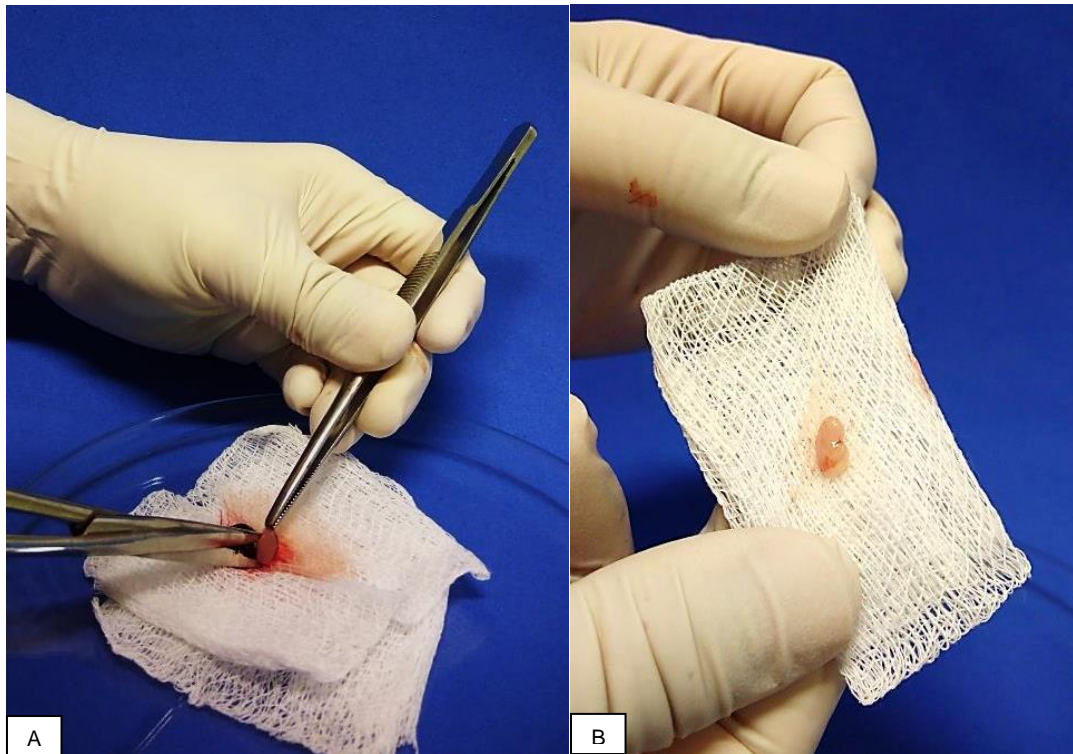
A coleta sanguínea foi realizada com os animais anestesiados por via inalatória com sevoflurano em vaporizador calibrado a 2%. Com o animal em plano anestésico adequado, coletou-se uma amostra de 0,8mL de sangue por punção da veia gengival mandibular (Figura 3). Para confecção da PRF, 0,4mL de sangue foi armazenado em tubo de vidro siliconizado (12,7x75mm) estéril sem anticoagulante. O tubo foi imediatamente submetido ao protocolo para aquisição da PRF com centrifugação (Centrífuga 80-2B, Centribio - Hexasystems Group) a 200 x g por 14 minutos em temperatura ambiente (FUJIOKA-KOBAYASHI *et al.*, 2017). Após ativação plaquetária e sedimentação dos hemocomponentes, a PRF foi retirada do tubo para secção do terço final (hemácias) com tesoura cirúrgica e colocada sobre gaze seca estéril para a promoção da drenagem parcial do soro hiperagudo até a confecção das feridas por aproximadamente 5 minutos (Figura 4). O coágulo de PRF foi então depositado sobre a ferida ocupando toda extensão. Todos os animais receberam tratamento autólogo.

**FIGURA 3** - Punção da veia gengival mandibular (*labialis mandibularis*), via de acesso para coleta de sangue em ratos. A coleta permitiu a obtenção de 800  $\mu$ L de sangue periférico, em um único evento de amostragem e sem trauma aparente para os animais. Estes se encontravam em plano anestésico por sevoflurano como agente inalatório, administrado via vaporizador calibrado a 2%



Fonte: Autor, 2020.

**FIGURA 4 - A-** Secção com tesoura cirúrgica do terço final da fibrina rica em plaquetas (PRF) depois de retirada do tubo, permitindo a separação de grande parte das hemácias sedimentadas durante a centrifugação. **B-** PRF obtida colocada sobre gaze seca estéril para a promoção da drenagem parcial do soro hiperagudo



Fonte: Autor, 2020

### 3.4 Contagem plaquetária

A contagem plaquetária do sangue total periférico excedente, ou seja, não utilizado na confecção da PRF, foi acondicionado em criotubos cônicos de 2mL, contendo anticoagulante (EDTA) para realização posterior da análise hematimétrica. A quantificação das plaquetas foi realizada em contador automatizado de células sanguíneas (Mindray BC-2800 Vet<sup>®</sup>) devidamente calibrado e programado para a espécie de interesse do presente estudo. A análise da morfologia plaquetária foi realizada em esfregaço corado com corante hematológico comercial (NEWPROV<sup>®</sup>-PA205, Brasil) para exclusão de possíveis atipias. A contagem média de plaquetas e desvio-padrão no sangue dos animais incluídos no experimento estão expressos na Tabela 1.

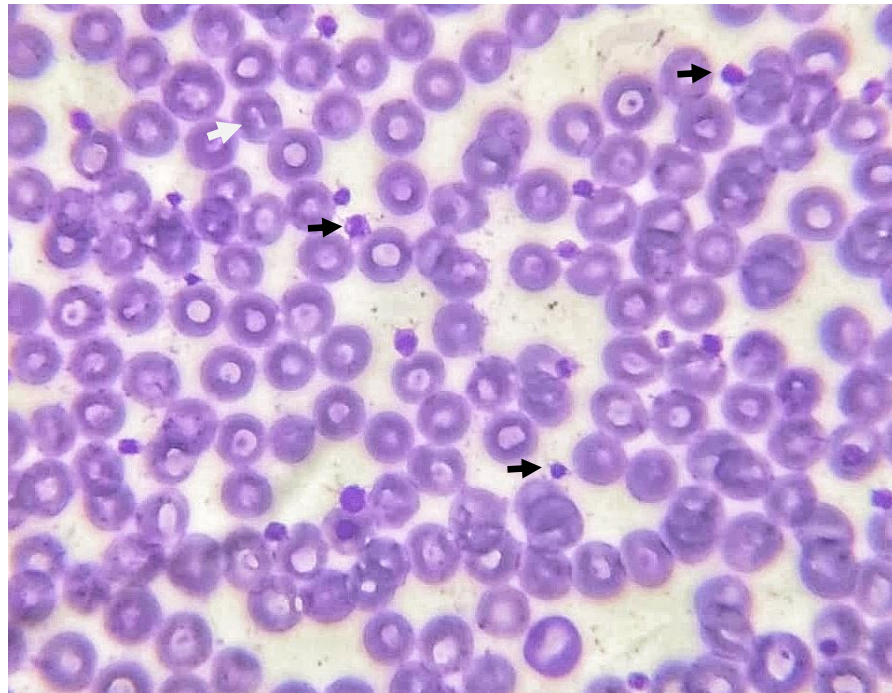


**TABELA 1 - Valores de média e desvio-padrão totais da contagem plaquetária (sangue periférico) obtido da veia gengival mandibular de ratos Wistar durante o experimento**

	Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )
Média	1027
Desvio padrão	209

Fonte: Autor, 2020.

**FIGURA 5 -** Fotomicroscopia de esfregaço sanguíneo de rato linhagem Wistar macho evidenciando a morfologia plaquetária normal sob o aumento de 1000X (seta preta), as plaquetas são encontradas entre as hemácias (seta branca), corante hematológico comercial (NEWPROV®- PA205, Brasil)



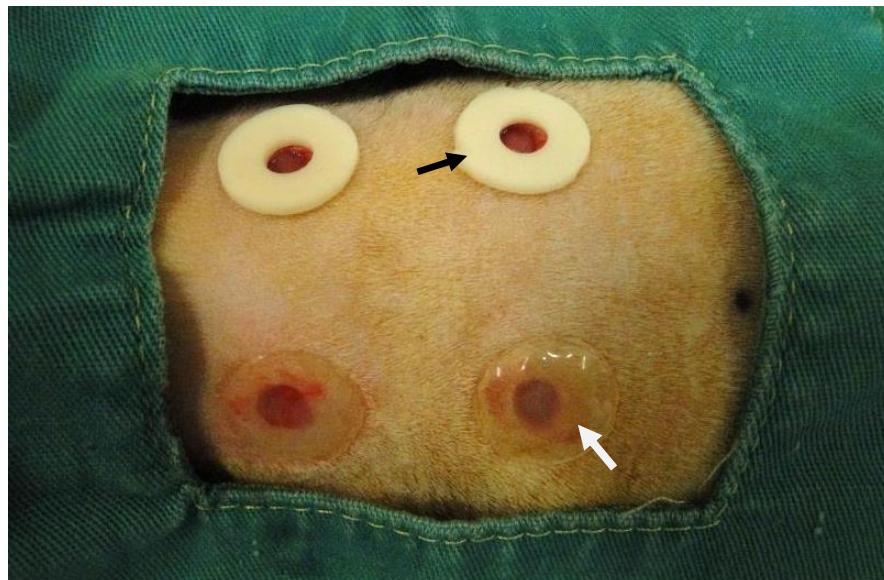
Fonte: Autor, 2020.

### 3.5 Ferida cirúrgica e cuidados pós-operatórios

A confecção das feridas agudas excisionais de espessura total seguiu o protocolo de Wang *et al.* (2013) modificado. Com os ratos ainda sob anestesia supracitada, realizou-se tricotomia da superfície dorsal torácica do animal, seguida de antissepsia local com iodopovidine e álcool 70% e colocação dos campos estéreis. Os locais das feridas foram limitados por mensuração e desenho de uma linha imaginária ao longo do eixo longitudinal (linha média) e outras duas perpendiculares às inserções dos membros, delimitando os pontos A, B, C e D; entre cada raio foi preconizada uma distância maior que 1,5cm, evitando eventual contato

entre os tratamentos. Um único cirurgião realizou o procedimento durante todo o experimento, com auxílio de tesoura, pinça e ferramenta para biópsia estéril (“punch”) descartável com 5 mm para padronização. As feridas A e B passaram pelos tratamentos PRF+ML e ML, respectivamente. Quatro pontos de sutura epidérmicos com nylon 5-0 e cola de polimetilmetacrilato foram aplicados para fixação das membranas. As feridas controles (C e D) foram preenchidas com cloreto de sódio 0,9% estéril. Para minimizar a cicatrização por contratura e mimetizar a ação de contenção da membrana de látex, foram fixados anéis de silicone atóxico estéreis de fabricação própria ao redor da ferida, centralizados e distantes dos bordos. Os anéis possuíam o mesmo raio da membrana de látex. Ao término de todos os procedimentos, os animais receberam dose analgésica de cloridrato de tramadol 5mg/kg por via subcutânea, sendo monitorados durante a recuperação anestésica e subsequentemente devolvidos a gaiolas individuais no mesmo ambiente proposto.

**FIGURA 6** - Confecção das quatro feridas de 5mm de diâmetro respeitando 1,5cm para evitar contato entre os tratamentos ML, ML+PRF, C1 e C2 (controles) no tempo experimental 0. Para minimizar a cicatrização por contratura e mimetizar a ação de contenção da membrana de látex (seta branca), foram fixados anéis de silicone (seta preta) atóxico estéreis de fabricação própria ao redor da ferida, centralizados e distantes dos bordos.



Fonte: Autor, 2020.

### **3.6 Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas**

A avaliação do fechamento das feridas foi realizada em cada grupo a partir da captura de imagens fotográficas por câmera digital (Sony dsc-hx1<sup>®</sup>) e mensuração das lesões com auxílio de paquímetro, no momento da eutanásia aos 3, 7, 14 e 21 dias de acordo com os grupos.

### **3.7 Análise histológica**

#### **3.7.1 Preparação das lâminas histológicas**

As amostras de tecido foram removidas em blocos e imediatamente fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas em temperatura ambiente, sendo posteriormente submetidas ao procedimentos de desidratação com passagens seriadas em álcoois, diafanização em xilol e inclusão em blocos de parafina. As secções de tecido foram obtidas por micrótomo contendo a área da ferida, com cortes entre 5-6 $\mu$ m.

#### **3.7.2 Análise semiquantitativa (HE)**

A coloração Hematoxilina & Eosina (HE) foi utilizada para avaliação semiquantitativa (GAL *et al.*, 2008) sob microscopia de luz (DM 4000 B, Leica, câmera - DFC 500, Leica) nos aumentos de 25X, 50X, 100X e 400X. A avaliação das feridas foi feita quanto à reepitelização, presença de polimorfonucleares (células inflamatórias), fibroblastos e neovascularização. Todos os parâmetros histológicos observados foram graduados em uma escala de 0 a 4 (Tabela 2).

TABELA 2 - Escala de avaliação semiquantitativa com pontuação 0 a 4, adaptado de Gal et al. (2008)

Escala	Epitelização	Leucócitos Polimorfonucleares	Fibroblastos	Neovascularização
0	Espessura dos bordos	Ausente	Ausente	Ausente
1	Migração celular <50%	Poucos, ao redor da lesão	Poucos ao redor da lesão	Leve - Restrita ao subcutâneo
2	Migração celular >50%	Poucos – LD/TG	Poucos TG	Leve - TG
3	Preenchimento da lesão	Moderada – LD/TG	Moderada no TG	Moderada - TG
4	Queratinização	Intensa – LD/TG	Intensa no TG	Intensa - TG

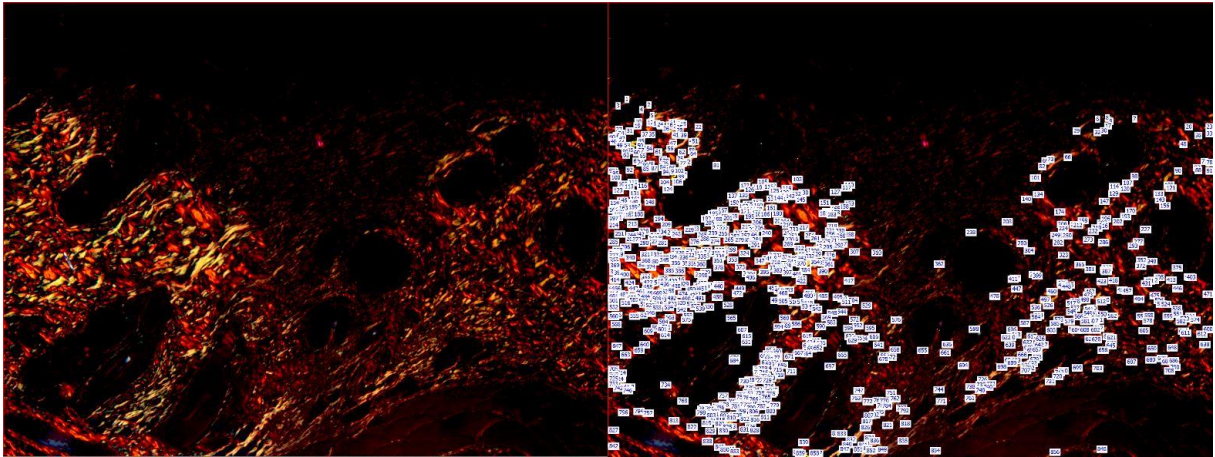
Legenda: LD- linha de delimitação, TG- tecido de granulação.

Fonte: Autor, 2020.

### 3.7.3 Análise quantitativa (*Picrosirius red*)

A análise quantitativa se baseou na avaliação de imagens do tecido sob coloração Picrosírius Red em microscopia de luz polarizada (DM 4000 B, Leica) e camera DFC 500(Leica), com aumento de 50X e em área de aproximadamente 7mm<sup>2</sup>, através do programa Leica Application Suite (v 4.12 , Leica Microsystems, Frankfurt). Assim durante o curso temporal do experimento, as secções histológicas coradas com PSR e observadas sob luz polarizada, mostraram fibras colágenas com birrefringência laranja-avermelhada (tipo I) e de tons amarelos ao verde (tipo III) condizendo com o padrão obtido por Coleman (2011). A visualização e análise computadorizada resultaram na observação e quantificação das fibras de colágeno. O tecido conjuntivo foi avaliado quanto à deposição de colágeno maturo e imaturo, aplicando-se os valores para cor vermelha (colágeno tipo I) de: 0-34 de matiz, 255-106 de saturação e 255-52 de luz; e para cor verde (colágeno tipo III) de: 146-35 de matiz, 255-60 de saturação e 194-55 de luz, espaço de cores RGB (Figura 7).

**FIGURA 7** - Quantificação de colágeno imaturo após coloração com PSR submetido à luz polarizada pelo programa Leica Application Suite v 4.12, em fragmento de pele de rato, linhagem Wistar, submetido à confecção de ferida aguda de espessura total. As marcações representam a quantificação numérica dos tons de verde obtidos dentro de uma faixa de coloração específica para colágeno tipo III



Fonte: Autor, 2020.

### 3.8 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram testadas quanto à normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os tratamentos das variáveis quantitativas foram determinadas por ANOVA com medidas repetidas e pós-teste de Tukey. As diferenças entre os tratamentos das variáveis semiquantitativas foram determinadas pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn. Todas as análises estatísticas foram efetuadas em GraphPad Prism v.6.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), sendo considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação clínico-cirúrgica e mensuração macroscópica

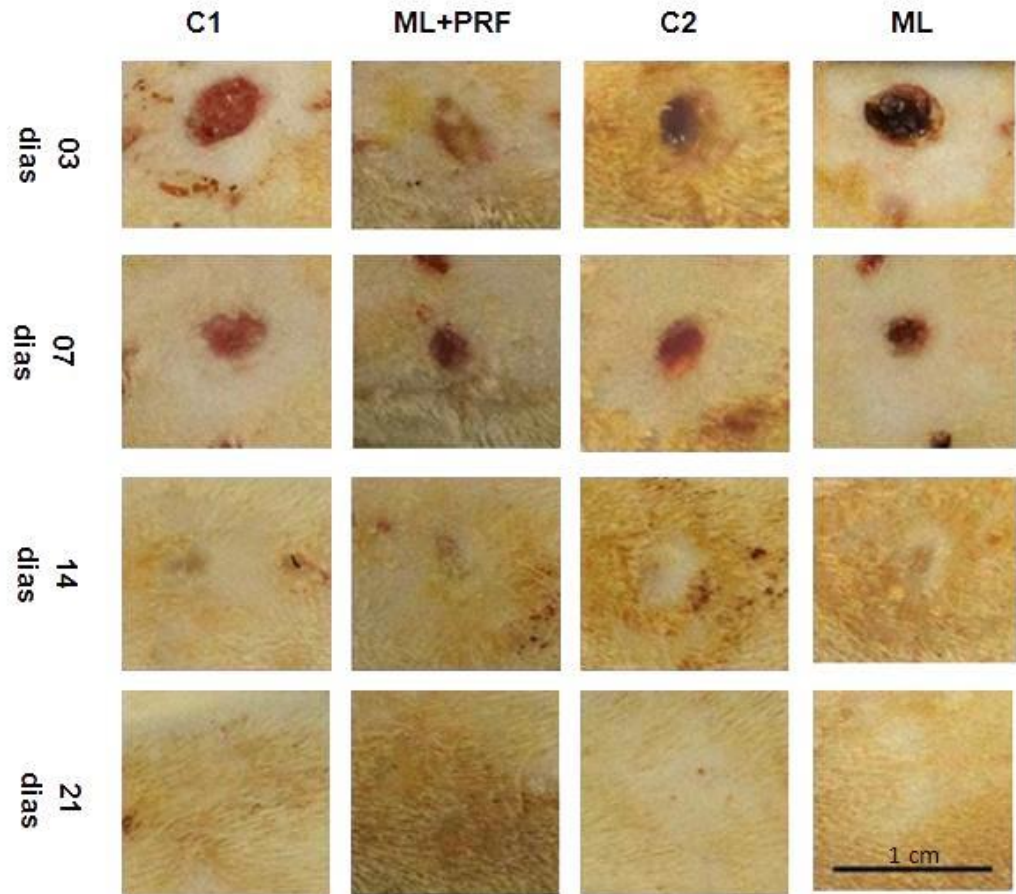
Quanto à aplicabilidade das técnicas, a anestesia inalatória foi primordial para uma boa execução da técnica cirúrgica empregada, que em associação à analgesia pós-operatória foi um protocolo anestésico multimodal que gerou boa resposta sem sinal imediato de dor pós-operatória.

Mediante avaliação macroscópica e mensuração, não foram observadas complicações nas feridas, sem aspecto de infecção ou reações de hipersensibilidade local (Figura 8). Na mesma imagem, nota-se a diminuição gradativa das áreas lesionadas nos grupos experimentais, cursando com aspecto macroscópico de recobrimento quase que total nos animais eutanasiados aos 14 dias.

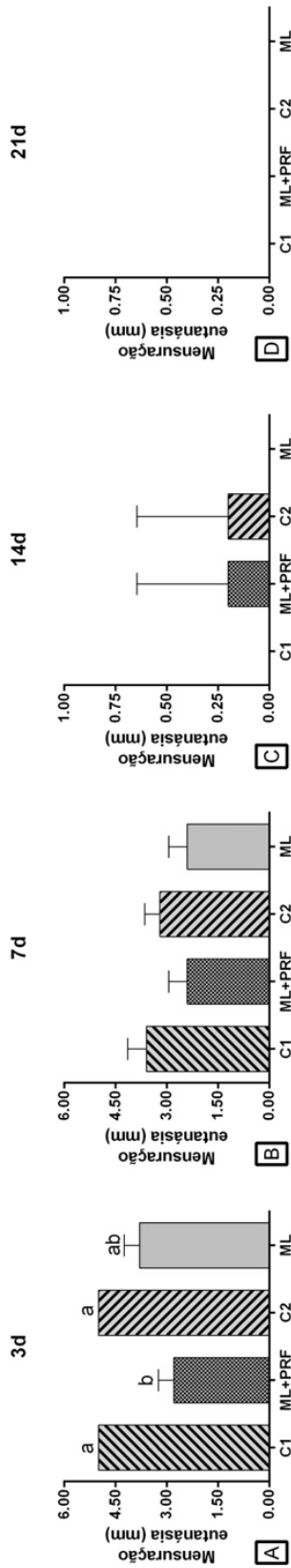
No decorrer do curso temporal, foi verificado que o grupo referente aos 3 dias após a confecção da ferida, exibiu diferença métrica significativa entre os controles e as feridas que receberam recobrimento de ML+PRF ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).

Em todos os grupos, ML+PRF, ML, C1 e C2 foram evidenciadas a diminuição significativa do diâmetro das feridas, em milímetros, entre os 03 e 21 dias, e somente no grupo ML+PRF foi notado também aos 07 dias uma diferença significativa na redução (Figura 10).

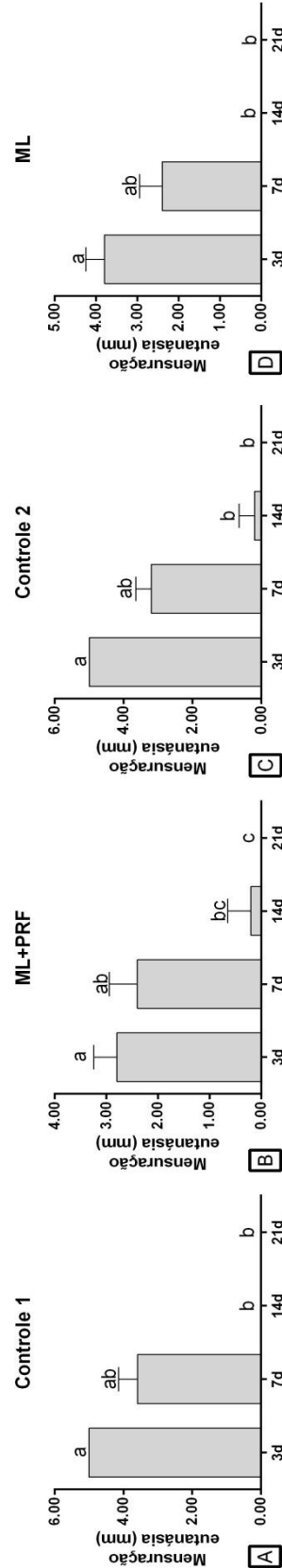
**FIGURA 8** - Fotografias digitais obtidas dos animais controle (C1 e C2) e tratados (ML+PRF e ML), no decorrer do tempo experimental (03, 07, 14 e 21 dias) através da intersecção dos eixos, dias e grupos, conseguimos acompanhar a evolução da cicatrização evidenciando melhor aspecto de cicatrização nos grupos tratados com a associação de coberturas



Fonte: Autor, 2020.



**FIGURA 9** - A a D - Gráficos de barra representando os valores em milímetros obtidos mediante mensuração dos diâmetros das feridas dos animais controle (C1 e C2) e tratados (PRF+ML e ML) ao longo do curso temporal (A – 3dias, B – 7dias, C – 14 dias e D – 21 dias). As variáveis numéricas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e submetidas ao teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis



**FIGURA 10** - A a D - Gráficos de barra representando os valores em milímetros obtidos mediante mensuração dos diâmetros das feridas ao longo do curso temporal (A – Controle (C1), C – Controle (C2), B – ML+PRF e D – ML). As variáveis categóricas foram verificadas pelo teste de Kruskal-Wallis



## 4.2 Caracterização histológica semiquantitativa

Avaliando a epitelização, foi observado que as feridas que receberam cobertura apresentaram uma melhor classificação quanto à migração de células epiteliais aos 3 dias, sendo os grupos com cobertura ML e ML+PRF com maior pontuação segundo a escala e diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles (Fig. 2). Já a análise aos 7, 14 e 21 dias não revelou diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), exibindo em sua grande maioria grau final de reepitelização com queratinização.

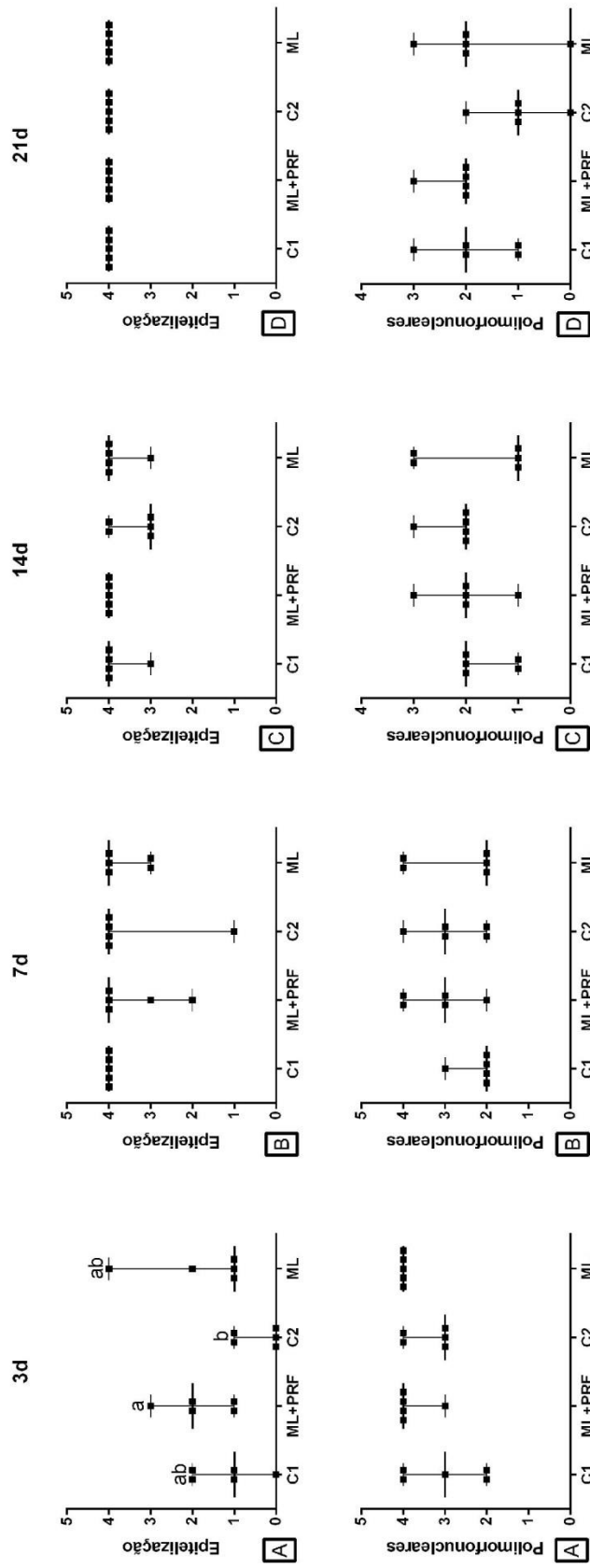
Quanto à resposta inflamatória local avaliada pela migração de polimorfonucleares, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ou ao decorrer do tempo ( $p > 0,05$ ).

A visualização de fibroblastos se manteve homogênea em todos os grupos e a neovascularização se mostrou presente durante todo curso temporal, contudo sem diferença significativa entre as respostas angiogênicas das feridas submetidas aos diferentes tratamentos e os grupos controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 2). A pontuação das categorias observadas junto à análise histológica semiquantitativa está detalhadamente expressa na Tabela 3.

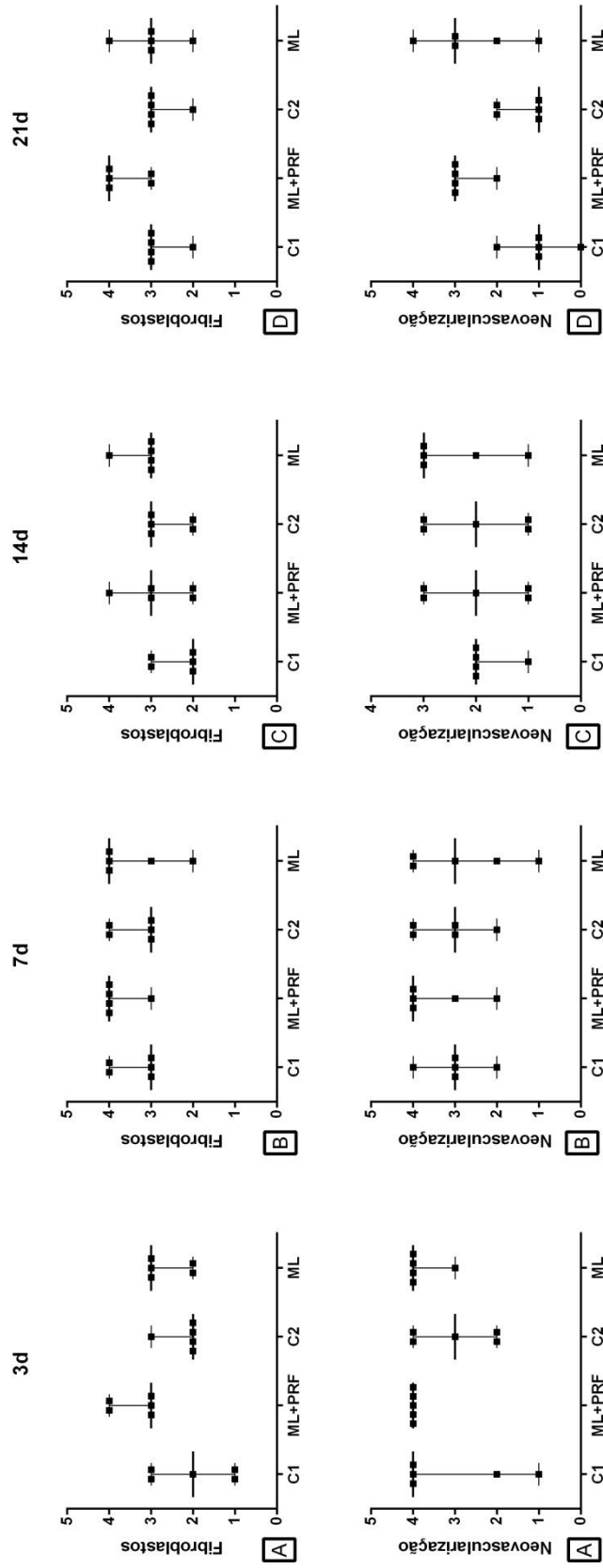
**TABELA 3 - Mediana da pontuação dos grupos C1, C2, ML e ML+PRF na escala de avaliação histológica semiquantitativa**

Grupos	Epitelização				Leucócitos Polimorfonucleares			
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
C 1	1 <sup>Ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>
C 2	0 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	1 <sup>ab</sup>
ML	1 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	1 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>
ML+PRF	2 <sup>AB</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>
Grupos	Fibroblastos				Neovascularização			
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
C 1	2 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	1 <sup>ab</sup>
C 2	2 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	1 <sup>ab</sup>
ML	3 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>
ML+PRF	3 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	3 <sup>ab</sup>

Legenda: C1: Grupo controle 1, feridas C) não submetidas a tratamentos e preenchidas com NaCl 0,9%; C2: Grupo controle 2, feridas D) não submetidas a tratamentos e preenchidas com NaCl 0,9%; ML: Grupo submetido ao tratamento com membrana de látex, ferida B); ML+PRF: Grupo submetido ao tratamento com membrana de látex + fibrina rica em plaquetas, ferida A); Escala de pontuação adaptada de Gal et al. (2008); Letras maiúsculas e minúsculas na mesma linha ou coluna representam diferença estatística significativa entre os grupos (teste de Friedman com pós-teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

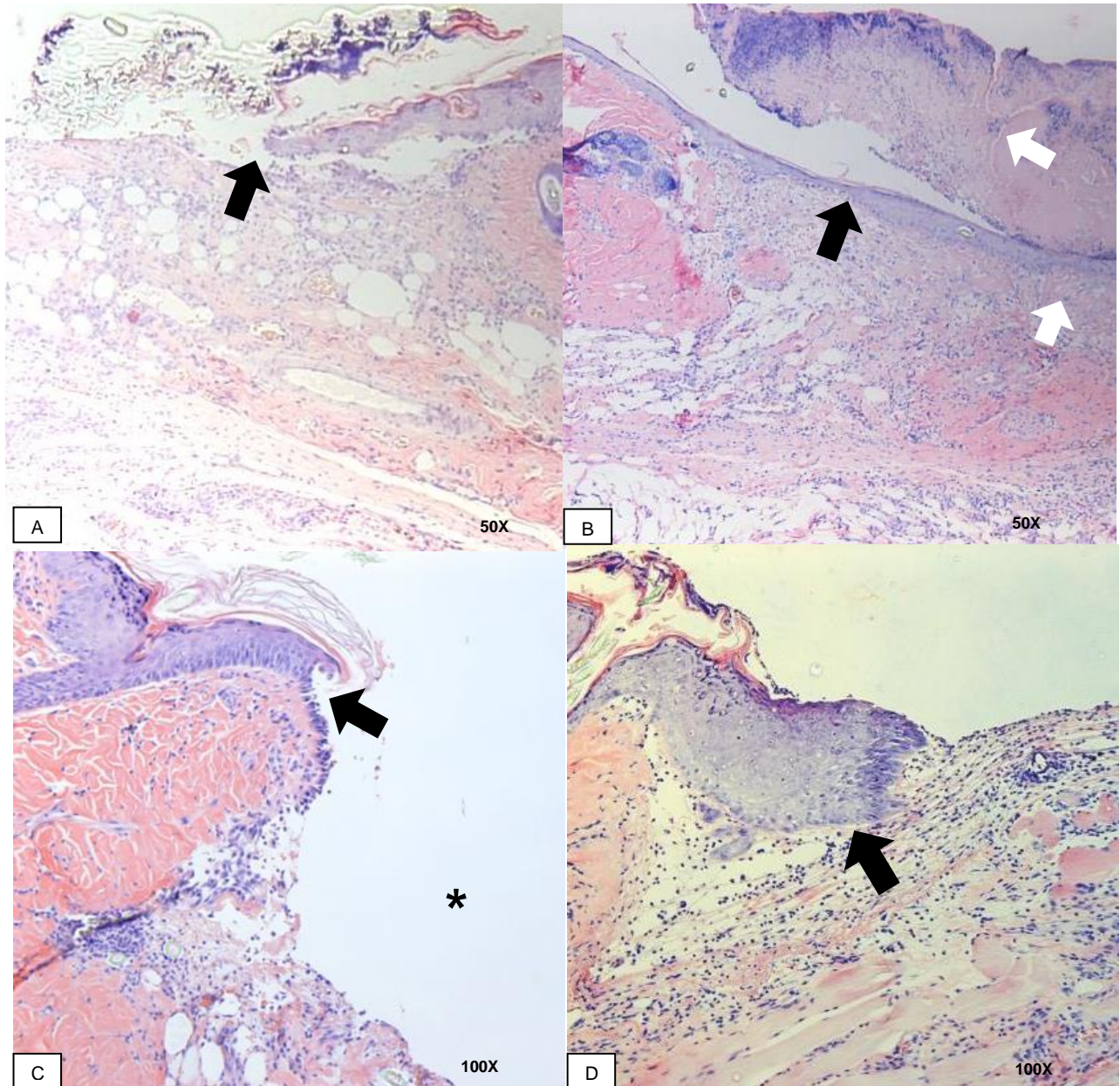


**FIGURA 11** - A a D - A análise microscópica das seções histológicas coradas em HE dos animais controle (C1 e C2) e tratados (ML+ PRFe ML) que permitiu a obtenção dos dados, mediana, mínimo e máximo da avaliação semiquantitativa, via pontuação em escala de 0 a 4. Dados expressos em gráficos de ponto representando as diferenças entre os tratamentos determinadas pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn e significância quando  $p < 0,05$  ao longo do curso temporal (A - 3dias, B - 7dias, C - 14 dias e D - 21 dias).



**FIGURA 11 - Continuação-** A a D - A análise microscópica das seções histológicas coradas em HE dos animais controle (C1 e C2) e tratados (ML+PRF e ML) que permitiu a obtenção dos dados, mediana, mínimo e máximo da avaliação semiquantitativa, via pontuação em escala de 0 a 4. Dados expressos em gráficos de ponto representando as diferenças entre os tratamentos determinadas pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn e significância quando  $p < 0,05$  ao longo do curso temporal (A – 3dias, B – 7dias, C – 14 dias e D – 21 dias).

**FIGURA 12** - Fotomicroscopia (DM 4000 B, Leica, câmera - DFC 500, Leica) de pele de rato Wistar aos 3 dias de evolução pós confecção de ferida aguda de espessura total, sendo o A animal controle 1, zona da ferida cirúrgica com pobre proliferação tecidual e seta preta mostrando carente proliferação epitelial, B animal submetido ao tratamento com ML+PRF exibindo alta taxa de reepitelização (seta preta) recobrir o tecido de granulação e rede de fibrina decorrente da PRF (seta branca). C animal controle 2, \* zona da ferida cirúrgica sem proliferação tecidual e seta preta mostrando proliferação epitelial diminuída, D animal submetido ao tratamento com ML exibindo zona ativa de reepitelização (seta preta) em direção ao tecido de granulação e migração celular difusa

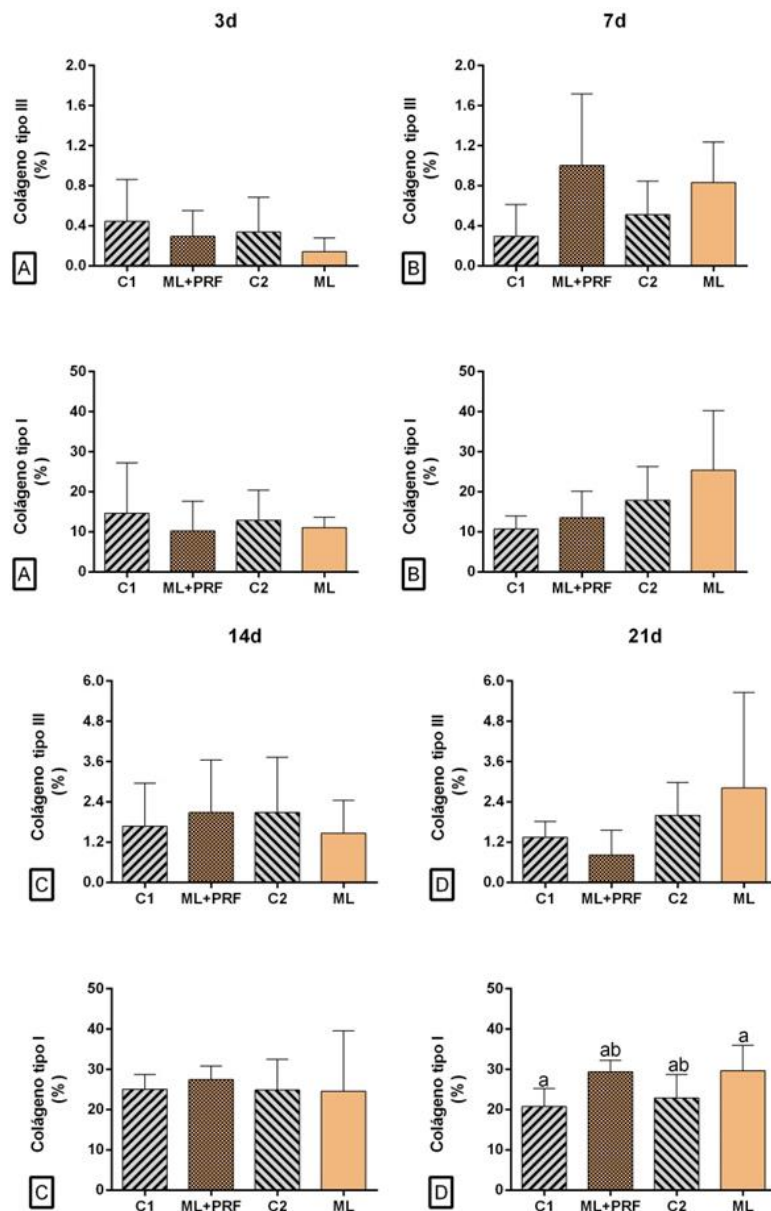


Fonte: Autor, 2020.

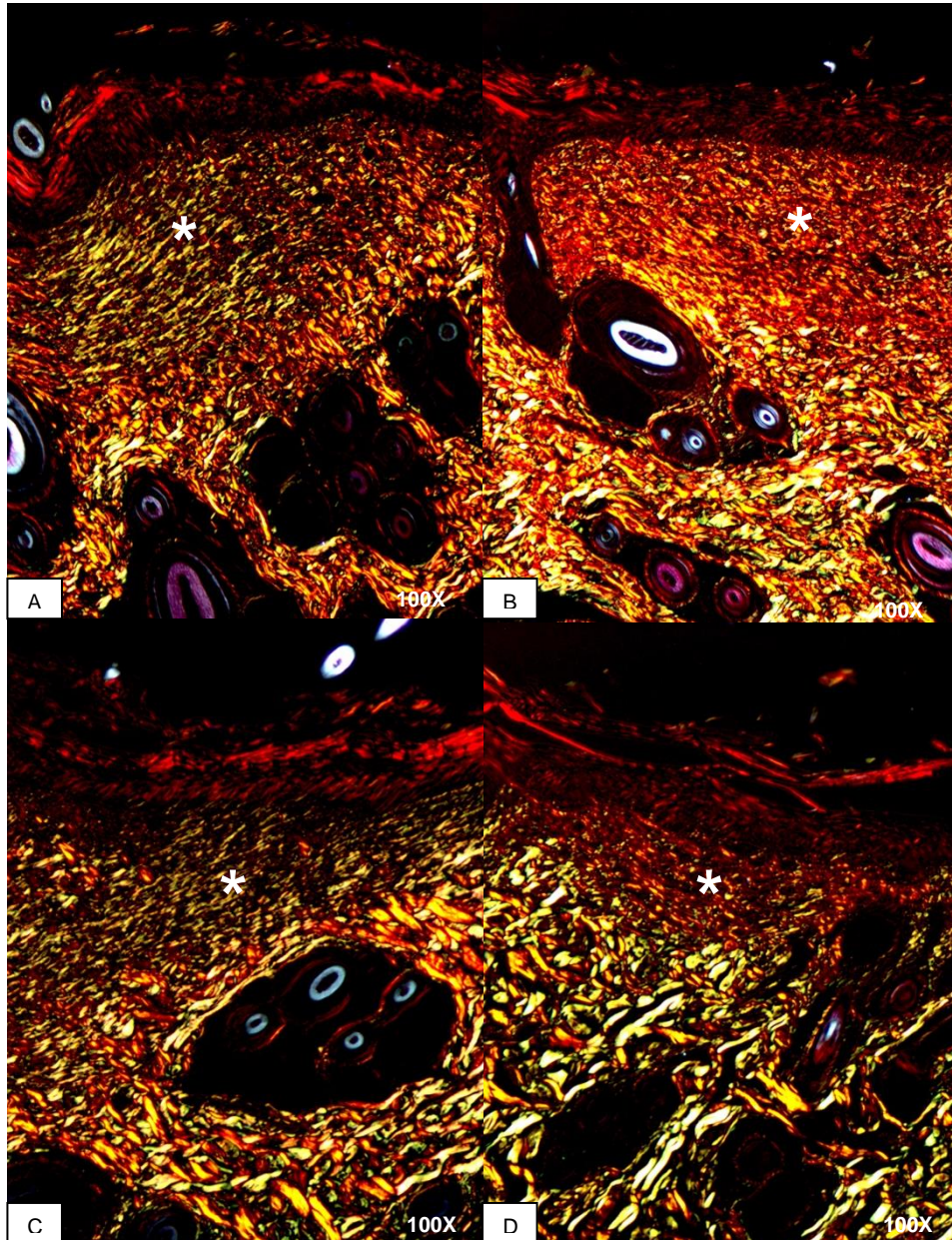
### 3.1 Análise quantitativa de colágeno

A coloração com *Picrosirius red* sob a luz polarizada exibiu uma maior expressão de fibras de colágeno de coloração vermelha aos 21 dias nos grupos ML e PRF+ML com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles (Fig. 13). Quanto à expressão de fibras de coloração verde, não houve diferença significativa entre os tratamentos ao decorrer do curso cicatricial, com maior desvio amostral nos grupos ML+PRF aos 7 dias e ML aos 21 dias em relação aos outros grupos e tempos.

**FIGURA 13** - A a D - Gráficos de barra representando média e desvio-padrão obtidos pela da avaliação quantitativa via fotomicroscopia das seções histológicas dos animais controle (C1 e C2) e tratados (ML+PRF e ML) coradas com PSR sob luz polarizada e analisadas pelo programa Leica Application Suite v 4.12. Valores expressos em porcentagem obtidos pela deposição de colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) sendo as diferenças entre os tratamentos determinadas por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey com significância quando o  $p < 0,05$



**FIGURA 14** - Fotomicroscopia em luz polarizada de pele de rato Wistar aos 21 dias de evolução pós confecção de ferida aguda de espessura total, sendo o A animal controle 1, B animal submetido ao tratamento com ML+PRF exibindo maior intensificação na coloração vermelha na área da ferida, \* zona da ferida cirúrgica. C animal controle 2, D animal submetido ao tratamento com ML exibindo maior intensificação na coloração vermelha na área da ferida, \* zona da ferida cirúrgica. As imagens foram adquiridas sob luz polarizada (DM 4000 B, Leica, câmera - DFC 500, Leica).



Fonte: Autor, 2020.

## 4 DISCUSSÃO

Durante o curso nos grupos, ML+PRF, ML, C1 e C2 notou-se diminuição significativa do diâmetro das feridas, em milímetros, entre os 03 e 21 dias, que leva a evidências de um o padrão positivo de fechamento das feridas e ausência de complicações com uso do látex em forma de membrana em animais saudáveis. Com o uso do látex em forma de gel em ratos com feridas agudas, macroscopicamente não houve diferença estatisticamente significativa nos primeiros seis dias de tratamento, em relação à porcentagem de retração (PENHAVEL *et al.*, 2016). Diferente do observado com o látex em forma de membrana que gerou diferença métrica significativa entre os controles e as feridas que receberam recobrimento. A importância da cobertura como curativo fornecendo proteção gera resposta cicatricial positiva, já que utilizando látex na forma de creme-gel em feridas agudas em ratos também foi relatada ausência da cicatrização completa macroscopicamente aos 21 dias em relação ao controle com solução fisiológica (BRANDÃO *et al.*, 2016).

Segundo a análise semiquantitativa houve maior pontuação na escala quanto à migração de polimorfonucleares nos grupos que receberam a cobertura aos 3 dias. Após as primeiras 72 horas da injúria dérmica, haverá recrutamento celular e formação do coágulo sanguíneo por ativação plaquetária com liberação de seus grânulos (WOODLEY *et al.*, 2017). O processo de agregação plaquetária leva à formação de uma rede de contenção permeada por leucócitos, por consequência elevam-se os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento locais, uma reação característica da fase inflamatória (GAUGLITZ *et al.*, 2011; SZPADERSKA *et al.*, 2003). Sabe-se da importância da presença dos neutrófilos ao incitar a resposta angiogênica e restaurativa tecidual, em concordância com os resultados exibidos quanto aos polimorfonucleares, foi comparado o látex e extrato herbal em feridas agudas profunda em ratos, pela microscopia aos primeiros 7 dias, acentuada presença de neutrófilos no leito da ferida indicando a fase inflamatória, também sem diferença notável entre seus grupos (BRANDÃO *et al.*, 2016).

Durante o tempo experimental, os grupos que receberam a cobertura de látex associada ou não a PRF se mantiveram com resposta favorável quanto à presença de fibroblastos e neovascularização, entretanto não houve diferença

estatisticamente significativa entre eles, o que implica que as presenças tanto do látex como da PRF não interferiram na fibroplasia e proliferação das células endoteliais. Corroborando com esses dados, sabe-se que a aplicação de membranas derivadas do látex em lesões ulcerativas promove indução da cicatrização por estímulo angiogênico seguido de reepitelização (FRADE *et al.*, 2012). A resposta angiogênica culmina com a restauração da vasculatura, geralmente transcorridos 3 a 10 dias após a lesão, onde é notável a acentuação da fase proliferativa, sendo a neovascularização por brotamento a resposta vascular esperada, salientando que esta só é possível se houver preenchimento da lesão por meio da formação do tecido de granulação (TG). A fibroplasia é mais marcada em humanos que nos roedores, estes se diferem dos humanos tendo em vista a retração, dita contração da ferida, como mecanismo principal de cicatrização (GALIANO *et al.*, 2004). O modelo de ferida excisional profunda em associação à contenção, tanto da membrana de látex quanto do anel de silicone, limitam o efeito contração da ferida permitindo a cicatrização por formação de tecido de granulação e posterior reepitelização. O TG é rico em fibroblastos locais e advindos também da borda da ferida, queratinócitos e matriz extracelular que se instalam ao longo da rede de fibrina do coágulo (REINKE; SORG, 2012; WANG *et al.*, 2018).

A fase de migração inicial de queratinócitos acontece em estágios iniciais após a lesão, estimulados pelas mudanças na tensão de oxigênio devido à vasoconstrição local. Nos resultados demonstrados no presente estudo destaca-se que a cobertura da ferida melhorou significativamente a taxa de epitelização sobre a ferida independente da cobertura utilizada, o que gerou maior pontuação quanto à reepitelização na escala de avaliação histológica semiquantitativa nos grupos ML e ML+PRF em relação aos controles mesmo que não simétricos. Na literatura, em coelhos apresentando feridas agudas tratados com a biomembrana de látex foi relatado maior reepitelização, e de maneira antecipada em relação aos animais controles (MRUE *et al.*, 2004).

Igualmente, a utilização dos derivados plaquetários exhibe resultados promissores nesta fase do reparo, assim como sua aplicação, tomando a PRF como concentrado plaquetário eleito, este exibiu em feridas agudas cirúrgicas melhora na aparência da ferida, condizendo com a fase de reepitelização e menor incidência de



dor pós-operatória (CHIGNON-SICARD *et al.*, 2012), com evidências também na melhora de feridas totais de camundongos que mostraram resposta cicatricial significativa a partir do terceiro dia (DING *et al.*, 2017).

Outro ponto a ser questionado é o modelo murino de ferida sem patologia de base, como parâmetro de reepitelização para a espécie humana principalmente, tendo em vista que a contração é significativa no fechamento epidérmico nesses animais. Como particularidade podemos notar a presença de uma camada muscular subdérmica nos murinos, o *panniculus carnosus*, ausente nos humanos, este no caso de injúria permite a movimentação da pele incitando rápida contração da ferida. O anel de silicone e a própria existência da ML empregados mimetizam as condições de reepitelização e granulação semelhante ao processo cicatricial nos humanos, permitindo melhor reprodutibilidade, contudo não isentas de deslocamentos ou movimentação total (PASTAR *et al.*, 2018).

Acompanhando as escalas gráficas, contidas na Figura 4, que exibem o percentual de colágeno, observamos aumento na concentração de colágeno tipo III nos grupos tratados com a ML e ML+ PRF, partindo de um percentual de aproximadamente 9% para uma concentração final média próxima a 27%. Sugere-se que estes dados sejam resultantes da angiogênese e presença de fibroblastos no leito cicatricial, já identificados na histomorfometria durante a análise semiquantitativa, o que confirma uma deposição de colágeno jovem. No curso natural da cicatrização ocorre degradação enzimática do colágeno tipo III depositado, com posterior substituição por tipo I e reorganização das fibras (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019). Tendo isso em vista, podemos levantar a hipótese que a cobertura de látex está atuando sobre a resposta celular local, já que a inibição ou ativação das enzimas que irão degradar o colágeno ou induzir sua produção pelos fibroblastos são comandadas mediante ação de citocinas e fatores de crescimento teciduais, tomando a exemplo a presença dos fatores membros da família do FGF que induzem a fibroplasia e ativação fibroblástica, obtendo como resultado a deposição de colágeno (YANG *et al.*, 2018). Devido à importância da mediação dos fatores de crescimento no processo de reparo tecidual, nosso grupo de pesquisa pretende obter dados de marcação tecidual para alguns fatores de crescimento nas amostras obtidas. Com esses dados, também

poderemos levantar resultados partindo da ideia de interação entre fibroblastos e queratinócitos, tendo em vista a reepitelização precoce relatada nos resultados, a investigação de fatores de crescimento produzidos por fibroblastos, como o KGF, também possibilitaria um mapeamento mais profundo desta interação, pois ele age estimulando a migração, multiplicação e sobrevida dos queratinócitos (CHOMISKI *et al.*, 2016).

Em contrapartida, o resultado obtido na quantificação quanto à síntese de colágeno do tipo I, que corresponde ao colágeno maduro da pele, este foi expresso em concentrações maiores no grupo de 21 dias que passou por tratamento com as coberturas, gerando diferença estatisticamente significativa em relação aos seus respectivos controles. Utilizando ratos como modelo de feridas, foi observado igualmente um aumento no percentual de colágeno tipo I nos animais tratados por aplicação tópica de fatores de crescimento em relação aos demais (MASI *et al.*, 2016). Ao decorrer das fases cicatriciais, aos 21 dias, é característica a fase de remodelamento, em que notamos ajustes da pele entre a apoptose celular, maturação do colágeno e retração pelos miofibroblastos (WANG *et al.*, 2018). É sabido que a fibra tipo I é a mais abundante forma de colágeno na pele durante essa fase, que corrobora com os achados, sendo a mesma responsável pela manutenção da resistência e função da matriz tecidual.

Os modelos de feridas *in vivo* são desafiadores e de desempenho variável quanto à resposta da ferida ao reparo. No entanto, sua reprodutibilidade e maior proximidade ao tratamento humano geram perspectivas em prol de uma melhor compreensão da cicatrização e regeneração, ampliando as estratégias de pesquisa com objetivo de uma maior efetividade no tratamento das feridas cutâneas (LODHI; GAUTAM, 2017; MASSON-MEYERS *et al.*, 2020). Como limitação na experimentação para estudo do reparo tecidual de feridas agudas profundas em pele, o tamanho amostral e a disparidade entre a fisiologia das espécies animal e humana, podem gerar variação na resposta dos biocurativos abordados quando aplicados em outras situações. Para melhor entendimento e aperfeiçoamento da utilização desses biomateriais na rotina médica humana ou veterinária sugere-se a realização de ensaios clínicos prospectivos randomizados e com maior grupo amostral para obtenção de maior poder estatístico.

## 5 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do presente estudo, A associação do látex natural derivado da *Hevea brasiliensis* em forma de biomembrana com a fibrina rica em plaquetas auxilia no reparo da pele em tratamento de feridas agudas de espessura total em ratos da linhagem Wistar hígidos. A diminuição significativa no diâmetro e reepitelização ao longo do tempo experimental observadas na utilização dos biocurativos são tomadas como uma vantagem importante, por diminuir a entrada de patógenos no leito da ferida, com decaimento da taxa de infecção. Na análise microscópica o padrão de reestabelecimento da função tecidual se perpetuou independente do tratamento, levantando a questionar as especificidades relativas à adaptabilidade e resistência e do modelo experimental murino. Um ponto positivo a ser levantado é a atuação na fase final de remodelação, por incitar deposição de colágeno tipo I, indicação de boa resistência tecidual. Não foram observadas complicações quanto ao uso da associação do látex em forma de biomembrana na presença ou não da fibrina rica em plaquetas em ratos.

## REFERÊNCIAS

- Andrade TAM, Iyer A, Das PK, Foss NT, Garcia SB, Coutinho-Netto J, Jordão-Jr AA, Frade, MAC. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(10):1036-47. doi: 10.1590/S0100-879X2011007500116.
- Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014;32(1):3-13. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.05.021.
- Bhardwaj N, Sow WT, Devi D, Ng KW, Mandal BB, Cho NJ. Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering. *Integr Biol (Camb).* 2015;7(1):53-63. doi: 10.1039/c4ib00208c.
- Brandão ML, Reis PR, Araújo LA, Araújo AC, Santos MH, Miguel MP. Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and Aloe vera extract in rats. *Acta Cir Bras.* 2016;31(9):570-7. doi: 10.1590/S0102-865020160090000001.
- Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *Int J Inflamm.* 2019;2019:3706315. doi: 10.1155/2019/3706315.
- Chignon-Sicard B, Georgiou CA, Fontas E, David S, Dumas P, Ihrari T, Lebreton E. Efficacy of leukocyte- and platelet-rich fibrin in wound healing: a randomized controlled clinical trial. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130(6):819e-29e. doi: 10.1097/PRS.0b013e31826d1711.
- Chomiski V, Gragnani A, Bonucci J, Correa SAA, Noronha SMR, Ferreira LM. Keratinocyte growth factor and the expression of wound-healing-related genes in primary human keratinocytes from burn patients. *Acta Cir Bras.* 2016;31(8):505-12. doi: 10.1590/S0102-865020160080000002.
- Coleman R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem.* 2011;113(3):231-3. doi: 10.1016/j.acthis.2010.02.002.
- Ding Y, Cui L, Zhao Q, Zhang W, Sun H, Zheng L. Platelet-rich fibrin accelerates skin wound healing in diabetic mice. *Ann Plast Surg.* 2017;79(3):e15-9. doi: 10.1097/SAP.0000000000001091.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. 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):e37-44. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.008.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):514-25. doi: 10.1038/sj.jid.5700701.

Frade MAC, Assis RVC, Coutinho NJ, Andrade TAM, Foss NT. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. *An Bras Dermatol.* 2012;87(1):45-51. doi: 10.1590/S0365-05962012000100005.

Fuchs E. Epithelial skin biology: three decades of developmental biology, a hundred questions answered and a thousand new ones to address. *Curr Top Dev Biol.* 2016;(116):357-74. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.11.033.

Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol.* 2017;88(1):112-21. doi: 10.1902/jop.2016.160443.

Gál P, Kilík R, Mokry M, Vidinsky B, Vasilenko T, Mozeš S, Bobrov N, Tomori Z, Bober J, Lenhardt L. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Vet Med.* 2008;53(12):652–9. doi: 10.17221/1973-VETMED.

Galiano RD, Michaels J 5th, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 2004;12(4):485-92. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x.

Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med.* 2011;17(1-2):113-25. doi: 10.2119/molmed.2009.00153.

Gemeinder J. Desenvolvimento e avaliação de um sistema de liberação sustentada de gentamicina em biomembranas de látex natural [mestrado]. Assis: Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho; 2016.

Guinot A, Arnaud A, Azzis O, Habonimana E, Jasienski S, Frémond B. Preliminary experience with the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane for urethroplasty coverage in distal hypospadias surgery. *J Pediatr Urol.* 2014;10(2):300-5. doi: 10.1016/j.jpuro.2013.09.026.

Kim BS, Gao G, Kim JY, Cho DW. 3D cell printing of perfusable vascularized human skin equivalent composed of epidermis, dermis, and hypodermis for better structural recapitulation of native skin. *Adv Healthc Mater.* 2019;(8)1801019. doi: 10.1002/adhm.201801019.

Lee CT, Chiu TS, Chuang SK, Tarnow D, Stoupe J. Alterations of the bone dimension following immediate implant placement into extraction socket: systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2014;41(9):914-26. doi: 10.1111/jcpe.12276.

Leite MN, Leite SN, Caetano GF, Andrade TAM, Fronza M, Frade MAC. Healing effects of natural latex serum 1% from *Hevea brasiliensis* in an experimental skin abrasion wound model. *An Bras Dermatol.* 2020;95:418–27. doi: 10.1016/j.abd.2019.12.003.

Li Q, Pan S, Dangaria SJ, Gopinathan G, Kolokythas A, Chu S, Geng Y, Zhou Y, Luan X. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *BioMed Res Int.* 2013;2013:638043. doi: 10.1155/2013/638043.

Lodhi S, Gautam PV. Relevance and perspectives of experimental wound models in wound healing research. *Asian J Pharmac Clin Res.* 2017;10(7):57-62. doi: 10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18276.

Losquadro W. Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017;25(3):283–9. doi: 10.1016/j.fsc.2017.03.001.

Masi ECDJ, Campos ACL, Masi FDJ, Ratti MAS, Shin II, Masi RDJ. The influence of growth factors on skin wound healing in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2016;82(5):512-21. doi: 10.1016/j.bjorl.2015.09.011.

Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, Frade MAC. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol.* 2020;101(1-2):21-37. doi: 10.1111/iep.12346.

Mrue F, Coutinho Netto J, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mat Res.* 2004;7(2):277-83. doi: 10.1590/S1516-14392004000200010.

Parfejevs V, Debbache J, Shakhova O, Schaefer SM, Glausch M, Wegner M, Suter U, Riekstina U, Werner S, Sommer L. Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. *Nat Commun.* 2018;9(1):236. doi: 10.1038/s41467-017-01488-2.

Pastar I, Liang L, Sawaya AP, Wikramanayake TC, Glinos GD, Drakulich S, Chen V, Stojadinovic O, Davis SC, Tomic-Canic M. Preclinical models for wound-healing studies. In: Marques AP, Pirraco RP, Cerqueira MT, Reis RL. *Skin tissue models.* Boston: Academic Press; 2018. p. 223–53.

Penhavel MVC, Tavares VH, Carneiro FP, Sousa JB. Effect of *Hevea brasiliensis* latex sap gel on healing of acute skin wounds induced on the back of rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões;* 2016;43(1), 48-53. <https://doi.org/10.1590/0100-69912016001010>

Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM, Quirynen M. Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets.* 2018;29(5):468-75. doi: 10.1080/09537104.2017.1327654.

Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43. doi: 10.1159/000339613.

Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of dermis: scarring and cells involved. *Cells*. 2019;8(6):607. doi: 10.3390/cells8060607.

Rosa SSRF, Rosa MFF, Fonseca MAM, Luz GVDS, Avila CFD, Domínguez AGD, Dantas AGD, Richter VB. Evidence in practice of tissue healing with latex biomembrane: integrative review. *J Diabetes Res*. 2019;2019:7457295. doi: 10.1155/2019/7457295.

Sorg H, Grambow E, Eckl E, Vollmar B. Oxytocin effects on experimental skin wound healing. *Innov Surg Sci*. 2017;2(4):219-32. doi: 10.1515/iss-2017-0033.

Steenvoorde P, van Doorn LP, Naves C, Oskam J. Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds. *J Wound Care*. 2008;17(2):60-3. doi: 10.12968/jowc.2008.17.2.28179.

Szpaderska AM, Egozi EI, Gamelli RL, DiPietro LA. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *J Invest Dermatol*. 2003;120(6):1130-7. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12253.x.

Vyas KS, Vasconez HC. Wound healing: biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds. *Healthcare*. 2014;2(3):356-400. doi: 10.3390/healthcare2030356.

Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(2):94-101. doi: 10.1016/j.jcma.2017.11.002.

Wang X, Ge J, Tredget EE, Wu Y. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat Protoc*. 2013;8(2):302-9. doi: 10.1038/nprot.2013.002.

Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998-1008. doi: 10.1038/sj.jid.5700786.

Woodley DT, Wysong A, DeClerck B, Chen M, Li W. Keratinocyte migration and a hypothetical new role for extracellular heat shock protein 90 alpha in orchestrating skin wound healing. *Adv Wound Care*. 2015; 4(4):203-12. doi: 10.1089/wound.2014.0566.



Woodley DT. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing. *Dermatol Clin*. 2017;35(1):95-100. doi: 10.1016/j.det.2016.07.004.

Xu F, Zou D, Dai T, Xu H, An R, Liu Y, Liu B. Effects of incorporation of granule-lyophilised platelet-rich fibrin into polyvinyl alcohol hydrogel on wound healing. *Sci. Rep*. 2018;8(1):8-10. doi: 10.1038/s41598-018-32208-5.

Yang L, Zhang D, Wu H, Xie S, Zhang M, Zhang B, Tang S. basic fibroblast growth factor influences epidermal homeostasis of living skin equivalents through affecting fibroblast phenotypes and functions. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31(5):229-37. doi: 10.1159/000488992.