

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) ISOLADA E
ASSOCIADA COM DIFERENTES ESTÍMULOS NA
REPARAÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA EM RATOS WISTAR**

Júlia Banhareli Tasso

Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) ISOLADA E
ASSOCIADA COM DIFERENTES ESTÍMULOS NA
REPARAÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA EM RATOS WISTAR**

Júlia Banhareli Tasso

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Dissertação apresentada à banca examinadora da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

2024

T214u	Tasso, Júlia Banhareli Uso de Fibrina Rica em Plaquetas (PRF) isolada e associada com diferentes estímulos na reparação de ferida cirúrgica em ratos Wistar / Júlia Banhareli Tasso. -- Jaboticabal, 2024 59 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Paola Castro Moraes 1. Cicatrização de ferimento. 2. Regeneração. 3. Plasma Rico em Fibrina. 4. Terapia a laser de baixa potência. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial dessa pesquisa

O presente estudo visou, como todo projeto, o desenvolvimento na medicina veterinária, especialmente na área de pequenos animais. A pesquisa realizada trouxe resultados promissores no tratamento de feridas agudas, com objetivo de aplicar esses resultados no dia a dia do clínico veterinário, promovendo saúde e bem-estar para os pets e seus tutores, que é um dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Ainda, espera-se que com os resultados obtidos neste trabalho possamos levar a pós graduação da FCAV/UNESP Jaboticabal para o cenário nacional e internacional.

Potential impact of this research

The present study aimed, like every project, the development in veterinary medicine, especially in the area of small animals. The research carried out brought promising results in the treatment of acute wounds, with the aim of applying these results in the daily routine of veterinary clinicians, promoting health and well-being for pets and their owners, which is one of the Sustainable Development Goals. Furthermore, it is hoped that with the results obtained in this work we can take the postgraduate studies at FCAV/UNESP Jaboticabal to the national and international scene.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) ISOLADA E ASSOCIADA COM DIFERENTES ESTÍMULOS NA REPARAÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA EM RATOS WISTAR

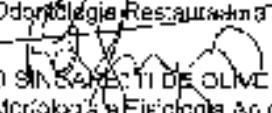
AUTORA: JÚLIA BANHARELI TASSO

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias,
Área: Saúde Animal, pela Comissão Examinadora:


Prof.ª. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP Jaboticabal


Prof. Dr. HERMES PRETZEL (Participação Presencial)
Departamento de Odontologia Restauradora / FOAr UNESP Araraquara


Prof. Dr. PATRÍCIO SIMASATTI DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de julho de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Júlia Banhareli Tasso, natural de Franca – SP, nascida no dia 14 de julho de 1997. Realizou graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal, entre os anos de 2016 e 2021, com duas bolsas de Iniciação Científica financiadas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos número 2017/23831-6 e 2018/26014-1. Realizou aprimoramento na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, de 2021 a 2023. Realizou cursos de aprimoramento em Cirurgia Geral de Pequenos Animais, Neurocirurgia de Pequenos Animais e Ortopedia de Pequenos Animais pela Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP), FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Atualmente, realiza curso de aprimoramento em Cirurgia Oncológica e Reconstructiva em cães e gatos, bem como curso de Mestrado do programa de Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal. Atua junto ao Serviço de Cirurgia Geral e Endoscopia Veterinária (CIGEV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó, Luci (*in memoriam*), que ainda estava aqui durante a parte prática deste projeto, que acompanhou de perto minha dedicação, mesmo enquanto lutávamos bravamente contra as adversidades da vida. Durante grande parte do mestrado, me vi pertencente somente ao luto. Mas hoje, entrego este trabalho em sua homenagem. Vó, a senhora foi única. Espero que esteja junto da minha querida avó Zenaide (*in memoriam*), e que juntas possam ver meu triunfo pessoal e profissional. Isto é por vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que em sua infinita e misericordiosa bondade me proporcionou chegar até este momento, concluindo mais uma etapa tão única em minha vida. Obrigada Jesus e ao meu anjo da guarda, por estarem comigo sempre em minhas preces, me reerguendo quando eu já não havia forças. À Espiritualidade, pela proteção e amparo em todos os momentos e dias da minha vida.

À minha família, que são a razão pela qual acordo e batalho todos os dias. À minha mãe, Luci, por ter me gerado e me feito tão semelhante à ela mesma, qualidade que tenho orgulho de dizer que possuo. Obrigada por me ensinar o significado de generosidade, empatia e humildade. Você é meu maior exemplo de mulher. Ao meu pai, Olivar, por nunca medir esforços pelo meu bem-estar e me ensinar tanto sobre perseverança, honestidade e bondade. À minha irmã, Laura, por me representar melhor do que eu mesma. Não existem palavras, frases ou ações suficientes que demonstrem tudo o que eu tenho para te falar e agradecer. Você é minha base, meu alicerce. Ao meu noivo, Alison, que é meu maior encorajador e maior apoiador. Você é capaz de iluminar qualquer ambiente somente por estar nele comigo. Você me traz paz, segurança, proteção. Não consigo expressar a gratidão que tenho por toda a parceira ao longo dos anos. Obrigada por ser meu lar junto com a Nymeria.

À minha professora e orientadora Paola, agradeço imensamente por todas as oportunidades, toda a assistência e paciência comigo. A senhora é uma verdadeira inspiração para mim e para tantos que cruzam seu caminho. Que honra ter sido uma dessas pessoas! Sua alegria ao ensinar, sua paciência, empatia, carinho e acolhimento fazem uma profissional e professora de excelência.

Aos meus melhores amigos desde a graduação, que mesmo longe sempre se fizeram presente, Laís, Giovanna e Guilherme. Vocês estiveram lá no início da minha carreira como cirurgiã, vendo meu amor por esta área crescer a cada dia e a cada vitória. Obrigada por permanecerem.

Aos meus grandes amigos de residência, Isabella, Marcus, Janayna e Carolina, que foram essenciais em toda essa jornada de grandes responsabilidades e crescimento profissional. Espero que vocês saibam da capacidade que vocês possuem e eu espero estar sempre junto para cada conquista de vocês.

Aos amigos que a pós-graduação me trouxe, Camila, Alefe, Bárbara Araújo, Matheus, Renato, Mirella, Herlem, Diego, Ariadne e Bárbara C., e tantos outros, obrigada por tudo. Palavras não são capazes de descrever o que fizeram por mim nos últimos meses e como me sinto grata por estar ao redor de pessoas tão grandes como vocês.

Ainda, agradeço a toda a equipe com a qual trabalhei no desenrolar deste trabalho, especialmente ao Matheus Nobile, Ketlyn e Mateus Gregio. À FCAV e toda sua equipe, por terem proporcionado toda a estrutura e assistência necessária no desenvolvimento deste projeto. Ao professor Hermes Pretel, agradeço imensamente sua paciência e colaboração.

Agradeço o apoio e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte concedido pela bolsa de mestrado (processo número 2022/16205-0). E agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – PROEX pelo financiamento da discente com bolsa de mestrado nos meses iniciais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Biologia da Reparação da Ferida	2
2.1.1 Fase de Hemostasia.....	2
2.1.2 Fase de Inflamação	3
2.1.3 Fase Proliferativa ou de Maturação/Reparação	6
2.1.4 Fase de remodelação	7
2.2 Fibrina Rica em Plaquetas (PRF).....	9
2.3 Laserterapia.....	10
2.4 Membrana Dérmica Endoform®.....	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Aspectos éticos	14
4.2 Animais experimentais	15
4.3 Desenho do estudo e Tamanho da Amostra	15
4.4 Procedimento cirúrgico.....	16
4.5 Métodos de tratamento.....	17
4.5.1 Grupo controle	17
4.5.2 Membrana Dérmica	17
4.5.3 Fibrina Rica em Plaquetas (PRF).....	17
4.5.4 Laser vermelho.....	18
4.6 Coleta dos resultados.....	18
4.6.1 Acompanhamento macroscópico	18
4.6.2 Avaliação histopatológica.....	18
4.7 Análise dos Resultados	19
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	38
8.0 REFERÊNCIAS.....	38

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da resposta tecidual com diferentes estímulos na reparação de feridas em ratos wistar: comparação entre Laser, Plasma Rico em Fibrina e Membrana Dérmica Endoform®", protocolo nº 5630/22, sob a responsabilidade da Profª Drª Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de agosto de 2022.

Vigência do Projeto	23/08/2022 a 14/11/2022
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus albinus</i>
Nº de animais	150
Peso / Idade	300g
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Unesp Botucatu)

Jaboticabal, 17 de agosto de 2022.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (PRF) ISOLADA E ASSOCIADA COM DIFERENTES ESTÍMULOS NA REPARAÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA EM RATOS WISTAR

RESUMO - As feridas cutâneas são a interrupção de continuidade da pele, podendo afetar uma ou mais camadas. Atualmente, existem diversos tipos de materiais disponíveis para o tratamento destas lesões, como, por exemplo, a Fibrina Rica em Plaquetas (PRF), o laser e a Matriz de Estômago de Ovinos (OFM). Objetivou-se comparar o uso PRF isolado e associado a estas outras duas formas de tratamento. Para tal, foram utilizados 75 ratos, distribuídos em cinco grandes grupos com base no tratamento (controle negativo, PRF isolado, PRF associado ao laser, PRF associada a OFM e PRF associado ao laser e OFM). Dentro de cada grupo, foram realizadas outras três subdivisões, cada qual com 5 animais, correspondendo ao tempo de avaliação (três, 15 ou 30 dias). A ferida foi realizada de com *punch* estéril de 8 mm de diâmetro e cada tratamento foi aplicado uma única vez, no pós-operatório imediato, exceto pelo laser que também foi realizado com 48 e 96 horas. Foram realizadas análises macroscópicas com imagens fotográficas, que foram retiradas dos animais no pós-operatório imediato, com três e sete dias e no momento da eutanásia. Ao fim, foi coletado fragmento cutâneo da região da ferida, para análise microscópica, em que se observou angiogênese, presença de fibroblastos, presença de células inflamatórias e maturação de colágeno. Ainda, foi-se definido duas tabelas de escores com base na inflamação e grau de reparação tecidual. Observou-se que o PRF associado ao laser apresentaram resultados mais favoráveis, seguido do PRF associado ao laser e a membrana de estômago de ovinos, especialmente na microscopia, onde foram visualizadas maiores deposições de colágeno organizado e células inflamatórias induzidas pelo PRF. No entanto, todos os tratamentos obtiveram fechamento da ferida já a partir do décimo quinto dia. O grupo PRF associado à membrana dérmica de OFM diferiu estatisticamente dos outros grupos na análise de três e quinze dias em relação a tempo de cicatrização, apresentando resultados piores pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para comparação dos grupos dentro de cada período de avaliação. Nenhum outro grupo mostrou diferença estatística significativa no tratamento para feridas de ratos na cicatrização.

Palavras-chave: cicatrização, hemoderivados, laserterapia.

USE OF PLATELET-RICH FIBRIN (PRF) ISOLATED AND ASSOCIATED WITH DIFFERENT STIMULI IN THE REPAIR OF SURGICAL WOUND IN WISTAR RATS

ABSTRACT - Skin wounds are interruptions in the continuity of the skin and can affect one or more layers. Currently, there are several types of materials available for the treatment of these injuries, such as, for example, Platelet Rich Fibrin (PRF), laser and Ovine Forestomach Matrix (OFM). The objective was to compare the use of PRF alone and associated with these other two forms of treatment. To this end, 75 rats were used, distributed into five large groups based on treatment (negative control, PRF alone, PRF associated with laser, PRF associated with OFM and PRF associated with laser and OFM). Within each group, three other subdivisions were made, each with 5 animals, corresponding to the evaluation time (three, 15 or 30 days). The wound was created with a sterile punch measuring 8 mm in diameter and each treatment was applied once, in the immediate postoperative period, except for the laser, which was also performed at 48 and 96 hours. Macroscopic analyzes were carried out with photos taken from the animals in the immediate postoperative period, at three and seven days and at the time of euthanasia. Finally, a skin fragment was collected from the wound region for microscopic analysis, which observed angiogenesis, the presence of fibroblasts, the presence of inflammatory cells and collagen maturation. Furthermore, two score tables were defined based on inflammation and degree of tissue repair. It was observed that PRF associated with laser presented more favorable results, followed by PRF associated with laser and the sheep stomach membrane, mainly under microscopy, where greater depositions of organized collagen and inflammatory cells induced by PRF were visualized. However, all treatments achieved wound closure fifteen to thirty days postoperatively. The PRF group associated with the OFM dermal membrane differed statistically from the other groups in the analysis of three and fifteen days, presenting worse results using the Kruskal-Wallis Test ($p < 0.05$) for comparing the groups within each evaluation period. No other group showed a statistically significant difference in wound healing treatment in rats.

Key words Healing, Blood products, Lasertherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tampão de fibrina presente na fase inflamatória, com presença de células inflamatórias estimulando mais mediadores inflamatórios, na tentativa de reparação tecidual.....	5
Figura 2. Citocinas envolvidas no processo de cicatrização, seus efeitos biológicos e células produtoras.....	6
Figura 3. Imagem ilustrativa com a divisão dos grupos experimentais	16
Figura 4. Imagens fotográfica do defeito criado no dorso de rato com 8 mm de diâmetro no pós-operatório imediato e os tratamentos realizados.....	21
Figura 5. Imagem da i-PRF (ou PRF injetável) em (a) e sua aplicação no leito da ferida cirúrgica (b)	21
Figura 6. Imagem da aplicação de laser vermelho no pós-operatório imediato.....	22
Figura 7. Percentual de índice médio de contração da ferida de acordo com o tratamento preconizado de todos os grupos avaliados no trabalho exposto.....	23
Figura 8. Imagens fotográficas dos grupos de tratamento, a cada dia de acompanhamento	24
Figura 9. Imagens histopatológicas do grupo controle	26
Figura 10. Imagens histopatológicas do grupo tratado com PRF isolado.....	27
Figura 11. Imagens histopatológicas do grupo tratado com PRF associado ao laser.....	28
Figura 12. Imagens histopatológicas do grupo tratado com PRF associado a membrana dérmica	29
Figura 13. Imagens histopatológicas do grupo tratado com PRF associado ao laser e a membrana dérmica	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escore do grau de inflamação.....	19
Tabela 2. Escore do grau de reparação tecidual	20
Tabela 3. Índice médio de contração da ferida de acordo com o tratamento instituído e os períodos avaliados	22
Tabela 4. Classificação nos escores de inflamação e de reparação tecidual de cada grupo em cada dia de análise	31
Tabela 5. Análise estatística do índice médio de contração da ferida, comparando-se os grupos e os tempos de análise	34

1. INTRODUÇÃO

O sistema tegumentar é o maior órgão do corpo, correspondendo a aproximadamente 10% do peso corporal. Ele é dividido em camadas, sendo elas a epiderme e a derme, além de seus anexos (Gonzalez *et al.*, 2016). A pele tem como principal função ser barreira contra o ambiente ao redor e, conseqüentemente, contra traumas, os quais podem ter origem física, química, térmica e/ou biológica (Singer e Clark, 1999). A epiderme é avascular, recebendo sua nutrição do fluido que penetra nas camadas mais profundas e dos capilares dérmicos e é a camada principal responsável pela proteção. A derme é vascular e mais grossa que a epiderme, sendo responsável pela nutrição e suporte. É composta por fibras colágenas, reticulares e elásticas, cercada por mucopolissacarídeos. Os vasos da pele dos cães e gatos, diferentemente dos primatas, são paralelos à pele e são vasos cutâneos diretos (MacPhail, 2015).

As feridas possuem como definição uma interrupção de continuidade da pele, podendo afetar uma ou mais camadas, e atingir, até mesmo, tecidos mais profundos, como músculos, ossos, tendões, entre outros (Malagutti e Kakiyama, 2010).

Existem diversos tipos de materiais disponíveis atualmente para tratamento das lesões de pele, das mais superficiais e limpas, até as mais profundas e infectadas. O principal objetivo é o rápido fechamento e a formação de cicatriz funcional e esteticamente satisfatória (Singer e Clark, 1999), ou seja, a reparação se baseia na reconstrução do local, com a finalidade de restaurar a sua integridade e função normal (Tacon *et al.*, 2011). Com o avanço nesta área e o crescimento do mercado pet nos últimos anos, se mostra essencial a realização de um estudo multifatorial comparativo entre as principais terapias disponíveis, para melhora da cicatrização no tratamento de ferida, a fim de definir protocolos de aplicação mais eficazes, diminuir o tempo de cicatrização, aumentar a qualidade do tecido reparado, melhorar o bem-estar do paciente e facilitar o manejo pelo tutor.

Com isso, o presente estudo tem o objetivo de elucidar alguns dos mais novos materiais descritos no tratamento de feridas em animais de laboratório, a fim de, futuramente, ser utilizado em animais de companhia, não só para reparação cutânea de feridas extensas, que é o foco do trabalho aqui exposto, mas também em casos de reparação óssea (Pretel, 2007; Luvizuto *et al.*, 2013), oftalmologia (Felix *et al.*, 2005;

Rodrigues, 2022), odontologia (Pretel, 2008; Huang *et al.*, 2010) e até mesmo controle de dor em diferentes situações (Lopes e Diniz, 2018), uma vez que a maioria dos trabalhos relatados é de medicina humana, porém com expectativa de que cheguem na veterinária também.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia da Reparação da Ferida

A reparação tecidual é um processo dinâmico e envolve mediadores solúveis, células sanguíneas, matriz extracelular e células parenquimatosas. Ela é a combinação de eventos físicos, químicos e celulares que restauram o tecido ferido ou substituem por colágeno e se inicia a partir do momento em que a ferida é realizada (MacPhail, 2015).

É dividida em quatro fases, que ocorrem simultaneamente: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação e remodelação (Guo e DiPietro, 2010), ou mesmo em três fases, porém com classificações atualizadas, onde a hemostasia e inflamação são abordadas juntas, uma vez que uma depende da outra para ocorrer (Almadani *et al.*, 2021). A interrupção ou desregulação de uma ou mais fases do processo de reparação tecidual leva à ausência de reparação, com formação de feridas crônicas (EMING *et al.*, 2014).

Diversos fatores afetam a reparação tecidual, tanto locais quanto sistêmicos, portanto, este processo não depende somente do material utilizado. Alguns fatores locais que podem ser citados são a oxigenação e a presença de infecção. Já em relação às características e alterações sistêmicas do animal, destacam-se idade, estresse, hormônios sexuais, utilização de medicações, presença de doenças endócrinas, principalmente diabetes, nutrição e obesidade (Agah *et al.*, 2004; Guo e DiPietro, 2010).

2.1.1 Fase de Hemostasia

O trauma causa ruptura dos vasos sanguíneos com consequente extravasamento de constituintes do sangue. De início, eles contraem por cinco a dez minutos para limitar a hemorragia (George Broughton *et al.*, 2006), mas, logo em seguida, dilatam e ocorre o extravasamento de fibrinogênio, com formação do coágulo

e fornecimento de matriz extracelular provisória para a invasão e recrutamento de células inflamatórias, principalmente (Werner *et al.*, 1994; Henry e Emiling, 1996; Guo e DiPietro, 2010; Eming *et al.*, 2014). Esta matriz é formada a partir de dímeros de fibronectina presente no coágulo em questão, que se cruzam maneira covalente à fibrina e a eles mesmos, na presença do fator XIII ativado (MacPhail, 2015).

As plaquetas são ativadas pelo contato com colágeno exposto, liberando grânulos que secretam mediadores de reparação tecidual, como os fatores de crescimento (Almadani *et al.*, 2021). Induzidos pela trombina, sofrem degranulação plaquetária e liberam outros fatores de crescimento, como os mediados por plaquetas, o de crescimento transformante β (TGF- β), o de crescimento epidérmico (EGF), entre outros, que irão atrair macrófagos e fibroblastos para a região lesionada, levando à deposição da matriz de fibrina provisória na ferida. Ainda, juntamente com a ativação da cascata de coagulação e do complemento e, através das células parenquimatosas lesionadas, são estimulados numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos, os quais, recrutam leucócitos inflamatórios (Clark, 1996; Mendonça *et al.*, 2009). Neste momento, inicia-se a fase inflamatória.

2.1.2 Fase de Inflamação

A inflamação é a resposta protetora do tecido, iniciada por um dano. Esta fase é caracterizada pelo aumento na permeabilidade vascular, quimiotaxia das células circulatórias, liberação de citocinas e fatores de crescimento e ativação de células. As primeiras células a aparecerem de forma aguda são os neutrófilos. (MacPhail, 2015).

A partir de agentes quimiotáticos específicos, como fragmentos de proteína de matriz extracelular, TGF- β e quimioatraente de monócitos proteína 1, a entrada de monócitos no leito da ferida é estimulada, os quais se transformam em macrófagos ativados em 24 a 48 horas (Henry e Emiling, 1996; Singer e Clark, 1999). Os macrófagos têm papel importante na reparação, secretando collagenase para remover o tecido necrótico e limpando a área da ferida de partículas estranhas e bactérias, por fagocitose, por meio da ligação de seus receptores de integrina a proteínas específicas da matriz extracelular (Clark, 1996; Henry e Emiling, 1996; Singer e Clark, 1999). Esta fase pode ser chamada também de fase de granulação e se inicia entre seis a 12 horas após a lesão (Henry e Emiling, 1996).

Adicionalmente, os macrófagos inflamatórios secretam fatores quimiotáticos, que direcionam os macrófagos ao tecido danificado e induzem a expressão de outras células inflamatórias, como o estimulador de colônias 1, citocina necessária para a sobrevivência dos próprios macrófagos e monócitos; fator de necrose tumoral, importante citocina inflamatória; fator de crescimento derivado das plaquetas, potente agente quimiostático e mitógeno para fibroblastos; fator de crescimento transformador α (TGF- α), interleucina -1, TGF- β e fator de crescimento semelhante a insulina (Singer e Clark, 1999); e prostaglandinas, que funcionam como vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos (Mendonça *et al.*, 2009).

Esses fatores de crescimento são os responsáveis por preparar a ferida para a fase de reparo, quando fibroblastos e células endoteliais também são recrutados, junto com angiogênese no local, levando a formação do tecido de granulação (Xu e Clark, 1996). A figura 1 ilustra a presença do tampão de fibrina provisório no leito da ferida e as células nele presentes, com os mediadores inflamatórios estimulados, e os detalhes destes mediadores e suas funções podem ser observados na figura 2.

Por fim, os linfócitos também são recrutados nessa fase, porém mais tardiamente que neutrófilos e macrófagos. São responsáveis por melhorar o ritmo e qualidade de reparo do tecido e estimular ou inibir a migração e a síntese de proteína por outras células (MacPhail, 2015). Sabe-se que animais com depleção de macrófagos têm reparo defeituoso de feridas, comprovando o papel do macrófago nessa fase de reparação (Guo e DiPietro, 2010; Almadani *et al.*, 2021). No entanto, em casos de neutropenia e linfopenia, este evento pode ser prejudicado (MacPhail, 2015).

Nessa fase também há a formação de novos vasos, também chamada de fase proliferativa angiogênica. A angiogênese envolve a produção de macrófagos dos fatores mitogênicos e quimiotáticos para as células endoteliais. Os leitos capilares se originam dos vasos sanguíneos existentes, com colunas de células endoteliais capilares migrando na direção da ferida, se unindo uns com os outros ou com vasos rompidos. Ademais, a angiogênese está intimamente ligada com o fator básico do crescimento de fibroblastos. Assim, a combinação de novos capilares, com fibroblastos e tecido fibroso forma o tecido de granulação, com cerca de três a cinco dias após a lesão. Este tecido leva à contração da ferida em busca do fechamento,

em um ritmo de 0,4 a 1 mm/dia. Ele fornece barreira contra a infecção, superfície para migração epitelial e fonte de fibroblastos especiais (Mendonça *et al.*, 2009; MacPhail, 2015; Gonzalez *et al.*, 2016).

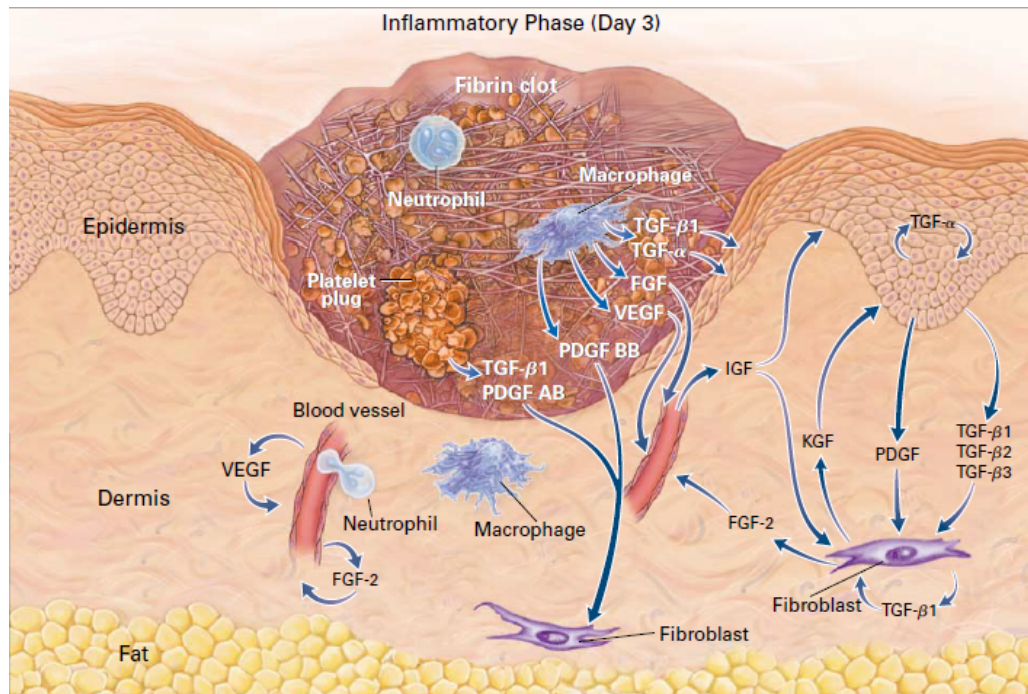


Figura 1. Tampão de fibrina presente na fase inflamatória, com presença de células inflamatórias estimulando mais mediadores inflamatórios, na tentativa de reparação tecidual. Fonte: Singer e Clark, 1999. TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3 denotam fator de crescimento transformador β1, β2 e β3, respectivamente; TGF-α: fator de crescimento transformante α; FGF: Fator de crescimento de fibroblastos; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; PDGF, PDGF AB e PDGF BB: fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento derivado de plaquetas AB e fator de crescimento derivado de plaquetas BB, respectivamente; IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina; e KGF: fator de crescimento de queratinócitos.

Citocinas	Células produtoras	Efeito biológico
IL-1 (interleucina-1)	Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos	Super-expressão de selectinas no endotélio e aumento da síntese de NOSi.
IL-8 (interleucina-8)	Macrófagos, Fibroblastos	Quimioatraente para polimorfonucleares e macrófagos.
IFN- γ (interferon gama)	Macrófagos	Diferenciação de monócitos em macrófagos e ativação destes; aumento da síntese de NOSi.
TNF- α (fator de necrose tumoral alfa)	Macrófagos, Endotélio	Super-expressão de selectinas no endotélio, aumento da síntese de NOSi e supra-regulação de integrinas.
EGF (fator de crescimento epidérmico)	Plaquetas, Macrófagos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos; proliferação e quimioatração de queratinócitos.
FGF (fator de crescimento dos fibroblastos)	Macrófagos, Endotélio, Fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e queratinócitos; potente fator angiogênico.
KGF (fator de crescimento dos queratinócitos)	Fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
HGF (fator de crescimento dos hepatócitos)	Células Mesenquimais	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
VEGF (fator de crescimento vascular endotelial)	Macrófagos, Queratinócitos	Potente fator angiogênico.
PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)	Plaquetas, Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos	Quimiotaxia de polimorfonucleares; proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto; degradação do colágeno I e síntese do III.
TGF- β (fator transformador do crescimento beta)	Plaquetas, Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos, Fibroblasto	Quimiotaxia de polimorfonucleares; síntese de NOSi; proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto; degradação do colágeno III e síntese do I; fator angiogênico.

Figura 2. Citocinas envolvidas no processo de cicatrização, seus efeitos biológicos e células produtoras. Fonte: Isaac *et al.*, 2010.

2.1.3 Fase Proliferativa ou de Maturação/Reparação

Esta fase se inicia com dois a três dias de lesão e pode se estender por até um ano, com os macrófagos estimulando o ácido desoxirribonucleico (DNA) e a proliferação de fibroblastos (Henry e Emiling, 1996; MacPhail, 2015; Almadani *et al.*, 2021). O objetivo central desta etapa é alcançar a máxima resistência à tração por meio da reorganização, degradação e ressíntese da matriz extracelular. Ocorre a tentativa de recuperar a estrutura normal do tecido e o tecido de granulação é gradativamente remodelado, formando tecido cicatricial menos celular e vascular e que apresenta um progressivo aumento da concentração de fibras colágenas (Gonzalez *et al.*, 2016).

Os fibroblastos se originam nas células mesenquimais não diferenciadas no tecido conjuntivo e migram para o ferimento através dos filamentos de fibrina, presentes no coágulo. São responsáveis por sintetizar e secretar colágeno, proteoglicanos e fibronectina na área de reparação da ferida. As proteoglicanas são

os principais componentes da substância fundamental amorfa do tecido conjuntivo, que embebe as células e as fibras colágenas. Posteriormente, esses compostos formarão o tecido fibroso (Henry e Emiling, 1996).

Conforme ocorre o amadurecimento do ferimento, aumenta a concentração de colágeno tipo I (maduro), que corresponde a 80 a 90% na pele não lesionada, e tipo III (imaturo), o qual representa 10% na cicatriz madura. Consequentemente, diminui o número de fibroblastos e o ritmo de síntese deste colágeno. Isso ocorrerá com, em média, duas a três semanas após a lesão, e marca o fim da fase de reparo (George Broughton *et al.*, 2006).

2.1.4 Fase de remodelação

Por último, ocorre a fase de reepitelização ou remodelação. A fase de reepitelização se inicia horas após a lesão, ocorrendo estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos pelos TGF- α e EGF (Mendonça *et al.*, 2009). As células epidérmicas dos anexos da pele removem rapidamente sangue e estroma danificados na ferida, ao mesmo tempo que essas células sofrem alterações fenotípicas, como retração de monofilamentos intracelulares, dissolução temporária dos desmossomos e hemidesmossomos (estruturas que ligam as células), e formação de filamentos de actina citoplasmáticos na periferia da lesão, os quais permitem o movimento celular, uma vez que os desmossomos foram dissolvidos. A expressão de receptores de integrina nestas células também leva à interação com diversas matrizes extracelulares, as quais são intercaladas com colágeno estromal tipo I na margem da lesão e entrelaçado com o coágulo de fibrina no espaço da ferida (Gonzalez *et al.*, 2016).

A migração epitelial ocorre de forma aleatória, porém é orientada pelas fibras de colágeno. As células basais periféricas da ferida desenvolvem microvilos e estendem pseudópodos amplos e finos sobre a superfície exposta dos feixes de colágeno. Elas também desenvolvem microfilamentos intracitoplasmáticos e fixam seletivamente os anticorpos de antiactina e antimiosina. As células epiteliais que estão atrás dessas células migram sobre elas até atingirem a superfície do ferimento (Gonzalez *et al.*, 2016). Este processo disseca a ferida, separando escaras (crosta) de tecido viável. Esse caminho de separação é determinado pelo arranjo das

integrinas que as células migratórias expressam em suas membranas celulares (Singer e Clark, 1999).

Para que as células epidérmicas migrem entre a derme colagenosa e a escara de fibrina, é necessário que ocorra a degradação da matriz extracelular, processo dependente da produção de colagenase (Pilcher *et al.*, 1997) e da ativação da plasmina pelo ativador de plasminogênio produzido pelas próprias células epidérmicas. Esta última substância também ativa a colagenase, facilitando, assim, a degradação do colágeno e das proteínas da matriz extracelular (Clark, 1996).

Conforme se passam os dias, as células epidérmicas da borda da ferida começam a se proliferar. A liberação local de fatores de crescimento, como já explicado no item anterior, ajuda a estimular este processo (Clark, 1996). À medida que este processo ocorre, as proteínas da membrana basal reaparecem em sequência ordenada da periferia da lesão para o centro (George Broughton *et al.*, 2006). Inicialmente, o colágeno depositado é mais fino e frágil que o colágeno de uma pele não lesada, uma vez que apresenta somente uma camada de células e é orientado paralelamente à pele. Porém, à medida que novas camadas se proliferam, os fios iniciais de colágeno são reabsorvidos e depositados mais espessos e organizados ao longo das linhas de tensão (George Broughton *et al.*, 2006). Em seguida, as células epidérmicas reverterem ao seu fenótipo normal, aderidas novamente a membrana basal e a derme subjacente (Singer e Clark, 1999). Essas mudanças também são acompanhadas por uma ferida com resistência à tração aumentada, indicando uma relação positiva entre a espessura da fibra de colágeno e a orientação e resistência da fibra (George Broughton *et al.*, 2006).

É importante frisar que a epitelização ocorre melhor no ambiente úmido que no seco, e não ocorre sobre tecido inviável. Ademais, a migração epitelial depende de energia e está relacionada à tensão de oxigênio, por isso, em condições de anóxia, a ferida não se desenvolve, enquanto em câmaras hiperbáricas (com alto teor de oxigênio) a ferida progride rapidamente (Guo e DiPietro, 2010). Sabe-se também que o colágeno na cicatriz, mesmo após um ano de maturação, nunca será tão organizado quanto o colágeno encontrado na pele ilesa (George Broughton *et al.*, 2006).

2.2 Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

A Fibrina Rica em Plaquetas (PRF, do inglês *Platelet Rich Fibrin*) vem tendo cada vez maior número de sucesso em tratamento de feridas, levando à máxima eficácia na cicatrização e regeneração de tecidos, especialmente em feridas crônicas de difícil cicatrização (Tsai *et al.*, 2019). Também é utilizado em reparação óssea em humanos (Luvizuto *et al.*, 2013) e em procedimentos estéticos, como reconstrução capilar e rejuvenescimento facial (Karimi e Rockwell, 2019; Shashank e Bhushan, 2021).

É um biomaterial recentemente desenvolvido por Choukroun e sua equipe, em 2001, à base de plaquetas, obtido a partir de amostras de sangue e é preparado por meio de uma única centrifugação, sem o uso de anticoagulantes, justamente para a cascata de coagulação entrar em ação (Choukroun *et al.*, 2001; Dohan *et al.*, 2006; Ghanaati *et al.*, 2014). Foi desenvolvido para facilitar o uso na rotina clínica, não sendo necessário o uso de aditivos, diferentemente de seu precursor, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), no qual se utiliza anticoagulantes e soro bovino. Assim, com o objetivo de melhorar e agilizar os métodos de preparação, especialmente por utilizar biomateriais semeados a partir do próprio paciente, surgiu a PRF (Ghanaati *et al.*, 2014). Ainda, o PRF libera fatores de crescimento por um período mais longo e em uma taxa mais lenta do que o PRP ao protegê-los da proteólise pela ausência de trombina (Karimi e Rockwell, 2019), se mantendo viável, em média, por sete dias para os fatores de crescimento mais conhecidos (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2010), mas com alguns durando semanas (Karimi e Rockwell, 2019). In vitro, foi percebida duração de 28 dias (Pinto *et al.*, 2017). Foi comprovado que o PRF possui três vezes mais fatores de crescimento que o PRP, assim como maior quantidade de leucócitos, sendo mais eficaz no combate a infecções (Pravin *et al.*, 2016; Gole *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2021) e possuindo também a capacidade de atuar contra a formação de biofilme bacteriano (Aydinyurt *et al.*, 2020).

A trombina, presente no sangue total, desencadeia a polimerização de plaquetas e fibrinogênio durante a centrifugação de forma natural e devagar, para formação de um coágulo de fibrina ou matriz de fibrina. Essa fase funciona de forma quase fisiológica, uma vez que não ocorre adição de nenhum componente (Dohan *et al.*, 2006). Esse coágulo possui uma rede tridimensional de fibrina, a qual é capaz de

mimetizar a MEC em termos de sua estrutura, criando um ambiente ideal para funcionamento das células (Choukroun *et al.*, 2001; Ghanaati *et al.*, 2014). Nesta rede, as plaquetas, citocinas, fatores de crescimento e leucócitos são aprisionados e atuam liberando altas concentrações de proteínas estruturais bioativas, agindo como um promotor de cicatrização de liberação temporal na angiogênese e remodelação tecidual. Esta rede de fibrina também é um transportador de células tronco mesenquimais (Ghanaati *et al.*, 2014).

Seu uso está sendo cada vez mais defendido baseado no raciocínio de que as plaquetas são reservatórios de vários fatores de crescimento críticos para a regeneração do tecido, além de propriedades antibacterianas (Soares *et al.*, 2021). Alguns estudos experimentais demonstraram pré queratinócitos dérmicos, fibroblastos gengivais humanos, pré adipócitos e osteoblastos maxilofaciais sofreram diferenciação e proliferaram sob efeito da PRF (Huang *et al.*, 2010). No entanto, seu uso na veterinária ainda é muito escasso e recente. Alguns estudos mostram seu uso na oftalmologia em pequenos animais (Rodrigues, 2022), porém o próprio artigo afirma que pouco se sabe em relação a indicações de uso, doses, quantidade utilizada e resultados com uso da PRF na medicina interna de pequenos animais.

Ainda, uma das maiores restrições da PRF está nas constantes coletas sanguíneas de sangue para a produção necessária de coágulo até o fim do tratamento. Na veterinária, essa restrição se torna ainda mais importante, devido a permissividade dos animais, doenças concomitantes e a falta de doadores. Assim, vem sendo estudada a administração xenogênica de PRFs (Soares *et al.*, 2021) ou mesmo a associação da PRF com outras formas de tratamento para reparação tecidual, com o objetivo de diminuir o tempo de cicatrização da ferida. Para isso, podem ser citados alguns tratamentos, como laserterapia e uso de matriz de estômago de ovinos (OFM), ambos tratamentos já utilizados na medicina humana com eficácia comprovada e que atuam de forma diferente da PRF, podendo abranger todas as fases de reparação tecidual.

2.3 Laserterapia

A Terapia por Fotobiomodulação (FBM) ou LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é a terapia que utiliza formas não ionizantes de

fontes de luz, incluindo lasers, Light Emitter Diode (LEDs) e luz de banda larga. É um processo não térmico que envolve cromóforos endógenos, desencadeando eventos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Ou seja, são formas de emissão de radiação eletromagnética em forma de fonte de luz, utilizadas com a finalidade de controle de dor, inflamação e estímulo de cicatrização (Mester *et al.*, 1971; Ribeiro e Zezell, 2011; Lopes e Diniz., 2018). Por isso, na rotina humana e veterinária, é utilizado em tratamentos fisioterápicos (Lopes e Diniz, 2018), regeneração tecidual (Noronha *et al.*, 2001) e óssea (Pretel *et al.*, 2007), na odontologia (Pretel, 2008), na oftalmologia (Felix *et al.*, 2005), entre outros.

É classificado de acordo com o risco de causar dano ocular, sendo que as classes utilizadas com fins terapêuticos são as Classes IIIb e IV. Nele, devem ser definidos os comprimentos de onda (que irão influenciar na profundidade de penetração de luz), potência de saída do aparelho (dada em mWatts ou Watts - W, determina a velocidade de aplicação), a frequência (dada em Hertz - Hz, determina a emissão de laser de maneira contínua ou pulsada), e a largura e tempo de pulso (Lopes e Diniz, 2018). A emissão de fótons se dá através de algumas propriedades da luz, como: luz monocromática (um único comprimento de onda), coerente (ondas uniformes em tempo e espaço) e colimada (feixe de ondas paralelas) (Oliveira, 2017; Lopes e Diniz, 2018). Essa luz se encontra tipicamente no espectro entre 600 e 1100 nanômetros (nm), que está entre o espectro vermelho e infravermelho, com irradiância (W/cm²) entre 1mW e 5W/cm² (Huang *et al.*, 2009).

Deve-se ter em mente o tipo de tecido que se quer tratar e o grau de lesão, uma vez que a resposta terapêutica muda de acordo com a irradiância e o tempo de administração do laser (Huang *et al.*, 2009; De Freitas e Hamblin, 2016), tendo influência também na profundidade do tecido a ser tratado. O laser vermelho, que possui comprimento de onda de 625 a 740 nm, atinge lesões mais superficiais, localizadas em locais como a derme, epiderme e fáscia muscular, enquanto o laser infravermelho, o qual possui comprimento de onda entre 780 e 1100 nm, atua, por exemplo, em músculos, tendões, ligamentos e tecido ósseo (Huang *et al.*, 2009; Farivar *et al.*, 2014).

Ele estimula uma cascata de eventos, através da biomodulação de processos biológicos, por meio da reação de fótons com receptores celulares de luz (primários e

secundários). Com isso, ocorrem várias reações químicas e fisiológicas, gerando aumento de ATP; normalização da função celular; regeneração celular; analgesia; controle da inflamação; produção de ácido araquidônico; promoção da cicatrização; neoangiogênese; entre outros (Gul *et al.*, 2008; Busnardo *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2014; Pryor e Millis, 2015; Lopes e Diniz, 2018; Bavaresco *et al.*, 2019; Wardlaw *et al.*, 2019).

A analgesia ocorre por meio da liberação de endorfinas, produção de óxido nítrico, bloqueio da despolarização de fibras nervosas aferentes C e estabilização do potencial de membrana das células nervosas. Já o efeito anti-inflamatório ocorre pela transformação da prostaglandina em prostaciclina; estabilização da membrana celular; aumento da angiogênese; diminuição do nível de proteína C-reativa; e estimulação do fluxo linfático. Também é cicatrizante, pois aumenta os níveis de ATP e taxa de mitose; estimula fibroblastos, a atividade macrofágica, neovascularização, granulação e epitelização; e aumenta os níveis de fatores de crescimento celular (Lopes e Diniz, 2018). Naterstad e colaboradores (2018) conseguiram concluir que o uso de laser, a uma certa dosagem, foi mais efetivo na regeneração tecidual, diminuindo os marcadores inflamatórios, do que drogas anti-inflamatórias conhecidas, como diclofenaco e dexametasona.

No entanto, é contraindicada para pacientes gestantes (sobre o útero grávidico), regiões fotossensíveis, olhos e sobre linhas de crescimento. Em casos de feridas infectadas, deve-se limpar a ferida antes da aplicação do laser (Lopes e Diniz, 2018). Também deve-se ter em mente que para animais obesos ou de pele mais escura deve-se aumentar a dose. Alguns estudos afirmam que outra contraindicação seria para pacientes com tumores (Lopes e Diniz, 2018), entretanto, outros autores afirmam que pode ser utilizado sem complicações (Zimin *et al.*, 2008).

2.4 Membrana Dérmica Endoform®

As feridas crônicas apresentam altos níveis inflamatórios e de estresse oxidativos, tornando o ambiente favorável para a indução de células senescentes. Este tipo de célula é incapaz de proliferar, limitando o potencial regenerativo do tecido (Nelson, 2018). Ademais, produz e secreta de substâncias pró – inflamatórias, como interleucinas 1, 6 e 8, sob controle da transcrição fator NF- κ B, e proteases que degeneram os tecidos (Childs, 2015; Nelson, 2018). As proteases interferem na

reparação, pois degradam as proteínas dérmicas importantes nesse processo, assim como fatores de crescimento e a matriz extracelular (MEC) natural do organismo (Bohn, 2017).

A MEC tem extrema importância para o tecido vivo, uma vez que possui efeitos estruturais, de adesão e de sinalização, além proteínas metabólicas, como os colágenos estruturais, os quais formam uma rede de tecido fibroso e conferem resistência e estrutura ao tecido (Dempsey, 2019). Enquanto os biomateriais baseados em MEC têm lugar estabelecido na medicina humana como instrumento para regeneração de tecidos e cicatrização de feridas crônicas, contribuindo com matriz provisória e moléculas para sinalizar o processo de cicatrização (Lun, 2010), na medicina veterinária ainda é método em ascensão.

O modelo dérmico Endoform® é uma matriz de estômago de ovinos (OFM, do inglês *Ovine Forestomach Matrix*), sendo considerada biomaterial de MEC descelularizado. Ela atua em todas as fases da cicatrização para estabilizar, corrigir, criar e organizar tecidos, segundo a marca. Também pode ajudar a identificar a presença ou a ausência de proteases, e, diferentemente de outros modelos, possui ação sob várias delas (MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13 e MMP14). A OFM Endoform® foi desenvolvida com 153 moléculas secundárias para o processo de cicatrização, 58 glicoproteínas, 13 proteínas afiliadas a matriz extracelular natural, elastina, 12 proteoglicanos, colágenos I, III e IV, glicosaminoglicanos (GAGs), fibronectina, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF2) e laminina (Dempsey, 2019).

Atualmente, sabe-se que a OFM promove regeneração de tecido lesado, angiogênese e remodelação, atuando tanto em feridas agudas quanto crônicas, e também para reparo de parede abdominal. Ela é ideal para reparação tecidual guiada. Na medicina humana, é muito utilizada para feridas de difícil cicatrização em pacientes diabéticos e em feridas contaminadas e/ou infectadas, podendo ser uma alternativa viável na veterinária futuramente (Irvine *et al.*, 2011). Seu sucesso em reparações teciduais está relacionado na composição de proteínas da MEC e na capacidade de manter a estrutura proteica nativa (característica de biomateriais descelularizados). Com isso, a capacidade regenerativa da membrana está nas suas propriedades biofísicas e em sua diversidade molecular (Dempsey, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Objetivou-se avaliar de maneira macro e microscópica a regeneração tecidual da pele em ratos Wistar com o uso de Plasmá Rico em Fibrina isolado e associado à laserterapia e membrana dérmica de matriz de estômago de ovinos (OFM), a fim de diferenciar qual dos tratamentos propostos foi mais eficaz, quanto tempo de tratamento foi necessário para cada técnica e qual modelo apresentou maior qualidade de tecido regenerado, no que tange a angiogênese do tecido, assim como quantidade de fibroblastos, maturação fibra colágena, e de células inflamatórias presentes.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, do ponto de vista clínico e histopatológico, a reparação tecidual em defeito cutâneo induzido no dorso de ratos, tratado com o uso de PRF isolado; PRF e membrana dérmica de OFM; PRF e laserterapia; e todos estes tratamentos juntos (PRF, laserterapia e membrana dérmica de OFM);
- Comparar, do ponto de vista clínico e histopatológico, o grau de reparo tecidual tegumentar em ratos sem tratamento e com tratamento de PRF;
- Comparar, do ponto de vista clínico e histopatológico, o grau de reparo tecidual tegumentar em ratos sob tratamento de PRF isolada ou associado a laserterapia e/ou OFM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi executado nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal – UNESP. O presente estudo seguiu os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp – Câmpus de Jaboticabal aprovou o projeto sob o número de protocolo 5630/22 em reunião ordinária de 17 de agosto de 2022.

Ademais, também foi seguido o guideline da ARRIVE em relação aos itens essenciais e os recomendáveis, que tratam da descrição de trabalho e de materiais e métodos envolvendo animais.

4.2 Animais experimentais

Foram utilizados o total de 90 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos (média de 60 dias de vida), com peso entre 250 e 300 gramas de massa corporal, procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, em Botucatu. Os animais que não estavam dentro deste padrão foram excluídos do trabalho.

Os animais foram agrupados em gaiolas inicialmente, com cinco animais em cada gaiola, mantidos em ambiente com temperatura a 24°C, controlado via ar condicionado, em local fechado, e foram alimentados antes e durante o período experimental com ração sólida e água à vontade, a fim de evitar estresses térmicos e contato com animais errantes.

4.3 Desenho do estudo e Tamanho da Amostra

Dos 90 animais, 15 deles foram utilizados para a exsanguinação, processo este necessário para a obtenção de material sanguíneo para a etapa inicial da produção da PRF, que foi utilizado em alguns dos grupos experimentais.

Os 75 animais restantes foram distribuídos aleatoriamente em cinco grandes grupos de avaliação, com 15 animais cada, de acordo com o tratamento instituído, isto é, controle negativo, PRF isolado, PRF associado com o laser, PRF associado à Membrana Dérmica Endoform™ e PRF associado ao laser e a Membrana Dérmica Endoform™. Em cada grupo, os animais foram subdivididos em três grupos de cinco animais cada, referentes ao tempo de análise e eutanásia, a saber (Figura 3):

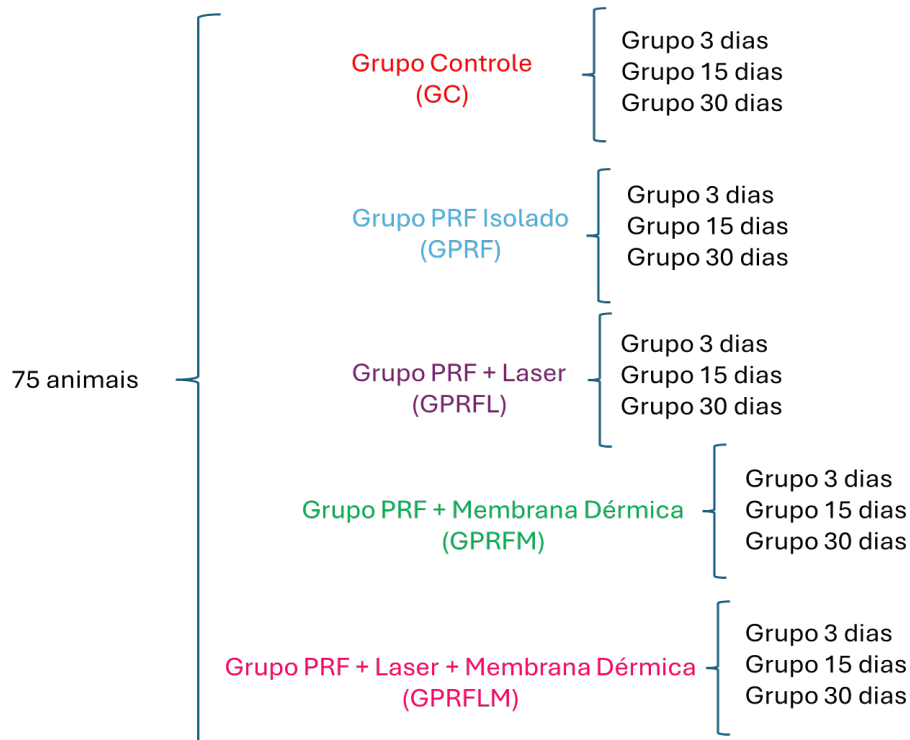


Figura 3. Imagem ilustrativa com a divisão dos grupos experimentais.

O n amostral foi definido de acordo com estudos preliminares realizados (Pretel, 2007; Naterstad *et al.*, 2018), com resultados estatisticamente confiáveis, e validado por análise de poder 80%, através do software G Power.

4.4 Procedimento cirúrgico

Para os procedimentos experimentais, os animais foram submetidos à anestesia geral dissociativa com cloridrato de cetamina na dose de 0,08ml/100 gramas e cloridrato de xilazina na dose de 0,04ml/100 gramas, diluídos na mesma seringa, administrado por via intraperitoneal.

Após a anestesia, foi realizada tricotomia do dorso cervical com máquina elétrica. Em seguida, foi realizada antissepsia do local com gluconato de clorexidina degermante 2% e alcóolica. Após o tempo de ação, foi realizado um defeito crítico no dorso dos animais, com o auxílio de um *punch* estéril de diâmetro interno 8 mm, abrangendo as camadas do tecido epitelial, conjuntivo e subcutâneo, expondo o músculo do dorso.

Os animais foram mantidos nas gaiolas individuais durante todo o pós-operatório, sendo somente manipulados nas limpezas das caixas e na realização de cada procedimento em cada grupo.

4.5 Métodos de tratamento

Após a realização das feridas, cada grupo recebeu o respectivo tratamento, dando início ao período de acompanhamento (três, 15 ou 30 dias). Independente do tratamento preconizado, a ferida foi mantida aberta, sem uso de curativo, para evitar estresses e manejo errôneo. O objetivo destes tratamentos foi realizar simulação clínica, devido a isto, a maioria dos processos e tratamentos foi realizado nos primeiros dias.

4.5.1 Grupo controle

Nos animais do grupo controle foi realizada lesão crítica com o *punch* e o acompanhamento da evolução desta ferida, sem tratamento específico.

4.5.2 Membrana Dérmica

A membrana utilizada foi o modelo dérmico Endoform®. Foi aplicada uma vez, imediatamente após a confecção da ferida cirúrgica e, em seguida, umedecida com solução salina estéril 0,9%.

4.5.3 Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

A PRF foi produzida a partir do aparelho “Centrifuga Process by Choukroun” e os tubos utilizados por “S-P by Choukroun Vacuum sterile plain tubes” (Process for PRF – France). Foi realizada centrifugação 5 minutos – 700 rpm. Foi injetado 0,1 mL de PRF em cima da lesão criada, na região subcutânea, com auxílio de uma seringa de insulina, no pós-operatório imediato, somente esta única vez.

Para a produção da PRF foi realizada incisão na linha média ventral da porção cervical dos ratos destinados para este fim. Após dissecação das estruturas adjacentes, foram identificadas as artérias carótidas e as veias jugulares externas direitas e esquerdas, sendo incisadas para coleta do volume sanguíneo. O sangue foi posteriormente envasado nos tubos específicos do equipamento. Ao término da coleta, os ratos foram submetidos à eutanásia com sobredose anestésica.

4.5.4 Laser vermelho

Foi utilizado laser terapêutico da marca “Theravet (DMC equipamentos – São Carlos, Brasil), com comprimento de onda de 660 nanômetros (nm), com 100 miliWatts (mW) de potência. Foram utilizados 2 Joules (J) no ponto de aplicação, de acordo com protocolos previamente estabelecidos na literatura (Noronha *et al.*, 2001; Pretel *et al.*, 2007). Foram realizadas uma sessão imediatamente à confecção do defeito, após 48h e 96h. Este procedimento foi adotado para analisar quais os benefícios da FBM, em especial o laser vermelho, na fase inflamatória e na fase inicial de proliferação.

4.6 Coleta dos resultados

4.6.1 Acompanhamento macroscópico

Foram realizadas fotografias individuais padronizadas dos momentos pós-operatório imediato, com três e sete dias de lesão e no momento da eutanásia, de maneira a acompanhar macroscopicamente a evolução da ferida. Os animais foram posicionados em uma bancada específica com identificação do animal e do grupo, onde foi realizada, também, a mensuração das dimensões do defeito com auxílio de uma régua.

4.6.2 Avaliação histopatológica

Ao final de cada período (três, 15 ou 30 dias), os animais foram submetidos à eutanásia, realizada com sobredose anestésica, seguida de solução saturada de cloreto de potássio, por via intracardíaca, após a detecção da parada dos batimentos cardíacos, sendo em seguida, preparadas as peças.

Os fragmentos cutâneos foram removidos cuidadosamente e fixados em solução de formol tamponado pH 7,4 por 24 horas, lavados, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Obteve-se cortes semi-seriados de 6 µm por meio de micrótomo, os quais foram corados por hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson, para em seguida ser realizado o estudo histopatológico cicatricial. A avaliação seguiu artigos com protocolos previamente testados (Noronha *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2010).

Para avaliação histopatológica, realizou-se a análise descritiva das lâminas no microscópio óptico *Zeiss Jenaval* e fotomicrografia no laboratório de fotônica da

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Esta etapa foi conduzida como estudo cego.

4.7 Análise dos Resultados

As avaliações macroscópicas foram realizadas por meio de medida histométrica (índice médio de contração da ferida obtido pelo software Image J), utilizando as imagens realizadas com câmera digital padronizada Canon EOS rebel 6Ti - Canon - USA). Foi realizado um treinamento prévio para utilização do software e dois avaliadores foram responsáveis pelas mensurações das áreas de cada ferida. Foi feita três mensurações diferentes em todos os dias avaliados, e o valor da área utilizado foi uma média destas três medidas.

Para cálculo do índice de contração da ferida foi utilizada a seguinte fórmula, sendo A_i a área inicial e A_f a área final:

$$\frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100$$

Nas avaliações histopatológicas foram analisadas a angiogênese, presença de fibroblastos, presença de células inflamatórias e maturação de colágeno. Os fragmentos foram classificados de acordo com um escore de inflamação (Tabela 1) e escore de reparação tecidual (Tabela 2). Os escores foram definidos seguindo recomendações da International Organization for Standardition (ISO) (1992).

Para realizar a contagem histológica foi realizado contagem em triplicata adotando a moda como caráter de eleição para cada animal avaliado. Para realização da análise as imagens foram selecionadas com aumento de 400X para escore inflamação, e com aumento de 200x para escore de reparação tecidual. O software Image J foi utilizado com padrão de grades quadrangulares posicionando cada imagem.

Tabela 1 – Escore de inflamação (campo visual de 400x)

Escore	Caracterização
1	Ausência de inflamação (menor que 20 células inflamatórias)
2	Inflamação leve (entre 21 e 50 células inflamatórias)
3	Inflamação moderada (entre 51 e 99 células inflamatórias)
4	Inflamação intensa (maior que 100 células inflamatórias)

Fonte: International Organization for Standardition (ISO) (1992).

Tabela 2 – Escore de reparação tecidual (campo visual de 200x)

Escore	Caracterização
1	Necrose tecidual – Presença de células em degeneração e tecido necrótico;
2	Reação tecidual – Congestão vascular, hiperemia e presença de rede de fibrina no tecido conjuntivo. Presença de figuras de mitose das células epiteliais;
3	Tecido de granulação – Angiogênese e fibrinogênese – neoformação capilar, fibrilas colágenas e presença de miofibroblastos. Reepitelização com estratificação celular;
4	Resolução – Retorno dos tecidos conjuntivos e epitelial as condições ideais de organização.

Fonte: International Organization for Standardition (ISO) (1992).

Os dados foram avaliados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) para verificação da normalidade dos dados. Os dados não apresentaram distribuição normal, portanto foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para comparação dos grupos dentro de cada período de avaliação. Para comparação dos períodos (dentro de cada grupo) foi realizado o Teste de Friedman (Medidas repetidas no tempo) ($p < 0,05$). Quando houve significância ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Dunn's para comparação das medianas. Todos os testes tiveram significância de 95%.

5. RESULTADOS

As feridas cirúrgicas foram criadas em todos os grupos com êxito, sem intercorrências. Durante o período das avaliações, os animais não apresentaram nenhuma complicação que pudesse ser atribuída à cirurgia ou aos tratamentos realizados.

Os grupos, controle e experimentais, foram fotografados no pós-operatório imediato, com três e sete dias após o procedimento, e no momento de eutanásia, a depender do grupo. A figura 4 exemplifica o defeito criado e seu aspecto no pós-operatório imediato de cada tratamento instituído (grupo controle, PRF isolado e PRF associado à membrana dérmica). A figura 5 e 6 mostram a aplicação do PRF e laser, respectivamente, nestes animais.

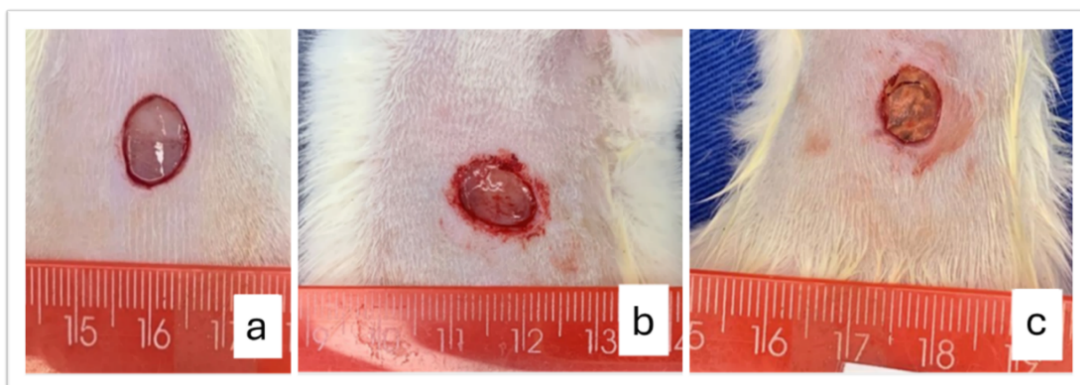


Figura 4. Imagens fotográfica do defeito criado no dorso de rato com 8 mm de diâmetro no pós-operatório imediato com os tratamentos realizados. (a) grupo controle. (b) PRF isolado. (c) PRF associado com membrana dérmica.



Figura 5. Imagem da PRF injetável (ou i-PRF) em (a) e sua aplicação no leito da ferida cirúrgica (b), na região dorsal cervical de rato wistar, correspondendo a 0,1 mL de PRF por defeito.



Figura 6. Imagem da aplicação de laser vermelho na região cervical dorsal de rato wistar, no pós-operatório imediato.

A tabela 3 e a figura 7 trazem os resultados do índice médio de contração da ferida em relação aos grupos de tratamento e ao período avaliado de cada um. A figura 8 demonstra a evolução das feridas ao longo dos dias, com base em cada tratamento.

Tabela 3 – Índice médio de contração da ferida de acordo com o tratamento instituído e os períodos avaliados.

Grupos	Índice Médio de Contração de Ferida (%)		
	3 dias	15 dias	30 dias
Grupo controle	19,07	98,64	100
Grupo PRF	9,70	98,40	100
Grupo PRFL	21,26	80,14	100
Grupo PRFM	12,40	38,8	100
Grupo PRFLM	12,36	80,4	97,8

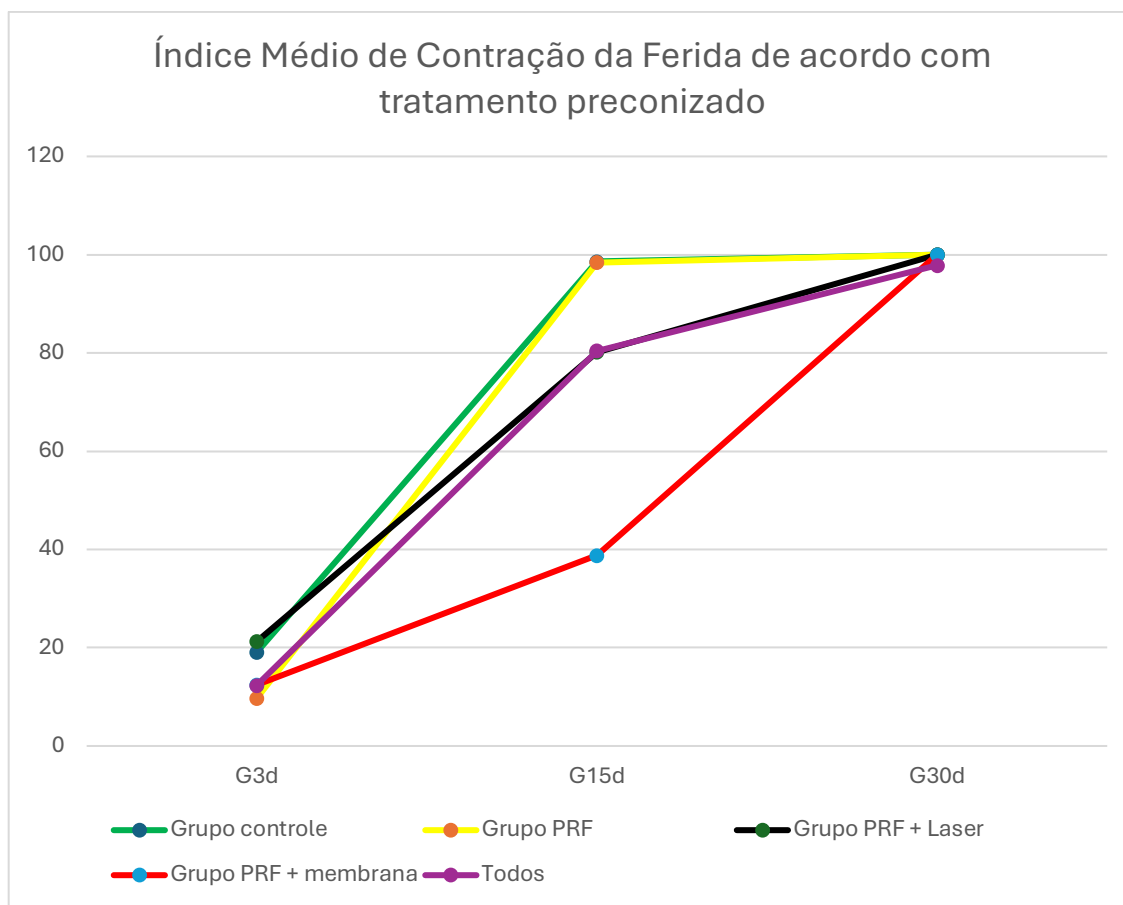


Figura 7. Percentual de índice médio de contração da ferida de acordo com o tratamento preconizado de todos os grupos avaliados no trabalho exposto.

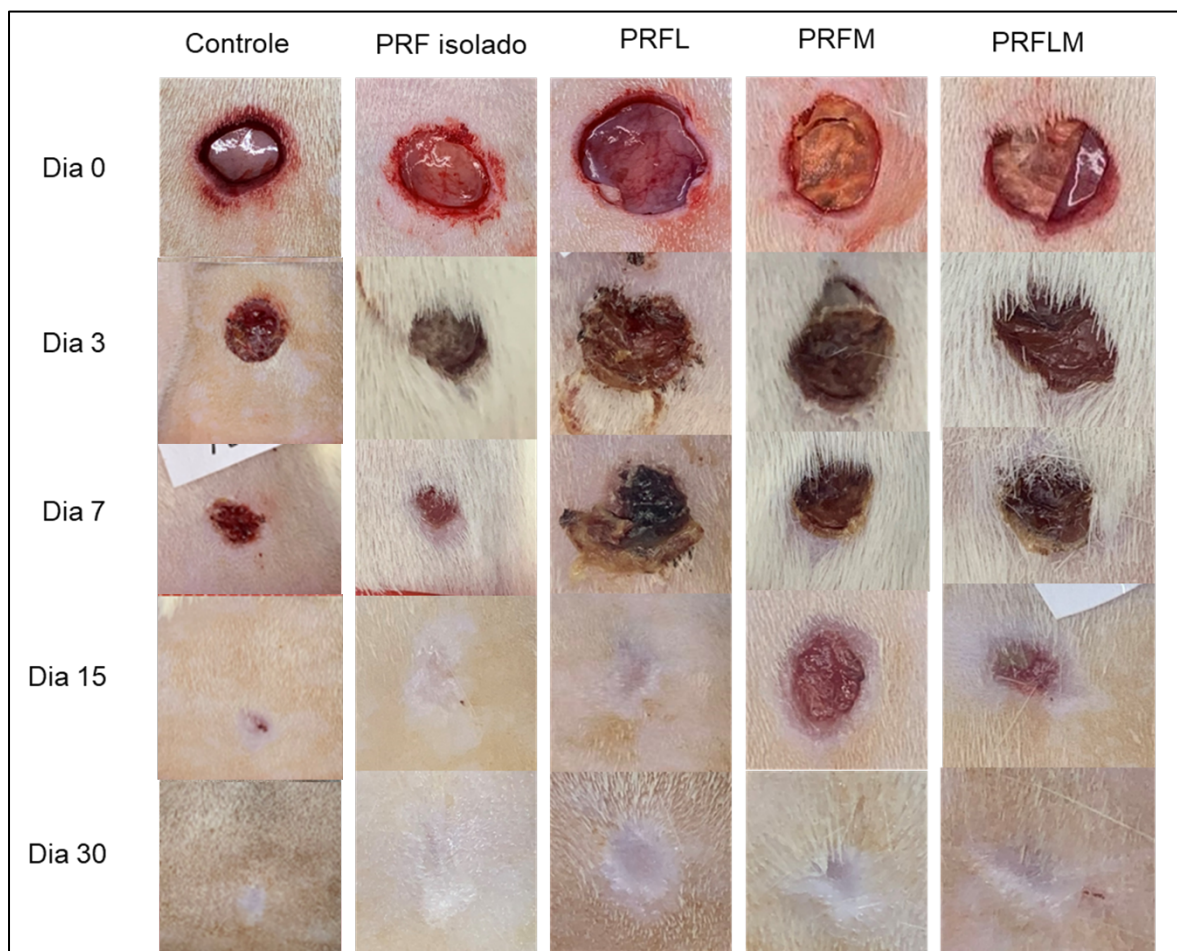


Figura 8. Imagens fotográficas dos grupos de tratamento, a cada dia de acompanhamento.

Para as análises histopatológicas, o material foi coletado e analisado conforme descrito na metodologia. As figuras de 9 a 13 exemplificam alguns cortes histopatológicos dos grupos analisados.

Com três dias de avaliação, o melhor resultado macro e microscópico foi do grupo associando-se PRF ao laser. Neste período foi o que apresentou maior índice de contração de ferida e, ao microscópio, já apresentava presença de células inflamatórias e intensa síntese de colágeno, com presença de fibroblastos em elevada síntese de colágeno, assim como ausência de tecido necrótico na região analisada, diferindo dos outros grupos avaliados.

No grupo de quinze dias após confecção da ferida, o maior índice de contração foi do grupo controle e do PRF isolado. Em contraste a isto, ao se avaliar de forma histopatológica estas amostras, percebe-se que o grupo PRFL e PRFLM foram os que

apresentaram melhor qualidade de tecido em regeneração, com grande quantidade de fibroblastos em síntese de colágeno. Visualiza-se também presença de células inflamatórias provenientes do PRF em ambos os casos.

Com trinta dias de evolução todas as feridas já haviam reparado de forma macroscópica, independente do tratamento preconizado. No entanto, nem todas apresentaram resultados satisfatórios no que tange a qualidade do tecido, como foi possível observar pela análise histopatológicas. O grupo PRFL e PRFLM já apresentavam fibras colágenas maduras e organizadas, diferentemente do grupo controle, PRF isolado e PRFM, os quais ainda estavam em processo de organização do colágeno.

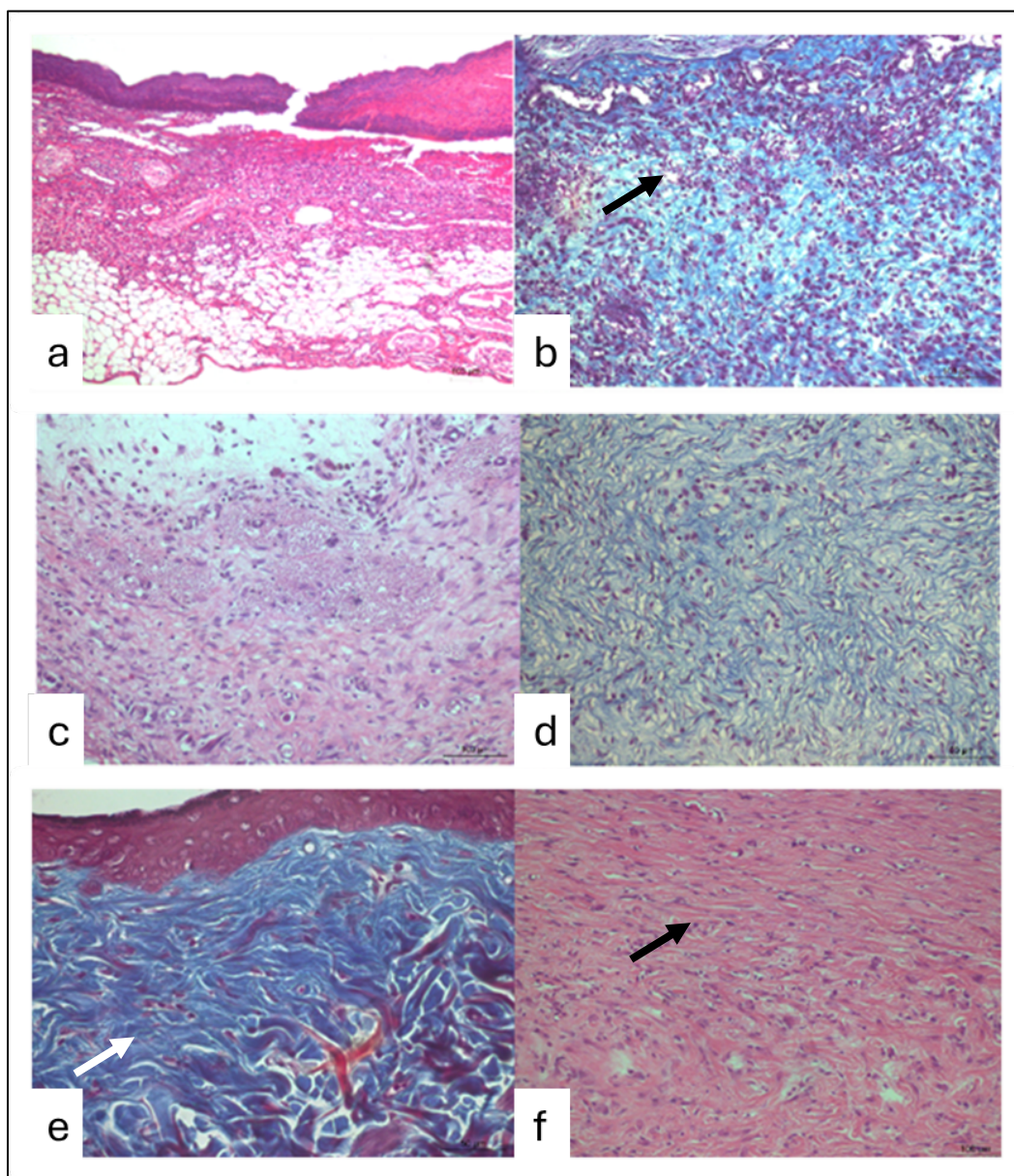


Figura 9. Fotomicrografias do grupo controle de ferida cirúrgica do dorso em ratos wistar. a e b: grupo de três dias. Inicialmente na região do defeito vimos um tecido necrótico extenso na borda da lesão com predominância de células inflamatórias (a) (seta preta) - 100X H&E. Em (b) coloração de tricrômico de Masson evidenciando zona hemorrágica com presença de grande infiltrado inflamatório e hemácias por toda área. Incipiente síntese de fibrilas colágenas (400X -TM). **c e d:** grupo de 15 dias. Capilares com regurgitação sanguínea, e pouca formação de colágeno. Processo de inflamação aguda com macrófagos e pouca síntese de colágeno (c) - 200 x. H&E. Na imagem (d) fibroblastos em síntese de colágeno desorganizado, presença de macrófago e grande quantidade de fibroblastos (400X - TM). **E e f:** grupo de 30 dias. Camada epitelial delgada em formação em (e) com camada de colágeno em organização (400x - TM). Em (f) vimos ainda presença de células inflamatórias (seta preta), grande quantidade de matriz extracelular com fibras colágenas em organização (seta branca). Nítida separação organizacional entre camada superficial da derme e camada média (400X - H&E)

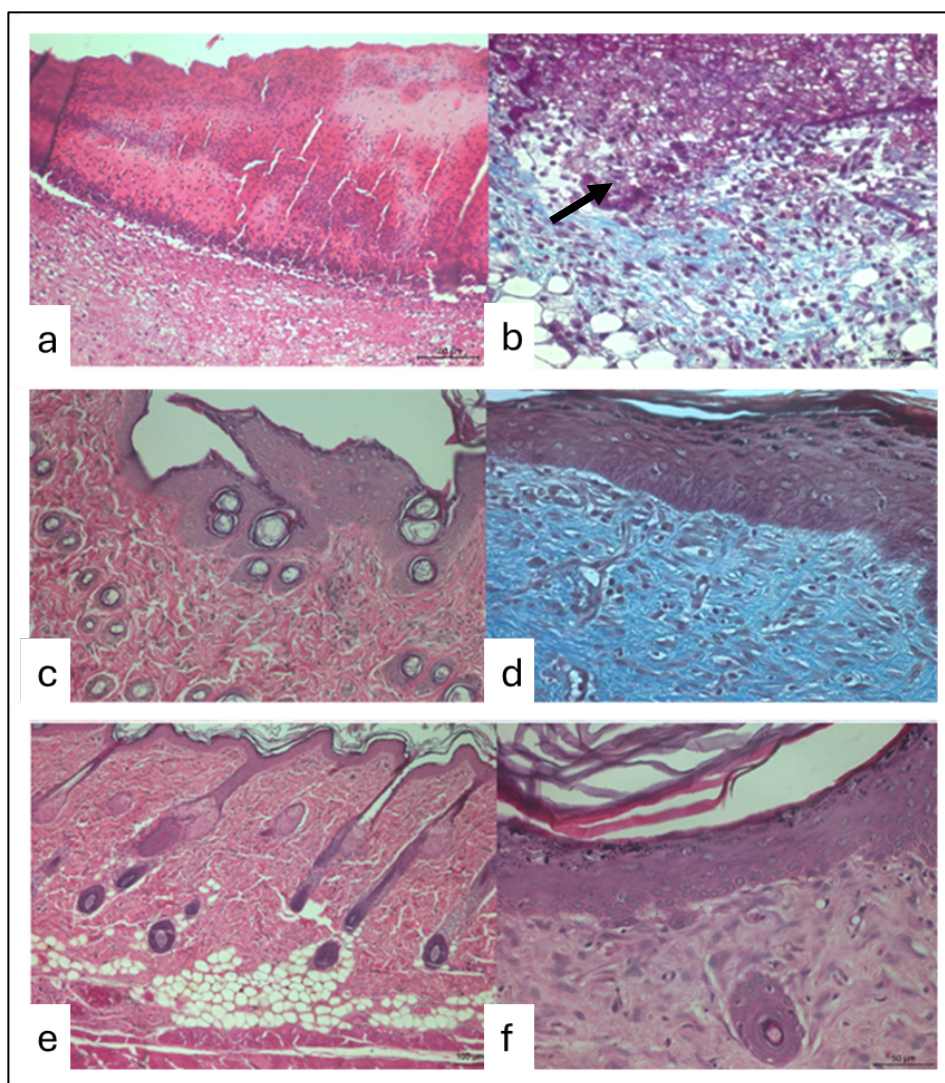


Figura 10. Fotomicrografias do grupo tratado com PRF isolado de ferida cirúrgica do dorso em ratos wistar. a e b: grupo de três dias. No período inicial verifica-se uma malha de fibrina necrótica com aglomerado de neutrófilos compondo a borda da lesão (a) - 100x HE. No tecido conjuntivo predominância de células mononucleares (seta preta), capilares sanguíneos em estase, hemorragia, e edema tecidual. Presença de fibrilas colágenas com grande quantidade de células de defesa advindas da PRF (b) - (400 x Tricômico de Massom). **c e d:** grupo de 15 dias. Em (c), tecido em processo de reestruturação com camada epitelial em proliferação e presença de folículos pilosos em formação (200x - H&E). Em (d), fibras colágenas em processo de organização com presença intensa de fibroblastos e células defesa (400X - TM). **E e f:** grupo de 30 dias. Em (e), grande quantidade de fibras colágenas em processo de maturação com camada hipodérmica presente e folículos pilosos em intensa síntese (200X - H&E). Na imagem (f), camada multicelular no tecido epitelial com presença de camada córnea. No tecido conjuntivo presença de fibroblasto em intensa atividade de síntese proteica com fibras colágenas em processo de organização (400X - H&E).

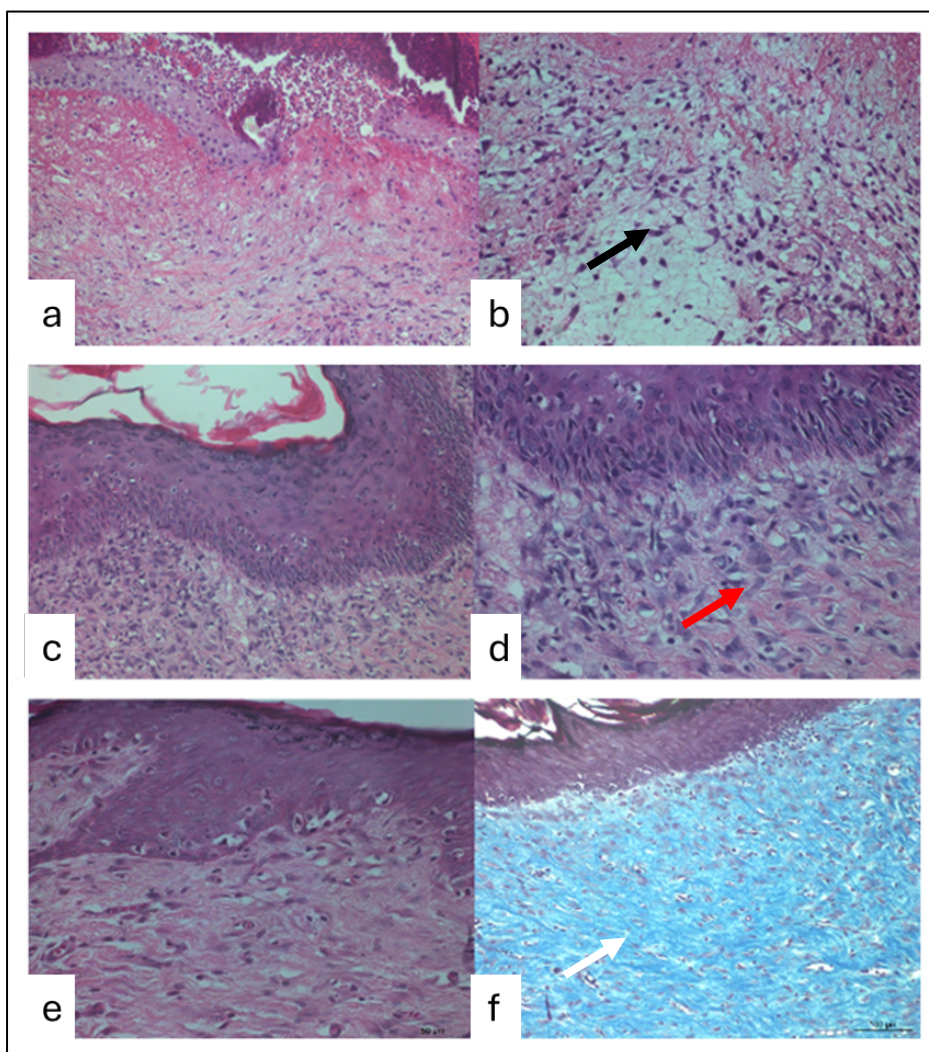


Figura 11. Fotomicrografias do grupo tratado com PRF associado ao laser de ferida cirúrgica do dorso em ratos wistar. a e b: grupo de três dias. Em (b), verifica-se intensa quantidade de células inflamatórias na região da borda da lesão e formação de camada tecido epitelial. Na porção da derme visualiza-se intensa síntese de colágeno com presença de fibroblastos em elevada síntese de colágeno (200X - H&E). Em (b), maior aumento encontra-se grande quantidade de fibroblastos com presença de células inflamatórias (seta preta) e pequena hemorragia. Na região de hipoderme presença de fibroblastos e células do processo inflamatório (400X - H&E). **c e d:** grupo de 15 dias. Na imagem (c), tecido epitelial multicamadas com intensa proliferação epitelial e presença de camada córnea (200X - H&E). Na imagem (d), em maior aumento, nota-se presença de grande quantidade de fibroblasto (seta vermelha) em intensa síntese de colágeno com grande citoplasma evidenciando alta atividade metabólica. Visualiza-se também presença de células inflamatórias provenientes do PRF (400X - H&E). **E e F:** grupo de 30 dias. Em (e), temos camada epitelial bem definida com estrato córneo, camada espinhosa, e basal bem definidas. Tecido conjuntivo bem organizado com fibras colágenas alinhadas e diminuição na quantidade de fibroblastos evidenciando maturação do colágeno (400x - H&E). Na figura (f), a coloração de Tricrômico de Massom evidencia bem a organização das fibras colágenas (seta branca) e presença de células advindas do PRF (200X - TM).

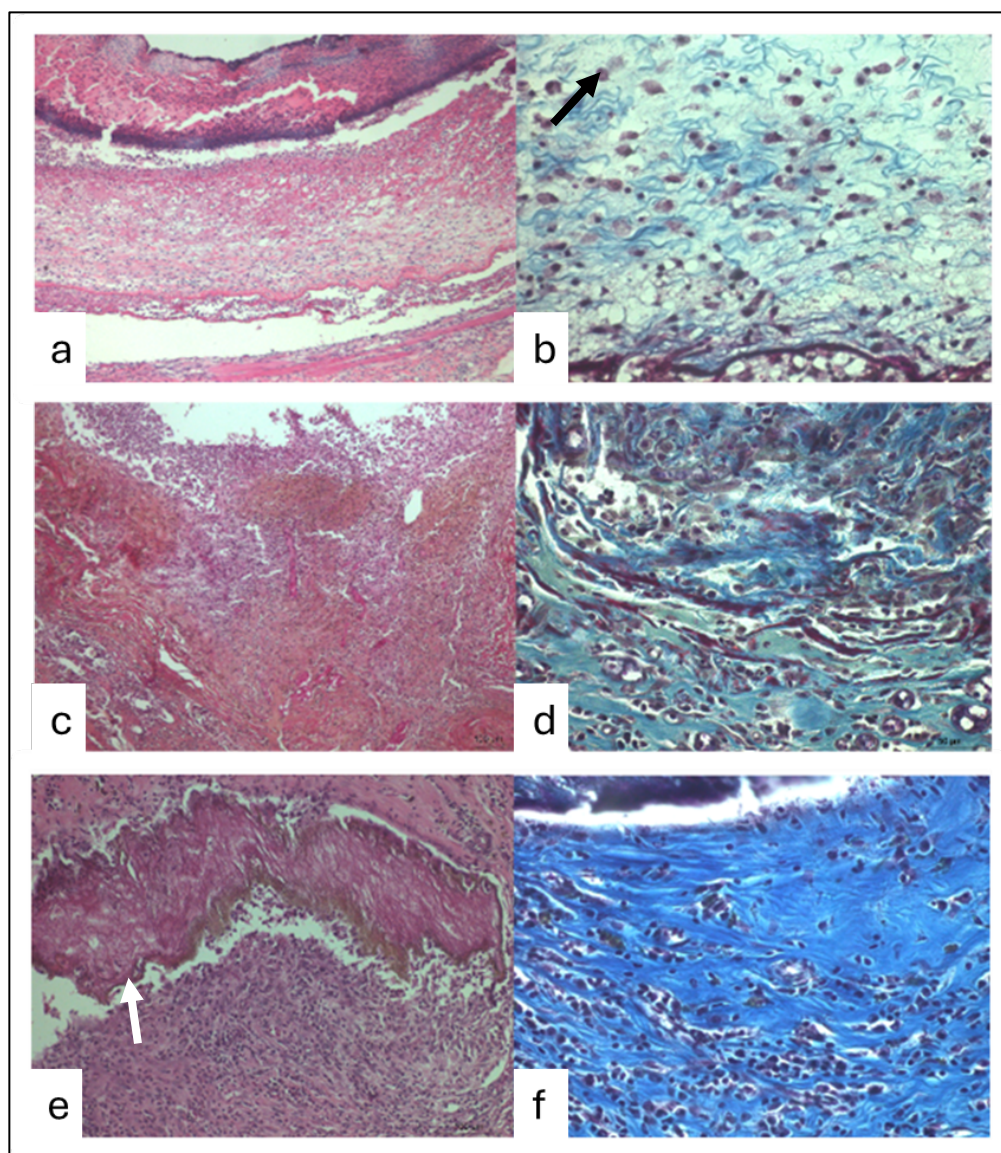


Figura 12. Fotomicrografias do grupo tratado com PRF associado a membrana dérmica de ferida cirúrgica do dorso em ratos wistar. a e b: grupo de três dias. Em (a), vemos a borda da lesão com tecido necrótico com grande quantidade de células inflamatórias do tipo neutrófilo. Tecido conjuntivo com predominância de hemácias e células inflamatórias evidenciando grande edema (100X - H&E). Figura (b) ilustra fibrilas colágenas com muitas células inflamatórias (seta preta), com predominância de macrófagos e fragmentos de células (400X - TM). **c e d:** grupo de 15 dias. A Figura (c) apresenta grande concentrado inflamatório com ilhotas de formação colágeno e remanescente de membrana em meio a matriz extracelular (200 X - H&E). Na imagem (d), verifica-se remanescente da membrana dérmica com intenso processo inflamatório e desorganização das fibras colágenas (400X - TM). **E e f:** grupo de 30 dias. Predominância de processo inflamatório com característica de cronicidade, e presença de remanescente membrana dérmica (e) (seta branca) (200X - H&E). Na figura (f), verifica-se intenso infiltrado inflamatório e matriz de colágeno em processo de organização (400X - TM).

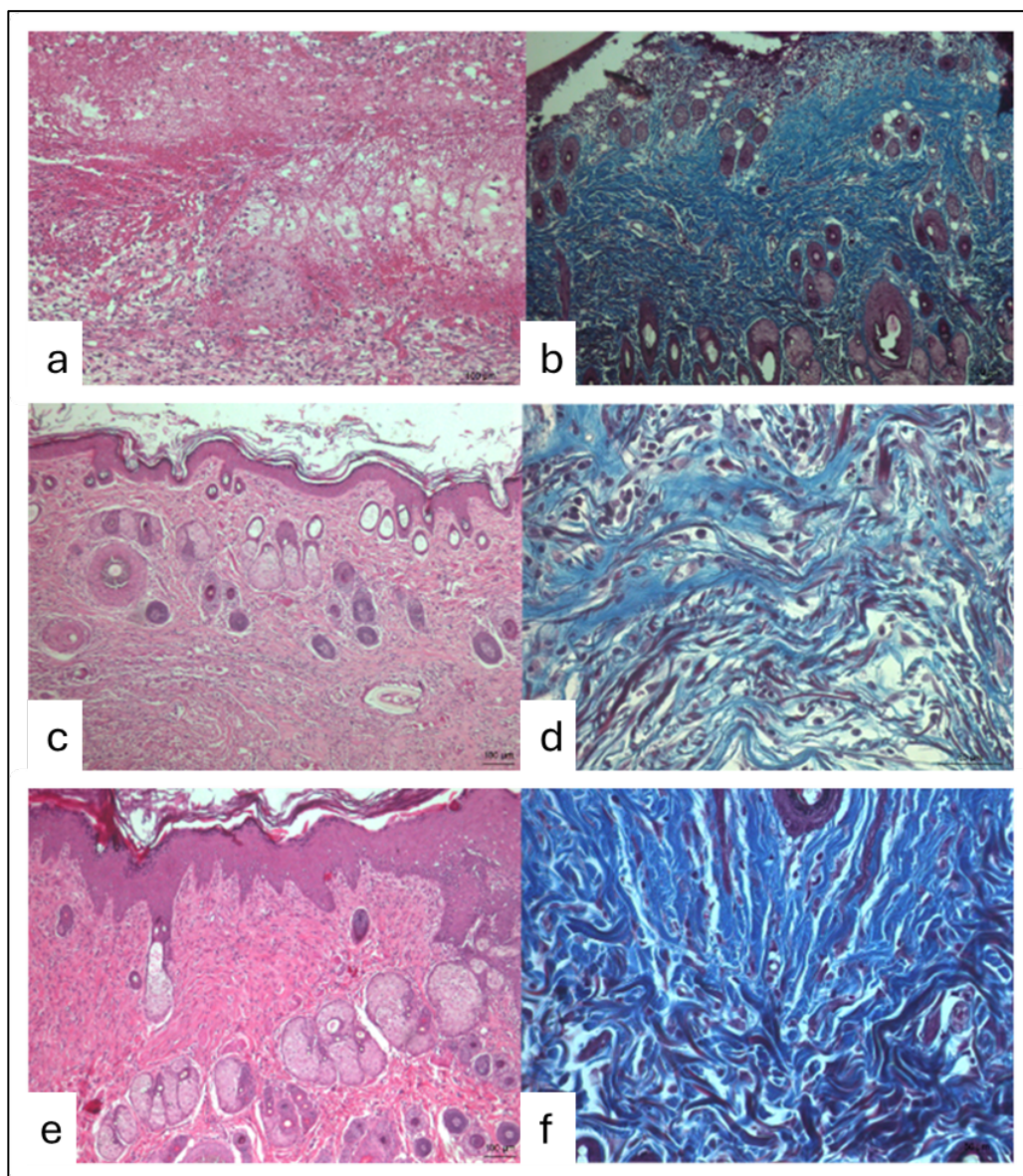


Figura 13. Fotomicrografias do grupo tratado com PRF associado ao laser e a membrana dérmica de ferida cirúrgica do dorso em ratos wistar. a e b: grupo de três dias. Na Figura (A), é vista intensa hemorragia com muitas hemácias e células inflamatórias. Presença de membrana dérmica permeada por rede de fibrina (200X - H&E). Na figura (B), presença de intenso infiltrado inflamatório em meio a manutenção de folículos pilosos (200X - TM). **C e D:** grupo de 15 dias. Na figura (C) camadas bem definidas, porém em estágio de definição. Derme conjuntiva com grande quantidade de matriz extracelular (200X - H&E). Na figura (D), fibrilas colágenas em maturação com predominância de células inflamatórias (400X - TM). **E e F:** grupo de 30 dias. Figura (E) com tecido em resolução e camadas bem definidas e organizada (200X - H&E). E na figura (F) estrutura colágeno com maturação tecidual e traves de sustentação. É possível visualizar a polarização das fibras colágenas (400 X - TM).

Por fim, cada animal de cada grupo foi classificado nos escores de inflamação e de reparação tecidual (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação nos escores de inflamação e de reparação tecidual de cada grupo em cada dia de análise.

Grupo	Período dias de avaliação	Escore de Inflamação (1 a 4)	Escore de Reparação Tecidual (1 a 4)
		Score	Score
Grupo Controle	3	3	1
	3	3	1
	3	2	2
	3	3	2
	3	2	1
Grupo Controle	15	2	3
	15	2	2
	15	1	3
	15	2	2
	15	2	3
Grupo Controle	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
	30	2	3
Grupo PRF	3	4	1
	3	4	2
	3	4	1
	3	4	1
	3	3	2
Grupo PRF	15	1	3
	15	1	3
	15	1	3
	15	2	2
	15	2	3

Grupo PRF	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
Grupo PRF e Laser	3	4	1
	3	4	2
	3	3	1
	3	3	2
	3	3	2
Grupo PRF e Laser	15	1	3
	15	1	3
	15	1	3
	15	2	2
	15	1	3
Grupo PRF e Laser	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
	30	1	4
Grupo PRF e Membrana Dérmica	3	3	2
	3	4	1
	3	3	1
	3	3	2
	3	4	1
Grupo PRF e Membrana Dérmica	15	2	3
	15	2	3
	15	2	3
	15	3	2
	15	1	3
	30	2	3

Grupo PRF e Membrana Dérmica	30	3	3
	30	2	3
	30	1	4
	30	2	3
Grupo PRF, Laser e Membrana Dérmica	3	4	1
	3	4	1
	3	3	1
	3	3	2
	3	2	2
Grupo PRF, Laser e Membrana Dérmica	15	2	2
	15	2	3
	15	1	3
	15	2	2
	15	1	3
Grupo PRF, Laser e Membrana Dérmica	30	1	4
	30	1	4
	30	2	3
	30	1	4
	30	1	4

Inicialmente, para análise macroscópica das amostras, foi realizado índice de correlação para a área inicial e final entre os dois avaliadores. Para a área inicial, obteve-se uma correlação de 82,5%, com $p < 0,001$. Para a área final, a correlação foi de 94,5%, também com $p < 0,001$. A partir destes valores, utilizou-se a média obtida dos resultados de cada área dos avaliadores para valores finais de área inicial e final. Com base na estatística realizada das análises macroscópicas (Tabela 5), consegue-se inferir que o grupo de PRF com Membrana Dérmica Endoform™ obteve pior resultado na análise de três dias, assim como na avaliação de 15 dias, cujo mesmo grupo de tratamento também foi inferior aos grupos controle e de PRF isolado. Apesar disto, nenhum outro grupo mostrou diferença estatisticamente significativa no tratamento para feridas de ratos wistar na cicatrização na macroscopia.

Tabela 5. Análise estatística do índice médio de contração da ferida, comparando-se os grupos e os tempos de análise.

GRUPO	ÍNDICE DE CONTRAÇÃO			P
	3	15	30	
GC	15,24 [2,84 – 23,13] aB	100,0 [97,3 – 100,0] aA	100,0 [100,0 – 100,0] aA	<0,001
GPRF	6,93 [4,18 – 15,32] aB	100,0 [96,1 – 100,0] aAB	100,0 [100,0 – 100,0] aA	0,008
GPRFL	25,30 [13,80 – 29,97] aB	100,0 [54,0 – 100,0] abA	100,0 [100,0 – 100,0] aA	<0,001
GPRFM	13,51 [9,47 – 14,71] aC	39,8 [30,7 – 44,5] bB	100,0 [100,0 – 100,0] aA	<0,001
GPRFLM	10,83 [6,27 – 18,46] aB	80,8 [66,6 – 91,2] abA	100,0 [97,3 – 100,0] aA	<0,001
P	0,381	0,007	0,406	

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Dunn's ($P>0,05$)

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta tecidual de uma ferida cirúrgica frente a diversos tratamentos disponíveis no mercado, cada qual com sua atuação no processo de reparação, para obter fechamento rápido da ferida, com a formação de uma cicatriz esteticamente satisfatória e semelhante ao tecido ileso. Para isso, foi necessário avaliar principalmente a angiogênese, presença de células inflamatórias na ferida e a deposição e organização de colágeno na cicatriz. A qualidade do tecido reparado é importante pois, quanto maior a produção e a organização do colágeno, assim como sua espessura, maior a resistência desta cicatriz (George Broughton *et al.*, 2006).

É importante considerar o ambiente que permeia o animal/paciente, uma vez que tanto fatores locais quanto sistêmicos podem afetar a reparação tecidual (Agah *et al.*, 2004; Guo e DiPietro, 2010). Em diversos casos, quando o ambiente está favorável, livre de contaminações e sujidades e a depender do tamanho da ferida, ela é prontamente fechada com o passar de alguns dias, uma vez que o corpo é preparado para lidar com tal situação (Eming *et al.*, 2014), assim como pode ser visto no grupo controle do presente estudo, o qual se manteve em boa taxa de reparação tecidual durante todo o período. No entanto, nem sempre a reparação se dá da melhor forma e qualidade possível, sendo necessários tratamentos específicos para cada ferida. Para evitar tais influências, o estudo em questão utilizou-se de animais da mesma espécie, pesos e idades semelhantes e mesmo sexo.

As plaquetas possuem papel fundamental na cicatrização e reparação tecidual. Seus principais elementos são os leucócitos e os fatores de crescimento, sendo estes últimos, polipeptídios que participam na diferenciação, proliferação, migração e metabolismo das células (Garcia, 2004). Neste contexto, surgiu a PRF, um hemoderivado, caracterizado como um biomaterial de fibrina, levando à angiogênese e estimulação de fatores de crescimento, células inflamatórias e células tronco mesenquimais. É oriunda do próprio sangue, sem adição de componentes, trazendo, assim, uma fibrina natural para a estrutura do coágulo, com menor chance de reação imunogênica e transmissão de doenças (Choukroun *et al.*, 2001; Choukroun *et al.*, 2006; Dohan *et al.*, 2006; Ghanaati *et al.*, 2014).

De todos os grupos avaliados, os melhores resultados aqui observados tanto macro quanto microscopicamente foram do grupo associando-se PRF e laser, sendo este o primeiro estudo, no conhecimento dos autores, que comprova e relata o benefício desta associação. A maioria dos estudos produzidos possuem o caráter de comparação entre as técnicas (de Sousa Resende, 2019).

Ao pensar no PRF isolado para reparação de feridas, um estudo preliminar conduzido por Soares e colaboradores (2021) avaliou o uso da PRF em quatro gatos com feridas extensas, sendo três delas infectadas, com aplicação xenogênica (canina) da PRF. Seus resultados comprovam a ação antibacteriana do PRF, com completa cicatrização destas feridas (Soares *et al.*, 2021). Este mesmo estudo mostrou a possibilidade do uso xenogênico em pacientes que apresentam doenças concomitantes, que impossibilita a produção de PRF a partir de seu próprio sangue (Soares *et al.*, 2021). Outro estudo conduzido por Camargo (2013) obteve sucesso no fechamento de feridas com utilização do PRF com menos de 14 dias de evolução, além de não apresentarem nenhum foco de infecção ou complicações. Tal resultado ocorreu no estudo em tela, no entanto, o grupo controle também não apresentou complicações ou focos de infecção, possivelmente por se tratar de uma ferida cirúrgica confeccionada de forma asséptica. Portanto, o PRF pode ter colaborado na prevenção de infecções nestes pacientes, especialmente nos do grupo de 30 dias, que permaneceram por mais tempo com a ferida exposta ao ambiente.

Ainda, por não possuir adição de trombina, a PRF libera os fatores de crescimento relacionados às plaquetas de forma mais lenta e por um período mais

longo (Karimi e Rockwell, 2019). Isto fica muito claro no estudo aqui realizado, no qual, na avaliação histopatológica, foi possível observar maior quantidade de células inflamatórias advindas da PRF, nas avaliações de quinze e trinta dias, o que influenciou diretamente na maturação e organização do colágeno.

Um estudo realizado por Pinto e colaboradores (2017) constatou que o uso do PRF em pacientes com úlceras cutâneas crônicas diminui consideravelmente a dor, não sendo necessário nenhum tratamento analgésico adjuvante após algumas sessões de aplicação do PRF. Também comprovou que seu uso ajudou a promover a cicatrização tanto no quesito de fechamento da lesão, mas também com maior qualidade deste tecido reparado. Ainda, os pacientes estudados não obtiveram recorrência da ferida durante um ano, diferindo de quando outros tratamentos são instituídos (Pinto *et al.*, 2017). Diversos outros estudos mostram a eficácia do PRF no tratamento de úlceras cutâneas, especialmente em pacientes diabéticos humanos, com resultados positivos (Pravin *et al.*, 2016; Gole *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2021).

A associação do PRF com o laser no presente trabalho obteve resposta mais exponencial já nos primeiros dias de avaliação, até em torno do décimo quinto dia, isto é, durante a fase proliferativa do processo de cicatrização, fase em que o laser obtém sua maior ação (Santos *et al.*, 2013). São inúmeros os estudos que comprovam a atuação do laser na regeneração tecidual (Noronha *et al.*, 2001), na regeneração óssea (Pretel *et al.*, 2007), na odontologia (Pretel, 2008), na oftalmologia (Felix *et al.*, 2005) e/ou na reabilitação animal (Lopes e Diniz, 2018).

De Oliveira *et al.* (2023) demonstraram que a utilização de laser aumenta a deposição de colágeno, efeito ainda mais potencializado caso as doses sejam elevadas de forma crescente. Porém, foi percebido que o efeito anti-inflamatório se mantém o mesmo, independente da dose, sendo superior a grupos não tratados. Solmaz e colaboradores (2017) compararam a utilização de diferentes tipos de comprimentos de onda de laser para a reparação tecidual, chegando à conclusão de que o laser de 635 nm, semelhante ao utilizado neste estudo, obteve maior resistência à tração tanto na avaliação histopatológica quanto em testes mecânicos, comprovando novamente a ação deste tratamento em feridas.

No entanto, o resultado encontrado ao se avaliar o grupo de quinze dias foi diferente na macroscopia. Pela análise das fotos, o grupo com maior índice de

contração foi o grupo controle e com PRF isolado. Estudos realizados por Danielsen *et al.* (2008) e Camargo (2013) avaliaram o uso do PRF na cicatrização de feridas cirúrgicas confeccionadas para o estudo, e obtiveram os mesmos resultados aqui visualizados, com pouca ou nenhuma diferença entre este grupo e o grupo controle. O fato do estudo ser planejado, com o defeito cutâneo sendo realizado de forma cirúrgica e asséptica, pode ter contribuído para tal resultado (Danielsen *et al.* 2008), diferentemente do relatado por autores que utilizaram deste produto para tratamento de feridas não cirúrgicas. A quantidade de administração, especialmente a quantidade de células presentes no PRF também pode influenciar no resultado, que irá ou não sinalizar um reparo tecidual sistêmico (Jorgensen *et al.*, 2002). Assim, para casos em que se deseja uma cicatrização rápida, o uso do PRF isolado pode ser um bom aliado.

Entretanto, ao se avaliar de forma histopatológica estas amostras, assim como quando classificadas nos escores, percebe-se que, por mais que os grupos supracitados tenham apresentado maior rapidez no fechamento da ferida, o grupo PRFL e PRFLM foram os que apresentaram maior taxa de reparação tecidual, ou seja, maior qualidade de tecido regenerado, com formação de fibras colágenas já em maturação ou maduras. Isto traz uma nova perspectiva no tratamento de feridas, comprovando o enorme benefício que foi a associação entre PRF e Laser. Apesar destes resultados, o grupo de PRF isolado também apresenta resultados satisfatórios para o mesmo período quando avaliado por microscopia.

O resultado menos promissor, tanto macro quanto microscopicamente, está na baixa média obtida pelo grupo de PRF e membrana dérmica. Estes tratamentos, em tese, se complementam em suas funções (Choukroun *et al.*, 2001; Bohn, 2017; Dempsey *et al.*, 2019), no entanto, possivelmente, tal resultado ocorreu pela exposição da membrana dérmica ao ambiente, e, consequente ressecamento dela, diferente do recomendado pelo fabricante. Em um estudo comparativo utilizando membranas de colágeno (porém de outro fabricante) e PRF, chegou-se à conclusão de que a PRF possuiu melhores propriedades antibacterianas, impedindo a penetração e degradação de sua membrana por bactérias, assim como melhor fechamento da ferida (Qiu *et al.*, 2023). Este foi o primeiro estudo em que fora realizada a associação destes dois tratamentos para finalidade comum. Entretanto, a

membrana dérmica, mesmo apresentando grandes propriedades, não se mostrou necessária ou valiosa para a reparação tecidual quando associada ao PRF.

No presente estudo, foi percebido que é necessário avaliar mais do que o fechamento da ferida por si só. Com 30 dias de análise, todos os grupos já haviam obtido a cicatrização, porém somente dois estavam em um processo mais adiantado de reparação tecidual. A hipótese é de que os outros grupos (controle, PRF e PRFM) iriam evoluir para o mesmo grau de maturação colágena que os grupos PRFL e PRFLM, porém de forma mais lenta, uma vez que não apresentavam tantas células inflamatórias quanto os outros grupos. Outra possível situação é a estagnação da reparação da forma como foi visualizada, onde as fibras colágenas nunca se organizariam da forma ideal, mantendo uma cicatrização efetiva, porém não satisfatória. Assim, seria necessário avaliar por mais tempo estes grupos para confirmar ao certo a evolução da ferida nestes tratamentos.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo fora realizado, pode-se concluir que:

- A associação entre PRF e laserterapia é extremamente benéfica, tanto do ponto de vista macro quanto microscópico, levando à formação de uma cicatriz funcional e com ótima qualidade de reparação, possuindo fibras colágenas espessas e organizadas.
- A associação com a membrana dérmica proveniente de matriz de estômago de ovinos não se mostrou positiva como o esperado, possivelmente pela forma como foi executado o estudo.

Mais estudos são necessários para definir o melhor protocolo quanto as dosagens e periodicidade da aplicação destes tratamentos.

8.0 REFERÊNCIAS

- Agah A, Kyriakides Tr, Letrondo N, Bjorkblom B, Bornstein P (2004). Thrombospondin 2 levels are increased in aged mice: consequences for cutaneous wound healing and angiogenesis. **Matrix Biology** 22, 7:539 547.
- Almadani YH, Vorstenbosch J, Davison PG, Murphy AM (2021) Wound healing: a comprehensive review. **Seminars in plastic surgery**, 35(3), 141-144. Thieme Medical Publishers, Inc.

Andrade FDSDD, Clark RMDO, Ferreira ML (2014). Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, 41, 129-133.

Aydinyurt HS, Sancak T, Taskin C, Basbugan Y, Akinci L. (2021). Effects of injectable platelet-rich fibrin in experimental periodontitis in rats. **Odontology**, 109, 422-432.

Barbosa NF, Boaretto FS, Santos TBD, Amaral CS, Silva MABD (2018) Estudo clínico do uso do LIB: laser de baixa intensidade (GaAlAs) no tratamento da dor em discopatia de cães. **Nosso clínico**, 26-30.

Bavaresco T, Osmarin VM, Pires AUB, Moraes VM, Lucena ADF (2019). Terapia a laser de baixa potência na cicatrização de feridas. **Rev. enferm. UFPE online**, 216-226.

Bohn G. (2017) Proactive and Early Aggressive Wound Management: A Shift in Strategy Developed by a Consensus Panel Examining the Current Science, Prevention, and Management of Acute and Chronic Wounds. **Wounds: A compendium of clinical research and practice**. 29, 11:S37-S42.

Busnardo VL, Biondo-Simões ML (2010). Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, 14, 45-51.

Camargo FFD (2013). **Efeito do plasma rico em plaquetas e da fibrina rica em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas em ratos**. 184p. Dissertação de mestrado (Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Carneiro MIDS, Ribas Filho JM, Malafaia O, Ribas CAPM, Santos CAM, Cavalcanti TCS, Czezko LEA (2010). Estudo comparativo do uso de extrato de *Pfaffia glomerata* e do laser de baixa potência (Hélio-Neônio) na cicatrização de feridas em ratos. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, 23, 163-167.

Carvalho MGF, Araújo LMB, Lopes LP, *et al.* (2021). O uso de PRF e PRP em feridas resultantes do pé diabético The use of PRF and PRP in wounds resulting from the diabetic foot. **Brazilian Journal of Health Review**, 4(4), 17444-17454.

Carvalho PDTC, Mazzer N, Siqueira JF, Ferreira VJ, Silva IS (2003). Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. **Fisioter. Bras**, 253-258.

Childs BG, Durik M, Baker DJ, Van Deursen JM. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. **Nat. Med.** 21(12), 1424-1435.

Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A (2001). Une opportunité en parodontologie: Le PRF. **Implantodontie**, 42(55), e62.

Choukroun K, Diss A, Simonpieri A. (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral**

Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 101(3), e56-e60.

Clark RAF (1996) The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd ed. **New York: Plenum Press**, 427-74.

Danielsen P, Jorgensen B, Karlsmark T, Jorgensen LN, Agren MS. (2008). Effect of topical autologous platelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial. **Plast Reconstr Surg**.122:1431-1440.

De Freitas LF, Hamblin MR (2016). Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE Journal of selected topics in quantum electronics**, 22(3), 348-364.

De Oliveira LP, de Lima Chagas A, de Souza TR, Araújo IR, de Menezes LB, Miguel MP, Vulcani VAS. (2023). Low-power laser in increasing doses improve wound healing process in rats. **Lasers in Medical Science**, 38(1), 60.

De Sousa Resende MR (2019). **Utilização de laser ou de Fibrina Rica em Plaquetas no Maneio de Feridas do Membro Distal Equino**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa (Portugal).

Dempsey SG, Miller CH, Hill RC, Hansen KC, May BC (2019). Functional insights from the proteomic inventory of ovine forestomach matrix. *Journal of proteome research*, 18(4), 1657-1668.

Diniz CM, De Castro Diniz R, dos Santos WG, Freitas PMC (2021) Fotobiomodulação no tratamento de necrose de língua em cão. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, 4(3), 4330-4335.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, 101(3), e37-e44.

Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. (2010). Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. **Journal of periodontology**, 81(4), 546-555.

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science translational medicine**, 6(265), 265sr6-265sr6.

Ehrenfest DMD, Peppo GMD, Doglioli P, *et al.* (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukrouns platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. **Growth Factors** 27(1):63–9.

Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R (2014) Biological effects of low level laser therapy. **Journal of lasers in medical sciences**, 5(2), 58.

Felix CF, de Oliveira Castro V, Peixoto RM, de Lucena RS, de Albuquerque Segundo JS, de Melo Junior WA (2005). O Laser Na Oftalmologia. **Revista Saúde & Ciência online**, 27.

García García V, Corral I, Bascones Martínez A. (2004). Plasma rico en plaquetas y su utilización en implantología dental. **Avances en periodoncia e implantología oral**, 16(2), 81-92.

George Broughton II, Janis JE, Attinger CE (2006) The basic science of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, 117(7S), 12S-34S.

Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, *et al.* (2014). Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *Journal of Oral Implantology*, 40(6), 679-689.

Gole PV, Muhammed N, Patadia SR. (2019). Efficacy of autologous platelet rich fibrin matrix in the management of non-healing ulcers. **Int J Res Dermatol**, 5(686), 10-18203.

Gonzalez ACDO, Costa TF, Andrade ZDA, Medrado ARAP (2016). Wound healing-A literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, 91, 614-620.

Gul NY, Topal A, Cangul IT, Yanik K (2008). The effects of topical tripeptide copper complex and helium-neon laser on wound healing in rabbits. **Veterinary Dermatology**, 19(1), 7-14.

Guo SA, DiPietro LA (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229. HUANG, F.; YANG, S.; ZHAO, J.; CHANG, Y. Platelet-rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental Pulp cells. **J Endod.** v. 36, p.1628–1632, 2010.

Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR (2009). Biphasic dose response in low level light therapy. Dose-response, 7(4), dose-response.

Isaac C, de Ladeira PRS, do Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC (2010) Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Comunicação & Educação**, 89(3-4), 125-131.

International Organization For Standardization - ISO. Biological evaluation of medical devices. **Genève**: ISO 10993-3, p.2-7, 1992.

Irvine SM, Cayzer J, *et al.* (2011) Quantification of in vitro and in vivo angiogenesis stimulated by ovine forestomach matrix biomaterial. **Biomaterials**, 32(27), 6351-6361.

Jorgensen LN, Agren MS, Madsen SM, *et al.* (2002) Dose-dependent impairment of collagen deposition by topical granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human experimental wounds. **Ann Surg.** 236:684-692.

Karimi K, Rockwell H. (2019). The benefits of platelet-rich fibrin. **Facial Plastic Surgery Clinics**, 27(3), 331-340.

Lopes RS, Diniz R (2018) Laserterapia. In.: Lopes Rs, Diniz R. **Fisiatria em pequenos animais** 1. Ed. São Paulo: Editora Inteligente, p. 128 132.

Lun S, Irvine SM, *et al.* (2010). A functional extracellular matrix biomaterial derived from ovine forestomach. **Biomaterials**, 31(16), 4517-4529.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Betoni Jr W, Margonar R, Prado MV (2013). Características e particularidades do plasma rico em fibrina (L-PRF) na regeneração óssea. **ImplantNews**, 355-361.

MacPhail CM (2015) Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: Fossum TW. Cirurgia de pequenos animais. **Elsevier Brasil**, Cap. 16, 2015.

Malagutti W, Kakiyara CT (2014). Curativos, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional. **Rev. Eltr. Enferm** (pp. 637-637).

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG (1971). Effect of laser rays on wound healing. **The American Journal of Surgery**, 122(4), 532-535.

Naterstad IF, Rossi RP, Marcos RL, Parizzoto NA, Frigo L, Joensen J, Martins PSL, Bjordal JM, Lopes-Martins RAB (2018). Comparison of photobiomodulation and anti-inflammatory drugs on tissue repair on collagenase-induced Achilles tendon inflammation in rats. **Photomedicine and laser surgery**, 36(3), 137-145.

Nelson G, Kucheryavenko O, Wordsworth J, Von Zglinicki T (2018) The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. **Mechanisms of ageing and development**, 170, 30-36.

Noronha LD, Schulz RT, Martins VDM, Auersvald A, Graf R (2001). Estudo comparativo das alterações histológicas imediatas causadas pelo uso do laser de CO₂ e do laser de erbium na pele de ratos wistar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 37, 273-278.

Oliveira CAS (2017). **Reabilitação Física de Cães com Doença Ortopédica no Membro Pélvico**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa.

Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. **The Journal of cell biology**, 137(6), 1445-1457.

Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM, Quirynen M. (2018). Leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. **Platelets**, 29(5), 468-475.

Pravin AJS, Sridhar V, Srinivasan BN. (2016). Autologous platelet rich plasma (PRP) versus leucocyte-platelet rich fibrin (L-PRF) in chronic non-healing leg ulcers--a

randomised, open labelled, comparative study. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, 5(102), 7460-7463.

Pretel H (2008) **Reparação tecidual pulpar sob ação bioestimuladora do laser de baixa intensidade (LILT), e do diodo emissor de luz (LED): estudo em macacos prego..** Tese de doutorado em Odontologia, Unesp, Araraquara.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT (2007). Effect of low-level laser therapy on bone repair: Histological study in rats. **Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, 39(10), 788-796.

Pryor B, Millis DL (2015) Therapeutic laser in veterinary medicine. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, 45(1), 45-56.

Qiu Y, *et al.* (2023). Bacterial exclusion and wound healing potential of horizontal platelet-rich fibrin (H-PRF) membranes when compared to 2 commercially available collagen membranes. **Clinical oral investigations**, 27(8), 4795-4802.

Ribeiro MS, Zezell DM (2011). Laser em baixa intensidade. In: Maio M (ed.). **Tratado de Medicina Estética**. 2 ed.. São Paulo, SP: Roca Ltda, p. 945-953.

Santos CFF, Santos AP, *et al.* (2013) Cicatrização de feridas cutâneas em ratos após terapia laser de baixa intensidade (660nm). **Rev Voz dos Val**, 3, 1-13.

Shashank B, Bhushan M. (2021). Injectable platelet-rich fibrin (PRF): the newest biomaterial and its use in various dermatological conditions in our practice: a case series. **Journal of cosmetic dermatology**, 20(5), 1421-1426.

Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. **New England journal of medicine**, 341(10), 738-746.

Solmaz H, Ulgen Y, Gulsoy M. (2017). Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. **Lasers in medical science**, 32, 903-910.

Rodrigues GP (2022). **Hemoderivados rico em plaquetas na oftalmologia veterinária de pequenos animais: revisão da literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária, Unesp, Botucatu.

Soares CS, Dias IR, Pires MA, Carvalho PP (2021). Canine-origin platelet-rich fibrin as an effective biomaterial for wound healing in domestic cats: A preliminary study. **Veterinary Sciences**, 8(10), 213.

Tacon KCB, Santos HCO, Parente LML, Cunha LCD, Lino-Júnior RDS, Ribeiro-Rotta RF, Tacon FSA, Amaral WND. (2011). Healing activity of laser InGaAlP (660nm) in rats. **Acta cirurgica brasileira**, 26, 373-378.

Tsai HC, Chang GRL, Fan HC, Ou-Yang H, Huang LC, Wu SC, Chen CM (2019) A mini-pig model for evaluating the efficacy of autologous platelet patches on induced acute full thickness wound healing. **BMC veterinary research**, 15, 1-13.

Wardlaw JL, Gazzola KM, Wagoner A, Brinkman E, Burt J, Butler R, Gunter JM, Senter LH (2019) Laser therapy for incision healing in 9 dogs. **Frontiers in veterinary science**, 5, 349.

Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT (1994) The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. **Science**, 266(5186), 819-822.

Xu J, Clark RA (1996) Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. **The Journal of cell biology**, 132(1), 239-249.

Zimin AA, Zhevago NA, Samoilova KA (2008) 113 Low Power Visible and Near Ir Light in Clinical Oncology. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, (5), S37-S38.