

## Utilização de Fator de Crescimento Vascular Endotelial recombinante tópico na cicatrização por segunda intenção em ratos de laboratório

Amanda Schnorr<sup>1</sup>, Angela Dal Pizzol Leite<sup>1</sup>, Fernanda Braga Seganfredo<sup>1</sup>, Mauro Thome Lopes<sup>1</sup>, Ricardo Mattheus Almeida<sup>1</sup>, Ricardo Wischral Bastos<sup>1</sup>, Anderson Ricardo Ingracio<sup>2</sup>, Jefferson Luis Braga da Silva(orientador)<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, PUCRS, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, <sup>3</sup>Faculdade de Medicina e Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS

### Resumo

#### Introdução

A fisiologia cicatricial envolve, reconhecidamente, uma ampla gama de substâncias endógenas que agem associadamente com o objetivo de propiciar a reconstituição dos tecidos. Porém, todo o processo está exposto a fatores- patologias, condições do paciente ou, até mesmo, fatores externos- que podem afetar negativamente a cicatrização das feridas <sup>1,2</sup>.

Com a preocupação de acelerar e qualificar o processo cicatricial esforços têm sido feitos para agir na fisiologia da cicatrização de forma positiva. O conhecimento de que as plaquetas possuem ação secretória de inúmeros fatores de crescimento, como PGDF (platelet-derived growth factor), TGF –  $\beta$  (transforming growth factor –  $\beta$ ), EGF (platelet-derived epithelial growth factor), PF<sub>4</sub> (platelet-derived angiogenesis factor) e PAF (platelet-activating factor), grande parte agindo na cascata de cicatrização, faz-se atentar para o papel destas células no objetivo proposto. A utilização de um composto concentrado desses fatores criou os conceitos de plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrina (PRF), compostos que, aplicados na ferida, potencializariam a fisiologia cicatricial basal<sup>3-11</sup>.

A obtenção de fatores de crescimento humanos recombinantes, em especial através da terapia gênica, permite a utilização isolada ou associada destes inúmeros peptídeos no processo de cicatrização <sup>12-13</sup>. Autores têm proposto a utilização de fatores de crescimento recombinantes de maneira tópica em feridas de modelos experimentais, a fim de mimetizar ação esperada do PRP e PRF e possibilitar melhor cicatrização de feridas<sup>14-16</sup>.

Estabelecida segurança e viabilidade dos fatores de crescimento recombinantes em utilização tópica, obter-se-ia importante instrumento terapêutico para as feridas de difícil cicatrização a ser testada também em humanos.

O objetivo geral do projeto é, portanto, comparar o efeito da utilização ou não do Fator de Crescimento Vascular Endotelial recombinante (rVEGF) tópico na cicatrização por segunda intenção no dorso de ratos Wistar.

## **Metodologia**

Estudo experimental animal com doze ratos Wistar entre 8 a 10 semanas, com aproximadamente 250 g, os quais serão divididos em dois grupos. Os dois grupos serão anestesiados, tricotomizados e sob técnica asséptica, submetidos a punch de pele em diâmetro total de 6 mm. Um dos grupos terá a ferida unicamente tratada com creme excipiente e ocluída com curativo Tegaderm<sup>f</sup>. No segundo grupo, cada rato terá aplicação tópica de rVEGF e creme excipiente diretamente na ferida. Após, a oclusão será idêntica ao grupo anterior.

Quatro momentos distintos serão instituídos: 0 – ato da biópsia; 3 – 3 dias após a biópsia; 7 – 7 dias após a biópsia; 15 – 15 dias após a biópsia. As feridas serão fotografadas nos quatro momentos, com máquina fotográfica digital da marca Samsung, 9 megapixels, utilizando-se flash e macro para todas, em ângulo paralelo à bancada/dorso dos ratos, de forma standardizada em todos momentos. Nos dias 3, 7 e 15, dois ratos de cada grupo serão novamente anestesiados e biopsiados por punch de 6 mm na mesma região da ferida.

Após realizadas as fotografias e biópsias, os ratos serão sacrificados.

## **Resultados**

As fotos das feridas serão analisadas pelo software Image J<sup>f</sup> e a área cruenta medida em milímetros quadrados. As biópsias serão marcadas e coradas (Hematoxilina-eosina, picrosirius e técnica imunohistoquímica para colágeno I e III). A densidade capilar, densidade de colágeno e quantificação por campo de aumento de colágeno tipos I e III serão obtidos.

Esperamos constatar se a concentração capilar e de colágeno tipos I e III nas biópsias das feridas dos ratos realmente é maior com a utilização de rVEGF tópico em comparação com as feridas sem tratamento. Além disso, pretendemos analisar se o fechamento das feridas, por cicatrização secundária, com aplicação de rVEGF tópico realmente é mais eficiente e mais rápido em relação ao fechamento das feridas sem tratamento.

## Referências

1. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Reparo de tecidos: Crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: Robbins – Patologia estrutural e funcional. 6ª Ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. Pags 79-100.
2. Mélega JM, Freitas AG. Biologia da cicatrização. In: Cirurgia Plástica Fundamentos e Arte – Princípios Gerais. São Paulo : Medsi. 2002. Pags 09-14.
3. Santos MD, Deus Santos MD. O sangue e a medula óssea. In: Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento – das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo : Livraria Santos. 2004. Pags 3-44.
4. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-Rich Plasma: A Review of Biology and Applications in Plastic Surgery. *Plast.Reconstr. Surg.* 2006 : 118: 147e-159e.
5. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1502-1508.
6. Sclafani AP, Romo III T, Ukrainsky G, McCormick SA, Litner J, Kevy SV, Jacobson MS. Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate. *Arch Facial Plast Surg.* 2005;7:163-169.
7. Chandra RK, Handorf C, West M, Kruger EA, Jackson S. Histologic effects of autologous platelet gel in skin flap healing. *Arch Facial Plast Surg.* 2007;9(4):260-263.
8. Hom DB, Linzie BM, Huang TC. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg.* 2007; 9 : 174-183.
9. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promotion effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 122 : 1352-1360.
10. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004; 91(1):4-15.
11. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology.* 2009; 27 : 158 – 167.
12. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Gene Therapy and Wound Healing. *Clin Dermatol.* 2007 ; 25(1): 79-92.
13. Cheng B, Liu HW, Fu XB, Sun TZ, Sheng ZY. Recombinant human platelet-derived growth factor enhanced dermal wound healing by pathway involving ERK and c-fos in diabetic rats. *J. Dermatol Sci* (2007) 45, 193—201.
14. Kwon YB, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Baek RM, Kim JY, Kweon JY, Lee KG, Park YH, Lee JH. Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. *J. Vet. Sci.* (2006), 7(2), 105–109.
15. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC. Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *Am J Pathol* 2004, 164:1935–1947).
16. Ryu SH, Kim YH, Lee SW, Hong JP. The Preventive Effect of Recombinant Human Growth Factor(rhEGF) on the Recurrence of Radiodermatitis. *J. Radiat. Res.*, 51, 511–517 (2010).