



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

VANESSA BELEBECHA

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS SOBRE A  
ADERÊNCIA ABDOMINAL E O ESTRESSE OXIDATIVO NO  
IMPLANTE DE TELAS DE POLIPROPILENO EM COELHOS**

VANESSA BELEBECHA

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS SOBRE A  
ADERÊNCIA ABDOMINAL E O ESTRESSE OXIDATIVO NO  
IMPLANTE DE TELAS DE POLIPROPILENO EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, para o exame de qualificação do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida.

Co-orientadora: Prof. Dra. Rúbia Casagrande.

Londrina  
2016

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B428e Belebecha, Vanessa.

Efeito do plasma rico em plaquetas sobre a aderência abdominal e o estresse oxidativo no implante de telas de polipropileno em coelhos / Vanessa Belebecha. - Londrina, 2016.  
62 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida Almeida.

Coorientador: Prof. Dra. Rúbia Casagrande.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Aderências teciduais - Teses. 2. Inflamação - Teses. 3. Coelho - Teses. 4. Estresse oxidativo - Teses. I. Almeida, Silvio Henrique Maia de Almeida. II. Casagrande, Rúbia . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616.33/.34-089

VANESSA BELEBECHA

**EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS SOBRE A  
ADERÊNCIA ABDOMINAL E O ESTRESSE OXIDATIVO NO  
IMPLANTE DE TELAS DE POLIPROPILENO EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, para o exame de qualificação do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Freitas Rodrigues  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr.  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 02 de junho de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Esse trabalho foi concebido com a colaboração direta ou indireta de muitas pessoas, sem as quais jamais poderia ser realizado.

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus que me sustentou durante o desenvolvimento deste trabalho, me concedendo força, paciência e capacidade.

Aos meus pais e irmãs pelo apoio.

Às alunas Suzana Fonseca e Daniele Matiel pela ajuda na realização do experimento.

À professora Rubia Casagrande, que colaborou grandiosamente no experimento e em sua análise.

Ao colega patologista Jefferson Crespigio pela colaboração com as lâminas.

Ao Sr. Isaltino Farias e ao veterinário Donizete Rodrigues Belitardo pelo cuidado com os animais e auxílio nas cirurgias do experimento.

O meu agradecimento, em especial, ao Dr. Silvio H. M. Almeida, meu orientador. Agradeço toda a paciência, disposição e orientação. Obrigada por me dar forças quando estava desanimada, me ajudando a chegar até aqui.

Agradeço aos membros da banca aqui presentes, pela atenção e contribuição com seus conhecimentos para enriquecer esse trabalho.

BELEBECHA, Vanessa. **Efeito do plasma rico em plaquetas sobre a aderência abdominal e o estresse oxidativo no implante de telas de polipropileno em coelhos**. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

**Introdução:** A tela de polipropileno é usada em uroginecologia e para correção de hérnias, devido sua boa incorporação e acessibilidade, porém pode causar aderências viscerais, erosões e extrusões. Telas compostas ou envoltas em substâncias estimuladoras da incorporação são tentativas de diminuir essas complicações, ocasionadas por dificuldades cicatriciais. Assim, como o plasma rico em plaquetas (PRP) melhora a cicatrização de feridas e é disponível com baixo custo, propõe-se recobrir as telas de polipropileno com PRP para avaliar a diminuição das aderências e do estresse oxidativo. **Métodos:** Estudo experimental com 27 coelhos adultos New Zealand. Implantou-se em um lado da cavidade abdominal telas de polipropileno recobertas com PRP e do outro lado sem PRP. Três coelhos serviram de grupo Sham, sacrificados aos 60 dias. Após eutanásia com 7,30 e 60 dias, um patologista, desconhecendo os grupos de estudo, avaliou a área do infiltrado celular, como forma de controle de infecção. Também avaliou-se a atividade da Mieloperoxidase (medida indireta dos neutrófilos) e atividade da N-acetilglicosaminidase (medida indireta do número de macrófagos); o estresse oxidativo pelo poder antioxidante redutor de ferro e a capacidade em reduzir o radical ABTS (avaliação de antioxidantes inespecíficos), níveis da Glutathione reduzida (antioxidante endógeno específico) e produção de ânion superóxido (radical livre); e o aspecto das aderências (escala de tenacidade e Escala de Diamond) nos grupos com e sem PRP. Utilizou-se os testes estatísticos de Wilcoxon, Kruskal-Wallis e ANOVA. **Resultados:** Não houve diferença estatística na avaliação macroscópica das aderências e na área das células inflamatórias, porém houve diminuição dos parâmetros de resposta inflamatória, através de uma diminuição da MPO e da NAG aos 60 dias; do estresse oxidativo, com um aumento dos antioxidantes aos 60 dias, medidos pelo FRAP, ABTS e GSH; e diminuição dos radicais livres (superóxido) com o uso de PRP aos 7 e 60 dias. **Conclusão:** Embora não tenha havido redução significativa no aspecto macroscópico das aderências, o PRP pode ser útil para diminuir a resposta inflamatória, como demonstraram os resultados da MPO e NAG, e na diminuição do estresse oxidativo, aumentando os antioxidantes e reduzindo o radical livre superóxido.

**Palavras-chave:** Aderências teciduais. Inflamação. Coelho. Estresse oxidativo. Tela. Plasma rico em plaquetas.

BELEBECHA, Vanessa. **Effect of platelet-rich plasma on the adhesions abdominal and oxidative stress in implant polypropylene meshes in rabbits.** 2018. 62 p. Dissertation (Master's Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

**Introduction:** The polypropylene mesh is used for hernia repair, because of its good incorporation and accessibility, however, it can cause intestinal adhesions. Meshes with composed or wrapped stimulatory substances of incorporation are one of the attempts to reduce this complication. The platelet-rich plasma improves the healing of wounds and is available at a low cost. It is proposed to cover the polypropylene mesh with PRP to evaluate the reduction of adhesions and oxidative stress. **Methods:** Experimental study of 27 adult New Zealand rabbits. Polypropylene mesh coated with PRP and the other side without PRP were implemented on the abdominal cavity. Three rabbits served as a sham group, sacrificed at 60 days. After euthanasia with 7,30 and 60 days, a pathologist, unaware of the study groups, assessed the area of the cell infiltrate. Also, we evaluated in the groups with and without PRP, the activity of Myeloperoxidase (indirect measure of neutrophils) and N-acetylglucosaminidase activity (indirect measure of number of macrophages). We measured the oxidative stress by reducing the antioxidant power of iron and ability to reduce the ABTS radical (evaluation of unspecific antioxidants), Glutathione levels reduced (evaluation of unspecific antioxidant) and production of anion superoxide (free radical) and appearance of adhesions (toughness scale and Diamond scale). We used statistical tests of Wilcoxon, Kruskal-Wallis, and ANOVA. **Results:** There was no statistical difference in the macroscopic evaluation of adhesions or the area of inflammatory cells. There was a reduction of inflammatory, with a decrease of MPO and NAG in 60 days; oxidative stress, with an increase of antioxidants also in 60 days as measured by FRAP, ABTS and GSH; and reduction of free radicals (superoxide) by the use of PRP at 7 and 60 days. **Conclusion:** Although there has been no significant decrease in the macroscopic appearance of adhesions, the PRP may be useful to decrease the inflammatory response, as shown by the results of MPO and NAG and also reduce oxidative stress, increasing antioxidants and reducing free radical superoxide.

**Keywords:** Tissue adhesion. Inflammation. Rabbit. Oxidative stress. Mesh. Platelet-rich-plasma.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** –Aspecto macroscópico das cavidades abdominais demonstrando em diferentes momentos da eutanásia as telas e eventuais aderências. ....18
- Figura 2** –Exemplo de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina em aumento de 400 vezes demonstrando o aspecto do infiltrado celular de acordo com grupos com ou sem PRP. Pág. 23
- Figura 3** –Análise da extensão das aderências de acordo com a média obtida na Escala “Diamond modified” (mDs) – Teste de Mann-Whitney. Pág.30
- Figura 4** –Análise da média da tenacidade das aderências – teste de Mann-Whitney.....31
- Figura 5** –Área do infiltrado celular (pixels<sup>2</sup>) nos diferentes tempos de estudo, comparando grupos com e sem PRP. o  $p < 0,05$  – Teste de Mann-Whitney.....31
- Figura 6** –Atividade da mieloperoxidase (MPO) representada pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos separados. [ $*p < 0.05$  sem PRP comparado com o grupo controle;  $\#p < 0.05$  com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey. ....32
- Figura 7** –Atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG) representada pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos separados. [ $*p < 0.05$  sem PRP comparado com o grupo controle;  $\#p < 0.05$  com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey.....33
- Figura 8** –Efeito do PRP no poder antioxidante redutor de ferro, representado pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos separados. [ $*p < 0.05$  sem PRP comparado com o grupo controle;  $\#p < 0.05$  com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey. ....34
- Figura 9** –Efeito do PRP no poder antioxidante redutor de ferro, representado pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos



|  |    |
|--|----|
| separados. [ <sup>#</sup> $p < 0.05$ com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey.....  | 35 |
| <b>Figura 10</b> – Efeito do PRP sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH), representado pela média $\pm$ EPM e relativo a dois experimentos separados. [ <sup>*</sup> $p < 0.05$ sem PRP comparado com o grupo controle; <sup>#</sup> $p < 0.05$ com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey..... | 35 |
| <b>Figura 11</b> – Figura 11 - Efeito do PRP produção de ânion superóxido, e relativo a dois experimentos separados. [ <sup>*</sup> $p < 0.05$ sem PRP comparado com o grupo controle; <sup>#</sup> $p < 0.05$ com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey. ....                                       | 36 |

## ABREVIATURAS E SIGLAS EM ORDEM DE APARIÇÃO NO TEXTO

|          |  |
|----------|--|
| TGF-beta | Fator de crescimento do fator Beta                                       |
| Redox    | Sistemas de redução-oxidação   |
| PRP      | Plasma Rico em Plaquetas   |
| VEGF     | Fator de Crescimento endotelial vascular                                 |
| PDGF     | Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas                               |
| FGF      | Fator de crescimento de fibroblasto                                      |
| EGF      | Fator de crescimento epidérmico  |
| IL-1     | Interleucina-1   |
| MDs      | Escala “Diamond modificada   |
| MPO      | Mieloperoxidase  |
| NAG      | N- acetilglicosaminidase   |
| FRAP     | Poder antioxidante redutor do ferro                                      |
| CEUA-UEL | Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina |
| HTAB     | Brometo de hexadecil trietil amônio                                      |
| KCl      | Cloreto de Potássio  |
| HCl      | Ácido Clorídrico   |
| TPTZ     | 2,4,6-Tripyridyl-s-triazina  |
| Trolox   | 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromano-2-carboxylic                       |
| ABTS     | Ácido sulfônico 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolina-6                 |
| DBTNB    | Ácido dissulfeto 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)                       |
| TCA      | Ácido tricloroacético  |
| NBT      | Nitroblue tetrazolium  |
| EDTA     | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético                                       |
| DMSA     | Dimetilsulfóxido   |
| HE       | Hematoxilina-eosina  |
| EPM      | Erro padrão da média   |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | INTRODUÇÃO .....   | 12 |
| 2.    | JUSTIFICATIVA .....  | 16 |
| 3.    | OBJETIVOS GERAIS.....  | 16 |
| 4.    | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 16 |
| 5.    | MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 16 |
| 5.1   | Obtenção do PRP .....  | 17 |
| 5.2   | Cirurgia .....   | 17 |
| 5.3   | Avaliação Macroscópica .....   | 18 |
| 5.4   | Avaliação Microscópica .....   | 19 |
| 5.4.1 | Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) .....                            | 20 |
| 5.4.2 | Avaliação da atividade de N- acetilglicosaminidase (NAG) .....                   | 20 |
| 5.4.3 | Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP).....                     | 21 |
| 5.4.4 | Avaliação da capacidade em reduzir o radical ABTS.....                           | 21 |
| 5.4.5 | Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona<br>reduzida (GSH)..... | 22 |
| 5.4.6 | Determinação da produção de ânion superóxido.....                                | 23 |
| 5.5   | Avaliação Histopatológica .....  | 23 |
| 6.    | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 25 |
| 7.    | ARTIGO CIENTÍFICO.....   | 26 |
| 8.    | CONCLUSÕES .....   | 41 |
| 9.    | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 42 |

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de telas em cirurgias é uma prática muito comum, especialmente em uroginecologia e nas correções de hérnias da parede abdominal. As Hérnias são uma complicação comum das cirurgias abdominais com uma incidência de 11-20% (1,2,3). Existem técnicas de reparo primário destas hérnias, mas o uso de telas para a correção destes defeitos alterou significativamente a conduta frente ao tratamento das hérnias. Por permitir reparo livre de tensão, o uso de próteses tem reduzido as taxas de recorrência de mais de 50% para menos de 24% (4,5,6).

As telas reforçam a parede abdominal com formação de tecido cicatricial. As melhores telas são as mais fortes e capazes de induzir mais fibrose, diminuindo as chances de recorrências. Todavia, quanto mais fibrose, maior incidência de dor e retração da tela. Portanto, os melhores resultados são com a escolha do material adequado e da técnica cirúrgica correta. O uso de telas, além de permitir o reparo livre de tensão, possibilita a correção de grandes defeitos herniários, sem as quais seriam de difícil reparo.

Na escolha do tipo de tela, existem algumas características que devem ser consideradas: resistência à tração (devem resistir à pressão intra-abdominal), tamanho dos poros (quanto maior a porosidade melhor, permitindo a infiltração de macrófagos, fibroblastos e conseqüentemente colágeno), baixo peso (menor reação de corpo estranho), biocompatibilidade, elasticidade, baixo índice de retração, risco de infecção e aderências. As telas disponíveis são as sintéticas (multifilamentares, monofilamentares, micro ou macroporosas, simples ou compostas) e os materiais biológicos, como a Aderm (matriz de colágeno acelular derivado da derme humana) ou Surgisis (submucosa do intestino delgado do porco), que apresentam menor resistência mecânica (7,8).

Desde a década de 1990, uma opção para o reparo das hérnias é a via laparoscópica. Esta técnica é viável para a correção de grandes defeitos sem necessidade de grande dissecação dos planos fasciais e musculares. A laparoscopia diminui a morbidade, índices de infecção, seromas e diminui o tempo operatório e de internação (9,10,11). A grande desvantagem desta técnica é que a tela é colocada intraperitoneal, em contato com as alças intestinais, podendo causar intensas aderências.

A malha mais usada em nosso meio, por ser mais acessível, é a de polipropileno. Possui boa resistência tênsil e causa reação inflamatória pronunciada e persistente. Além disso, possui uma estrutura macroporosa que facilita a incorporação por tecido fibroso cicatricial resultando em

reparo mais consistente. Tem a desvantagem de causar aderências quando em contato com o intestino. Estas podem gerar erosões, íleo prolongado e fístulas (12,13,14,15,6).

Aderência é uma fibrose anormal entre superfícies do corpo. Ela se forma quando existe uma lesão na superfície do peritônio, destruindo sua integridade. A partir daí há uma intensa reação inflamatória peritoneal com exsudato fibrinoso, ativação de citocinas pró-inflamatórias e redução da fibrinólise, causando aderências fibrosas (16). Se houver uma fibrinólise adequada não haverá formação de aderências, mas uma resposta inflamatória exacerbada, desregulando a homeostasia entre deposição de fibrina e fibrinólise (3 a 5 dias após a lesão), podendo desencadear as aderências (17). Resulta de infecções, cirurgias, irritação peritoneal e endometriose. Cirurgias abdominais causam aderências em 63-97% dos casos. Estas são a maior causa de obstrução intestinal e podem ocasionar infertilidade, dor abdominal crônica e dificuldades em cirurgias subsequentes. (18,19). Além disso, causam grande elevação nos custos com a saúde pública.

Um fator relacionado com a formação de aderências é o estresse oxidativo, que acontece quando há excesso de radicais livres que não foram controlados pelos antioxidantes. Os radicais livres são átomos ou moléculas que tem elétrons não emparelhados, passível de consegui-los em outras substâncias por meio de oxidação, o que é prejudicial aos tecidos. São altamente reativos. A hipóxia e o trauma cirúrgico aumentam a formação de radicais livres, especialmente o superóxido, predispondo às aderências. Além disso, a hipóxia e o ânion superóxido diminuem os ativadores do plasminogênio, diminuindo assim a atividade fibrinolítica intrínseca do peritônio, favorecendo a formação de bandas fibrosas, as aderências. Uma citocina que aumenta com a hipóxia é o fator de crescimento transformador beta (TGF- beta), que sabidamente favorece as aderências (17).

O termo estresse oxidativo foi definido como uma perturbação no equilíbrio pró-oxidante - antioxidante em favor do primeiro. Este termo descreve as condições quando os principais sistemas de redução-oxidação (redox) celulares, por exemplo: ascorbato, glutathiona, vitamina E, ácido lipóico, nicotinamida adenina dinucleotídeo, são deslocados para o estado oxidado. As células não podem tolerar esta condição por longos períodos sob o risco de ocorrer eventos fisiopatológicos como a oxidação de proteínas, danos no DNA, e oxidação lipídica. Consequentemente, as células conseguem reparar o dano ou morrem por necrose ou por apoptose. Pró-oxidantes abrangem uma ampla variedade de moléculas, incluindo o ânion superóxido radical, peróxido de hidrogênio, radicais peroxi, e peroxinitrito, que muitas vezes ocorrem combinados sob as espécies reativas de oxigênio.

As mudanças desencadeadas pelos radicais oxidados são frequentemente reversíveis e funcionam como sistemas de regulação e de comunicação celular, controlando as respostas

celulares. Essa sinalização contribui para a propagação, ativação e ação de macrófagos e término da resposta inflamatória. Após a estabilização dos macrófagos ativados, esses sinais retornam e limitam a inflamação e a destruição celular.

O aumento do metabolismo celular e da produção de energia são necessários para processos intracelulares como a biossíntese, movimento e transporte, bem como para a sobrevivência da célula. Ocorre proliferação celular e reepitelização a partir dos lados ferida de modo a formar uma barreira (20).

Na maioria dos casos, a complicação no processo cicatricial é devida à inflamação. Essa resulta na formação contínua de metabólitos reativos. Um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes de defesa da célula, leva a uma excessiva produção de metabólitos de oxigênio, gerando uma condição de estresse oxidativo que resulta em peroxidação de lipídeos, quebra de DNA e inativação enzimática (20, 21).

A atividade anti-bacteriana do oxigênio é essencial, e a produção de espécies reativas de oxigênio, é usada por fagócitos, tais como os neutrófilos e macrófagos, na atividade bactericida e na remoção de detritos celulares necróticos. Os níveis de oxigênio também afetam diretamente a taxa e a qualidade do crescimento dos vasos sanguíneos. Em conclusão, espécies reativas de oxigênio são essenciais para os processos de sinalização de fatores de crescimento e processos tais como o recrutamento de leucócitos, motilidade celular, angiogênese e formação de matriz extracelular. Entretanto, esse processo deve ser auto-limitado (21).

A prevenção das aderências pode ser conseguida com a manipulação cuidadosa dos tecidos, meticulosa hemostasia, evitando-se grandes feridas e dissecação desnecessária, com objetivo de diminuir a lesão no peritônio e serosas (19). O revestimento da tela com materiais protetores tem sido surgido para esta finalidade. Este material deve demonstrar poucas reações adversas e complicações, incluindo ausência de reação de corpo estranho ou inflamação, ser ativo na presença de sangue, ser de simples uso e manuseio e ser absorvido espontaneamente. Numerosas substâncias, permanentes ou biodegradáveis, têm sido interpostas formando uma barreira antiaderente entre vísceras e tela/peritônio, mas ainda não foi encontrado um material ideal de custo acessível (6,18,19,22).

O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) em cirurgia tem sido estudado em várias especialidades médicas. Ele é uma porção do plasma com uma concentração de plaquetas, leucócitos e fatores de coagulação superiores ao normal e obtido após centrifugação. As proteínas contidas nos grânulos alfa das plaquetas (fatores de crescimento) possuem uma forte influência nos fenômenos reparatórios das feridas e algumas delas se encontram ausentes em feridas crônicas, evidenciando o papel dessas substâncias na reparação tecidual (23,24,25).

Dentre os fatores de crescimento e quimiocinas liberados dos grânulos alfa das plaquetas estão: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF beta), fator de crescimento epidérmico (EGF), interleucina-1 (IL-1), entre outros. Estes fatores amplificam o reparo das feridas, aumentam sua fase proliferativa, angiogênese e deposição de matriz extracelular, melhorando a cicatrização e regeneração dos tecidos (26,27).

Estudos sugerem que a utilização deste plasma melhora a cicatrização, diminui o processo inflamatório e as taxas de infecção. Outro benefício seria diminuir fístulas, hemorragia e infecção após anastomoses gastrointestinais (28).

Outros usos inovadores são em implantes sintéticos em ortopedia e odontologia e na fixação de telas em herniorrafias, acelerando o processo de cicatrização (29). Ainda existem poucos estudos avaliando o efeito do PRP nas hérnias ventrais (26)

Existem protocolos bem estabelecidos de obtenção do PRP com baixo custo e com uso de equipamentos básicos, possibilitando sua utilização cotidiana nas diversas áreas do tratamento da saúde (30,31). Sabe-se que nestes protocolos eleva-se a concentração plaquetária em até quatro vezes, mas ainda não é conhecida a concentração ideal para melhor reparo de feridas (23).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Diante da necessidade de materiais sintéticos mais acessíveis e com menor risco de complicações para uso intraperitoneal; e das poucas pesquisas usando o PRP com esses fins, este estudo propõe o uso deste material autólogo em telas de polipropileno, estudando sua relação com as aderências, reação inflamatória e estresse oxidativo.

## **3. OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar o efeito do PRP na diminuição das aderências macroscópicas em telas de polipropileno implantadas na parede abdominal de coelhos;

Analisar parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo com o uso de PRP; em telas de polipropileno implantadas na parede abdominal de coelhos;

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliação do efeito do PRP sobre a tenacidade e extensão das aderências macroscópicas, através da Escala “Diamond modified” (“mDs);

Avaliação do efeito do PRP sobre os de parâmetros inflamatórios através da atividade da mieloperoxidase (MPO) e atividade de N- acetilglicosaminidase (NAG).

Avaliação do efeito do PRP sobre o estresse oxidativo através da avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP), dos níveis do antioxidante endógeno glutationa reduzida (GSH), da capacidade de redução do radical ABTS e determinação da produção do ânion superóxido.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

Estudo experimental com 27 coelhos da raça White New Zealand com peso médio de 2.918 gramas (6 meses de idade), mantidos no biotério do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina isogênicos e obtidos do biotério central do Curso de Zootecnia da



Universidade Estadual de Maringá. Eles foram alojados em gaiolas individuais, em condições ideais de temperatura, umidade e luz, sendo alimentados com ração específica e água. Tais animais foram observados por trinta dias, anteriormente ao início do estudo, a fim de excluir doenças próprias desta espécie. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEL), processo 7798.2014.03 (anexo I).

Para a definição das etapas do experimento e do número de animais realizou-se um projeto piloto.

### **5.1 Obtenção do PRP**

Para a obtenção do PRP utilizou-se o protocolo descrito por Anitua et al, citado por Macedo et al. (25). Após anestesia com Quetamina 40mg/kg e Xilasina 3mg/Kg, coletou-se 5 ml de sangue por punção cardíaca dos animais (devido ao grande volume relativo ao peso dos animais), com seringa agulhada descartável e transportou-se o sangue para um tubo de polipropileno estéril de 1,8mL (BD Vacutainer®, Estados Unidos) contendo 0,10 mL de citrato de sódio 3.2% como anticoagulante (no mesmo ato cirúrgico do implante das telas). Após a homogeneização, o tubo foi centrifugado (Fanem Ltda., Brasil) a 1200rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foi possível distinguir duas camadas no tubo, as hemácias ao fundo e o plasma sobrenadante. Removeu-se 1,2 mL do plasma com pipeta graduada e depositou-se em tubo tipo Ependorf de plástico estéril, onde foi novamente centrifugado a 2000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao material restante adicionou-se 5 µL (0.005mL) de gluconato de cálcio a 10% estéril (Ariston®, Brasil) e homogenizou-se por 15 minutos, adquirindo a consistência de gel.

### **5.2 Cirurgia**

Após a obtenção do plasma, com os coelhos anestesiados, realizou-se à tricotomia abdominal, e administração de Penicilina intramuscular. A cirurgia consistiu de incisão mediana abdominal, diérese até cavidade e implante das telas. Criou-se um defeito da parede abdominal de modo que a malha ficou na interface entre o peritônio e as alças intestinais. Em cada um dos animais, foram implantadas duas telas: do lado direito a tela com PRP e do esquerdo sem o plasma; sem a fixação das telas na parede abdominal. Depois se realizou a síntese por planos, da aponeurose com algodão 2.0 e da pele com Nylon 4.0. O gel de PRP foi espalhado na face peritoneal da tela em toda a sua extensão.

Após o procedimento cirúrgico e a recuperação da anestesia, os coelhos foram levados ao biotério da instituição, em suas gaiolas, onde permaneceram sob condições ideais (temperatura, umidade, luz, alimentação), até o momento do sacrifício com a analgesia adequada.

Os três primeiros coelhos serviram de controle, sendo submetidos somente à laparotomia mediana e fechamento por planos, sem inserção de tela, sendo sacrificados aos 60 dias.

Dos 24 restantes, 10 ficaram 30 dias com a tela, 10 por 60 dias e 4 permaneceram 7 dias com a tela. Após os dias determinados, os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina, sofreram eutanásia com Cloreto de Potássio 19,1% (2 ml) intracardíaco. Ocorreram casos de infecção respiratória e pneumotórax na punção. Não houve nenhuma infecção abdominal ou de ferida operatória. As perdas foram substituídas por outros animais. Após a eutanásia realizou-se a abertura do abdome em “U” e retirada das camadas da parede abdominal com as telas em bloco para análise macroscópica das aderências e microscópica da resposta inflamatória. Os coelhos controles também foram submetidos ao mesmo procedimento, só que com a retirada de parte de tecido muscular e do peritônio para análise microscópica.

### **5.3 Avaliação Macroscópica**

Para a análise macroscópica foi usada a tenacidade das aderências, que embora seja subjetiva, é bastante utilizada (32,33,34,35,36,37,38). A graduação foi: 0= sem aderência; 1= a tela solta facilmente dos tecidos ao redor; 2= a tela solta dos tecidos com tração manual; 3= solta com dissecação roma; e 4= solta com dissecação fina. Também foi usada a Escala “Diamond modified” (“mDs”) que divide os graus de adesão de acordo com a sua extensão da área observada (neste caso da tela): grau 0= 0%; grau 1= 1-25%; grau 2= 26-50%; grau 3= 51-75% e grau 4, >75% (9, 27). Esta avaliação foi feita no momento da retirada das telas, aos 30 e 60 dias, nos grupos de estudo.

A figura 1 apresenta imagens da abertura da cavidade abdominal no momento da eutanásia, de animais controle e com implante das telas, nos diferentes tempos do estudo.

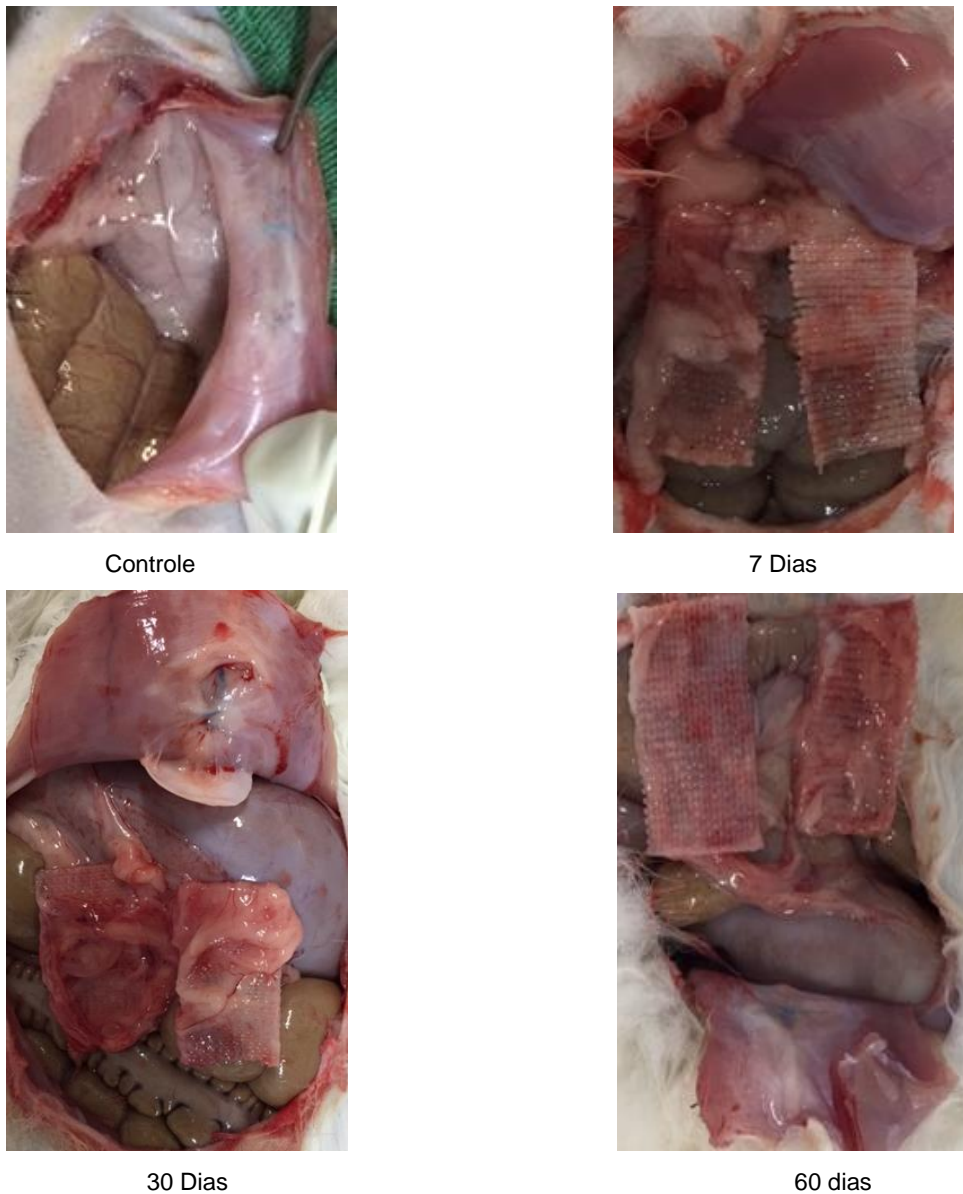


Figura 1 – Aspecto macroscópico das cavidades abdominais demonstrando em diferentes momentos da eutanásia um animal controle e animais com telas e eventuais aderências.

#### 5.4 Avaliação Microscópica

A análise microscópica consistiu na avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. Esta análise foi feita com o material retirado no dia da eutanásia (tela + tecido cicatricial aderido à tela). E através de solubilização coletou-se o tecido dos interstícios da tela.

Os parâmetros inflamatórios foram: a atividade da mieloperoxidase (MPO) e atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG). E os parâmetros de estresse oxidativo foram: a avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP), avaliação dos níveis do antioxidante endógeno

glutationa reduzida (GSH), avaliação da capacidade de redução do radical ABTS e determinação da produção do ânion superóxido. Todos estes métodos estão descritos abaixo.

#### **5.4.1 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A quantificação da migração de neutrófilos foi determinada indiretamente pela atividade da MPO, uma enzima oxidorrredutora do peróxido de hidrogênio encontrada em grânulos de leucócitos, predominantemente em neutrófilos. Neste método, a MPO catalisa a oxidação do substrato *o*-dianisidina, resultando em um composto colorido que é detectado espectrofotometricamente em 540 nm (39,40).

As amostras foram coletadas em microtubos contendo 400 µL de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,0) com 0,5% de brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB) e mantidas a -80 °C até o uso. Para realização do ensaio, as amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogenizador Tissue-Tearor (Biospec®). O homogenado foi centrifugado a 16.100 g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio.

Em microplaca de 96 poços, foi adicionado alíquota do sobrenadante das amostras (30 µL). A reação colorimétrica inicia-se pela adição de 200 µL de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (pH 6,0), 0,0167 % de *o*-dianisidina e 0,05% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água deionizada. Após 20 minutos de reação a atividade da MPO das amostras foi determinada em 450 e comparada com uma curva padrão de neutrófilos de concentração conhecida.

A curva padrão foi preparada na mesma placa com a adição de 100 µL de tampão fosfato 0,05 M e uma solução contendo 200.000 neutrófilos no primeiro poço (A1) com posterior diluição seriada até o décimo primeiro poço (A11). O décimo segundo poço (A12) foi utilizado como branco ao qual foi adicionado apenas 200 µL de água deionizada. Foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (41). Os resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos/ µg de proteína).

#### **5.4.2 Avaliação da atividade de N- acetilglicosaminidase (NAG)**

Para avaliar a infiltração de células mononucleares em um determinado tecido, especialmente de macrófagos, é possível avaliar a atividade da enzima N-acetilglicosaminidase, uma enzima presente em macrófagos. Esta enzima está presente no lisossomo dos macrófagos ativados e pode ser facilmente quantificada conforme propõem Bailey (1988).

As amostras foram coletadas em tampão fosfato 50mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio e homogeneizadas com auxílio do turrax. O homogenado foi centrifugado a 16.100 g por 2 min. 20µL do sobrenadante de cada amostra foi misturado com 100µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida (0,767 mg/mL), diluído em tampão citrato 50mM (pH 4,5). As amostras foram incubadas por 10 minutos. Após a reação, 100 µL de tampão glicina 0,2M foram adicionados às amostras para paralisar a reação. A leitura da absorbância foi realizada a 400nm. A atividade de NAG das amostras foi comparada com uma curva padrão de macrófagos. Foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (41). Os resultados foram expressos em números de macrófagos totais/ µg de proteína (42).

#### **5.4.3 Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP)**

O método FRAP foi realizado para avaliar o poder antioxidante de redução férrica. As amostras foram coletadas em microtubos contendo 500 µL de KCl 1,15%. Para a realização do ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio de triturador (Tissue-Tearor, Biospec). Em seguida, foram centrifugadas a 1.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para a análise. O reagente de FRAP foi preparado como segue: 2,5 mL de uma solução de 2,4,6-Tripyridyl-s-triazina (TPTZ) 10 mM em ácido clorídrico (HCl) 40 mM foram adicionados a 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6). Esta solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos antes do uso. Para a reação foram utilizados 30 µL do sobrenadante e 1 mL de reagente FRAP preparado.

A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e posteriormente foi realizada a leitura em 595 nm. Foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Uma curva analítica com diferentes concentrações de ácido 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromano-2-carboxylic (trolox) (0,01-20 nmol) foi preparada e utilizada para posterior cálculo dos resultados em nmol equivalente de trolox/ µg de proteína (43,40).

#### **5.4.4 Avaliação da capacidade em reduzir o radical ABTS**

O ensaio é baseado na diminuição da absorvância devido à doação de elétrons ao radical ácido sulfônio 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolina-6) (ABTS) (43).

As amostras foram coletadas em microtubos contendo 500 µL de KCl 1,15%. Para a realização do ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio de triturador (Tissue-Tearor, Biospec). Em seguida, foram centrifugadas a 1.000 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi retirado para a análise. A solução ABTS foi preparada em meio aquoso e o cátion ABTS foi obtido após a reação de 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em geladeira por no mínimo 16 horas antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até uma atingir absorvância de 0,7 a 0,8 em 730 nm. Para a reação foi adicionado 7 µL do sobrenadante a 200 µL de solução de ABTS preparada.

A reação foi incubada por 6 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em 730 nm. Foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (34). Uma curva analítica com diferentes concentrações de trolox (0,01-20 nmol) foi preparada e utilizada para posterior cálculo dos resultados em nmol equivalente de trolox/ µg de proteína ( 40,43).

#### **5.4.5 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH)**

O método baseia-se na detecção do ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico, um composto amarelo, liberado pela quebra da ligação dissulfeto do ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) pelo grupo sulfidril da glutathiona.

As amostras foram coletadas em microtubos e posteriormente diluídas em 600 µL de EDTA 0,02 M e trituradas (Tissue-Tearor, Biospec). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1: 0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para análise.

O ensaio para quantificação dos níveis de GSH foi realizado em microplaca de 96 poços por meio da adição de 50 µL de amostra ao meio reacional contendo 100 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de DTNB em metanol (1,9 mg/mL de metanol). O branco foi preparado com a adição de 50 µL de EDTA 0,02 M ao meio reacional. A absorvância foi determinada após 5 minutos de incubação das amostras no meio reacional a 405 nm. A curva analítica foi preparada com 5 a 150 µM de GSH. Foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (34). Os resultados foram expressos em µM de GSH/ µg de proteína (40).

#### 5.4.6 Determinação da produção de ânion superóxido

A quantificação da produção do ânion superóxido foi realizada usando o ensaio de redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) (44). As amostras foram coletadas em microtubos, homogeneizadas em 600 µL de EDTA 0,02 M com triturador (Tissue-Tearor, Biospec), centrifugadas a 2000 g por 20 segundos e o sobrenadante foi retirado para a análise.

Para a reação 50 µL do sobrenadante foi incubado em placas de 96 poços por 1 hora. Em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente removido e às células fixadas foi adicionado 100 µL de NBT (1 mg/mL). Após 15 minutos o sobrenadante foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 µL de metanol 100% para fixar, 120 µL de KOH 2M e 140 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar as partículas de formazan (NBT reduzido) presentes dentro das células. A redução do NBT foi determinada espectrofotometricamente em 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (OD)/µg de proteína. Foi realizada dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (41).

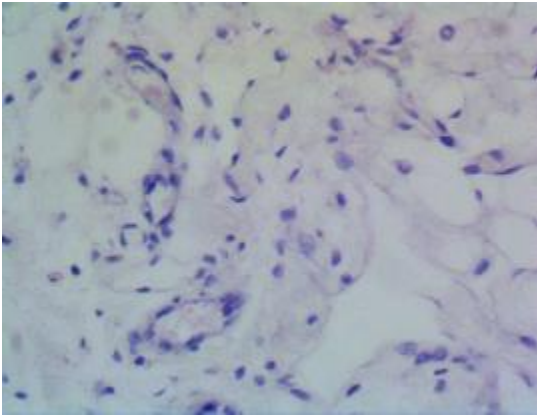
#### 5.5 Avaliação Histopatológica

Também como forma de controle de infecções, além dos sinais clínicos avaliou-se a quantificação do infiltrado inflamatório no implante. Para a quantificação do infiltrado celular no tecido do peritônio, escolheu-se a área de maior densidade inflamatória, fotografando-a no aumento de 400x. Utilizando método de morfometria computadorizada, calculou-se a área total do tecido e determinação da densidade de células inflamatórias, quantificadas em pixels<sup>2</sup> (programa Image J, NIH, Bethesda, MD); e os valores expressos em porcentagem de pixels (pixels das células inflamatórias/pixel total do tecido).

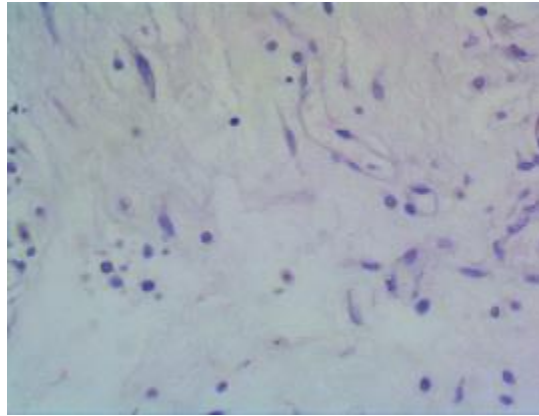
A retirada da amostra (tela e tecido cicatricial ao seu redor) ocorreu de forma asséptica. Preservaram-se as relações anatômicas entre as diversas camadas. Realizou-se a análise macroscópica do tecido, procurando-se evidenciar sinais de eritema, necrose, tumefação e coleções. Não houve sinais clínicos de infecção na ferida ou sinais de extrusão da tela.

Após fixação por 12-24 horas com formaldeído a 10%, as amostras de peritônio foram processadas pelas técnicas tradicionais de inclusão em parafina, realizando cortes histopatológicos de 5 µm, corados pelo método hematoxilina-eosina (HE). As lâminas preparadas foram avaliadas em microscópio óptico (NIKON E-200, Japão) quanto a morfologia dos tecidos e fotografadas com uma câmera (CCD – Samsung, Japão), acoplada ao microscópio.

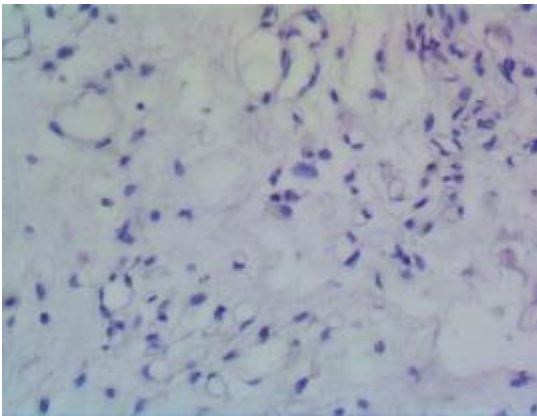
A figura 2 exemplifica lâminas dos grupos com e sem PRP nos diferentes tempos de estudo.



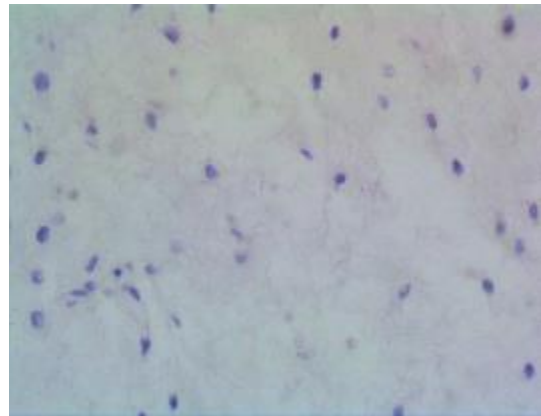
7 dias com PRP



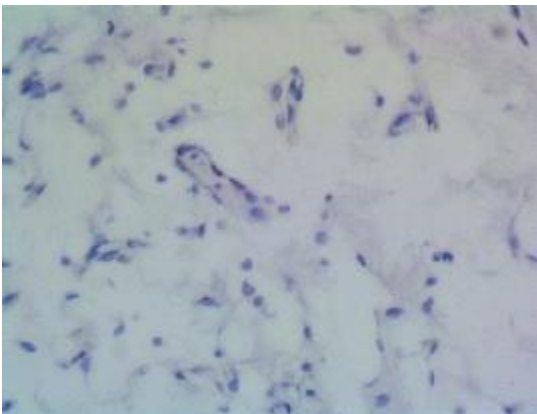
7 dias sem PRP



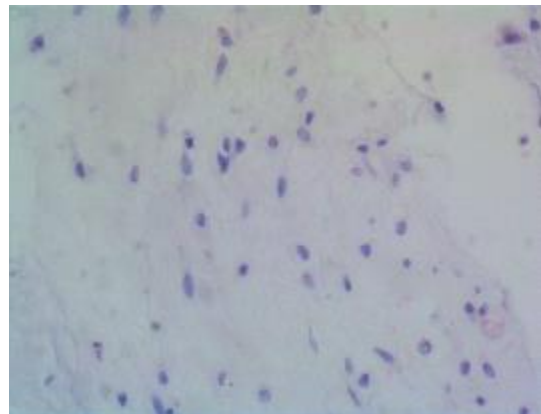
30 dias com PRP



30 dias sem PRP



60 dias com PRP



60 dias sem PRP

Figura 2 – Lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina em aumento de 400 vezes demonstrando o aspecto do infiltrado celular de acordo com grupos com ou sem PRP.



## **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados dos parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com um fator, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo por experimento. As análises foram realizadas usando-se o software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

Já a análise da tenacidade, extensão das aderências e área das células inflamatórias foram avaliadas pelo Teste de Wilcoxon (ou Mann-Whitney) para dados pareados, com exceção da análise da comparação dos grupos com o controle, que foi feita pelo Teste de Kruskal-Wallis, com o software SPSS Statistics, também considerando  $p < 0,05$ .

**Os resultados são demonstrados na forma de artigo científico**

## EFEITO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS SOBRE A ADERÊNCIA ABDOMINAL E O ESTRESSE OXIDATIVO NO IMPLANTE DE TELAS DE POLIPROPILENO EM COELHOS

### RESUMO

**Introdução:** A tela de polipropileno é usada em uroginecologia e para correção de hérnias, devido sua boa incorporação e acessibilidade, porém pode causar aderências viscerais, erosões e extrusões. Telas compostas ou envoltas em substâncias estimuladoras da incorporação são tentativas de diminuir essas complicações, ocasionadas por dificuldades cicatriciais. Assim, como o plasma rico em plaquetas (PRP) melhora a cicatrização de feridas e é disponível com baixo custo, propõe-se recobrir as telas de polipropileno com PRP para avaliar a diminuição das aderências e do estresse oxidativo. **Métodos:** Estudo experimental com 27 coelhos adultos New Zealand. Implantou-se em um lado da cavidade abdominal telas de polipropileno recobertas com PRP e do outro lado sem PRP. Três coelhos serviram de grupo Sham, sacrificados aos 60 dias. Após eutanásia com 7,30 e 60 dias, um patologista, desconhecendo os grupos de estudo, avaliou a área do infiltrado celular, como forma de controle de infecção. Também avaliou-se a atividade da Mieloperoxidase (medida indireta dos neutrófilos) e atividade da N-acetilglicosaminidase (medida indireta do número de macrófagos); o estresse oxidativo pelo poder antioxidante redutor de ferro e a capacidade em reduzir o radical ABTS (avaliação de antioxidantes inespecíficos), níveis da Glutathiona reduzida (antioxidante endógeno específico) e produção de ânion superóxido (radical livre); e o aspecto das aderências (escala de tenacidade e Escala de Diamond) nos grupos com e sem PRP. Utilizou-se os testes estatísticos de Wilcoxon, Kruskal-Wallis e ANOVA. **Resultados:** Não houve diferença estatística na avaliação macroscópica das aderências e na área das células inflamatórias, porém houve diminuição dos parâmetros de resposta inflamatória, através de uma diminuição da MPO e da NAG aos 60 dias; do estresse oxidativo, com um aumento dos antioxidantes aos 60 dias, medidos pelo FRAP, ABTS e GSH; e diminuição dos radicais livres (superóxido) com o uso de PRP aos 7 e 60 dias. **Conclusão:** Embora não tenha havido redução significativa no aspecto macroscópico das aderências, o PRP pode ser útil para diminuir a resposta inflamatória, como demonstraram os resultados da MPO e NAG, e na diminuição do estresse oxidativo, aumentando os antioxidantes e reduzindo o radical livre superóxido.

**Palavras-chave:** aderências teciduais; inflamação; coelho; estresse oxidativo; tela; plasma rico em plaquetas

## EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA ON THE ADHESIONS ABDOMINAL AND OXIDATIVE STRESS IN IMPLANT POLYPROPYLENE MESHES IN RABBITS.

### ABSTRACT

**Introduction:** The polypropylene mesh is used for hernia repair, because of its good incorporation and accessibility, however, it can cause intestinal adhesions. Meshes with composed or wrapped stimulatory substances of incorporation are one of the attempts to reduce this complication. The platelet-rich plasma improves the healing of wounds and is available at a low cost. It is proposed to cover the polypropylene mesh with PRP to evaluate the reduction of adhesions and oxidative stress. **Methods:** Experimental study of 27 adult New Zealand rabbits. Polypropylene mesh coated with PRP and the other side without PRP were implemented on the abdominal cavity. Three rabbits served as a sham group, sacrificed at 60 days. After euthanasia with 7,30 and 60 days, a pathologist, unaware of the study groups, assessed the area of the cell infiltrate. Also, we evaluated in the groups with and without PRP, the activity of Myeloperoxidase (indirect measure of neutrophils) and N-acetylglucosaminidase activity (indirect measure of number of macrophages). We measured the oxidative stress by reducing the antioxidant power of iron and ability to reduce the ABTS radical (evaluation of unspecific antioxidants), Glutathione levels reduced (evaluation of unspecific antioxidant) and production of anion superoxide (free radical) and appearance of adhesions (toughness scale and Diamond scale). We used statistical tests of Wilcoxon, Kruskal-Wallis, and ANOVA. **Results:** There was no statistical difference in the macroscopic evaluation of adhesions or the area of inflammatory cells. There was a reduction of inflammatory, with a decrease of MPO and NAG in 60 days; oxidative stress, with an increase of antioxidants also in 60 days as measured by FRAP, ABTS and GSH; and reduction of free radicals (superoxide) by the use of PRP at 7 and 60 days. **Conclusion:** Although there has been no significant decrease in the macroscopic appearance of adhesions, the PRP may be useful to decrease the inflammatory response, as shown by the results of MPO and NAG and also reduce oxidative stress, increasing antioxidants and reducing free radical superoxide.

**Key-Words:** tissue adhesion; inflammation; rabbit; oxidative stress; mesh; platelet-rich plasma

## INTRODUÇÃO

O uso de telas em cirurgias é uma prática muito comum, especialmente nas correções de hérnias da parede abdominal. Hérnia é definida como uma protusão anormal de um órgão ou tecido através de um defeito nas suas paredes adjacentes. A hérnia incisional é uma complicação comum das cirurgias abdominais com uma incidência de 11-20% (1,2,3). Existem técnicas de reparo primário destas hérnias, mas o uso de telas para a correção destes defeitos, por permitir reparo livre de tensão, tem reduzido as taxas de recorrência de mais de 50% para menos de 24% (4,5,6). Outra opção para o reparo das hérnias é a via laparoscópica, que diminui a morbidade, índices de infecção, seromas e diminui o tempo operatório e de internação (9,10,11). A grande desvantagem desta técnica é a tela ser colocada intraperitoneal. A malha mais usada em nosso meio, é a de polipropileno, que causa aderências quando em contato com o intestino.

Aderência é uma fibrose anormal entre superfícies do corpo podendo gerar erosões, íleo e fístulas (6,12,13,14,15). Ela se forma quando existe uma lesão na superfície do peritônio, com intensa reação inflamatória peritoneal, exsudato fibrinoso, ativação de citocinas pró-inflamatórias e redução da fibrinólise (16). Quando há uma atividade fibrinolítica normal, há cura da lesão peritoneal, porém se houver redução da fibrinólise, há formação de bandas fibrosas entre os órgãos e parede abdominal, que são as aderências (17). São a maior causa de obstrução intestinal, podem causar infertilidade, dor abdominal crônica e dificuldades em cirurgias subsequentes (18,19).

Outro fator relacionado à formação de aderências é o estresse oxidativo, que acontece quando há excesso de radicais livres. A hipóxia presente em cirurgias predispõe à formação destes radicais livres (17,38), principalmente o superóxido. A hipóxia e o superóxido diminuem os níveis de ativadores do plasminogênio e aumentam o TGF-beta, diminuindo assim a fibrinólise e a formação de aderências (17).

Para a prevenção destas aderências sugere-se uma técnica cirúrgica cuidadosa e menos traumática possível. Também o revestimento da tela com materiais protetores, com poucas reações adversas, tem sido proposto. Estas substâncias ficariam entre a tela e as vísceras, mas o material ideal e de custo acessível ainda não foi encontrado (6,18,19,22).

Este estudo sugere o plasma rico em plaquetas (PRP) como um material protetor. Ele é obtido após centrifugação e possui uma concentração superior ao normal de plaquetas, leucócitos e fatores de coagulação. Esta maior concentração plaquetária libera mais fatores de crescimento,

que são importantes na cicatrização tecidual (24,25,26). Trabalhos sugerem que a utilização deste plasma melhora a cicatrização, diminuição do processo inflamatório e diminui as taxas de infecção, fístulas e hemorragias (28). Ele tem sido usado principalmente em enxertos ósseos, mas tem sido proposto que melhora a cicatrização também em tecidos moles (24). Há poucos estudos investigando o efeito do PRP em telas nas hérnias, mas os que existem mostram uma melhora na incorporação das telas, melhora neovascularização e diminuição das recidivas e aderências, entretanto se necessita de mais estudos para entender melhor estes efeitos (26,27). O PRP também pode ter um efeito na diminuição do estresse oxidativo. Existem protocolos bem estabelecidos de obtenção do PRP com baixo custo e com uso equipamentos básicos, possibilitando sua utilização cotidiana nas diversas áreas do tratamento da saúde (23,30,31)

## **MÉTODOS E METODOLOGIA**

Estudo experimental com 27 coelhos da raça White New Zealand com peso médio de 2.918 gramas (6 meses), alojados em gaiolas individuais, em condições ideais de temperatura, umidade e luz, sendo alimentados com ração específica e água. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA-UEL), processo 7798.2014.03. Em cada animal foram implantadas duas telas: de um lado a tela de polipropileno e de outro lado a mesma tela recoberta com o PRP. Criou-se um defeito da parede abdominal de modo que a malha ficou na interface entre o peritônio e as alças intestinais.

Para a obtenção do PRP utilizou-se o protocolo para humanos descrito por Anitua et al, citado por Macedo et al. (26). Após anestesia com Quetamina 40mg/kg e Xilasina 3mg/Kg, coletou-se 5 ml de sangue por punção cardíaca dos animais, que foi transportado para um tubo de polipropileno estéril de 1,8mL (BD Vacutainer®) contendo 0,10 mL de citrato de sódio 3.2% como anticoagulante, no mesmo ato cirúrgico do implante das telas. Após a homogeneização o tubo foi colocado na centrífuga (Fanem Ltda.) e centrifugado a 1200rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foi possível distinguir duas camadas distintas no tubo, as hemácias ao fundo e o plasma sobrenadante. Removeu-se 1,2 mL do plasma com pipeta graduada e depositou-se em tubo tipo Ependorf de plástico estéril, onde foi novamente centrifugado a 2000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ao material restante adicionou-se 5 µL (0.005mL) de gluconato de cálcio a 10% estéril (Ariston®) e homogenizou-se por 15 minutos, adquirindo a consistência de gel.

Após a obtenção do plasma, com os coelhos anestesiados, realizou-se uma incisão mediana abdominal e implante das telas, uma de cada lado, sob o peritônio. Do lado direito a tela com PRP e do esquerdo sem o plasma. Depois foi realizada síntese por planos. Três coelhos serviram de controle, sendo submetidos somente à laparotomia mediana e fechamento por planos, sem inserção de tela. Dos 24 restantes, 10 ficaram 30 dias com a tela, 10 ficaram 60 dias e 4 ficaram 7 dias com a tela. Após os dias determinados, os animais receberam anestesia com Quetamina e Xilasina e sofreram eutanásia com Cloreto de Potássio 19,1% (2ml) intracardíaco. Abriu-se a cavidade abdominal para a retirada das telas e para análise macroscópica das aderências e microscópica da resposta inflamatória. Os coelhos controles também foram submetidos ao mesmo procedimento.

Para avaliar a intensidade das aderências foi usada a análise macroscópica da tenacidade, que, apesar de ser uma medida subjetiva, é uma avaliação amplamente utilizada (32,33,34,35,36,37,38). Graduou-se como 0 sem aderência, 1 solta facilmente dos tecidos ao redor, 2 solta dos tecidos com tração, 3 solta com dissecação romba e 4 solta com dissecação fina. Também foi usada a Escala "Diamond modified" ("mDs") que divide os graus de adesão de acordo com a sua extensão: grau 0, 0% de área de aderência na tela; grau 1, 1-25%; grau 2, 26-50%; grau 3, 51-75% e grau 4, >75% (9, 27). A análise microscópica consistiu na avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. Os parâmetros inflamatórios foram a atividade da mieloperoxidase (MPO), que avalia a atividade dos neutrófilos e a atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG), que avalia os macrófagos. Os de estresse oxidativo foram a avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) e avaliação da capacidade de reduzir o radical ABTS (avalia antioxidantes inespecíficos); avaliação dos níveis do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH), antioxidante endógeno específicos; e determinação da produção do ânion superóxido, que é um radical livre.

Sinais clínicos de infecção nas feridas foram observados e análise histopatológica através da área do infiltrado inflamatório. Após fixação em formaldeído a 10%, as amostras de peritônio foram processadas pela técnica padrão em parafina, realizando cortes histopatológicos de 5 µm e corados pelo método hematoxilina-eosina (HE). As lâminas preparadas foram avaliadas em microscópio óptico (NIKON E-200, Japão) quanto a morfologia dos tecidos e fotografadas com uma câmera (CCD – Samsung, Japão), acoplada ao microscópio. Para a quantificação do infiltrado inflamatório nos tecidos, escolheu-se a área de maior densidade inflamatória, a qual foi fotografada no aumento de 400x. Utilizando método de morfometria computadorizada, foi realizado cálculo de área total do tecido e determinação da densidade de células inflamatórias, quantificadas em pixels<sup>2</sup> (programa Image J, NIH, Bethesda, MD). Foi realizado o cálculo da área marcada relativa à área total e os valores foram expressos em porcentagem de pixels (pixels das células inflamatórias/pixel total do tecido).

Os resultados dos parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo por experimento. Usou-se o software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para  $p < 0,05$ . Já a análise da tenacidade, extensão das aderências e área das células inflamatórias foram avaliadas pelo Teste de Wilcoxon (ou Mann-Whitney) para dados pareados, com exceção da análise da comparação dos grupos com o controle, que foi feita pelo Teste de Kruskal-Wallis, com o software SPSS Statistics, também considerando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A avaliação da tenacidade e da Escala de Diamond das telas após 7, 30 e 60 dias, não mostrou diferença estatística entre os dois grupos (com e sem PRP), como demonstrado nas figuras 3 e 4. A análise da área do infiltrado inflamatório não mostrou diferença entre os dois grupos aos dias 7, 30 e 60 dias, e também na comparação dos controles com os 60 dias (figura 5).

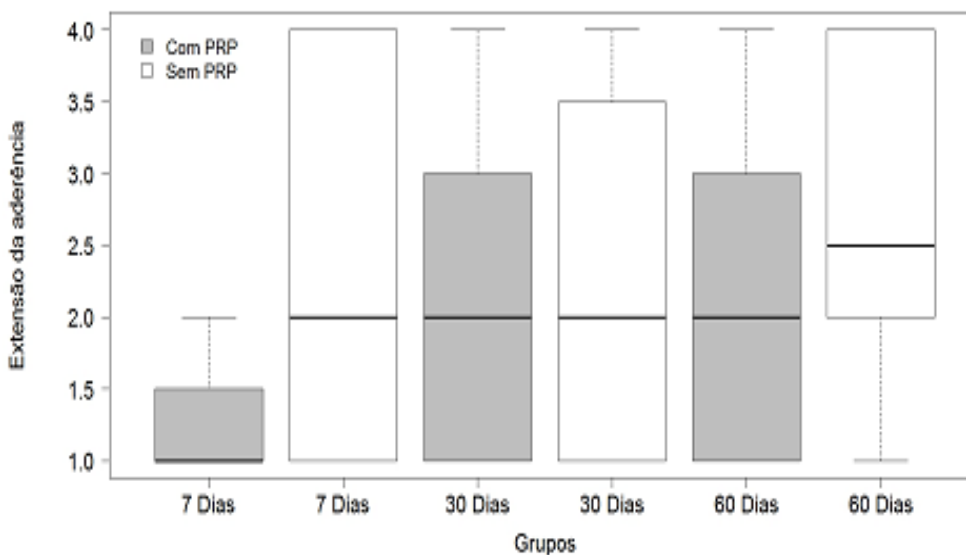


Figura 3 – Análise da extensão das aderências de acordo com a média obtida na Escala “Diamond modified” (mDs) – Teste de Mann-Whitney.

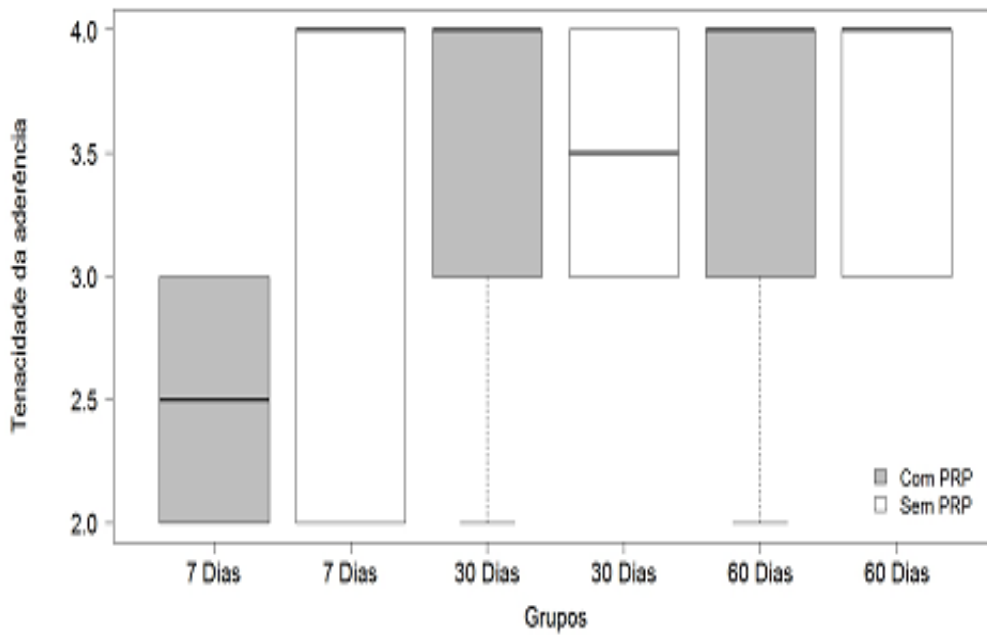


Figura 4 – Análise da média da tenacidade das aderências – teste de Mann-Whitney.

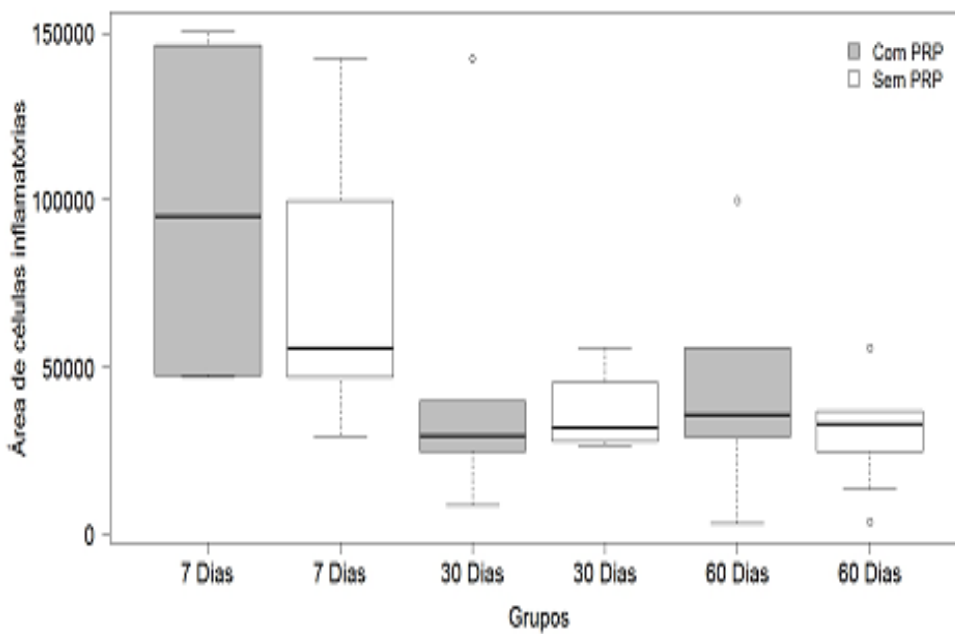


Figura 5 – Área do infiltrado celular (pixels<sup>2</sup>) nos diferentes tempos de estudo, comparando grupos com e sem PRP.

o  $p < 0,05$  – Teste de Mann-Whitney.



A análise dos parâmetros inflamatórios mostrou um aumento dos neutrófilos (medidos indiretamente pela MPO) em 60 dias no grupo sem PRP em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e uma diminuição significativa destas células no grupo com PRP neste mesmo tempo (figura 6)

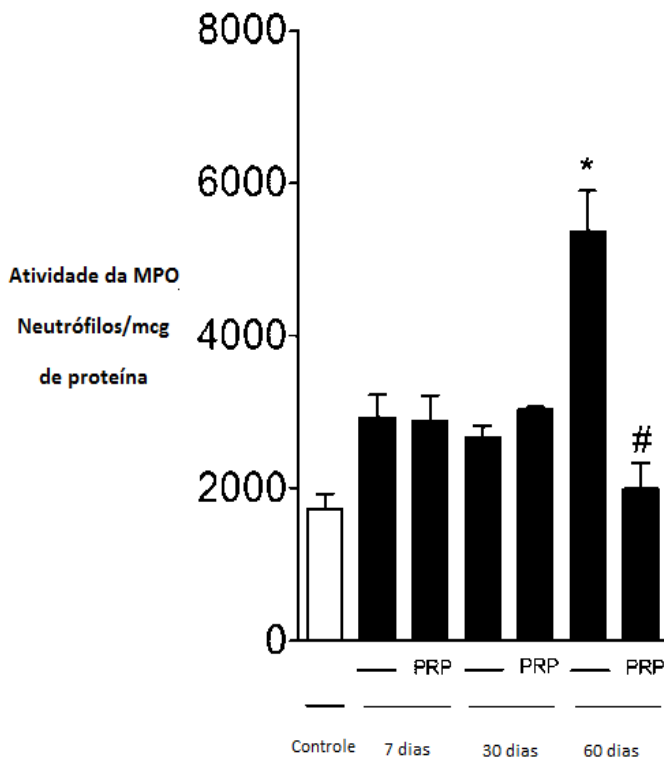


Figura 6 - Atividade da mieloperoxidase (MPO) representada pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos separados. [ $*p < 0,05$  sem PRP comparado com o grupo controle;  $\#p < 0,05$  com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey

A atividade da NAG (avalia indiretamente os macrófagos) aumentou em todos os tempos no grupo sem PRP em relação ao controle, porém teve diminuição no grupo com PRP comparado com o grupo sem PRP no tempo de 60 dias (Figura 7).

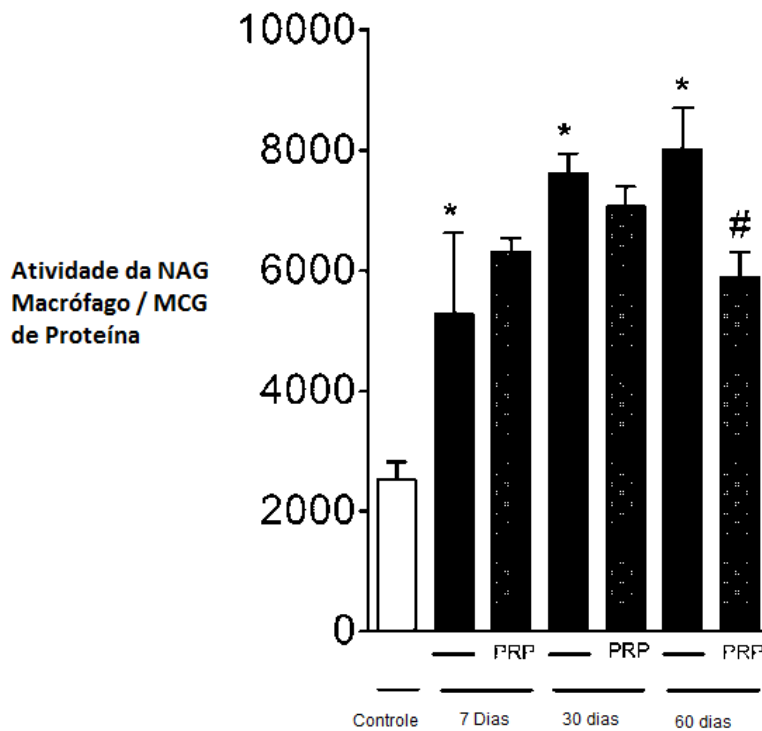


Figura 7 - Atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG) representada pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos separados. [\* $p$ <0.05 sem PRP comparado com o grupo controle; # $p$ <0.05 com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey.

Com relação aos efeitos no estresse oxidativo, as análises mostraram que no grupo com PRP aos 60 dias ocorreu um aumento significativo dos antioxidantes, medidos pela avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) e pela capacidade em reduzir o radical ABTS, (ambos testes são para a avaliação de antioxidantes inespecíficos), demonstrados nas figuras 8 e 9 respectivamente. Também o FRAP encontrou-se reduzido em 60 dias no grupo sem PRP com relação ao controle, mas com PRP apresentou aumento. E também pela determinação do nível do antioxidante endógeno glutathiona reduzida (GSH), apresentado na figura 10.

Avaliou-se também, o ânion superóxido, pela redução do NBT, demonstrando que o grupo sem PRP elevou o superóxido em todos os tempos e que o PRP diminui seus níveis ( $p$ <0,05) nos tempos 7 e 60 dias (figura 11).

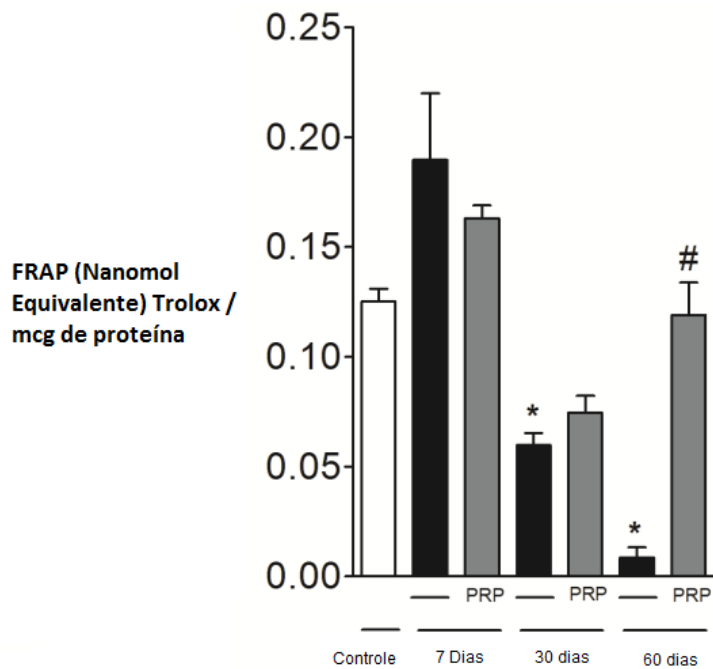


Figura 8 - Efeito do PRP no poder antioxidante redutor de ferro, representado pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos separados. [ $*p < 0.05$  sem PRP comparado com o grupo controle;  $#p < 0.05$  com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey.

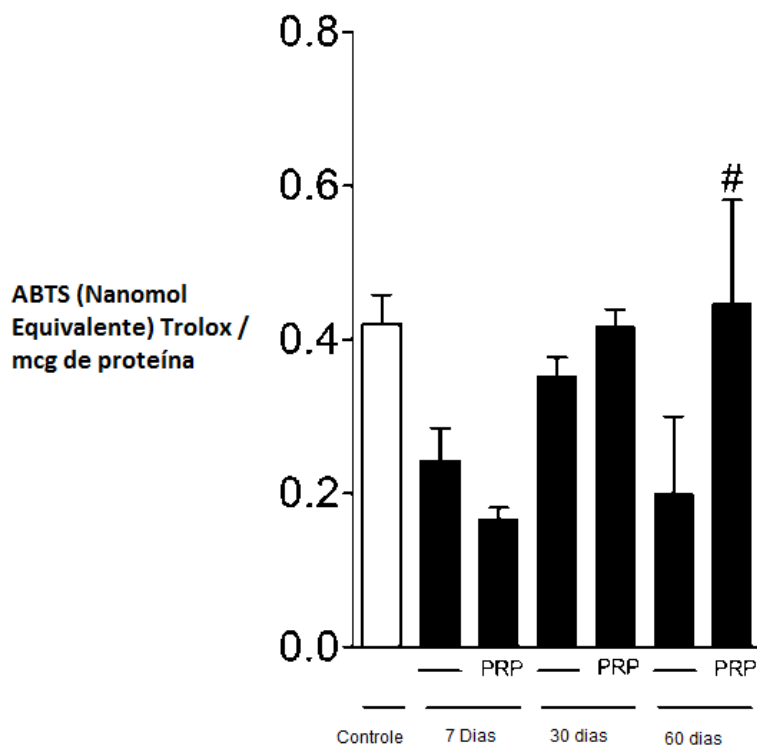


Figura 9 - Efeito do PRP no poder antioxidante redutor de ferro, representado pela média  $\pm$ EPM e relativa a dois experimentos separados. [ $#p < 0.05$  com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey.

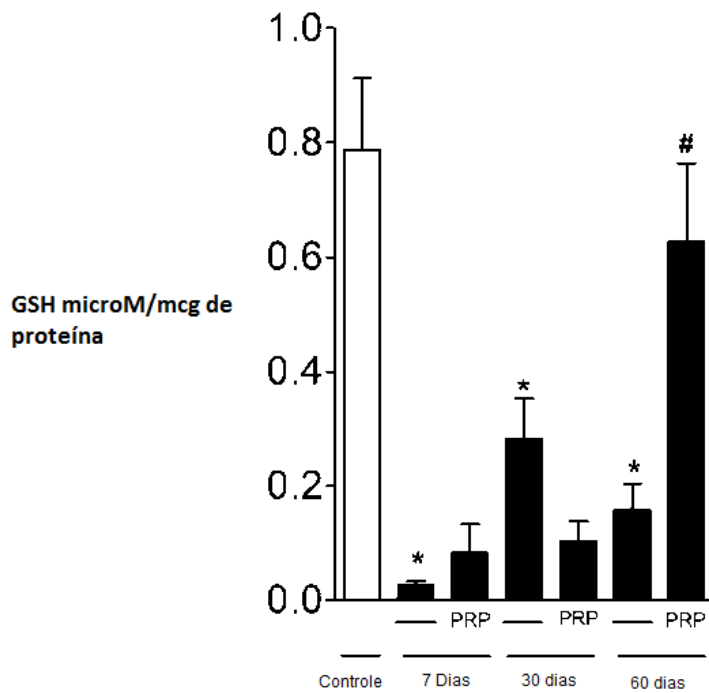


Figura 10 - Efeito do PRP sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH), representado pela média  $\pm$ EPM e relativo a dois experimentos separados. [\* $p$ <0.05 sem PRP comparado com o grupo controle; # $p$ <0.05 com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey.

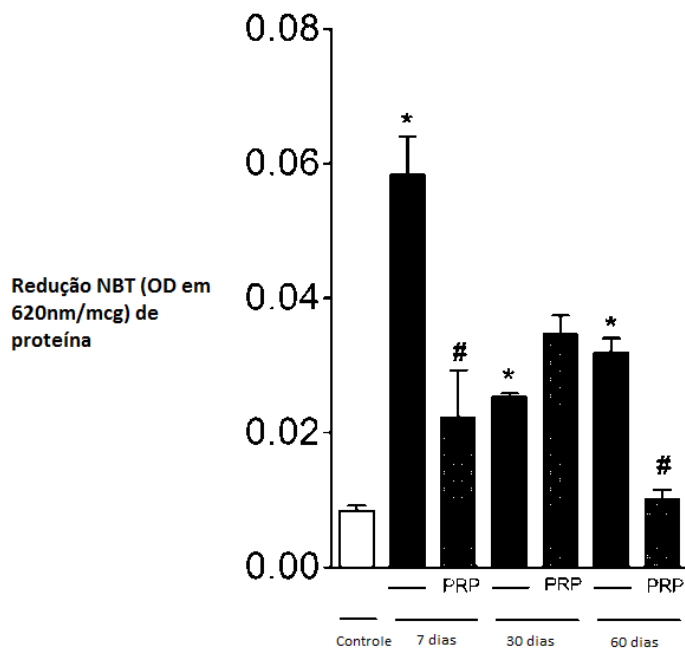


Figura 11 - Efeito do PRP produção de ânion superóxido, e relativo a dois experimentos separados. [\* $p$ <0.05 sem PRP comparado com o grupo controle; # $p$ <0.05 com PRP comparado com o grupo sem PRP no mesmo tempo de estudo]. Teste de Tukey.

## DISCUSSÃO

Embora macroscopicamente o grupo com PRP não tenha apresentado diferenças em aderências, a avaliação de atividade inflamatória e estresse oxidativo mostraram um benefício no uso do PRP especialmente com 60 dias. Esse resultado é importante já que as complicações como erosão, extrusão e aderências estão intimamente relacionadas com reação inflamatória ao implante .

Rechberger et al. observaram que o níveis séricos de citocinas são mais altos em pacientes com erosão de slings, que naquelas com adequada cicatrização (45). Da mesma forma, Di Vita et al. demonstraram que o uso de polipropileno para reparo de hérnias está associado com altos níveis de interleucina 6 e interferon, quando comparado à correção tradicional. Assim, existe uma inflamação crônica com extensa reação de corpo estranho promovendo complicações (46).

Na tentativa de diminuir essa reação inflamatória inicial, desencadeada pelo implante, vários pesquisadores têm procurado modificar as propriedades das telas recobrando-as com diferentes substâncias. Entretanto, são poucos estudos com o uso do PRP em telas para o reparo de hérnias e uroginecologia. Um estudo *in vitro* com 7 tipos de telas, usando PRP, após 6 semanas obteve uma diminuição nas aderências e melhora na biocompatibilidade (47). Dois experimentos usando o PRP em uma malha biológica (Strattice®) observaram aderências menos graves, maior angiogênese, maior neovascularização, maior integridade da tela e diminuição da recorrência da hérnia no grupo com PRP (26, 27).

Neste estudo, embora macroscopicamente o grupo com PRP não tenha apresentado diferenças em aderências, a avaliação de atividade inflamatória e estresse oxidativo mostraram um benefício no uso do PRP, especialmente com 60 dias, talvez mostrando que o efeito benéfico dele ocorra mais tardiamente. Também Gerullis et al ao estudar, *in vivo e in vitro*, a biocompatibilidade de malhas revestidas com plasma autólogo, observaram ausência de efeito sobre acontecimentos inflamatórios precoces como os valores do infiltrado inflamatório e invasão de macrófagos (48).

No entanto, 3 meses após o implante, marcadores da organização do tecido conjuntivo da vascularização: invasão de miofibroblastos e células endoteliais; são detectáveis e mostram diferenças nas três malhas investigadas (47).

Não se localizou outra pesquisa sobre o efeito do PRP no estresse oxidativo gerado pelo implante de telas de polipropileno. A hipóxia gerada pelo trauma cirúrgico é um fator determinante para formação de aderências e o déficit de oxigênio gera estresse oxidativo, que é altamente lesivo para as funções celulares (17,49,50). Imediatamente após o implante com o início da

reação inflamatória, neutrófilos começam a produzir oxidantes. A produção de espécies reativas de oxigênio, proteases e fatores de crescimento mediados por neutrófilos e macrófagos resulta na destruição dos tecidos, bem como a proliferação de fibroblastos, acumulação de colágeno aberrante e fibrose (51).

Também a oxidação do polipropileno produz radicais livres com consequente depolimerização, degradação oxidativa, lixiviação e hidrólise. Essas alterações resultam na perda de estrutura da tela com mudanças de peso molecular e da integridade mecânica ( 52, 53).

Assim nossos resultados de redução no estresse oxidativo com o uso do PRP, através do aumento significativo do FRAP e da capacidade de reduzir o radical ABTS, são importantes para a manutenção da integridade do implante. Houve aumento também da glutatona reduzida (GSH), um importante antioxidante biológico com papel protetor para aderências (50,54), e diminuição do ânion superóxido.

O trauma cirúrgico aumenta os níveis de superóxido, fibroblastos normais e de adesão. Os fibroblastos quando expostos ao superóxido, aumentam os níveis de TGF-beta e colágeno I, ambos envolvidos na patogênese das aderências (17), então os resultados com PRP são muito interessantes no sentido de diminuir a sequência de eventos desencadeantes das aderências.

Demonstrou-se também uma diminuição da inflamação, por meio da diminuição dos níveis da atividade da NAG, presente no lisossomo dos macrófagos ativados. Esse resultado é muito promissor, pois se sabe que poucas horas após o implante, já existe uma grande concentração de macrófagos no local e aos 7 dias existe uma verdadeira invasão (55).

Essa reação continua durante vários meses, dependendo do material implantado e do local do implante. Com a evolução do tempo esse processo transforma-se em crônico com formação de pequenos granulomas, e com o resultado final variando de fibrose a tecido funcionalmente normal. A presença de macrófagos prolongadamente no local sugere uma ação central, e talvez determinante para os macrófagos na remodelação tecidual após o implante de uma tela (56).

Também a MPO, um importante marcador inflamatório, enzima presente nos neutrófilos diminuiu com o PRP. Esta é uma heme-proteína que utiliza o peróxido de hidrogênio e íons cloreto para gerar ácidos citotóxicos e espécies radicais difusíveis (17,57). É conhecido um marcador inflamatório. Estudos têm mostrado um importante papel desta enzima no desenvolvimento de tecido fibroso, mostrando que a inibição da MPO poderia ser alvo de terapêuticas para redução de aderências pós-operatórias (49,50).

A oxidação de tela de polipropileno por neutrófilos e células gigantes de corpo estranho é conhecida. Como descrito por Costello et al, a degradação ocorre mesmo na ausência de infecção e erosão (58).

Bryan et al desenvolveram um modelo *in vitro* para facilitar a escolha da malha na reparação de hérnia através da determinação da ativação de neutrófilos e desgranulação. Sua abordagem representa uma das poucas ferramentas *in vitro* disponíveis na literatura. Em seus experimentos, espécies reativas de oxigênio, liberadas por neutrófilos ativados levaram a danos inespecíficos no tecido potencialmente enfraquecendo mecanicamente 6 tipos de malhas diferentes (59).

Assim, a associação de uma menor inflamação, observada através da diminuição da atividade da MPO e dos níveis da atividade da NAG, associadas com a diminuição do estresse oxidativo, potencialmente diminui o risco de fibrose, de outras complicações da integração e também mantém a integridade física do polipropileno.

Uma possível explicação para a discrepância entre os parâmetros macroscópicos de aderência e os dados de estresse oxidativo e inflamatórios, pode ser o tempo máximo do estudo, talvez insuficiente para observar macroscopicamente a diferença das aderências. Também se necessita de melhores parâmetros de medida macroscópica de aderências, já que não existe até um momento um sistema padrão para quantificar as aderências (32), mas várias classificações que têm sido propostas como ferramenta para avaliá-las. Tem-se a classificação de Majuzi (36,37), Evans (33); e o escore de Mage (34) que avaliam a tenacidade apenas. Também a escala de Diamond, que leva em conta a extensão, tipo e tenacidade das aderências (35,38); e o Índice de Aderências Peritoneais que graduam tenacidade e as regiões abdominais acometidas pelas aderências (32). Todos esses sistemas são subjetivos e assim sujeitos a críticas, entretanto amplamente utilizados. De forma para obter maior facilidade de comparação com outros artigos sobre aderências, também utilizou-se a Escala de Diamond e de Tenacidade.

Como em qualquer estudo em animais, a extrapolação dos resultados para a prática clínica deve ser cuidadosa (60). Nenhum modelo animal pode simular completamente a situação humana e a base multifatorial da cicatrização humana, entretanto a coelha é considerada um bom modelo animal para implantes, ainda que não seja primata ou de grande porte, apresentando todas as características bioquímicas dos ratos.

A resposta inflamatória e de reparo vai muito além do tipo de tela a ser implantada, cada tecido e local de implante responde de maneira distinta a agressão sofrida (61).

Implantes abdominais, por exemplo, ocorrem em ambiente estéril, com o processo de biomecânica completamente diferente dos implantes em vagina, que é um ambiente potencialmente contaminado (62).

Assim os resultados obtidos com implantes peritoniais devem ser comparados com cuidado frente à outras possíveis localizações, vagina ou parede abdominal por exemplo.

Outra possível crítica a este trabalho é a utilização de um único modelo de tela, mas optou-se por esse modelo (polipropileno macroporoso e monofilamentar) devido a sua ampla utilização em herniorrafias e reconstruções perineais.

Devemos discutir também a falta de padrão para a obtenção do PRP e para a definição de PRP, informação que poderia dificultar a comparação de resultados(25).

Mas nossas coletas de controle do número de plaquetas, realizadas durante o experimento, apresentaram índices de elevação das plaquetas em torno de 300%, valores que podem ser considerados de elevação moderada, e dentro das margens consideradas pelas definições existentes para PRP (63,64,65).



## **8. CONCLUSÕES**

O uso de PRP em telas de polipropileno não mostrou diferença significativa na presença e gravidade das aderências. Porém as medidas de avaliação da atividade inflamatória e estresse oxidativo demonstraram diminuição com o seu uso.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Mudge M, Hughes LE. Incisional hérnia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. *British Journal Surg* 1985; 72:70-71.
- 2) Khaira HS, Lall, P, Hunter B, Brown JH. Repair of incisional hernias. *J.R. Coll. Surgery. Edinb* Feb. 2001;39-43.
- 3) Sugerman HJ, Kellum JM Jr, Reines HD, De Maria EJ, Newsime HH, Lowry JH. Greater risk of incisional hernia with morbidly obese thansteroid-dependent patients and low recurrence with prefascial polypropylene mesh. *Am J Surg* 1996; 171:80-84.
- 4) Luijendijk RW, Hop W, Tol P, De Lage D, Braaksma M, Ijzermans J, Boelhouwer R, et al. A comparison of suture repair with mesh repair of incisional hernia. *N England J Med* Aug 2000 ;343: 392-398.
- 5) Anthony T, Bergen P, Kim L, Henderson M, Fahey T, Rege R, Turnage R. Factors affecting recurrence following incisional herniorrhaphy. *World J. Surg* 2000; 24:95-101.
- 6) Lontra M, Bigolin A, Costa R, Grossi J, Scalco P, Roll S, Cavazzola L. Efetividade do uso combinado de filme de ácido láctico e tela de polipropileno na formação de aderências intra-peritoneal- um modelo experimental em ratos. *Re. Col. Bras. Cir* 2010;37:364-369.
- 7) Brown C, Finch J. Which mesh for hernia repair? *Ann R Coll Surg Engl* 2010; 92:272-278.
- 8) Birolini C. O uso de próteses sintéticas na reconstrução da parede abdominal. In: Gama-Rodrigues J, Machado M, Rasslan S. *Clínica Cirúrgica*. São Paulo: Editora Manole, 2008; 36:508-515.
- 9) Baracs J, Takacs I, Sajjadi S, Horvath O, Weber G. Which mesh is appropriate for laparoscopic use? Prevention of adhesions to macroporous mesh, a rabbit model. *Eur Surg*. 44:319–324.
- 10) Heniford B, Park A, Ramshaw B, Voeller G. Laparoscopic Repair of Ventral Hernias-Nine Years' Experience With 850 Consecutive Hernias. *Ann Surg* 2003; 238:391–400.
- 11) Carbajo M, Olmo J, Blanco J, Cuesta C, Martín F, Toledano M, et al. Laparoscopic Treatment of Ventral Abdominal Wall Hernias: Preliminary Results in 100 Patients. *JSLs* Apr-Jun 2000. 4:141–145.

- 12) Burger J, Luijendijk R, Hop W, Halm J, Verdaasdonk E, Jeekel, J. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. *Ann Surg* 2004; 240:578-583.
- 13) Morris-Stiff G, Hughes L. The outcomes of nonabsorbable mesh placed within the abdominal cavity: literature and clinical experience. *J Am Coll Surg* 1998; 186:352–67.
- 14) Novotný T, Jeřábek J, Veselý K, Staffa R, Dvořák M, Cagaš J. Evaluation of a knitted polytetrafluoroethylene mesh placed intraperitoneally in a New Zealand white rabbit model. *Surg Endosc* 2012;26:1884–1891.
- 15) Raptis D, Vichova B, Breza J, Skipworth J, Barker S. A comparison of woven versus nonwoven polypropylene (PP) and expanded versus condensed polytetrafluoroethylene (PTFE) on their intraperitoneal incorporation and adhesion formation. *J Surg Res* 2011;169:1–6.
- 16) Al-Musawi D, Thompson J. Adhesion prevention: state of the art. *Gynaecological Endoscopy* 2001; 10:123-130.
- 17) Braun K, Diamond M. The biology of adhesions formation in the peritoneal cavity. *Seminars in Pediatric Surgery Dec.* 2014; 26:336-343.
- 18) Ahn H, Lee H, Yoo M, Jeong S, Han T, Kim W, et al. Efficacy of an injectable thermosensitive gel on postoperative adhesion in rat model. *J Korean Surg Soc* 2010; 79:239-245.
- 19) Binda M. Pathophysiology and prevention of adhesion formation in a laparoscopy mouse model. 2008. Doctoral thesis. *Acta Biomedica Lovaniensia* 417, Leuven University Press.
- 20) Brune B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, et al. Antioxidants & Redox signaling 2013;19.
- 21) Sen K. Wound healing essentials: let there be Oxygen. *Wound Rep Reg* 2009; 17:1-18.
- 22) Diamond M, Burns E, Accomando B, Mian S, Holmdahl L. Seprafilm® adhesion barrier: a review of preclinical, animal, and human investigational studies. *Gynecol Surg* 2012. 9:237–245.
- 23) Ribeiro D, Silva C, Marson F, Gama R, Neto Filho M. Utilização do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) na recuperação de tecidos ósseos. *BJSCR*. 2015; 11:48-52.

- 24) Oliveira-Filho M, Almeida L, Pereira J, Nassif P, Czczko N, Kume M, et al. Plasma Rico em Plaquetas de coelhos: Introdução a um modelo animal experimental. ABCD Arq Bras Cir 2008; 21:175-179.
- 25) Klein C, Wagner S, Silva J. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. Revista Brasileira de Neurociências 2011; 9:509-513.
- 26) Jeffrey V, Fernandez-Moure J, Cabrera F, Wang X, Karim A, Corradetti B, et al. Decreased hernia recurrence using autologous platelet-rich plasma (PRP) with Strattice™ mesh in a rodent ventral hernia model. Surg Endosc 2015.
- 27) Joseph S, Fernandez-Moure M, Jeffrey V, Zachary K, Menn M, Cabrera F, et al. Platelet rich plasma enhances tissue incorporation of biologic mesh. JSR 2015;199:412-419.
- 28) Everts P, Overvest E, Jakimowicz J, Oosterbos C, Schonberger J, Knape T, et al. The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery, a review. Surg Endosc 2007; 21:2063–2068.
- 29) Zieren J, Zieren H, Jacobi C, Wenger F, Muller, J. Prospective randomized study comparing laparoscopic and open tension-free inguinal hernia repair with Shouldice's operation. Am J Surg 1998;175:330-333.
- 30) Macedo AP, et al. Protocolo de Obtenção e Aplicações Clínicas do PRP. In: Pontual MAB, Magini RS, et al. Plasma Rico em Plaquetas PRP e Fatores de Crescimento – Das pesquisas científicas à Clínica Odontológica. São Paulo: Santos Editora Ltda 2004;189-230.
- 31) Vendramin F, Franco D, Nogueira C., Pereira M, Franco T. Análise histomorfométrica do reparo ósseo utilizando enxerto ósseo bovino orgânico associado a plasma rico em plaquetas. Rev Col Bras Cir 2006; 33:24-28.
- 32) Coccolini F, Ansaloni L, Manfredi R, Campanati L, Poiasina E, Bertoli P, et al. Peritoneal adhesion index (PAI) : proposal of a score for the “ignored iceberg” of medicine and surgery. World Journal of Emergency Surgery 2013;8:6.
- 33) Arslan E, Talih T, Oz B, Halaclar B, Caglayan, Sipahi M. Comparison of lovastatin and Hyaluronic acid/ Carboxymethyl cellulose on experimental created peritoneal adhesion model in rats. International Journal of Surgery 2014;120-124.

- 34) Erdogan N, Alaboud M, Darcha C, Alloui A, Cuvelier B, Jacquetin B. Effectiveness of Hyalobarrier and Seprafilm to prevent polypropylene mesh shrinkage: a macroscopic and histological experimental study. *Int Urogynecol J* 2014;25:1081-1087.
- 35) Klink C, Schickhaus P, Binnebösel M, Jockenhoevel S, Rosch R, Tolba R, et al. Influence of 4% icodextrin solution on peritoneal tissue response and adhesion formation. *BMC Surgery* 2013;13:34.
- 36) Basbug M, Bulbuller N, Camci C, Ayten R, Aygen E, Ozercan I, et al. The Effect of Antivascular Endothelial Growth Factor on the Development of Adhesion Formation in Laparotomized Rats: Experimental Study. *Gastroenterology Research and Practice* 2011.
- 37) Shahzamani P, Takhtfooladi A, Jahanshahi A, Sotoudeh A. Effects of Dexamethasone, Piroxicam and Sterile Aloe Vera Extract on the Prevention of Postoperative Peritoneal Adhesion Formation in Rat. *Advances in Environmental Biology* 2012;6:2851-2865.
- 38) Byrd J, Agee N, Nguyen P, Heath J, Lau K, Mckillop I, et al. Evaluation of Composite Mesh for Ventral Hernia Repair. *JSL* 2011;15:298-304.
- 39) Bradley P, Priebat D, Christensen R, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206-209.
- 40) Martinez R, Steffen V, Silva T, Caviglione C, Bottura C, Fonseca M, et al. Topical Formulation Containing Naringenin: Efficacy against Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Inflammation and Oxidative Stress in Mice. *PLoS One* 2016 ; 7.
- 41) Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 42) Belo A, Barcelos L, Ferreira M, Teixeira M, Andrade S. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sciences* 2004;74:2827-2837.
- 43) Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005;140:47-52.
- 44) Campanini M, Ribeiro F, Ivan A, Ferreira V, Vilela F, Vicentini F, et al. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J Photochem Photobiol B* 2013;127:153-160.

- 45) Rechberger T, Jankiewicz K, Adamiak A, Miotla P, Chrobak A, Jerzak M. Do preoperative cytokine levels offer a prognostic factor for polypropylene mesh erosion after suburethral sling surgery for stress urinary incontinence? *Int Urogynecol J* 2009; 20:69–74.
- 46) Di Vita G, Milano S, Patti R, et al. Cytokine modifications after tension-free hernioplasty or open conventional inguinal hernia repair. *Am J Surg* 2001; 181:487–491.
- 47) Gerullis H, Georgas E, Eimer C, Arndt C, Barski D, Lammers B, et al. Coating with autologous plasma improves biocompatibility of mesh grafts in vitro: development stage of a surgical innovation. *Biomed Research International* 2013; 13.
- 48) Gerullis H, Klosterhalfen B, Boros M, et al. Ideal in meshes for prolapse, urinary incontinence, and hernia repair. *Surgical Innovation* 2013;20:502–508.
- 49) Saed J, Jianq Z, Diamond M, Sound H. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of postoperative adhesions. *Wound Rep Reg* 2009. 17:531-539.
- 50) Awonuga A, Bellote J, Abuanzeh S, Fletcher N, Diamond M, Saed G. Advances in the pathogenesis of adhesion development: the role of oxidative stress. *Reproductive Sciences* 2014; 21:823-836.
- 51) Chen G, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010;10:826-37.
- 52) Sternschuss G, Ostergard D, Patel H. Post-Implantation of Polypropilene in the Human. *J Urol* July 2012;188:27-32.
- 53) Kurtz J, Rael B, Lerma J, Wright C, Khraishi T, Auyang E. Effects of reactive oxygen species on the physical properties of polypropylene surgical mesh at various concentrations: a model for inflammatory reaction as a cause for mesh embrittlement and failure. *Surgical Endoscopy*.
- 54) Wu G, Franq Y, Lupton J, Turner N. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134:489-492.
- 55) Gerullis H, Georgas E, Borós M, et al. Inflammatory Reaction as Determinant of Foreign Body Reaction Is an Early and Susceptible Event after Mesh Implantation. *BioMed Research International* 2014;2014:510807.
- 56) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 2004;25:677–686.

- 57) Vieira P, Moreira C, Silva M, Barcelos L. Estimation of wound tissue neutrophil and macrophage accumulation by measuring myeloperoxidase (MPO) and NAG activities. *Bio-protocol* 2015; 5.
- 58) Costello C, Bachman S, Ramshaw B, Grant S. Materials characterization of explanted polypropylene hernia meshes. *J. Biomed. Mater. Res* 2007;83B: 44–49.
- 59) Bryan N, Ahswain H, Smart N, Bayon Y, and Hunt J. “In vitro activation of human leukocytes in response to contact with synthetic hernia meshes.” *Clinical Biochemistry* 2012;45:672–676.
- 60) Jiang H, Damaser M. Animal Models of Stress Urinary Incontinence. *Handb Exp Pharmacol* 2011; 202: 45–67.
- 61) Patel H, Ostergard D, Sternschuss G. Polypropylene mesh and the host response. *Int. Urogynecol J* 2012; 23:669-679.
- 62) Abramov Y, Golden B, Sullivan M, Botros S, Miller J, Alshahrour A, et al. Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound Repair and Regen* 2007;15: 80–86.
- 63) Marx R. Platelet rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?. *Implant Dent.* 2001;10:225-8.
- 64) Anitua E, Andia I, Sanches M, Azofra J, Zalduendo M, Fuente M, et al. Autologous preparatios rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J of Orthop. Research.* 2005 Mar; 23:281-286.
- 65) Tamimi F, Montalvo S, Tresguerres I, Blanco J. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:1084–93.

**Anexo 1 – Termo de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da UEL. Página 47.**



Universidade  
Estadual de Londrina

CIR

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

OF. CIRC. CEUA Nº 110/2014

Londrina, 06 de Agosto de 2014.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 20 de maio de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Efeito do plasma rico em plaquetas em telas de polipropileno na diminuição de aderências abdominais em coelhos", registrado sob o processo CEUA nº 7798.2014.03, pesquisa do Centro de Ciências da Saúde de sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados o projeto esta **aprovado** para execução, entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 30 coelhos adultos (fêmeas) da linhagem WNZ, com idade de 6 meses, e pesando 2,0 kg, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Maringá. O projeto tem como objetivo comparar o efeito do plasma rico em plaquetas na formação de aderência da tela de polipropileno intraperitoneal. Após anestesia, será coletado o plasma dos coelhos e os mesmos serão submetidos à cirurgia. A cirurgia consiste de incisão mediana abdominal, diérese até cavidade e implantes das telas, uma de cada lado, sob o peritônio. Após o procedimento cirúrgico e a recuperação da anestesia, os coelhos serão levados ao biotério da instituição, em suas gaiolas, onde permanecerão sob condições ideais (temperatura, umidade, luz, alimentação) por todo o experimento. Após 30 dias, será realizada a retirada do material para análise por meio de outra cirurgia e eutanásia dos coelhos. Será realizada nova incisão sobre a cicatriz prévia e a tela será retirada para análise. Os animais serão descartados pela empresa Medi Tec Ambiental. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 18 meses.

Cumpre orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no projeto de pesquisa aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

*Waldiceu Ap. Verri Junior*  
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.  
**Prof. Dr. Silvio Henrique Maia Almeida**  
Coordenador do Projeto  
Departamento de Cirurgia Geral/ Urologia  
Centro de Ciências da Saúde  
Com cópia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Centro de Ciências da Saúde



## **Anexo 2 – Author Guidelines**

Wound Repair and Regeneration: The International Journal of Tissue Repair and Regeneration is the official publication of the Wound Healing Society, the European Tissue Repair Society, the Japanese Society for Wound Healing, and the Australian Wound Management Association. This Journal publishes original scientific and/or clinical papers on the broadly defined topics of wound healing and tissue regeneration. Articles that significantly advance the knowledge of processes involved with wound healing and regeneration in all tissues and organisms, or that provide new insights into clinical therapies will be given highest priority. Manuscripts that describe product evaluations will be considered but will receive lower priority. The Journal also welcomes articles that provide the reader with a thorough understanding of a specific methodology or technique pertinent to wound healing and regeneration studies. These articles will be subjected to the same peer review as regular research articles.

Questions about submissions can be directed to: [wrr\\_edoffice@wiley.com](mailto:wrr_edoffice@wiley.com)

Authors for whom English is a second language should have their manuscripts professionally edited by a native English speaker before submission. Wiley Editing Services is one resource for English-language editing. More information can be found at: <http://wileyeditingservices.com/en/>. All services are paid for and arranged by the author, and use of this service does not guarantee acceptance or preference for publication.

### **ARTICLE TYPES**

#### **Short Submissions**

Biomedical Hypothesis should present an untested original hypothesis backed up solely by a survey of previously published results rather than any new evidence. Hypotheses should not be reviews and should not contain new data. They should be short articles (abstract of 150 words, body of the paper should be 500-1500 words, 2 figures or tables, 10-15 references) outlining significant progress in thinking that would also be testable, though not so easily testable that readers will wonder why the testing has not already been done.

Brief Communication may report original data or discuss published articles (abstract of 150 words or less, body of the paper should not exceed 1,500 words, 2 figures or tables, and 15 references).

Brief Communications that contain original data will be fully peer-reviewed. In published form they should not to exceed 3 printed journal pages.

Letter to the Editor is usually written in response to a recent published article in the journal (Letters should not have an abstract; body of the letter should not exceed 1,000 words, 2 figures or tables, and 10 references). The Editor will normally solicit a response from the authors of the cited article. All Letters to the Editor are subject to editing and possible abridgment.

Case Report and Case Series. This journal does not review or publish this type of submission. Case studies should be submitted to a wound care journal.

Commentary. This type of submission is by invitation only.

Editorial. This type of submission is by invitation only.

Supplement. This type of submission is by invitation only.

Full Papers:

Original Research Article can be in 1 of 4 subcategories: Clinical Science, Basic Science, Regeneration Science or Young Investigator Award, that focuses on original, unpublished data generated by the submitting authors that is relevant to wound healing, tissue repair and regeneration, with the exceptions of hard tissues such as bone and cartilage, highly specialized tissues such as nerve, or other topics that are deemed by the editors to be outside the scope of interest of a general wound healing readership (abstract should not exceed 300 words, the body of the text should not exceed 21 manuscript pages, tables and figures should be limited to those needed to provide the most concise display of experimental design, compiled results and conceptual interpretations; in total not to exceed 8, and references should not exceed 40).

Clinical Science Articles cover human clinical trials, meta-analyses and other work relevant to investigation of evidence-based, advanced wound treatment and care. Clinical trials should be registered in [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) or comparable public database, and the appropriate citation included in the article.

Basic Science Articles focus on new paradigms for advancing the basic understanding of wounds and healing, development of novel interventions and analyses, and other research involving in

vitro, in vivo or in silico (mathematical) models. Analytical studies of human material beyond the realm of clinical care may also be considered as Basic rather than Clinical Research.

Regeneration Science deals with the unique restoration of tissues and organs beyond the normal capabilities of post-natal healing. It involves the regrowth of lost or destroyed organ components to their original pre-wounded structure and function.

Young Investigator Award Article. If the lead author has been recognized as a Young Investigator finalist at the annual meeting of the European Tissue Repair Society or the Wound Healing Society, and this paper is a report based on your presentation at the meeting, this option should be used. The cover letter must include documentation of this award.

Perspective Article [Invited Submissions Only] is a concise, contemporary review of a timely and relevant topic in the field of wound healing, tissue repair and regeneration, focusing on citations within the past 5 to 8 years (the body should not exceed 30 manuscript pages, should have not more than 6 total figures and tables, and should have a sufficient, but not excessive number of references ideally not to exceed 150). Note: authors should submit an initial proposal and article outline via email to the editorial office prior to submission. Unsolicited Perspective articles will be returned.

Technical Article describes a novel or re-worked methodology relevant to the study of wounds and wound healing. It is shorter than an original research paper (the body should not exceed 12 manuscript pages, figures and tables should be limited to those that are essential, but should not exceed 6 in total and should not exceed 30 references).

#### Submission of Manuscript

The Journal requires submission of manuscripts using our online manuscript processing system WRR-Manuscript Central™. This system may be accessed at <http://mc.manuscriptcentral.com/wrr>. Authors MUST suggest the names of three reviewers for the manuscript, ONE OF WHICH MUST BE AN EDITORIAL BOARD MEMBER. However, selection of the referees will be determined by the Editor. Authors are also encouraged to indicate individuals they feel should NOT be considered as reviewers.

The Journal requires that for each submission, the submitting author provides written assurance that the paper has not been previously published and that no other submission or publication will be made. Abstracts of oral or poster presentations are not considered to constitute prior

publication. Copyright to all papers is vested in the Wound Healing Society. Manuscripts purporting to contain original material will be considered for publication with the understanding that neither the article nor any of its essentials, including tables and figures, has been or will be published or submitted for publication elsewhere before appearing in this Journal. When submitting a paper, the submitting author should always make a full statement to the editor-in-chief about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant, duplicate or overlapping significantly with the presently submitted paper to WRR. The submitting author should also alert the Editor-in-Chief if the research in the current submission to WRR includes subjects about which a previous report has been published. Any such research should be referred to and referenced in the WRR paper. The Editor-in-chief will assess the information provided by the submitting author and subsequently may request copies of such previously published, in-press, or submitted (to another journal) papers before further review is permitted. It is the responsibility of the submitting author to disclose to the Editor any significant financial interests they may have in products mentioned in their manuscript. This information will be deemed confidential and will only be disclosed to manuscript reviewers if, in the opinion of the Editor, the information is directly pertinent for an informed review.

#### General Instructions

Manuscripts must be submitted for review through the WRR website at <http://mc.manuscriptcentral.com/wrr>. Step-by-step instructions for formatting and uploading manuscripts are available on the opening screen of the site. Save your text and tables as Word or RTF (rich text format) files. Figures should be submitted as separate TIF or JPG files. Type the manuscript using a 12-point font size, set text margins at 1" from edge, number your manuscript pages beginning with the title page, and double-space all elements of the paper, organized in the following order:

1. Cover Letter with Assurances
2. Title Page
3. Abstract
4. Introduction
5. Materials and Methods
6. Results
7. Discussion
8. Acknowledgments
9. Footnotes
10. References
11. Tables

## 12. Figure Legends

\*Upload Figures and any supplementary files separately

### Cover letter with Assurances

This letter from the submitting author must provide written assurance that the paper has not been previously published and that no other submission or publication of the original work has been or will be made. Abstracts or oral or poster presentation are not considered to constitute prior publication. The submitting author must further assure that every author listed meets the qualifications for authorship (see below) and has had the opportunity to read and comment upon the submitted manuscript.

### Title page

The title page should include (a) the title of the article, which should be concise but informative; (b) first name, middle initial, and last name of each author, with highest academic degree(s) and institutional affiliation; (c) name of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed; (d) name, address, telephone number, fax number, and email address of corresponding author; (e) name and address and email address of the author to whom requests for reprints should be addressed, (f) short running title, and (g) key words.

### Authorship

All persons designated as authors must qualify for authorship according to guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. General supervision of the research group is also not sufficient for authorship.

### Abstract

The second page should contain an abstract of not more than 300 words. The abstract should state the purpose of the investigation, basic procedures, main findings (BE SPECIFIC), and the principal conclusion. Emphasize new or unique aspects of the investigation. Abbreviations should not be used in the abstract. Generally, the abstract should be a single paragraph and should NOT be structured into separate sections with headings.

### Text

The text of the manuscript should be divided into the following sections with headings: Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments; Longer articles may be further divided with appropriate subheadings. For original research papers, the body of the text including title page

should not exceed 21 pages, and the number of references should be limited to 40 or fewer. Tables and figures should be used to support all reported results, but should not be redundant and should be limited to those necessary for data presentation and interpretation. For perspective articles, the manuscript length and number of references may be greater, and will be determined by the Editor.

### Introduction

State the purpose of the article; for original research, the statement of a hypothesis to be tested is appropriate. Summarize the rationale for the study, giving only pertinent references, and do not review the subject extensively. Do not include data or conclusions in this section from the work to be reported.

### Materials and Methods

Identify the methods, apparatus (include manufacturer's name, city and state or country in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references for established methods; provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well known; and describe in greater detail new or substantially modified methods (if deemed necessary, a diagram or flow chart may be used for complex procedures). Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration.

### Ethical Considerations

Human Investigations: Manuscripts reporting data obtained from research conducted in human subjects must comply with the ethical rules for human experimentation that are stated in the 1975 Declaration of Helsinki, including approval by the institutional review board - or human experimentation committee. Authors must disclose this compliance within the Materials and Methods section.

### Animal Investigations

Study protocols must be in compliance with the institution's guidelines or the National Research Council's criteria for humane care as outlined in the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, Revised 1985, <http://books.nap.edu/catalog/5140.html>). Researchers from countries other than the US are encouraged to consider guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, international (<http://www.aaalac.org/index.cfm>) and to recommend

membership in this organization to their institutions. A statement of assurance of the humane treatment of research animals must be provided within the Materials and Methods section.

### Statistics

Statistical methods must be described in sufficient detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Whenever possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty. Statistical probability (p) should be reported in tables, figures, and figure legends at only one of the following levels: p

### Results

The narrative of the text should take the reader through a logical progression of data consideration and interpretation. Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. DO NOT repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize or summarize only important observations.

**Significant Figures:** Quantitative data should be expressed in accordance with the precision of the measurement technique reflected by the use of an appropriate number of significant figures, which is dependent on the standard deviation. In general, the standard deviation is expressed with 1 or 2 significant figures and the associated value should agree in place with the expressed standard deviation. For example,  $10.3798 \pm 0.2573$  should be expressed as  $10.4 \pm 0.3$  or  $10.4 (0.3)$  and  $357.521 \pm 15.36$  should be expressed as  $358 \pm 15$  or  $358 (15)$ , where the second value is the standard deviation.

<http://www.facstaff.bucknell.edu/kastner/CHEM221/announcements/sigfig.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556591/>

### Discussion

Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. DO NOT repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results sections. Include in the Discussion section the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. It is appropriate to briefly discuss how the results fit into (or deviate from) the larger body of published work on the topic. Link the conclusions with the goals of the study, and avoid unqualified statements and conclusions not supported by the data. State the hypotheses when warranted but clearly label them as such.

### Acknowledgments

This section should contain one or more statements that specify (a) contributions that need acknowledgment but do not justify authorship; (b) acknowledgment of technical help; (c) acknowledgments of financial material support (specify the nature of the support); (d) financial relationships that may pose a conflict of interest.

Source of funding: Identify all internal and external sources of financial support for the work.

Pursuant to US National Institutes of Health (NIH) mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

For other funding agencies with similar open-access requirements, indicate the source of funding and notify the editorial office of this requirement in a statement on the Title page of the submitted manuscript.

Conflict of Interest disclosure statement: Include a statement disclosing any potential financial conflicts of interest (or none) for all of the authors.

#### List of Abbreviations and Other Footnotes

All nonstandard abbreviations should be grouped in alphabetical order into one footnote, with all footnotes placed on a separate page of the manuscript following the acknowledgments. Footnotes in the text should be denoted with a superscript Arabic numeral.

#### References

Number references consecutively in the order in which they are mentioned in the text. Identify references in text, tables, and figure legends by superscript numerals. References cited only in tables or figure legends should be numbered last. Use the style of the following examples, which are based with slight modification on the formats set forth in 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals,' ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the list of Journals Indexed for MEDLINE, as found in PubMed, posted by the US National Library of Medicine.

List all authors and/or editors up to 7; if more than 7, list the first 6 followed by "et al." Include the first and last page of each reference.



'Unpublished observations' and 'personal communications' may not be used as references but should be inserted in parentheses in the text.

Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add 'In press.' Examples of correct reference styles are given below:

#### Articles in Journals

Standard Journal Article - List all authors:

Whitby DJ, Ferguson MW. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 1991;147:207-15.

Organization as Author:

The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

No Author Given:

Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. *BMJ* 1981;283:628.

Volume with Supplement:

Magni F, Rossoni G, Berti F. BN-52021 protects guinea pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 (5 Suppl):75-8.

Issue with Supplement:

Gardos G, Cole JO, Haskell D, Marby D, Paine SS, Moore P. The natural history of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 1988;8(4 Suppl):31S-37S.

Issue with Part:

Reif S, Terranova VP, EL-Bendary M, Lebenthal E, Petell JK. Modulation of extracellular matrix proteins in rat liver during development. *Hepatology* 1990;12(3 pt 1):519-25.

Article Containing Comment:

Piccoli A, Bossatti A. Early steroid therapy in IgA neuropathy: still an open question [comment]. *Nephron* 1989;51:289-91. Comment on *Nephron* 1989;48:12-7.

Article Comment On:

Kobayashi Y, Fuji K, Hiki Y, Tateno S, Kurokawa A, Kamiyama M. Steroid therapy in IgA nephropathy: a retrospective study in heavy proteinuric cases [see comments]. *Nephron* 1989;51:289-91.

#### Books and Other Monographs

##### Personal Author(s):

Majno GA. *The heading hand: man and wound in the ancient world*. Cambridge: Harvard Univ Press, 1975.

##### Chapters in a Book:

Philips C, Wenstrup RJ. Biosynthetic and genetic disorders of collagen. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, editors. *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Philadelphia: Saunders, 1992:152-77.

##### Conference Proceedings:

Harely NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kaye SV, editors. *Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium; 1984 Oct 19-31; Knoxville (TN) Chelsea (MI): Lewis 1985;6-78.*

##### Unpublished Material:

In press (use only if accepted in book or journal format)

McMahon SB, Monroe JG. Role of primary response genes in generating cellular responses to growth factors. *FASEB J*. In press.

#### Tables

Type each table double-spaced on a separate page. DO NOT submit tables as photographs or digital images (pdf files). Number tables consecutively using Arabic numerals in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all nonstandard abbreviations that are used in each table. DO NOT use internal horizontal and vertical rules. The use of too many tables in relation to the length of the text can produce difficulties in the page layout. The Editor may recommend removal or modification of tables if the page layout is untenable. If the table has been published previously, written permission must be obtained and appropriate acknowledgment must be made. Large data tables may be included as supporting information and referenced in the text as being available online (the author(s) should coordinate this with the managing editor).

## Figure Legends

Type figures legends double-spaced starting on a separate page following the tables, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. Explain each symbol used in the illustration, such as arrows, and other visual aids. Scale bars should be labeled within the image, but original magnification may also be stated in the legend.

## Units of Measurement

Measurements of length, height, weight, and volume must be reported in metric units or their decimal multipliers. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressures in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI).

## Figures

All figures must be either professionally drawn and photographed or produced with appropriate computer graphics. All figures must be submitted electronically according to the specifications outlined below. Failure to submit images according to these specifications will result in reproductions that are small and illegible or in images that are declined. Color photographs should be saved in CMYK as TIF or JPG files at 600 dpi at 5 inches in width. Black and white photographs should be saved in greyscale as TIF files at 600 dpi at 5 inches in width. New line drawings should be prepared in Microsoft Word, PowerPoint, or Illustrator without embedded images from other sources. Existing line drawings should be scanned at 1200 dpi at a minimum of 12.5 cm (5 in) in width and saved as EPS files (flow charts must not exceed 7 inches [18 cm] in width). Any existing images added to Microsoft Word or PowerPoint will be rejected. Send original TIF or EPS files. All lettering should be done professionally and be of adequate size to retain clarity after reduction (final letter size in print is 1.5mm high or larger). It is understood that figures will be reproduced at a width of one column (approx. 12 cm or 2 inches), two columns (approx. 26.5 cm or 4 5/8 inches). All figures must be referred to specifically in the text, and numbered in order of appearance in the text. Graphs should be labeled with font size that will be legible in published format; groups or categories should be indicated within the graph whenever possible and error bars and statistical differences included where appropriate. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at [http://authorservices.wiley.com/prep\\_illust.asp](http://authorservices.wiley.com/prep_illust.asp).

Photomicrographs should include a scale bar embedded in the image. For multiple panels of the same magnification in one figure, only the first panel needs to have a scale bar.

If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph.

The manipulation of photographs by computer or other means may include a vast array of changes. These include addition of text or graphics, change of color, brightness, or contrast; enlargement; or other changes to image quality. Processes that destroy photographs in order to deceive an audience represent unethical manipulation. Distortion of photographs may be achieved by over or under exposure of the film at the time of photography or through computer manipulation. The WHS considers the manipulation of photographs used in presentation to patients, the media, in journals, or at scientific meetings for the purpose of deceiving the audience to be against the ethical standards of the Society.

Figures should be numbered using Arabic numerals consecutively according to the order in which they are cited in the text. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material.

Wound Repair and Regeneration will publish illustrations in color. However, the authors are responsible for all publication costs associated with color reproduction. Color charges are \$800.00 per page; there is a discounted rate of \$600.00 per page for WHS, ETRS and JSWH members (to receive discount, corresponding author must be an active member of the Wound Healing Society, excluding students and trainees). Figures should not be submitted in color if authors do not wish to pay for the color cost. NOTE: If color is "informative" and information conveyed through the use of color will not translate into gray scale, the figure will require color publication in print with associated color page charges. Color figures intended for gray scale print publication should not have color descriptors in the figure legends.

#### Copyright Release Form

After the paper is accepted, the Corresponding Author will receive an email prompting him or her to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) he or she will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions: [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

For authors choosing OnlineOpen

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

#### Reprints

Single reprints should be obtained directly from the author. A reprint order form will be sent to authors at the time of page proofs.

#### NIH Mandate

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

#### Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article -once it has been accepted- through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details about online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

NEW: OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see:

[http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms)

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website here:

<https://wileyonlinelibrary.com/onlineopen>

Prior to acceptance there is no requirement to inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.