



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KRISSIA CAROLINE LEME

AÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA REGENERAÇÃO TECIDUAL E  
ANALGESIA: USO COMPASSIVO EM FERIDA DE PÉ DIABÉTICO

CAMPINAS  
2023

KRISSIA CAROLINE LEME

AÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NA REGENERAÇÃO TECIDUAL E  
ANALGESIA: USO COMPASSIVO EM FERIDA DE PÉ DIABÉTICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA KRISSIA CAROLINE LEME, E ORIENTADA  
PELA PROFA. DRA. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L542a Leme, Krissia Caroline, 1994-  
Ação do plasma rico em plaquetas (PRP) na regeneração tecidual e analgesia : uso compassivo em ferida de pé diabético / Krissia Caroline Leme. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Ângela Cristina Malheiros Luzo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diabetes Mellitus. 2. Úlcera de pé diabético. 3. Plasma rico em plaquetas. 4. Cicatrização. 5. Analgesia. I. Luzo, Angela Cristina Malheiros, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Platelet rich plasma (PRP) action in tissue regeneration and analgesia : compassionate use in diabetic foot ulcer

**Palavras-chave em inglês:**

Diabetes Mellitus  
Diabetic foot ulcer  
Platelet rich plasma  
Wound healing  
Analgesia

**Área de concentração:** Cirurgia Translacional

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Ângela Cristina Malheiros Luzo [Orientador]  
Fernanda Borges de Araújo Paula  
Joaquim Murray Bustorff Silva

**Data de defesa:** 29-05-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Cirurgia

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2254-2789>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6956717801562652>

# **COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**KRISSIA CAROLINE LEME**

---

**ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO**

---

## **MEMBROS TITULARES:**

- 1. PROFA. DRA ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO**
  
- 2. PROFA. DRA. FERNANDA BORGES DE ARAÚJO PAULA**
  
- 3. PROF. DR. JOAQUIM MURRAY BUSTORFF SILVA**

---

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 29/05/2023**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por sempre ter guiado meus passos sendo luz na minha vida e minha força.

Agradeço à Dra Ângela Luzo por ter acreditado e depositado sua confiança em mim. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por ter sido um exemplo de profissional e pessoa. Diante de tantas incertezas, obstáculos, mudança de projeto, uma pandemia que mudou todos os planos, ela sempre dizia "Para tudo há seu tempo", e essa frase me ajudou em muitos momentos.

Agradeço aos meus pais Rogério e Bernadete por sempre estarem ao meu lado e por tantos ensinamentos, por serem meu suporte, exemplo e motivação. Obrigada por nunca terem medido esforços para que eu alcançasse meus sonhos. Ao meu irmão Kayron e à minha cunhada Priscila por sempre terem sido apoio e inspiração, e à minha linda sobrinha Mariana que enche meus dias de alegria. Ao meu namorado Herbert que me acompanhou durante toda essa trajetória, sendo um importante apoiador e ombro para os momentos de cansaço. Agradeço à minha avó Maria por toda preocupação e carinho. Ao Dusty por ser meu fiel companheiro.

Agradeço à minha grande amiga de vida Brenda, por ser minha incentivadora e se fazer tão presente, mesmo que distante fisicamente. À Clarice pelo cuidado e preocupação. À equipe da Synova por toda compreensão e incentivo.

Agradeço ao Hemocentro Unicamp, em especial a Adriana, Audrey, Suyellen, Andrea, Alexandra e Sandra, pela parceria e ensinamentos. Aos colegas Mariane Rizzo, Gabriel Biscaro, Luciana Cartarozzi e Jefferson Kalil pela parceria e crescimento conjunto. Agradeço ao Prof Nelson Duran, Prof Alexandre Leite e Prof Wagner Favaro pelos valiosos ensinamentos.

Ao Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas, em especial Dra Maria Cândida Parisi, Dra Mariana Fujiwara, enfermeiras Andreia Bulgareli e Lívia Miziara, por todo suporte para realização dessa pesquisa.

A toda equipe da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e da Pós-graduação em Ciências da Cirurgia por todo suporte e infraestrutura. Aproveito para agradecer a todos

os funcionários da UNICAMP, cada um exerce papel fundamental para o bom funcionamento desta Universidade.

Agradeço de todo meu coração aos pacientes que acreditaram em nosso trabalho, confiando suas dores em nosso trabalho, saber que conseguimos ser alívio para seus sofrimentos é o que me motivou.

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

Agradeço a todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”*

(Carl Jung)

## RESUMO

Ferida do pé diabético é uma das complicações crônicas do Diabetes Mellitus (DM), de difícil manejo e de grande impacto na qualidade de vida dos pacientes. Os locais de maiores incidências são os pés e tornozelos, sendo importante causa de amputações de membros inferiores. Os fatores de risco envolvem um mal controle glicêmico, neuropatia diabética e alterações vasculares. A prevalência de úlceras é maior em homens do que em mulheres, sendo também maior em DM tipo II do que no tipo I. O manejo dessas úlceras é complexo, devido à dificuldade de cicatrização desenvolvida no DM. Há uma busca por novos tratamentos que proporcionem uma cicatrização efetiva, assim um possível tratamento poderia ser o uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), um produto hemoterápico autólogo, com grande potencial terapêutico na regeneração tissular e analgesia, devido a moléculas bioativas, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas liberadas pelos grânulos alfa, presentes nas plaquetas. Nesse estudo, foram tratados com gel de PRP úlceras de 4 pacientes acompanhados pelo Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, que não foram responsivos a nenhum dos tratamentos convencionais utilizados previamente. Em todos os pacientes houve cicatrização da úlcera, e aquelas em locais que não havia pressão prolongada, não houve recidiva. Foi relatado analgesia por todos os pacientes, com remissão total da dor após poucas aplicações. O PRP tem potencial para ser importante instrumento para tratamento das úlceras do pé diabético, auxiliando na cicatrização e diminuindo o tempo de recuperação, melhorando assim a qualidade de vida destes pacientes.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus; Úlcera de Pé Diabético; Plasma Rico em Plaquetas; Cicatrização; Analgesia.

## ABSTRACT

Diabetic foot ulcer is one of the chronic complications of Diabetes Mellitus (DM), which is difficult to manage and has a great impact on patients' quality of life. The most common sites are the feet and ankles, being an important cause of lower limb amputations. Risk factors involve poor glycemic control, diabetic neuropathy and vascular problems. The prevalence of ulcers is higher in men than in women, in addition to being more prevalent in DM type II than in type I. The management of these ulcers is complex, due to the healing problems developed in DM. There is a search for new treatments that provide effective healing, so a possible treatment could be the use of Plasma Rich in Platelets (PRP), an autologous hemotherapy product with great therapeutic potential in tissue regeneration and analgesia, due to bioactive molecules, growth factors, cytokines and chemokines released by alpha granules present in platelets. In this study, ulcers of 4 patients followed at the Endocrinology Outpatient Clinic of Hospital das Clínicas-UNICAMP, who were not responsive to any of the conventional treatments previously used, were treated with PRP gel. In all patients there was healing of the ulcer, and those in places where there was no prolonged pressure, there was no recurrence. Analgesia was reported by all patients, with complete remission of pain after a few applications. PRP has the potential to be an important instrument for the treatment of diabetic foot ulcers, aiding in healing and reducing recovery time, thus improving the quality of life of these patients.

**Keywords:** Diabetes Mellitus; Diabetic Foot Ulcer; Platelet Rich Plasma; Wound Healing; Analgesia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Oxidação de glicose e estresse oxidativo induzido por hiperglicemia         | 18 |
| Figura 2: Estrutura da pele e células da barreira imunológica local                   | 20 |
| Figura 3: Cicatrização fisiológica de feridas   | 25 |
| Figura 4: Moléculas bioativas liberadas por plaquetas e suas ações                    | 28 |
| Figura 5: Processamento e gelificação do PRP.   | 35 |
| Figura 6: Escala Visual Analógica (EVA) utilizada para aferição da intensidade da dor | 35 |
| Figura 7: Gel de PRP  | 36 |
| Figura 8: Evolução da úlcera 1 do participante 1 em uso do gel de PRP                 | 38 |
| Figura 9: Evolução da úlcera 1 do participante 1 após uso do gel de PRP               | 39 |
| Figura 10: Acompanhamento da úlcera 1 do participante 1                               | 39 |
| Figura 11: Evolução da úlcera 2 do participante 1 em uso do gel de PRP                | 40 |
| Figura 12: Evolução da úlcera 2 do participante 1 após uso do gel de PRP              | 40 |
| Figura 13: Acompanhamento da úlcera 1 do participante 1                               | 41 |
| Figura 14: Úlcera da participante 2   | 42 |
| Figura 15: Evolução da úlcera da participante 2 no uso do gel de PRP                  | 42 |
| Figura 16: Acompanhamento da úlcera da participante 2                                 | 43 |
| Figura 17: Evolução do segundo tratamento da participante 2 no uso do gel de PRP      | 44 |
| Figura 18: Acompanhamento do segundo tratamento da participante 2                     | 45 |
| Figura 19: Úlcera do participante 3   | 46 |
| Figura 20: Evolução do tratamento do participante 3 no uso do gel de PRP              | 46 |
| Figura 21: Acompanhamento do tratamento do participante 3                             | 47 |
| Figura 22: Úlcera inicial do participante 4   | 48 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 23: Evolução do tratamento do participante 4 no uso do gel de PRP                  | 49 |
| Figura 24: Evolução da hipergranulação da úlcera do participante 3                        | 50 |
| Figura 25: Úlcera antes do início da segunda etapa do tratamento tópico com PRP           | 51 |
| Figura 26: Evolução da segunda etapa do tratamento do participante 4 no uso do gel de PRP | 52 |
| Figura 27: Fim do tratamento do participante 4  | 52 |
| Figura 28: Acompanhamento da úlcera do participante 4                                     | 53 |
| Figura 29: Cicatrização em DFU e influência do Gel de PRP                                 | 54 |
| Figura 30: PRP e Analgesia  | 56 |

## **LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Fatores de crescimento envolvidos no reparo tecidual | 24 |
| Tabela 2: Classificações do PRP ao longo do tempo              | 30 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACD-A: Ácido Cítrico Citrato de Sódio e Dextrose-Solucao A
- AGEs: Produtos finais de glicação avançada (do inglês, Advanced Glycation End-products)
- AP-1: Proteína ativadora-1
- CCL2: Ligante quimiocina 2 (do inglês, Chemokine Ligand 2)
- CCL20: Ligante quimiocina 20 (do inglês, Chemokine Ligand 20)
- COX-2: Ciclo-oxigenase-2
- CD40L: Ligante de CD40 (do inglês, CD40 ligand)
- DAMPs: Padrões moleculares associados a danos (do inglês, Damage Associated Molecular Patterns)
- DFU: Úlcera de pé diabético (do inglês, Diabetic Foot Ulcer)
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic Acid)
- E.V.A: Escala Visual Analógica
- ECM: Matriz Extracelular (do inglês, Extracellular Matrix)
- EGF: Fator de crescimento epidérmico (do inglês, Epidermal Growth Factor)
- Fas-L: Ligante Fas (do inglês, Fas ligand)
- FGF-2: Fator de crescimento de fibroblasto básico (do inglês, basic fibroblast growth factor)
- FGF: Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, Fibroblast growth factor)
- GAP: Gliceraldeído-3-fosfato (do inglês, Glyceraldehyde-3-phosphate)
- GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- GSH: Glutationa Peroxidase
- HGF: Hepatocyte growth factor (do inglês, Fator de crescimento de hepatócito)
- HIF-1a: Fator 1-alfa induzível por hipóxia (do inglês, Hypoxia inducible factor-1 alpha)
- HIFs: Fator Induzido por Hipoxia (do inglês, Hypoxia-inducible factors)
- IFN- $\gamma$ : Interferon-gama
- IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês, Insulin-like growth factors )
- IL-1: Interleucina-1

IL-10: Interleucina-10

IL-13: Interleucina-13

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

iNOS: Óxido Nítrico-sintase induzida

KGF: Fator de crescimento de queratinócitos (do inglês, Keratinocyte Growth Factor)

LIGHT: Conhecido por membro 14 da superfamília do Fator de necrose tumoral (do inglês, Tumor necrosis factor superfamily member 14)

LPS: Lipopolissacarídeo

M1: Macrófago M1

M2: Macrófago M2

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

MMP-1: MMP: Metaloproteinase de matriz 1 (do inglês, Matrix metalloproteinases 1)

MMP-8: MMP: Metaloproteinase de matriz 8 (do inglês, Matrix metalloproteinases 8)

MMP-9: MMP: Metaloproteinase de matriz 9 (do inglês, Matrix metalloproteinases 9)

MMP: Metaloproteinase de matriz (do inglês, Matrix metalloproteinases)

MSCs: Célula Mesenquimal (do inglês, Mesenchymal stem cells)

NETs: Armadilhas extracelulares dos neutrófilos (do inglês, Neutrophil Extracellular Traps)

Nrf2: Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa B

NO: Óxido Nítrico (do inglês, Nitric oxide)

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, Pathogen Associated Molecular Patterns)

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, Platelet-derived growth factor)

PRP: Plasma Rico em Plaquetas

RAGE: Receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês, Receptor of advanced glycation end-products )

ROS: Espécie Reativa de Oxigênio (do inglês, Reactive oxygen species)

SDF-1: Fator 1 derivado de células estromais (do inglês, stromal cell-derived factor 1)

SMCs: Célula muscular lisa (do inglês, Smooth muscle cell)

SOD: Superóxido dismutase

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- $\beta$ 1: Fator de crescimento transformador beta 1 (do inglês, Transforming growth factor beta 1)

TIMPs: Inibidores teciduais de metaloproteinases (do inglês, Tissue inhibitors of metalloproteinases)

TLRs: Receptores tipo Toll (do inglês, Toll-Like Receptors)

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, Tumor necrosis factor-alpha)

TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (do inglês, Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand)

TRL4: Receptor do tipo Toll 4 (do inglês, Toll-Like Receptors 4)

TWEAK: Indutor fraco de apoptose (do inglês, TNF-related weak inducer of apoptosis)

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, Vascular endothelial growth factor)

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>17</b> |
| 1.1 Diabetes Mellitus   | 17        |
| 1.2 Cicatrização fisiológica de úlceras   | 19        |
| 1.3 Patofisiologia de úlceras crônicas  | 26        |
| <b>2. OBJETIVO</b>  | <b>31</b> |
| 2.1 Objetivo Geral  | 31        |
| 2.2 Objetivos específicos   | 31        |
| <b>3. JUSTIFICATIVA</b>   | <b>31</b> |
| <b>4. HIPÓTESE</b>  | <b>32</b> |
| <b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>32</b> |
| 5.1 Preparo e aplicação do gel de PRP   | 33        |
| 5.2 Aplicação da Escala Analógica Visual (EVA), registro fotográfico das feridas e obtenção de histórico médico | 35        |
| <b>6. RESULTADOS</b>  | <b>36</b> |
| 6.1 Gel de PRP  | 36        |
| 6.2 Relatos de Casos  | 36        |
| <b>7. DISCUSSÃO</b>   | <b>53</b> |
| <b>8. CONCLUSÃO</b>   | <b>59</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>60</b> |
| <b>ANEXOS</b>   | <b>67</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

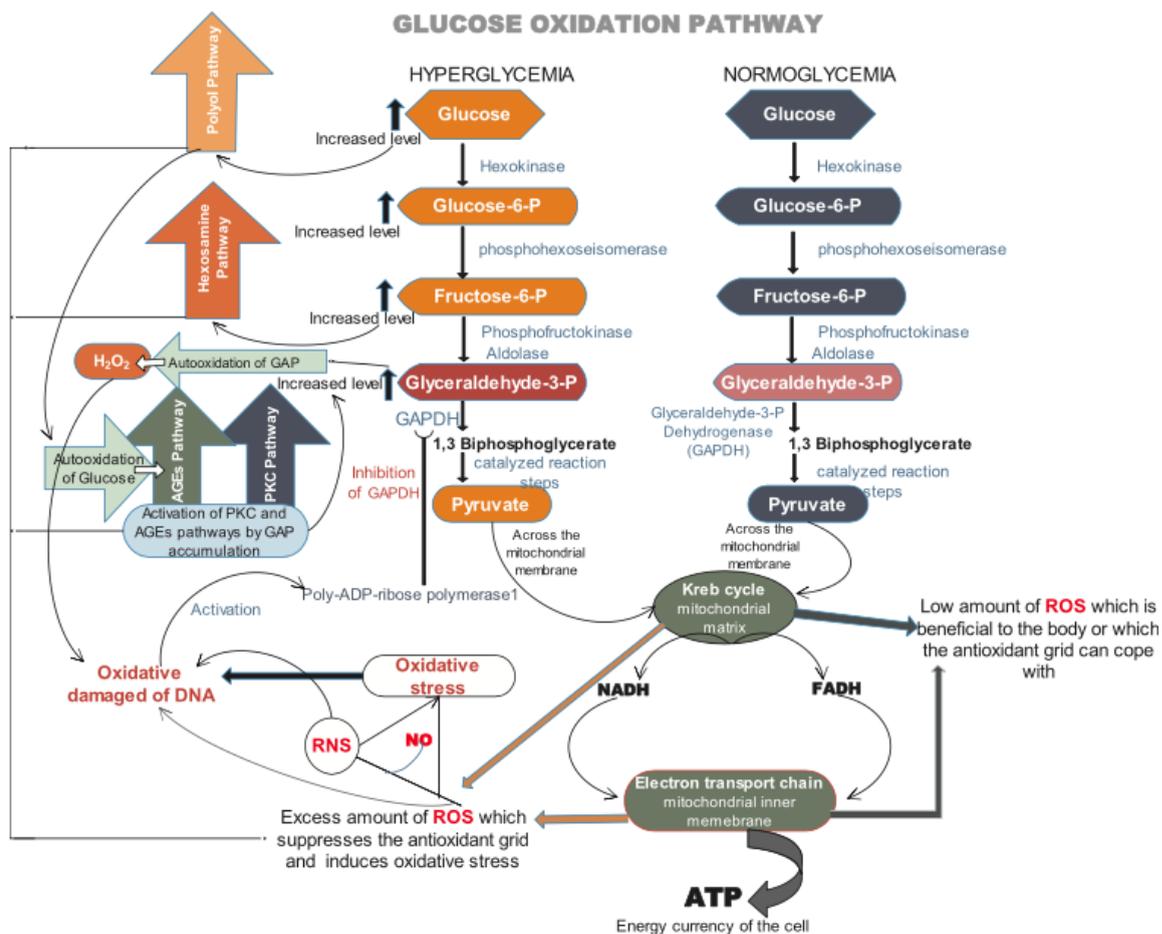
### 1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem endócrina e metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica. Sua classificação é baseada em sua etiologia, sendo o tipo 1 (DM1) caracterizado pela produção insuficiente ou ausente de insulina pelas células- $\beta$  pancreáticas, o tipo 2 (DM2) quando o organismo desenvolve resistência a ação da insulina e Diabetes Mellitus gestacional que ocorre quando há resistência insulínica desencadeada principalmente por hormônios gestacionais.<sup>1,2</sup> Os fatores de risco para o desenvolvimento de DM são multifatoriais, sendo os fatores genéticos mais relacionados com o DM1. Já os fatores associados com etnia, histórico familiar, idade, e estilo de vida como obesidade, sedentarismo, dieta desbalanceada estão mais relacionados ao desenvolvimento de DM2.<sup>2,3</sup>

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, é estimado que 537 milhões de adultos (20-79 anos) atualmente vivem com DM. Isso representa 10,5% da população mundial nesse grupo etário. É previsto que esse número aumente para 643 milhões (11,3%) em 2030 e para 783 milhões (12,2%) em 2045.<sup>3</sup> Essa estimativa é alarmante tanto do ponto de vista da qualidade de vida das pessoas quanto para os gastos públicos para o manejo do DM e de suas complicações.

A hiperglicemia crônica é o ponto em comum dentre todos os tipos de DM, sendo que seus efeitos deletérios se estendem para diversas estruturas e impactam muitas funções do organismo.<sup>4</sup> As complicações causadas pelo DM são, em sua grande maioria, crônicas e estão diretamente relacionadas com o aumento da taxa de morbidade e mortalidade. Dentre essas complicações, estão as desordens em microcirculação, que podem levar ao desenvolvimento de nefropatia, retinopatia, neuropatia, problemas na cicatrização e cardiovasculares. O estresse oxidativo é um fator crítico e determinante nessas complicações.<sup>4,5</sup>

As vias metabólicas como a glicolítica, da hexosamina, proteína C Quinase, Poliols e de produtos finais de glicação (AGEs) são vias pró-oxidativas e geralmente estão hiperativas em diabéticos, sendo responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo, devido a um desbalanço redox, causada pela supressão de enzimas antioxidantes e de defesas antioxidantes não enzimáticas. O estresse oxidativo é responsável por danos em membranas e biomoléculas essenciais, como DNA, proteínas e lipídios (Figura 1).<sup>6</sup>



**Figura 1: Oxidação de glicose e estresse oxidativo induzido por hiperglicemia:** A produção de radicais livres é aumentada em condições de hiperglicemia, levando a danos oxidativos ao DNA e a uma ativação subsequente da poli [ADP-ribose] polimerase 1, uma enzima reparadora de DNA. No entanto, a atividade da enzima Glicerolaldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é inibida, resultando no acúmulo de Glicerolaldeído-3-fosfato (GAP), que por sua vez leva a ativação de processos pró-oxidativos incluindo as vias da hexosamina, polioli, proteína quinase e produtos finais de glicação proteica (Ighodaro,2018).<sup>6</sup>

Do ponto de vista metabólico, o DM causa muitas disfunções, favorecendo as complicações associadas. No que diz respeito a cicatrização no DM, os distúrbios relacionados aos pés ou membros inferiores, como ulceração, infecção ou gangrena são indicações frequentes de hospitalização.<sup>7</sup> A úlcera de pé diabético (DFU) ou somente pé diabético, como é popularmente conhecida, é uma complicação frequente entre diabéticos, e caso não seja realizado um manejo adequado e efetivo, pode levar a amputação de membros inferiores nos casos mais graves. As úlceras podem ser desencadeadas por mau controle glicêmico, neuropatia periférica diabética, doença vascular periférica (isquemia), traumas

físicos e alta pressão plantar.<sup>8</sup> O manejo de DFU permanece sendo um desafio terapêutico e financeiro pelo mundo.<sup>9</sup>

O tratamento para DFU representa cerca de  $\frac{1}{3}$  do custo total dos cuidados diabéticos. Além dos altos custos para os sistemas de saúde, aproximadamente 20% dos pacientes possuem úlceras que não cicatrizam em um ano. E mesmo nos casos de cicatrização, a recorrência de úlceras é em torno de 40% de pacientes dentro de um ano.<sup>10</sup> Além dos fatores de risco para desenvolvimento de DFU, a disfunção no processo cicatricial causado pelo DM leva a exacerbação das úlceras, assim um pequeno ferimento pode atingir grandes proporções e cronicidade.

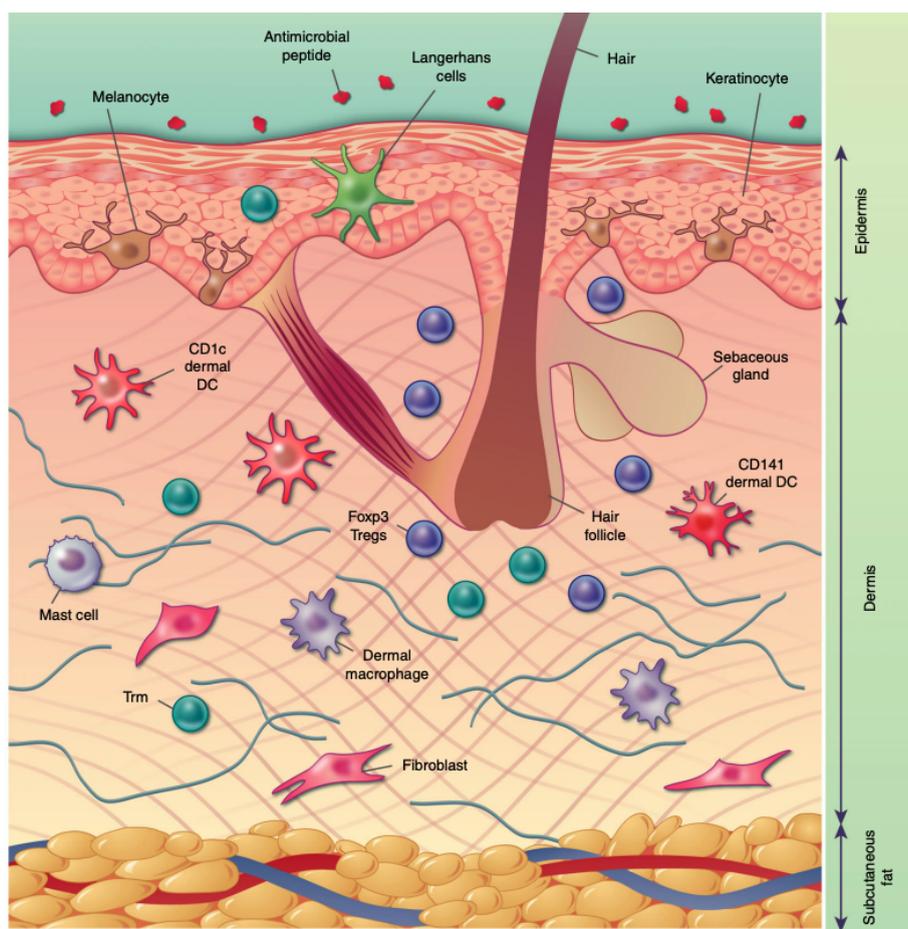
## 1.2 Cicatrização fisiológica de úlceras

A pele é uma estrutura complexa, oferece proteção aos órgãos internos contra agressões externas, promove integridade física, proteção imunológica, além de controle de temperatura e percepções sensoriais.<sup>11</sup> Os fatores externos são prejudiciais para a pele em níveis microscópicos como na desnaturação e degradação de proteínas, senescência celular, apoptose e diferenciação anormal, mas também a nível macroscópicos, como observado em feridas e fibrose.<sup>12</sup>

A estrutura da pele humana é composta de camadas distintas, cada uma composta de diversos tipos celulares e matriz extracelular (ECM). A camada mais externa é a epiderme composta principalmente por queratinócitos, melanócitos, células Merkel e células Langerhans. A camada mais interna é a derme, e do ponto de vista estrutural é a mais complexa, sendo composta de fibroblastos, glândulas sudoríparas, vasos linfáticos, tecido vascular e tecido nervoso. Abaixo dessas camadas há o tecido subcutâneo adjacente, também chamado de hipoderme. Todas essas estruturas interagem e coordenam mudanças moleculares para o reparo da pele quando ocorre injúria ou com o envelhecimento.<sup>13</sup> Além disso, hospeda um nicho imunológico especializado e crucial para manter a homeostasia dos tecidos.<sup>14</sup>

Peptídeos antimicrobianos e lipídios são secretados na superfície externa da pele para controle microbiológico. Os queratinócitos, um dos principais constituintes da epiderme, expressam receptores do tipo Toll (TLRs) sendo fator essencial para o reconhecimento de patógenos (PAMPs) e também padrões moleculares associados a danos (DAMPs), produzindo assim citocinas inflamatórias e quimiocinas como IL-1 $\beta$ , IL-8, CCL20 (recrutamento de

neutrófilos para o local).<sup>15</sup> Os fibroblastos são células estruturais da derme e também expressam TLRs desempenhando papel importante para o reconhecimento de patógenos. A sinalização TRL4 resulta na síntese de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-8 e CCL2 que são quimioatraentes para monócitos.<sup>16</sup> Células T de memória também compõem as defesas imunológicas da pele, mantendo uma vigilância imunológica e sendo crucial para iniciar uma resposta imune robusta. As células de Langerhans são fagócitos mononucleares, são apresentadores de antígenos para as células T na epiderme, e na derme esse papel é desempenhado pelas células dendríticas. Os macrófagos, também são células apresentadoras de antígenos, são sensíveis a PAMPs e DAMPs, mas além de respostas imunes, exercem função de hemostasia do tecido através de apropriado mecanismo anti-inflamatório, o que contribui para cicatrização de feridas (Figura 2).<sup>17</sup>



**Figura 2: Estrutura da pele e células da barreira imunológica local (Chambers and Vukmanovic-Stejic).<sup>17</sup>**

A cicatrização da pele é um processo extremamente coordenado e complexo que permite que um pequeno corte cicatrize de maneira eficiente em poucos dias. Em condições fisiológicas, envolve migração e sinalização celular, níveis apropriados de inflamação e angiogênese.<sup>18,19</sup> Quando, por algum motivo esse reparo ocorre inadequadamente, pode-se ter dois desfechos principais, ou a formação excessiva de tecido cicatricial (cicatriz hipertrófica ou quelóide) ou as úlceras crônicas, que são definidas como um defeito na barreira que não cicatriza em três meses.<sup>18</sup> O processo fisiológico de cicatrização ocorre em etapas sequenciais e distintas mas que em certos momentos podem se sobrepor, são elas a hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento.<sup>12</sup>

A hemostasia é a primeira resposta a uma injúria, onde o fator tecidual é exposto na parede dos vasos sanguíneos após comprometimento da vasculatura, iniciando a cascata de coagulação, realizada principalmente pelas plaquetas nesse momento. O coágulo na ferida é insolúvel e consiste em fibrina, sendo sua função primária conter o sangramento, e além disso funciona como molde para queratinócitos, para infiltração de células imunes na área da ferida e também como reservatório para citocinas e fatores de crescimento.<sup>14</sup> Além de seu papel na formação do coágulo, as plaquetas liberam moléculas bioativas, como fatores de crescimento e citocinas que estimulam células residentes da pele como os fibroblastos e queratinócitos.<sup>20</sup> O PDGF liberado pelas plaquetas promove a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, estimula a produção de fatores de crescimento e citocinas importantes para a cicatrização da ferida. Os macrófagos também possuem capacidade de secretar diversos fatores de crescimento, incluindo TGF- $\beta$ 1, VEGF, PDGF e FGF-2.<sup>21</sup>

A fase inflamatória é complexa e modulada por muitos fatores intrínsecos e extrínsecos. É caracterizada pelo influxo de células imunes, como neutrófilos, monócitos e linfócitos. Neste estágio há altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, para o recrutamento de outras células imunes periféricas. O objetivo da fase inflamatória é afastar quaisquer patógenos que tenham entrado no local da ferida e prevenir infecções. Além disso, fagócitos fazem a remoção de debris celulares.<sup>14</sup>

A primeira defesa é a resposta imune inata, iniciada pela ativação de células residentes como mastócitos, células Langerhans, células T e macrófagos por DAMPs liberados por células necróticas e tecido lesado, e PAMPs de componentes bacterianos. Neutrófilos são os primeiros a chegar no local da injúria, são atraídos por IL-1, TNF- $\alpha$ , e

endotoxinas bacterianas em casos de infecção. Em resposta a sinais pró-inflamatórios os neutrófilos e outras células no local liberam suas próprias citocinas. Neutrófilos fazem a remoção de tecido necrótico e patógenos via fagocitose, liberam ROS, peptídeos antimicrobianos, eicosanóides, enzimas proteolíticas e também liberam NETs. Na ausência de infecção, o número de neutrófilos do local da ferida diminui em poucos dias e os macrófagos os removem por esferocitose. Os neutrófilos remanescentes são removidos por apoptose, necrose ou fagocitose, ou podem sair do tecido inflamado e retornar para circulação através da migração reversa.<sup>22</sup>

Ainda na fase inflamatória, os monócitos circulantes entram no tecido da ferida onde se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos são as células efetoras no reparo tecidual desempenhando papéis versáteis e de alta plasticidade, além de removerem debris celulares necróticos. São tradicionalmente divididos em M1 de fenótipo pró-inflamatório e M2 de fenótipo anti-inflamatório. M1 são induzidos por estímulo inflamatório como LPS e IFN- $\gamma$  e promovem inflamação pela liberação de ROS, e citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), também secretam fatores de crescimento (VEGF e PDGF), induzem a proliferação e migração de fibroblastos, fagocitam neutrófilos apoptóticos. Nos estágios mais tardios da inflamação são caracterizados pela transição para M2, que por sua vez expressam citocinas (IL-4, IL-10, IL-13) capazes de imunomodulação como a IL-10 e arginase, também liberam fatores de crescimento para promover re-epitelização, fibroplasia e angiogênese, são as principais fontes de TGF- $\beta$  e induz a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos.<sup>12,20</sup>

Na sequência, acontece a fase proliferativa sendo marcada pela substituição do coágulo de fibrina por tecido de granulação, e pela intensa ativação de queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, para orquestrar o fechamento da ferida, deposição de ECM e angiogênese.<sup>14</sup> O coágulo de fibrina (matriz provisória) é degradado por MMP produzidas pelos fibroblastos, sendo substituído por tecido de granulação rico em fibronectina, colágeno imaturo e proteoglicanos. Esse tecido de granulação age como arcabouço para a migração e diferenciação de células da região da ferida, dando suporte a formação de novos vasos sanguíneos e deposição de ECM madura.<sup>22</sup> Nesse momento os fibroblastos residentes e derivados mesenquimais respondem a diversas moléculas incluindo TGF- $\beta$  e PDGF. Essa sinalização direciona os fibroblastos tanto para ser pró-fibrótico sintetizando proteínas de ECM ou para se diferenciar em miofibroblastos, o que ajuda na

contração da ferida. Novos vasos sanguíneos são formados para suprir as demandas metabólicas (entrega de oxigênio e de nutrientes) de um tecido altamente proliferativo.<sup>18</sup> A angiogênese é desencadeada por hipóxia, expressão de HIFs e liberação subsequente de VEGF e outros fatores. Em resposta a essas mudanças, células endoteliais microvasculares proliferam e migram pro leito da úlcera, formando novos vasos que se fundem com outros. O VEGF previne a apoptose de células epiteliais pois regula positivamente proteínas anti-apoptóticas como BCL-2. Os macrófagos desempenham papel importante na angiogênese pois produzem proteases como MMPs para degradar o network denso de fibrina e fatores quimioatraentes (TNF- $\alpha$ , VEGF e TGF- $\beta$ ), impulsionando assim a migração endotelial.<sup>20</sup>

Ainda na fase proliferativa, os fibroblastos se diferenciam para miofibroblastos que são responsáveis por promover força de contração no fechamento da ferida. Tanto o fibroblasto quanto o miofibroblasto iniciam a síntese de fibras imaturas de colágeno tipo III que atuam na formação de nova ECM.<sup>22</sup> As mudanças na tensão mecânica e gradientes elétricos, e também fatores de crescimento e citocinas ativam os queratinócitos, que por sua vez na borda da ferida sofrem transição para um fenótipo mais invasivo, migrando lateralmente através da ferida para refazer a camada epidérmica, processo chamado re-epitelização. Queratinócitos na nova epiderme libera MMPs para auxiliar na sua migração, sendo MMP-1 e MMP-9 essenciais pois ajudam na dissociação de receptores de integrina. Quando os queratinócitos dos lados opostos se encontram, a migração termina e uma fina camada é formada, e eles formam novas adesões à matriz subjacente. Assim os queratinócitos reformam completamente a membrana basal e sofrem diferenciação terminal, para estratificar e regenerar a epiderme.<sup>18,20</sup>

Na fase de remodelamento, há uma busca pela restauração da arquitetura original do tecido lesado. Muitas células imunes, células endoteliais, e miofibroblastos sofrem apoptose ou são removidos da ferida, restando principalmente a nova ECM recém sintetizada e MMPs que removem o excesso de colágeno, auxiliando na redução da formação de cicatrizes.<sup>14</sup> Além disso, as fibras imaturas do colágeno tipo III da fase proliferativa são substituídas por colágeno maduro tipo I, aumentando diretamente a força tênsil do tecido em cicatrização. Essas mudanças da ECM necessitam de um fino balanço entre a degradação e síntese de colágeno, alcançado pela regulação temporal de MMPs (Produzido por M2, fibroblastos e queratinócitos).<sup>22</sup> Uma vez iniciada, a fase de remodelamento pode continuar

por até 1 ano após injúria.<sup>14</sup> Quando as células do tecido de granulação não sofrem apoptose na fase de remodelamento, cicatrizes hipertróficas tendem a ser formadas.<sup>22</sup>

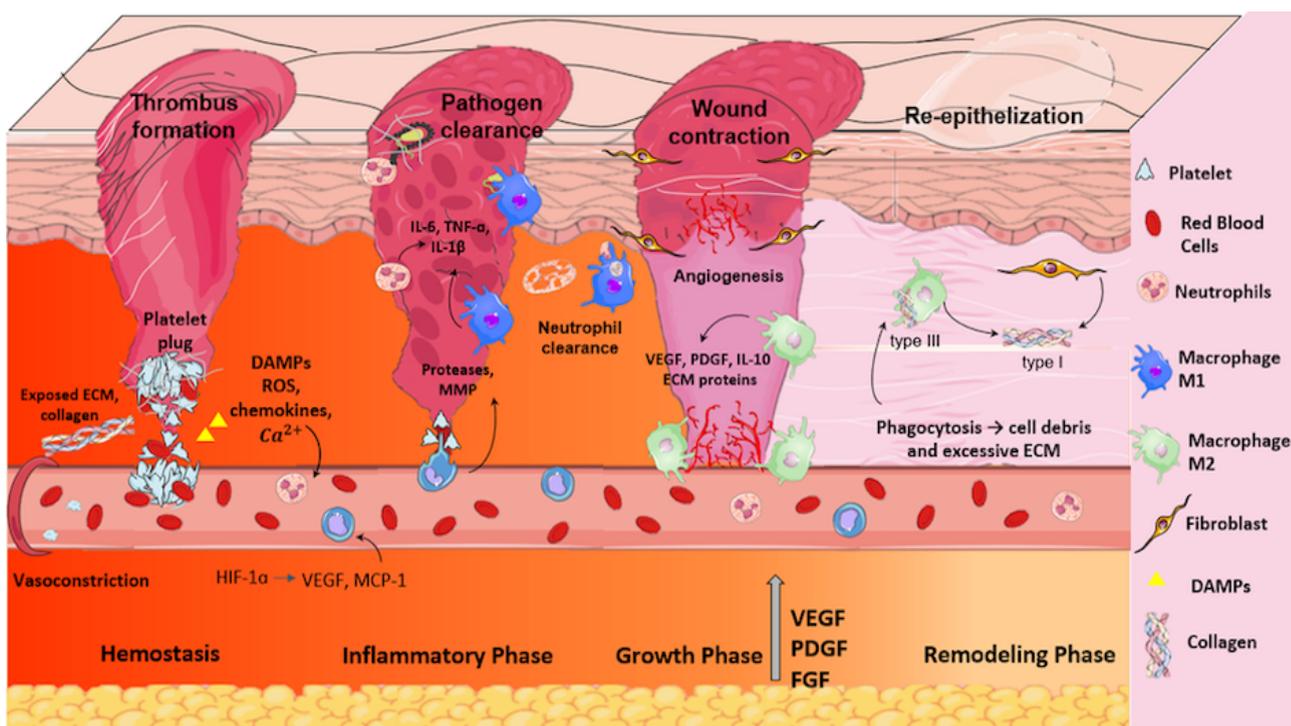
Os fatores de crescimento são essenciais durante todo o processo de reparo da pele, coordenando diversos eventos. Na tabela 1 estão descritos os principais fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização, suas ações e a etapa da cicatrização onde principalmente exercem seus efeitos. A cicatrização fisiológica está esquematizada na figura 3.

**Tabela 1: Fatores de crescimento envolvidos no reparo tecidual**

| <b>Fatores de Crescimento</b> | <b>Ação</b>   | <b>Fase da Cicatrização</b>   |
|-------------------------------|---|---|
| PDGF                          | Estimula a síntese de proteínas e colágeno; Quimiotaxia de monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células musculares lisas; Proliferação e migração de células endoteliais. | Um dos principais fatores secretados após o dano e promove reações celulares através de todas as fases do processo de cicatrização. |
| EGF                           | Proliferação de células epiteliais e queratinócitos assim como em sua diferenciação, crescimento e migração.  | Encontrado em maiores níveis no início do processo cicatricial.   |
| FGF                           | Suporte para epitelização, estimula a liberação de TGF- $\alpha$ ; Proliferação de fibroblastos; Acúmulo de colágeno; Acelera formação de tecido de granulação;             | Re-epitelização, angiogênese e formação de tecido de granulação.  |
| IGF                           | Efeito potencializado quando em combinação com outros fatores de crescimento como o PDGF e EGF; Migração de queratinócitos e aumento do reparo tecidual.                    | Ativamente envolvido na fase inflamatória e proliferativa; Fibroblastos secretam IGF-1 que exerce efeito autócrino.                 |
| VEGF                          | Exerce um forte efeito parácrino nas células endoteliais.   | Principal fator de crescimento responsável por iniciar a angiogênese no tecido de granulação.                                       |
| TGF- $\beta$                  | Diferenciação de fibroblasto e miofibroblasto; Deposição de ECM; Produção de colágeno e   | O TGF- $\beta$ possui 3 isoformas, sendo que o TGF- $\beta$ 3 está relacionado com angiogênese e o                                  |

|     |  |   |
|-----|--|---|
|     | fibronectina; Inibição de atividade de MMP.  | TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 associados com cicatriz e fibrose.                                  |
| HGF | Regulação do crescimento celular, motilidade e morfogênese em células epiteliais e endoteliais; Efeito sinérgico com o VEGF sobre células endoteliais, promovendo efeito angiogênico mais intenso. | Diretamente relacionado com reparo epitelial, formação de tecido de granulação e neovascularização. |
| KGF | Proliferação e migração de queratinócitos; Aumento da proliferação de células epiteliais.  | Principalmente na fase de remodelamento.  |

Fonte: Chicharro-Alcántara<sup>23</sup>



**Figura 3: Cicatrização fisiológica de feridas:** Após a injúria tecidual, a primeira fase de cicatrização é hemostasia, o influxo de células aumenta para o local. A fase inflamatória é iniciada e quando é finalizada, a fase proliferativa inicia sendo caracterizada por angiogênese, síntese de colágeno, e deposição de matriz extracelular. A última fase é o remodelamento, onde o colágeno tipo III é substituído por colágeno tipo I, macrófagos retornam para fenotipo fagocítico e há aumento de força tênsil da ferida, remodelamento de ECM e epitelização. O fechamento da ferida é o marco final do processo de cicatrização (Leme et al, 2022).<sup>24</sup>

### 1.3 Patofisiologia de úlceras crônicas

O processo de cicatrização é extremamente coordenado, e caso os eventos celulares e moleculares envolvidos não ocorram de forma adequada e não cicatrize em 3 meses ela é considerada uma úlcera crônica. Dentre as principais úlceras crônicas se destacam as de etiologia diabética, venosa e de pressão. A inflamação excessiva e persistente é um marco da maioria das úlceras crônicas, apresentando um aumento no influxo e retenção de células imunes inatas no local, o que pode inibir o processo de reparo tecidual.<sup>24</sup>

A DFU é geralmente decorrente de complicações de neuropatia periférica, deformidade dos pés e doença arterial periférica, sendo que em pacientes diabéticos a aterosclerose é acelerada e afeta principalmente os vasos da tibia.<sup>25</sup> De uma maneira geral, pode-se atribuir a cronicidade das úlceras há uma produção prejudicada de fatores de crescimento, resposta angiogênica inadequada e disfunção de células endoteliais, acúmulo de colágeno, migração e proliferação prejudicadas de queratinócitos e fibroblastos, estresse oxidativo e desbalanço entre o acúmulo de componentes extracelulares e suas proteases para o remodelamento. Também há prolongamento da fase inflamatória com consequente atraso na fase proliferativa.<sup>22,23</sup>

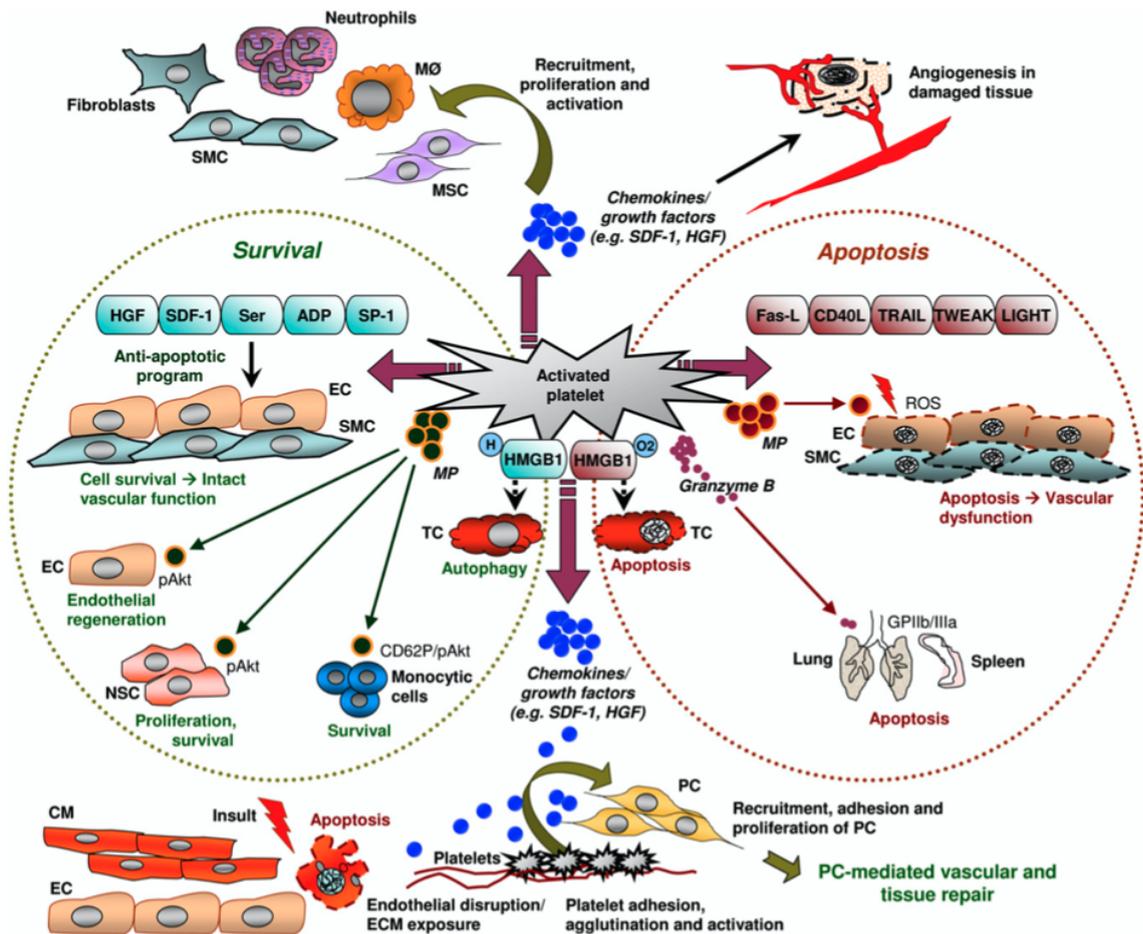
A hiperglicemia persistente compromete a função de leucócitos, induz senescência celular e causa glicação de componentes da ECM. Além disso, é causada uma disfunção endotelial, diminuindo assim a sinalização pró-angiogênica e produção de NO, ocasionando isquemia. Essa isquemia somada com as disfunções das células imunes, leva a uma resposta inflamatória inadequada. Há escassez de miofibroblastos, os queratinócitos das bordas da ferida expressam genes que refletem uma ativação parcial de proliferação, os fibroblastos aparecem senescentes comprometendo a síntese de ECM, com capacidade de migração menor e parecem ser não responsivos à sinalização de fatores de crescimento, refletido na redução drástica dos níveis de receptores TGF- $\beta$ . O tecido de granulação é defeituoso e não nutre a cicatrização, em parte devido a MMPs e uma infiltração deficiente de fibroblastos. Angiogênese é pobre e a fibrina restringe os vasos existentes, limitando a difusão de oxigênio na úlcera, causando hipóxia. O tecido danificado é substituído por tecido conectivo caracterizado por fibras de colágeno densamente orientadas, formando cicatriz sendo o grau de fibrose variável entre indivíduos.<sup>22</sup>

As bordas das úlceras em diabéticos costumam ser hiperqueratóticas e paraqueratóticas, devido a células locais não expressarem diversos ciclos celulares, diferenciação e marcadores desmosomais, sinalização de fatores de crescimento prejudicada e ausência de folículos pilosos. Ao mesmo tempo, a reconstituição da derme é inibida significativamente pelos altos níveis de proteases, que não somente quebram componentes de ECM, mas que também degradam fatores de crescimento e também citocinas. AGEs também induzem inflamação e estresse oxidativo via receptor RAGE.<sup>20</sup> A neovascularização é comprometida pela expressão reduzida do HIF-1 $\alpha$  e subsequente aumento do VEGF e do SDF-1 (recrutamento de progenitores endoteliais).<sup>25</sup>

Na inflamação prolongada no DFU há aumento na expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), os macrófagos são os primeiros produtores de tais citocinas, e no DM ele não faz a mudança fenotípica e funcional como esperado, permanecendo em estado pró-inflamatório. A hiperglicemia e o microambiente diabético conseguem mudar epigeneticamente macrófagos, via modificação de histona ou expressão de microRNA, para fenótipo pró-inflamatório. Os neutrófilos tendem a persistir por mais tempo na ferida pois são mais resistentes à apoptose e sua remoção pelos macrófagos é menos efetiva. É também observada redução de células T CD4<sup>+</sup>. Todas essas alterações, além de perpetuar o estado inflamatório, também aumentam a vulnerabilidade para infecções. Com inflamação persistente, há aumento na produção de MMP, principalmente MMP-1, MMP-8, MMP-9 e diminuição no TIMPs (inibidores). Esse desbalanço aumenta a degradação de ECM, prejudica a migração celular e reduz a síntese de colágeno.<sup>25</sup>

O tratamento padrão para DFU já é bem estabelecido e envolve desbridamento, curativos, diminuição da pressão no local da ferida, antibióticos para casos onde há infecção bacteriana, manejo da doença vascular periférica quando presente, bom controle glicêmico e em último caso a amputação.<sup>10</sup> Em pacientes com alto grau de isquemia, é realizada a revascularização do membro.<sup>7</sup> Contudo, muitos pacientes não respondem de forma efetiva, e o desfecho da cicatrização não é o desejável. Diante dessa dificuldade de manejo de DFU, há uma necessidade de novos tratamentos que visam uma cicatrização mais efetiva. Nesse contexto, a medicina regenerativa tem despertado interesse, e o uso de PRP vem ganhando destaque devido ao seu potencial de acelerar e estimular o processo de cicatrização, além de seu bom custo-benefício, facilidade e agilidade de preparo.<sup>23</sup>

O PRP é definido como produto autólogo derivado do sangue, onde a concentração de plaquetas é 2 a 5 vezes maior que no sangue circulante. O seu processamento é feito por meio de centrifugação, e quando as plaquetas são ativadas, liberam de seus grânulos- $\alpha$  moléculas bioativas que atuam em processos de reparo e regeneração tecidual, imunomodulação, regulação de apoptose e analgesia.<sup>26-29</sup>



**Figura 4: Moléculas bioativas liberadas por plaquetas e suas ações:** quando ativadas as plaquetas liberam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que controlam o recrutamento, proliferação e ativação de fibroblastos, neutrófilos, monócitos, SMCs, MSCs e outros tipos celulares críticos para a cicatrização de feridas. Também regulam a angiogênese em tecido danificado auxiliando na recuperação da função do tecido. Possuem capacidade de modular o balanço entre apoptose e sobrevivência celular, devido a sua capacidade de secretar mediadores pro-apoptóticos (Fas-L, CD40L, TRAIL, TWEAK, and LIGHT) assim como anti-apoptóticos (HGF, SDF-1, serotonina, adenosina difosfato e esfingosina-1-fosfato), além de controlarem um complexo mecanismo de reparo tecidual (Gawaz and Vogel, 2013).<sup>30</sup>

Dentre as diversas moléculas bioativas liberadas pelas plaquetas, do ponto de vista de melhora da cicatrização, se destacam os fatores de crescimento, que regulam o crescimento, diferenciação, proliferação e metabolismo celular de diversos tipos celulares. Promovendo assim, regeneração endotelial e epitelial, estimula angiogênese, síntese de colágeno, cicatrização de tecidos e hemostasia. Dentre esses fatores se destacam PDGF, EGF, HGF, FGF, IGF-1 e IGF-2, VEGF, TGF- $\beta$  e KGF.<sup>23</sup> Além de citocinas e quimiocinas que auxiliam na modulação do sistema imune.

Diante de todas as alterações desencadeadas pelo DM, as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento liberados pelo PRP tem uma atuação em diversas etapas da cicatrização afetadas pelo DM. Ativação do macrófago M2 por IL-4, IL-10, IL-13, e TGF- $\beta$ , restituição de fatores de crescimento depletados ou que foram menos sintetizados pelas células, imunomodulação da resposta inflamatória auxiliando para a resolução dessa fase que fica estagnada em diabéticos, assim permitindo que as fases subsequentes possam ocorrer, sendo suporte trófico para a região de ferida.<sup>24</sup>

Uma grande dificuldade em estudos com PRP é a falta de padronização para o seu preparo. O processamento consiste basicamente em centrifugação, porém o protocolo varia bastante entre os grupos de pesquisa. Essas diferenças interferem na reprodutibilidade dos protocolos de estudos e comparabilidade entre os resultados obtidos. Assim, o grupo de pesquisa em medicina regenerativa da UNICAMP fez estudos para padronizar o preparo do PRP, analisando diversas metodologias, e fazendo cálculos matemáticos para determinar qual a melhor forma de obtenção de PRP para ter o máximo de recuperação de plaquetas. Além disso, o grupo realizou a quantificação das moléculas bioativas e caracterização microscópica do PRP. Desde então, é utilizado pelo grupo de pesquisa o mesmo método de processamento.<sup>31,32</sup>

No que diz respeito a classificação do PRP, existem várias classificações utilizadas que levam em consideração aspectos específicos, o que também causa dificuldades envolvendo a comparação entre estudos. A tabela 2 mostra um resumo de todas as classificações do PRP até o momento atual.

**Tabela 2: Classificações do PRP ao longo do tempo**

| <b>Critério de Classificação</b>  | <b>Autores</b>   | <b>Detalhes da Classificação</b>   |
|---|--|--|
| Primeiro método de preparo descrito   | Anitua, 1999.  | Manual/Automatizado; força de centrifugação em G; melhores taxas de centrifugação; método de ativação.   |
| Método de preparo e produtos obtidos  | Anitua et al., 2005; Bielecki et al., 2007; Everts et al., 2008; Magalon et al., 2016; Mautner et al., 2015; Sánchez et al., 2007. | Líquido, gel or <i>clot formulation</i> ; Método de ativação; contagem final de plaquetas; presença ou não de leucócitos.  |
| Leucócitos e outras células hematopoiéticas   | Ehrenfest et al., 2009; (DeLong et al., 2012; Mautner et al., 2015)  | Presença e contagem de Leucócitos, arquitetura de fibrina; sistema PAW (Número de plaquetas, ativação e presença de leucócitos); Presença de Leucócitos e contagem de neutrófilos.   |
| DEPA  | Magalon et al., 2016.  | Dose de plaquetas injetadas; Eficiência do processamento; Pureza do PRP; Ativação.   |
| MARSPILL (Células Hematopoéticas e componentes moleculares)                                 | Lana et al, 2017.  | Neutrófilos, monócitos e seus subtipos, linfócitos, macrófagos, células vermelhas e biomoléculas, liberação de quimiocinas e interleucinas pelos grânulos alfa das plaquetas   |
| ISTH( International Society of Thrombosis and Hemostasis) classificação proposta            | Harrison, 2018   | Métodos de Preparo e Ativação: Concentração de plaquetas, sendo cada um subdividido em três.   |
| ISBT (International Society of Blood Transfusion) Padronização de lisado plaquetário humano | Henschler et al, 2019  | Método de preparo (sangue total/ concentração de plaquetas doadas) Controle de Infecção (patógenos aeróbios e anaeróbios, fungos, endotoxinas, vírus) ; Controle de qualidade (presença de microvesículas de biomoléculas e fatores de crescimento); Critérios de liberação do produto final; Regulamentação |

|                                   |                            |   |
|-----------------------------------|----------------------------|---|
| Classificação Bio-Produtos de PRP | Acebes-Huerta et al., 2020 | Bio-produtos de PRP: métodos de extração e preparo, caracterização de Bio-produtos; ativação; congelamento ou armazenamento sob refrigeração; tempo de armazenamento; controle de qualidade dos fatores derivados de plaquetas. |
| Classificação Proteômica          | Lee et al, 2020            | Proteínas identificadas relacionadas com cicatrização de feridas; neoangiogênese; migração de fibroblastos; biossíntese e ligações de colágeno e glicosaminoglicanos.   |

Fonte: Adaptado de Luzo et al<sup>33</sup>

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de ação do PRP na cicatrização de DFU de pacientes atendidos no ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, que não foram responsivos a nenhum dos tratamentos convencionais já definidos para tratamento das úlceras.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a evolução das feridas durante o tratamento com relação a:

- Diminuição das dimensões das feridas;
- Profundidade e características das bordas;
- Intensidade da dor relatada pelo paciente.

## 3. JUSTIFICATIVA

A DFU é uma complicação crônica do DM cujo tratamento convencional ainda não é totalmente efetivo. Os tratamentos disponíveis incluem o desbridamento da úlcera, alívio da pressão no local, controle da glicemia e controle de infecções, porém muitos pacientes não respondem efetivamente a esses tratamentos, podendo progredir para um quadro mais grave que pode levar a amputação do membro, além dos impactos na qualidade

de vida dos pacientes. Diante desse cenário, se faz necessário a busca por um tratamento efetivo para DFU, visando a completa cicatrização das úlceras e analgesia. Levando em consideração as moléculas bioativas liberadas pelas plaquetas, e seus efeitos benéficos, descritos em literatura, o PRP seria um possível tratamento para DFU. Um outro fator relevante no uso de PRP é seu ótimo custo-benefício, facilidade e agilidade de preparo.

#### **4. HIPÓTESE**

Diante das dificuldades para o tratamento e completa cicatrização de DFU, o PRP seria uma boa opção de tratamento visto suas propriedades de regeneração tecidual, imunomodulação, controle de proliferação celular e analgesia. Somado a isso, a facilidade para seu preparo e os custos acessíveis tornam o gel de PRP um futuro candidato para tratamento do DFU.

#### **5. MATERIAL E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo clínico de fase I, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE: 94921018.3.0000.5404, sobre o uso compassivo do gel de PRP para cicatrização de úlceras diabéticas, de pacientes atendidos no ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, que não foram responsivos aos tratamentos convencionais.

##### **Critérios de Inclusão:**

- Homens e mulheres com idade de 40 a 70 anos;
- Portadores de Diabetes Mellitus tipo 2
- Portadores de úlceras de pé diabético de etiologia neuropática, isquêmica ou mista sem melhora significativa da cicatrização com os tratamentos convencionais utilizados;
- Pacientes que tiveram recidiva e reaparecimento das úlceras após a realização de tratamento convencional;
- Possuir estado cognitivo preservado;
- Não estar em tratamento para neoplasia;

- Não estar em diálise;
- Não apresentar quadro de insuficiência hepática;
- Em tratamento no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, com rotina de retornos semanais.

**CrITÉRIOS de Exclusão:**

- Pacientes com sinais clínicos de infecção sistêmica: febre, calafrio, hipotensão;
- Pacientes com sinais de isquemia aguda;
- Pacientes com necrose bolhosa;
- Pacientes com neoplasias;
- Pacientes com cirrose hepática;
- Pacientes com problemas cognitivos que não permitisse a compreensão do TCLE;
- Pacientes que apresentaram melhora e cicatrização das úlceras com tratamentos convencionais;
- Pacientes que não compreenderam ou não aceitaram assinar o TCLE.

**Interrupção do estudo:** O estudo poderia ser interrompido caso o paciente não apresentasse nenhum quadro de melhora da cicatrização ou não quisesse mais participar.

O TCLE foi aplicado aos pacientes por membros da equipe de pesquisa. Foi realizada a leitura conjunta com os pacientes, e os mesmos puderam fazer seus questionamentos. Após todos os esclarecimentos, os pacientes assinaram 2 vias do TCLE, sendo uma via arquivada com a equipe de pesquisa e uma via entregue ao participante. Todos foram orientados que poderiam retirar o consentimento para participação no estudo a qualquer momento.

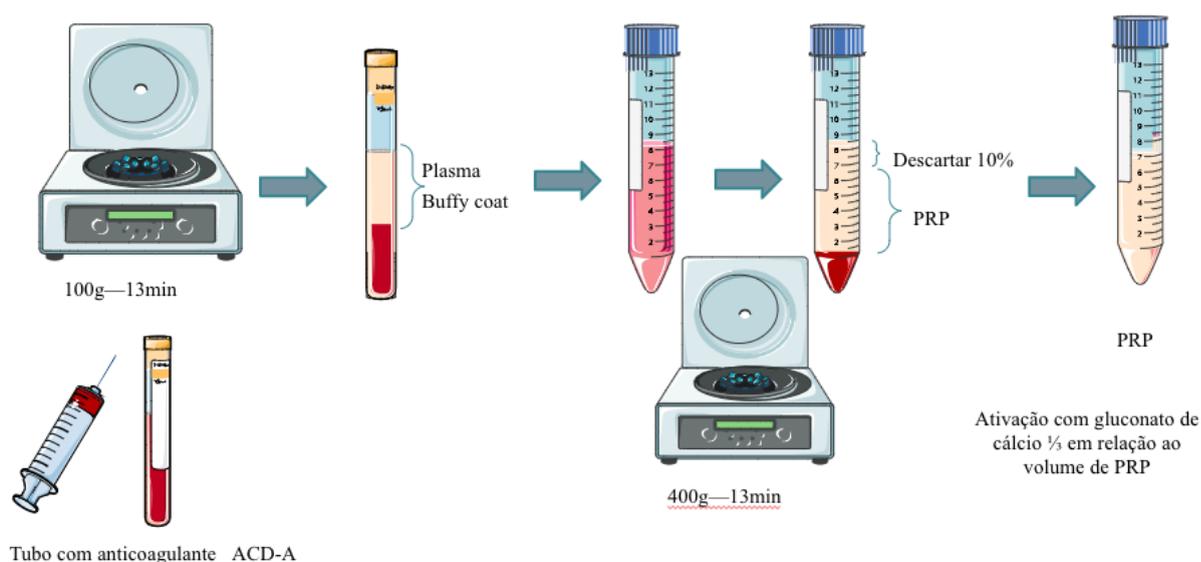
**5.1 Preparo e aplicação do gel de PRP**

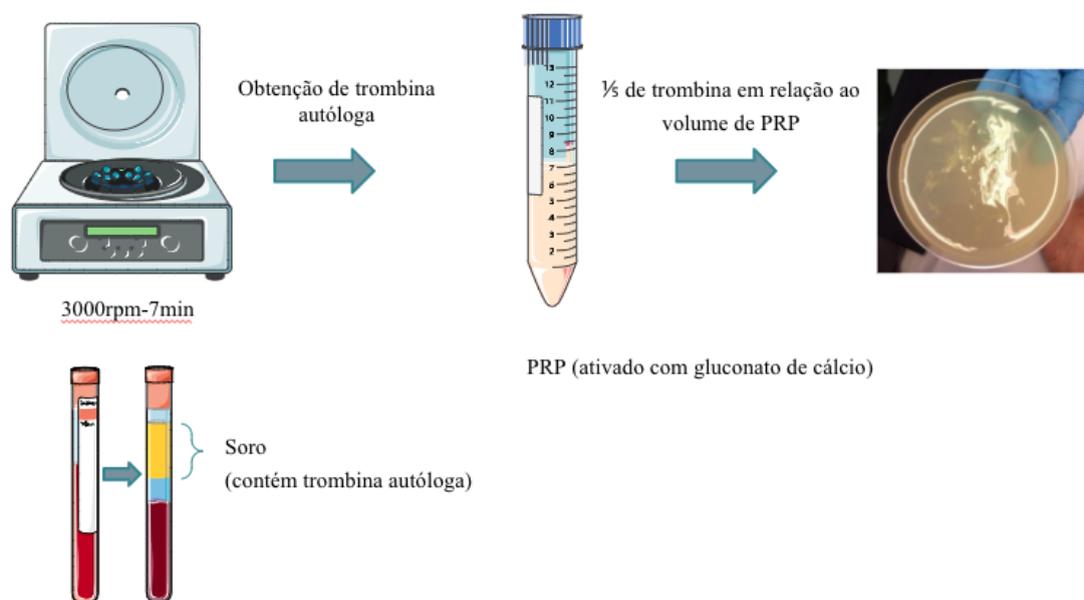
Para preparo do PRP foi coletado sangue periférico dos participantes, por punção venosa em membro superior, com garroteamento e assepsia do local da punção. O sangue foi coletado em tubo de 10 ml BD Vacutainer® com anticoagulante ACD-A para processamento do PRP e também foi coletado sangue em tubo seco com gel separador para obtenção de trombina autóloga para gelificação do PRP.

A quantidade de sangue coletado era dependente do hematócrito do paciente e também do tamanho das úlceras que seriam tratadas. As aplicações aconteciam uma vez por semana, e cada coleta variava em torno de 2 a 18 tubos de 10 mL de sangue em tubo com anticoagulante ACD-A. O número de tubos secos com gel separador também variava conforme parâmetros acima citados, sendo em torno de 2 a 4.

A obtenção do PRP <sup>24</sup> foi realizada por meio de duas centrifugações consecutivas do sangue colhido no tubo ACD-A. A primeira delas em 100g por 13 min, após essa etapa todo o plasma e buffy-coat foram transferidos para um tubo de centrifugação de fundo cônico, evitando a transferência de hemácias. Em seguida, era realizada uma nova centrifugação de 400g por 13 min. Para obtenção do PRP, foram descartados 10% da porção superior do plasma, e o restante corresponde ao PRP.

Para obtenção da trombina autóloga, o sangue coletado no tubo seco foi centrifugado a 3000 rpm por 7 min. Para a gelificação do PRP, as proporções utilizadas de gluconato de cálcio e de trombina autóloga foram 1:3 e 1:5, respectivamente, em relação ao volume de PRP. A gelificação ocorria rapidamente, portanto após o gluconato de cálcio e trombina autóloga serem colocados no PRP, o tubo era agitado 5 vezes aproximadamente por inversão, e o conteúdo transferido para uma placa de petri esteril. Todo o processamento era feito em cabine de fluxo laminar de classe 5 (Figura 5).



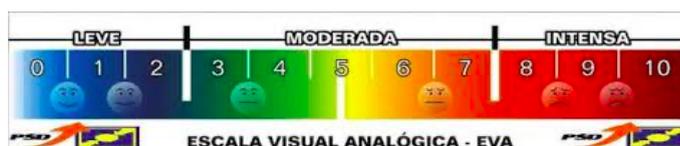


**Figura 5: Processamento e gelificação do PRP.** Fonte: do autor.

O gel de PRP era levado até o ambulatório, a úlcera era limpa com soro fisiológico 0,9% e o curativo feito com o novo gel. Os pacientes eram instruídos a não retirar o curativo até o próximo retorno. A quantidade de gel produzido era variável, de acordo com o tamanho da ferida. E a cada semana era realizada a coleta de sangue para produzir o gel para a troca de curativos.

## 5.2 Aplicação da Escala Analógica Visual (EVA), registro fotográfico das feridas e obtenção de histórico médico

Todas as semanas, a escala EVA (Figura 6) foi aplicada para aferir a intensidade da dor do paciente. As úlceras foram fotografadas semanalmente. Uma régua era posicionada ao lado das úlceras no momento do registro fotográfico, para acompanhamento da evolução em medida das úlceras. O histórico médico dos pacientes foi obtido por meio do prontuário do ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas da Unicamp.

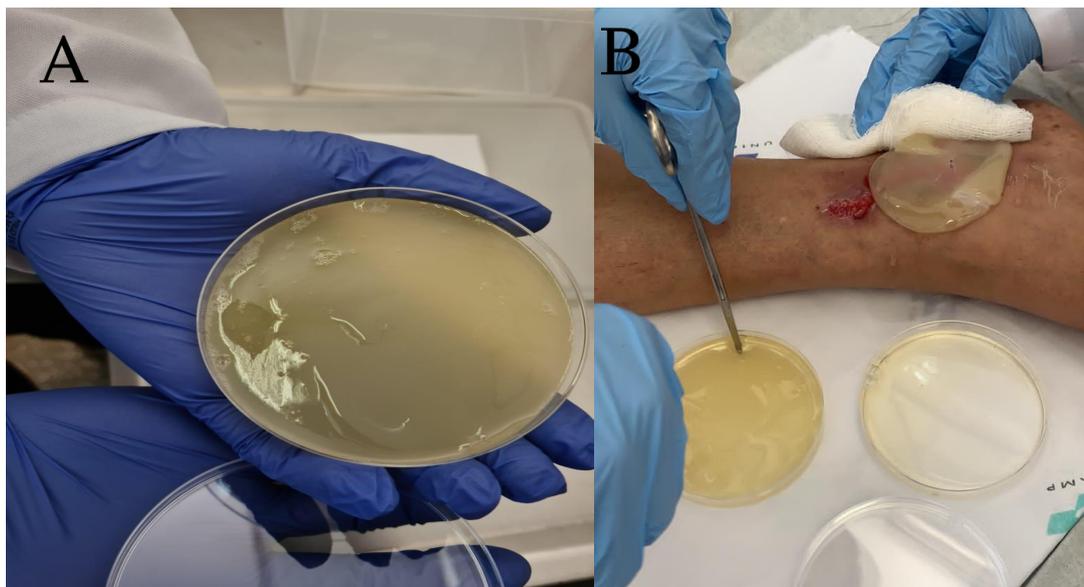


**Figura 6: Escala Visual Analógica (EVA) utilizada para aferição da intensidade da dor.**

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Gel de PRP

Com a formulação utilizada, a consistência obtida do gel de PRP está demonstrada na figura 7a. A cada semana o curativo era removido, a úlcera limpa, o gel de PRP aplicado topicamente e o curativo fechado novamente (Figura 7b).



**Figura 7: Gel de PRP.** A) Gel de PRP pronto para aplicação. B) Troca de curativo e aplicação tópica do gel de PRP.

### 6.2 Relatos de Casos

**Participante 1:** Paciente de 68 anos, sexo masculino, diabético tipo 2 há 20 anos, com histórico médico de transplante renal em 2011, hipertensão arterial sistêmica e coronariopatia. Apresentou úlceras profundas de etiologia mista (venosa, vascular e microangiopática), as quais apareceram espontaneamente sem origem traumática, por um período de 11 meses em membro inferior esquerdo, apresentando piora progressiva. As úlceras estavam espalhadas, sendo duas maiores e algumas outras menores. As duas úlceras maiores e mais profundas, que foram denominadas de úlcera 1 e úlcera 2, foram as escolhidas para tratamento com gel de PRP. A úlcera 1 estava localizada na face anterior da perna e a úlcera 2 estava localizada no maléolo lateral esquerdo.

Além das úlceras, o paciente também apresentava um quadro de dor crônica intensa, em queimação, contínua, no local das úlceras, E.V.A. 10/10. em terapia analgésica com derivado opioide, apresentava pouca resposta com permanência do quadro intenso de dor. Não apresentou resposta às terapias tópicas convencionais ao longo dos 11 meses. Como resultado a esse quadro, apresentava dificuldades de locomoção, necessitando de cadeiras de rodas. O paciente foi internado no Hospital das Clínicas da Unicamp, sendo avaliado pelo departamento de Cirurgia Vascular que contraindicou um tratamento cirúrgico devido ao quadro clínico de base do paciente. Em relação ao perfil glicêmico, o paciente apresentou em média glicemia de  $143,67 \pm 55,69$  mg/dl e de hemoglobina glicada  $9,13 \pm 0,58$  %. Em média, o número de plaquetas foi  $270.500 \pm 35.100$  / $\mu$ l e o hematócrito  $43,49 \pm 1,98$  %.

A úlcera 1 foi a primeira a ser tratada, e a úlcera 2 começou a ser tratada na semana seguinte. Ambas apresentavam necrose nas bordas e isquemia do tecido ao redor, porém sem infecção. Após a primeira semana do início do tratamento, o paciente relatou redução importante da dor na úlcera tratada em relação às demais, sendo que o mesmo relatou não sentir mais dor em 3 semanas do tratamento, E.V.A 0/10.

As dimensões da úlcera 1 pré-PRP eram de 8 cm x 4 cm, sendo a melhora progressiva a cada semana. Após 5 aplicações tópicas do gel de PRP, as dimensões não mudaram muito, contudo é possível observar a melhora na qualidade da pele ao redor da úlcera, o tecido de granulação se formando e a cicatrização ocorrendo do leito da úlcera para o exterior. Após 8 aplicações tópicas do gel de PRP, as dimensões da ferida eram 8 cm x 2,5 cm, com bordas bem definidas, pele adjacente rosada demonstrando boa vascularização do tecido (Figura 8). Foi observado um processo intenso de proliferação (hipergranulação) e uma biópsia foi realizada, sendo o resultado negativo para malignidade. O tecido de hipergranulação foi tratado com papaína a 3%, apresentando regressão em 3 semanas. Após 17 semanas da última aplicação do PRP a úlcera 1 estava completamente cicatrizada (Figura 9).

Durante todo o tratamento e mesmo após o fim das aplicações tópicas do gel de PRP, as úlceras não apresentaram nenhuma intercorrência como infecção. O paciente foi acompanhado por 3 anos, e a perna esquerda não teve nenhuma recidiva de úlcera e a dor permaneceu ausente, a pele com muita qualidade nos locais onde a úlcera foi tratada com gel

de PRP e cicatrizou sem cicatriz hipertrófica (Figura 10). O paciente relatou uma melhora significativa na qualidade de vida e locomoção, não necessitando mais usar cadeira de rodas.

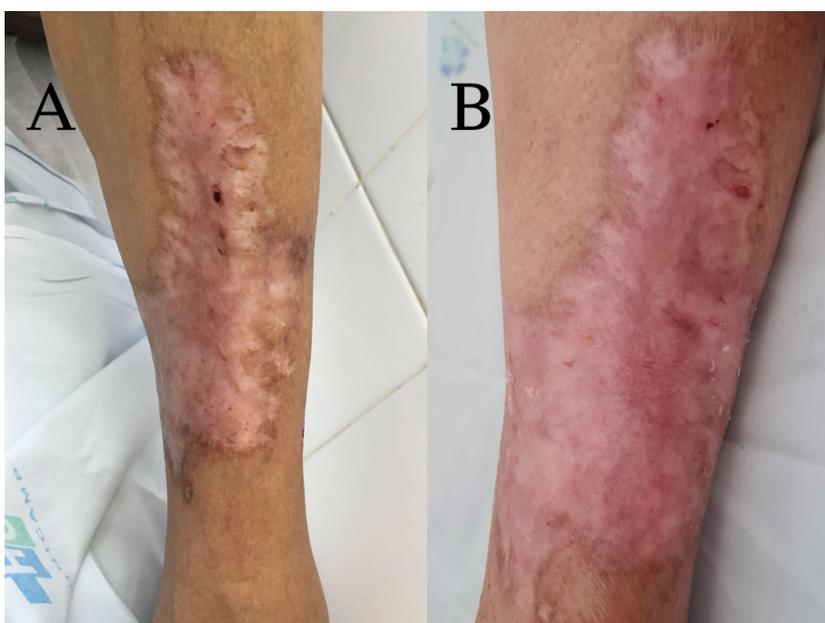
A evolução da úlcera 2 ocorreu de forma semelhante a úlcera 1, porém não foi observado hipergranulação, e no intuito de evitar que esta ocorresse após 8 aplicações tópicas de PRP foi finalizado o tratamento. As dimensões da úlcera 2 pré-PRP era de 3 cm x 6 cm, após 6 aplicações o tamanho era de 3 cm x 5 cm, no entanto apesar de o tamanho da úlcera não ter diminuído muito era perceptível que a úlcera estava bem superficial, indicando a cicatrização ocorrendo do interior para exterior. Após 7 aplicações, a úlcera tinha um tamanho de 3 cm x 4 cm (Figura 11). Após o término das aplicações do PRP, a cicatrização da úlcera 2 continuou evoluindo de forma favorável. A úlcera 2 cicatrizou quase que totalmente após 7 semanas do fim das aplicações tópicas do gel de PRP (Figura 12). De maneira semelhante à úlcera 1, o paciente não teve recidiva da úlcera 2 durante os 3 anos em que foi acompanhado (Figura 13).



**Figura 8: Evolução da úlcera 1 do participante 1 em uso do gel de PRP. A) Úlcera 1 pré-PRP. B) Úlcera 1 após 8 tópicas aplicações de PRP.**



**Figura 9: Evolução da úlcera 1 do participante 1 após uso do gel de PRP. A) Úlcera 1 após 3 semanas do fim das aplicações tópicas do gel de PRP. B) Úlcera 1 após 6 semanas do fim das aplicações tópicas do gel de PRP. C) Úlcera 1 após 17 semanas do fim das aplicações tópicas do gel de PRP.**



**Figura 10: Acompanhamento da úlcera 1 do participante 1. A) Úlcera 1 após 2 anos e 5 meses do início do tratamento. B) Úlcera 1 após 3 anos e 4 meses.**



**Figura 11: Evolução da úlcera 2 do participante 1 em uso do gel de PRP. A) Úlcera 2 pré-PRP. B) Úlcera 1 após 7 aplicações tópicas de PRP.**



**Figura 12: Evolução da úlcera 2 do participante 1 após uso do gel de PRP. A) Úlcera 2 após 4 semanas do fim das aplicações tópicas do gel de PRP. B) Úlcera 2 após 7 semanas do fim das aplicações tópicas do gel de PRP.**



**Figura 13: Acompanhamento da úlcera 1 do participante 1. A) Úlcera 2 após 2 anos e 5 meses do início do tratamento. B) Úlcera 2 após 3 anos e 4 meses.**

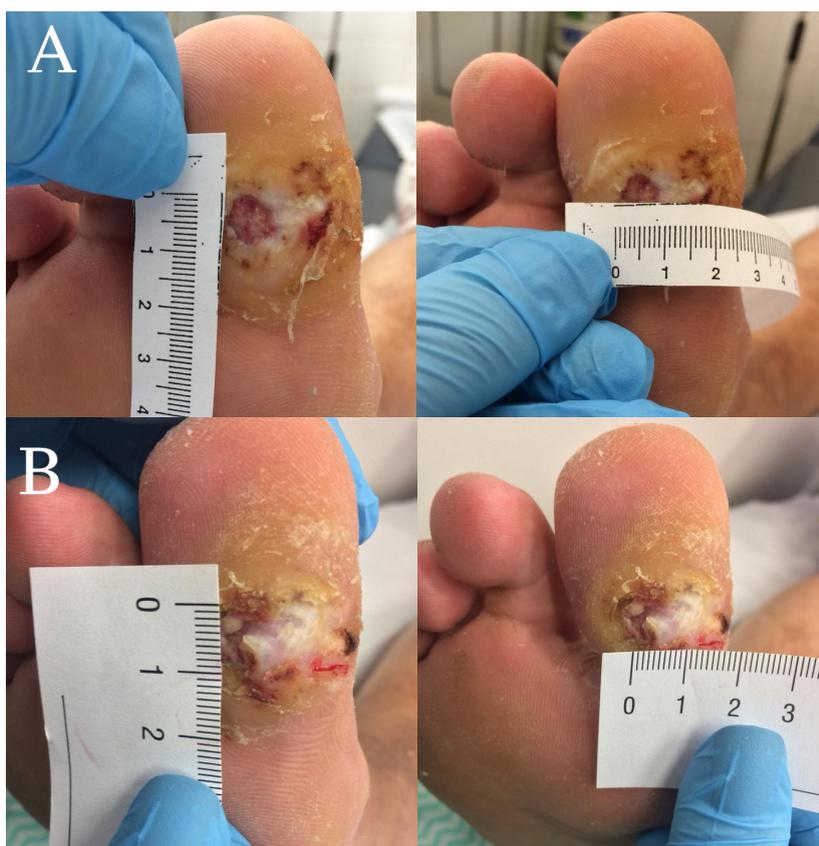
**Participante 2:** Paciente de 51 anos, sexo feminino, diabética tipo 2 há 21 anos, apresentava úlcera recorrente de pressão em hálux direito há 3 anos, com períodos variados de melhora e piora, sem uma cicatrização completa. A úlcera apresentava hiperqueratose e bordas maceradas, sendo que o tratamento adotado até o momento envolvia o desbridamento, alívio da pressão no local pelo uso de calçados adequados e controle glicêmico.

O tratamento com gel de PRP foi indicado pela equipe médica do ambulatório de endocrinologia. Antes da primeira aplicação tópica a dor relatada pela paciente era 4/10 na escala E.V.A, tamanho inicial da úlcera era de 3 cm x 2 cm, após 8 aplicações tópicas do gel de PRP o tamanho da úlcera diminuiu para 0,3 cm x 0,2 cm (Figuras 14 e 15). Foram realizadas no total 8 aplicações e após 10 semanas do início do tratamento a úlcera cicatrizou totalmente (Figura 16). A paciente relatou que na segunda semana a dor era de 0/0 na escala E.V.A. O perfil glicêmico da participante era média de glicemia de  $309,33 \pm 51,33$  mg/dl e de

hemoglobina glicada  $9,41 \pm 1,10$  %. Em média, o número de plaquetas foi  $153.500 \pm 30.989$  / $\mu$ l e o hematócrito  $38,93 \pm 3,52$  %.



**Figura 14:** Úlcera da participante 2. Úlcera pré- PRP.



**Figura 15:** Evolução da úlcera da participante 2 no uso do gel de PRP. A) Úlcera após 2 aplicações tópicas de PRP. B) Úlcera após 8 aplicações tópicas de PRP.



**Figura 16: Acompanhamento da úlcera da participante 2.** Úlcera 2 após 2 semanas do fim das aplicações tópicas do gel de PRP.

O local onde essa úlcera estava, é um lugar que sofre muita pressão ao andar. Por esse motivo, após 2 meses, a paciente apresentou recidiva da úlcera. Foi indicado um novo tratamento com gel de PRP, e mais uma vez o resultado foi satisfatório. O tamanho inicial da úlcera era de 1,5 cm x 1 cm e após 8 aplicações estava praticamente cicatrizada (Figura 17). No fim do tratamento a úlcera foi recoberta por uma fina camada de pele. A textura da pele era macerada por conta da força aplicada no local durante o caminhar (Figura 18).



**Figura 17: Evolução do segundo tratamento da participante 2 no uso do gel de PRP. A) Úlcera pré-PRP. B) Úlcera após 7 aplicações tópicas de PRP.**



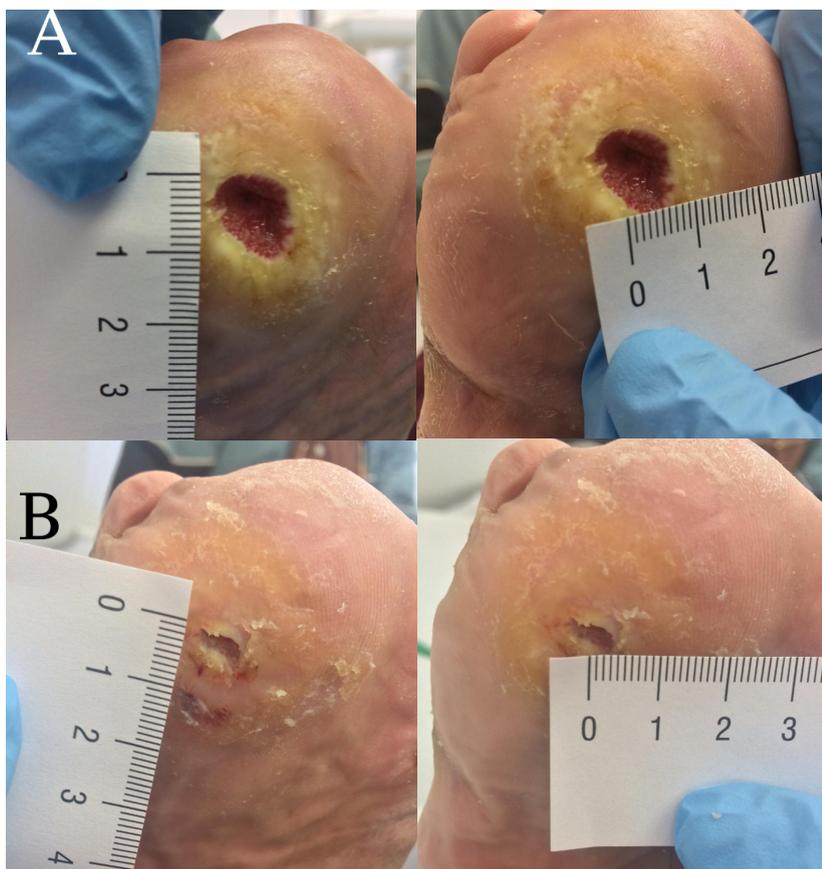
**Figura 18:** Acompanhamento do segundo tratamento da participante 2. Úlcera após 8 aplicações tópicas de PRP.

**Participante 3:** Paciente de 70 anos, sexo masculino, diabético tipo 2 há 30 anos, com diversas amputações de pododáctilos prévias. Apresentava úlcera plantar direita na região do quinto pododáctilo há 2 anos, com dor em queimação intermitente de intensidade 2/10 na escala E.V.A.

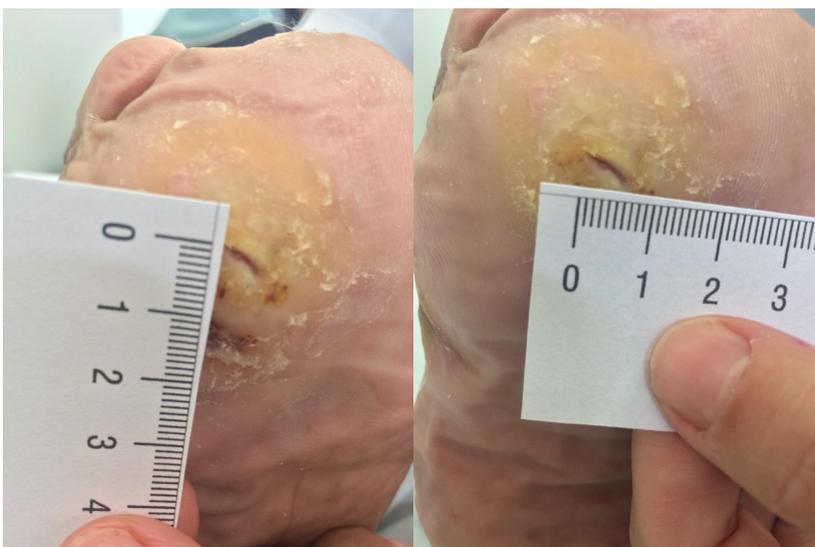
Foi indicado o tratamento com gel de PRP pela equipe médica do Ambulatório de Endocrinologia, sendo o perfil glicêmico do participante com média de glicemia de  $79,40 \pm 12,20$  mg/dl e de hemoglobina glicada  $5,35 \pm 0,85$  %. Em média, o número de plaquetas foi  $209.778 \pm 44.855$  / $\mu$ l e o hematócrito  $33,19 \pm 4,30$  %. O tamanho inicial da úlcera era de 0,9cm x 1,1cm (Figura 19). O paciente relatou que na segunda semana de tratamento a dor era 0/0 na escala E.V.A e a cicatrização ocorreu rapidamente, apresentando diferenças significativas entre as semanas (Figura 20). A cicatrização completa ocorreu na quinta semana de tratamento, portanto foram realizadas somente 5 aplicações tópicas do gel de PRP (Figura 21).



**Figura 19: Úlcera do participante 3. Úlcera pré-PRP**



**Figura 20: Evolução do tratamento do participante 3 no uso do gel de PRP. A) Úlcera após 1 aplicação tópica de gel de PRP. B) Úlcera após 4 aplicações tópica de gel de PRP.**



**Figura 21: Acompanhamento do tratamento do participante 3.** Úlcera após 5 aplicações tópicas de PRP.

**Participante 4:** Paciente de 70 anos, sexo masculino diabético tipo 2 há 23 anos. Apresentava úlcera crônica em maléolo medial em membro inferior direito há 3 meses após trauma local, relatando piora progressiva. O aspecto da úlcera era secretivo, com capa endurecida e dor latejante em queimação com pequena melhora por uma hora após uso de medicações prescritas do tipo opioides ou neuropáticas. Úlcera com fundo eritematoso, algumas áreas cobertas por crostas melicéricas, com algumas áreas escurecidas, sugestivas de necrose, com fundo sangrante, bordas relativamente bem definidas, eritematosas e pouco elevadas. Úlcera de 1,5 cm x 1,5 cm revestida por crosta hemática necrótica superiormente a úlcera anterior, sem secreção purulenta.

Foi discutida a indicação de tratamento com PRP, e para elucidação diagnóstica foi solicitado Doppler e Biópsia. No Doppler do membro inferior direito foi constatado ausência de fluxo nos terços proximal e médio da artéria tibial anterior e fluxo retrógrado em seu terço distal, além de apresentar ateromatose difusa. O resultado da biópsia mostrou que se tratava de úlcera crônica com extensa fibrose dermo-hipodérmica, tecido de granulação e processo inflamatório crônico inespecífico com áreas de supuração, pesquisa de fungos negativa e pesquisa de BAAR inconclusivas, sem indícios de pioderma gangrenoso. O tratamento com aplicação tópica de PRP foi indicado pela equipe médica.

As dimensões da úlcera no início do tratamento eram de 6,5 cm x 4,5 cm com pequeno ponto de necrose (Figura 22). Após 3 aplicações a lesão apresentava tamanho de 6 cm x 4 cm com melhora da hiperemia das bordas e ausência de necrose, após 5 aplicações de PRP o tamanho da úlcera era o mesmo porém mais superficial demonstrando uma cicatrização do interior para exterior. Após 7 aplicações de PRP a úlcera apresentava tamanho de 3 cm x 2 cm e foi observado hipergranulação no local e não foi mais aplicado PRP (Figura 23). Foi iniciado uso de papaína 10% porém a redução da hipergranulação não foi suficiente, sendo usado a cada 3 dias o curativo mesalt (Figura 24). Foi realizada biópsia, sendo o resultado negativo para malignidade. Após 3 meses a hipergranulação regrediu. O paciente apresentou melhora significativa da lesão após tratamento com PRP, portanto a equipe médica indicou novas aplicações para que a completa cicatrização fosse obtida (Figura 25).



**Figura 22: Úlcera inicial do participante 4. Úlcera pré-PRP.**



**Figura 23: Evolução do tratamento do participante 4 no uso do gel de PRP. A) Úlcera após 3 aplicação tópica de gel de PRP. B) Úlcera após 7 aplicação tópica de gel de PRP.**



**Figura 24: Evolução da hipergranulação da úlcera do participante 3. A) Hipergranulação após 3 semanas em uso de papaína 10%. B) Hipergranulação após 7 semanas de uso de papaína. C) Regressão completa da hipergranulação.**

Na segunda etapa do tratamento tópico com gel de PRP, após a primeira aplicação a úlcera apresentava dimensões de 3 cm x 1,8 cm (Figura 25). Após 2 aplicações o tamanho da úlcera reduziu para 2 cm x 1,8 cm. Após 5 aplicações o tamanho se manteve porém era perceptível que a cada semana a úlcera estava menos profunda (Figura 26). Após a sexta aplicação a cicatrização estava quase que completa e para não favorecer a hipergranulação novamente, o tratamento foi finalizado (Figura 27). Após 1 mês do fim do tratamento com PRP a úlcera estava completamente cicatrizada e desde então não apresentou recidiva (Figura 28). Perfil glicêmico do paciente com média de glicemia  $197,67 \pm 44$  mg/dL e de hemoglobina glicada  $7,47 \pm 1,29\%$ , com relação às plaquetas média foi de  $305.800 \pm 95.154/\mu\text{l}$  e hematócrito  $42,52 \pm 1,59\%$ .



**Figura 25: Úlcera antes do início da segunda etapa do tratamento tópico com PRP.**



**Figura 26: Evolução da segunda etapa do tratamento do participante 4 no uso do gel de PRP. A) Úlcera após 1 aplicação tópica de gel de PRP. B) Úlcera após 5 aplicações tópicas de gel de PRP.**



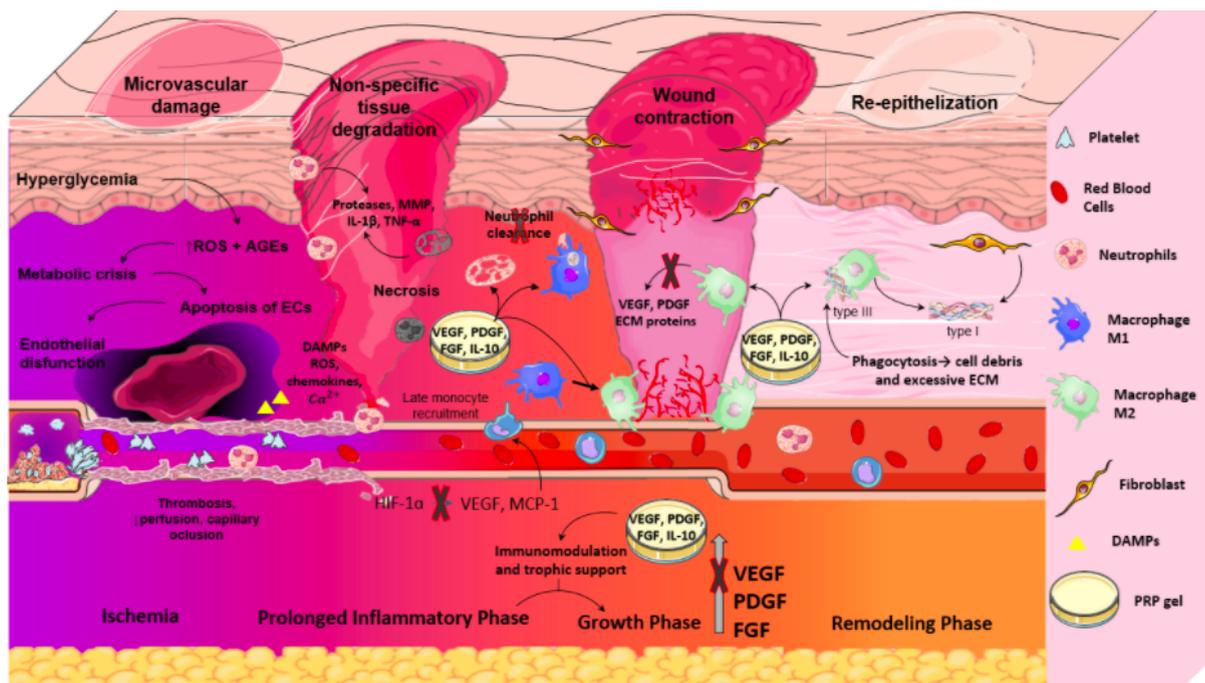
**Figura 27: Fim do tratamento do participante 4. Úlcera após 6 aplicações de PRP**



**Figura 28: Acompanhamento da úlcera do participante 4.** Úlcera após 1 mês do fim do tratamento com PRP.

## 7. DISCUSSÃO

O processo de cicatrização é regulado e coordenado por inúmeras citocinas e fatores de crescimento, além de inúmeras interações celulares. A cicatrização em diabéticos ocorre de maneira desregulada, alterando todos os eventos celulares e moleculares.<sup>34</sup> O uso do gel de PRP se demonstrou efetivo tanto na cicatrização das úlceras de pacientes diabéticos quanto na melhora da dor. Nos pacientes com as úlceras na região plantar dos pés, o fato de o local receber muita pressão no caminhar, fez com que as úlceras após algum tempo tivessem recidiva, porém enquanto no uso do gel de PRP apresentaram melhora significativa, o que não acontecia com os tratamentos convencionais. O tempo de resposta ao tratamento pode variar devido à fatores intrínsecos de cada paciente, controle glicêmico e local da úlcera. Foi possível observar, que mesmo após o fim das aplicações tópicas do gel de PRP as úlceras continuaram cicatrizando, devido a ação que o PRP teve de modular o processo cicatricial, ajudando na transição da fase inflamatória para a proliferativa, além de modular as respostas celulares no local da úlcera. A cobertura do leito da ferida com tecido de granulação foi um sinal da transição da fase inflamatória para a fase proliferativa<sup>35</sup>(Figura 29).



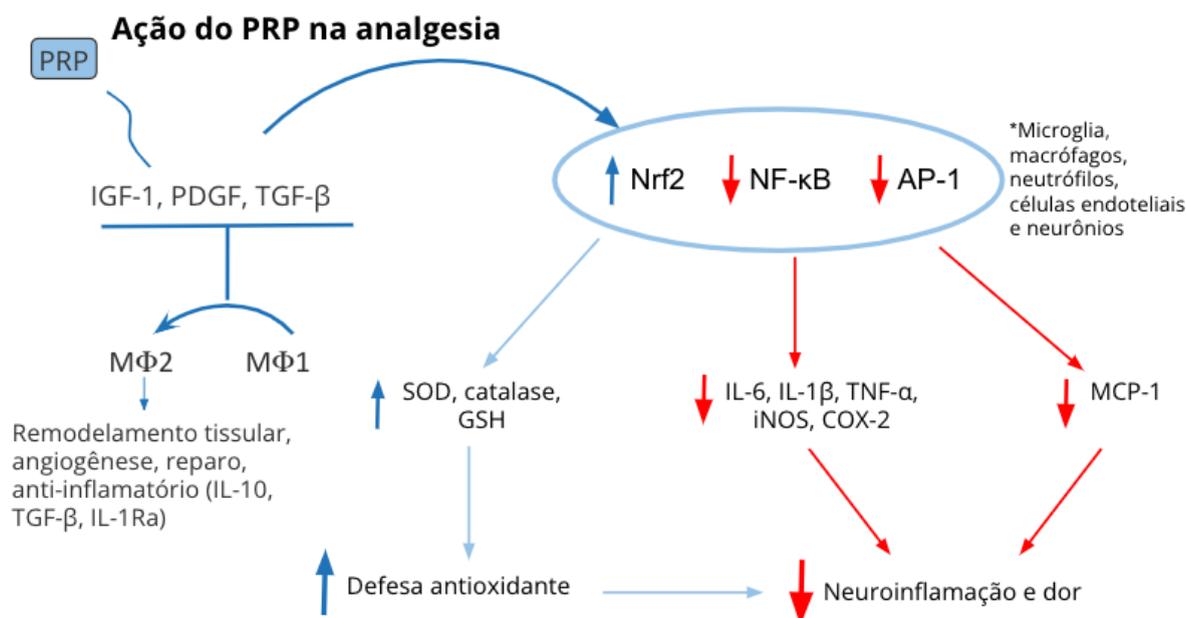
**Figura 29: Cicatrização em DFU e influência do Gel de PRP:** DM induz uma disfunção endotelial e isquemia, a fase inflamatória é mais longa devido a um atraso na expressão de quimiocinas, impactando na ativação de macrófagos, clearance de neutrófilos, remoção de debris celulares e ECM, atrasando assim a fase proliferativa. O VEGF liberado por macrófagos, queratinócitos e tecido adiposo subcutâneo é diminuído, fibroblastos são menos responsivos à hipóxia, e há aumento de síntese de MMPs. A angiogênese é afetada e a força tênsil da pele diminui, levando a úlceras recorrentes. GEL de PRP leva fatores de crescimento e citocinas para o local de injúria e promove suporte trófico para angiogênese e re-epitelização (Leme et al, 2022).<sup>24</sup>

Na literatura já foram descritos estudos envolvendo o uso de PRP para diversas patologias, contudo tais estudos são difíceis de serem reproduzidos, pois muitas vezes a metodologia de preparo do PRP não é descrita. Além disso, há diversas formas de processamento, algumas inclusive com kits comerciais, dificultando assim a comparação dos resultados. Isso se deve ao fato de a qualidade do PRP ser influenciada por particularidades no seu preparo como concentração de plaquetas, presença de leucócitos, tempo e velocidade da centrifugação, anticoagulante utilizado e hematócrito do paciente. Assim, ainda é difícil selecionar qual metodologia é melhor ou qual é mais propícia para determinado uso.<sup>36</sup>

Hirase T et al.<sup>37</sup> demonstraram em seu estudo que a cicatrização de úlceras de pé diabético tratadas com PRP tópico, apresentaram taxa superior quando comparadas aos pacientes que utilizaram tratamento convencionais. Dentre os 1.217 estudos identificados, apenas 11 foram selecionados, e mesmo assim foi possível observar a heterogeneidade entre

eles. O método utilizado no presente estudo é diferente de todos os apresentados por Hirase et al, mas os resultados obtidos corroboram com a conclusão feita pelos pesquisadores de que a aplicação tópica do PRP em úlceras de pé diabético resulta em índices de cura superiores aos tratamentos convencionais. Além da cicatrização e analgesia, um outro ponto a ser destacado foi a ausência de infecções durante todo tratamento e o reparo tecidual ocorreu sem formação de cicatriz hipertrófica. Esse resultado também condiz com a literatura de que os pacientes tratados com PRP apresentaram estatisticamente menos complicações se comparados ao grupo controle. Os efeitos benéficos observados se deve às moléculas bioativas e fatores de crescimento liberados pelos grânulos- $\alpha$  das plaquetas, que suprem as deficiências das DFU, além de modular as fases da cicatrização que estão estagnadas.

A neuropatia periférica diabética é uma complicação comum do DM, as apresentações clínicas incluem hipersensibilidade térmica e mecânica, dor espontânea em queimação, sensação de choque ou somente perda da sensibilidade sem apresentar dores. É resultado da destruição neuronal causada por desequilíbrio metabólico e consequente estresse oxidativo e apoptose. Esse mecanismo leva a sensação de dor, favorecimento para um ambiente inflamatório que sensibiliza neurônios, levando a dor persistente.<sup>38</sup> A dor em queimação é resultante do acometimento de fibras C que tornam-se danificadas e passam a produzir maiores disparos pela instabilidade da membrana, causando sintomas de hiperalgesia e alodinia. Células da microglia da medula espinhal na região dorsal estão ativos na neuropatia diabética, com superexpressão do receptor P2X4.<sup>39</sup> A analgesia após o uso de PRP, acontece graças a imunomodulação desempenhada, inibição da via NK- $\kappa$ B em células imunes e neuróglia, além de induzir a diferenciação dos macrófagos para o fenotipo M2. Os fatores de crescimento podem estimular a regeneração neural através da ação direta nas fibras danificadas. Além de induzir migração, proliferação e atividade biossintética em células Schwann e MSCs, aumentando mielinização, recuperação neurológica e regeneração de axônios.<sup>40</sup> Na figura 30 está esquematizado alguns mecanismos onde o PRP atua na analgesia.



**Figura 30: PRP e Analgesia**

Os tratamentos convencionais para úlceras de pé diabético, envolvem o desbridamento, alívio da pressão no local e controle glicêmico, contudo na maioria dos casos não há uma resposta efetiva do paciente. Como a fisiopatologia da úlcera crônica em diabéticos se relaciona com baixos níveis de fatores de crescimento e alterações de mecanismos celulares e moleculares, o tratamento padrão não é capaz de restabelecer as condições ideais para a cicatrização. Não existe um fator isolado exógeno que pode efetivamente mediar todos os aspectos da resposta cicatricial, contudo as plaquetas são uma fonte rica de fatores de crescimento e citocinas que estão envolvidas no processo natural de cicatrização.<sup>41</sup>

Fatores de crescimento são moléculas de polipeptídeos que são biologicamente ativos e funcionam de maneira parácrina ou autócrina, regulam quimiotaxia, migração, divisão e proliferação celular, formação de ECM e interações celulares.<sup>34</sup> Alguns produtos comerciais com fatores de crescimento estão disponíveis no mercado, porém o PRP apresenta uma maior variedade de fatores de crescimento, o que é melhor que fatores isolados e o custo do seu preparo é muito menor do que produtos comerciais. Todos os estágios da cicatrização

de feridas são regulados por fatores de crescimento secretados por plaquetas na fase inicial ou por células pró-inflamatórias. Esses fatores de crescimento alteram a atividade e morfologia de fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais, levando a mudanças na ECM e produção de fatores de crescimento pelas células do tecido. Assim, o gel de PRP é uma forma de suprir essas deficiências encontradas nas úlceras diabéticas.<sup>42</sup>

Para demonstrar o papel do TGF- $\beta$ 1 na cicatrização cutânea *in vivo*, Chong et al usaram um rato transgênico *knockout* onde megacariócitos e plaquetas não sintetizam TGF- $\beta$ 1. Foi utilizado modelo de úlcera excisional, e foi demonstrado que TGF- $\beta$ 1 aparenta promover a proliferação de queratinócitos e o remodelamento e regeneração da camada epidérmica.<sup>43</sup> Os fibroblastos são os principais mediadores da cicatrização de úlceras, estudos *in vitro* demonstraram que fibroblastos apresentaram aumento significativo em sua proliferação quando tratado com PRP em relação aos não tratados. Em relação a modulação de sua secreção de fatores de crescimento, o PDGF atingiu o pico antes da proliferação de fibroblastos, a secreção de IGF-1 e TGF- $\beta$ 1 aumentaram gradualmente atingindo pico máximo entre 4 a 6 dias pós-tratamento. A concentração de VEGF foi menor que a concentração de outros fatores de crescimento, porém aumentou conforme aumentou a proliferação celular.<sup>44</sup> Cho et al<sup>45</sup> demonstrou que o PRP aumentou a síntese de colágeno tipo I, expressão de MMP-1 e MMP-2 em fibroblastos de pele humana, além de aumentar a expressão da proteína alfa actina de músculos lisos. Estudos mais recentes demonstraram que o PRP promove a proliferação de fibroblastos via ativação da sinalização ERK1/2, além de regulação de apoptose via sinalização AKT.<sup>46</sup>

O PRP tem se demonstrado efetivo e seguro para úlceras crônicas. A meta-análise realizada por Xia et al<sup>47</sup> com 15 estudos clínicos entre 2000 a 2018 demonstrou que o grupo de pacientes tratados com PRP teve mais úlceras cicatrizadas em comparação ao grupo controle, sendo a diferença entre os grupos estatisticamente significativa. Contudo, mais estudos prospectivos precisam ser realizados para validar os resultados.<sup>47</sup> Uma revisão sistemática realizada por Del Pino-Sedeno mostrou que terapia com PRP impactou positivamente a cicatrização de úlceras e é uma opção segura para o tratamento de DFU crônica. A principal limitação desta revisão foi o baixo número e qualidade dos estudos.<sup>48</sup> Liao et al<sup>49</sup> avaliou a eficácia e segurança do PRP alogênico em comparação ao controle, após

30 dias foi observado redução de exsudato inflamatório e não foi observado nenhum tipo de reação de rejeição. A taxa de cicatrização foi muito mais rápida no grupo tratado com PRP alogênico em comparação ao grupo controle.<sup>49</sup> Esses estudos além de demonstrar o potencial do uso do PRP para tratamento de DFU, também trazem a problemática da dificuldade na comparação entre estudos devido ao baixo número e falta de padronização.

Sobre a composição de proteínas do PRP, ainda não há muitos estudos sobre a expressão de padrões de proteínas ativas no PRP. Lee et al identificaram 125 proteínas relacionadas com a cicatrização de feridas, 3 com angiogênese, 2 para migração de fibroblastos, 4 relacionadas com processo de biossíntese de colágeno, 2 para o processo de síntese de glicosaminoglicanos e 13 proteínas relacionadas a ligação de glicosaminoglicanos. Além dos fatores de crescimento que já são conhecidos por estarem envolvidos na cicatrização de tecidos, 25 novas proteínas foram identificadas.<sup>50</sup>

A principal vantagem do PRP inclui poucos efeitos colaterais, facilidade na técnica de preparo e ótimo custo-benefício. Porém, a falta de padronização no preparo dos produtos e nos sistemas de classificação levam a uma diversidade de produtos de PRP, que são descritos com diversas terminologias e abreviações. E assim, como consequências, devido a variações em seu preparo, pode haver diferenças nos desfechos clínicos e dificuldade na comparação entre estudos.<sup>51</sup>

O PRP é um promissor recurso para processos regenerativos, sendo cada vez mais difundidos os seus benefícios para cicatrização de úlceras modulando a resposta inflamatória, angiogênese, proliferação e migração celular. Contudo, ainda é necessário grandes estudos clínicos com métodos de processamento e tratamentos rigorosamente padronizados. Mesmo diante da diversidade de protocolos de preparo, esquemas de tratamentos e formas de aplicação, o uso do PRP no presente estudo demonstrou uma capacidade regenerativa significativa, que pode ser explorada e aprimorada cada vez mais para que se obtenha a maior eficácia desse produto autólogo.

## **8. CONCLUSÃO**

O uso de gel de PRP se mostrou efetivo na cicatrização de úlceras diabéticas crônicas, além de propiciar melhora no quadro de dor. A cicatrização ocorreu sem hipertrofia, com excelente qualidade de pele e sem a ocorrência de eventos adversos. Os resultados observados podem ser atribuídos a liberação de fatores bioativos dos grânulos- $\alpha$  que agiram na cicatrização e regeneração do tecido. Assim, o PRP tem potencial para ser um tratamento de úlceras de pé diabético.

## REFERÊNCIAS

1. Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Jan;38(1):e1-e8. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310221. PMID: 29282247; PMCID: PMC5776687.
2. Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rep.* 2019 Mar 4;21(4):21. doi: 10.1007/s11886-019-1107-y. PMID: 30828746.
3. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 10th edn.* Brussels, Belgium: 2021.
4. Dos Santos JM, Tewari S, Mendes RH. The Role of Oxidative Stress in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. *J Diabetes Res.* 2019 May 5;2019:4189813. doi: 10.1155/2019/4189813. PMID: 31192263; PMCID: PMC6525877.
5. Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol.* 2020 Jul;16(7):377-390. doi: 10.1038/s41581-020-0278-5. Epub 2020 May 12. PMID: 32398868.
6. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:656-662. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.058. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30245465.
7. Bandyk DF. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *Semin Vasc Surg.* 2018 Jun-Dec;31(2-4):43-48. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2019.02.001. Epub 2019 Feb 6. PMID: 30876640.
8. Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. *J Tissue Viability.* 2016 Nov;25(4):229-236. doi: 10.1016/j.jtv.2016.06.005. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27372176.
9. Vas P, Rayman G, Dhatariya K, Driver V, Hartemann A, Londahl M, et al. Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic foot ulcers in diabetes: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2020 Mar;36 Suppl 1:e3284. doi: 10.1002/dmrr.3284. PMID: 32176446.

10. Everett E, Mathioudakis N. Update on management of diabetic foot ulcers. *Ann N Y Acad Sci.* 2018 Jan;1411(1):153-165. doi: 10.1111/nyas.13569. PMID: 29377202; PMCID: PMC5793889.
11. Dyring-Andersen B, Løvendorf MB, Coscia F, Santos A, Møller LBP, Colaço AR, et al. Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. *Nat Commun.* 2020 Nov 5;11(1):5587. doi: 10.1038/s41467-020-19383-8. PMID: 33154365; PMCID: PMC7645789.
12. Kimura S, Tsuji T. Mechanical and Immunological Regulation in Wound Healing and Skin Reconstruction. *Int J Mol Sci.* 2021 May 22;22(11):5474. doi: 10.3390/ijms22115474. PMID: 34067386; PMCID: PMC8197020.
13. Bhartiya P, Masur K, Shome D, Kaushik N, Nguyen LN, Kaushik NK, et al. Influence of Redox Stress on Crosstalk between Fibroblasts and Keratinocytes. *Biology (Basel).* 2021 Dec 16;10(12):1338. doi: 10.3390/biology10121338. PMID: 34943253; PMCID: PMC8698713.
14. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 12;20(8):1811. doi: 10.3390/ijms20081811. PMID: 31013709; PMCID: PMC6515324.
15. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 20;21(22):8790. doi: 10.3390/ijms21228790. PMID: 33233704; PMCID: PMC7699912.
16. Yao C, Oh JH, Lee DH, Bae JS, Jin CL, Park CH, et al. Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes. *Int J Mol Med.* 2015 May;35(5):1443-50. doi: 10.3892/ijmm.2015.2146. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25812726.
17. Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology.* 2020 Jun;160(2):116-125. doi: 10.1111/imm.13152. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31709535; PMCID: PMC7218662.

18. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2015 Aug;173(2):370-8. doi: 10.1111/bjd.13954. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26175283; PMCID: PMC4671308.
19. Grigore TV, Cozma C. Platelet-rich plasma as a site-targeted approach in wound healing: a molecular perspective. *Discoveries (Craiova)*. 2018 Dec 31;6(4):e87. doi: 10.15190/d.2018.8. PMID: 32309605; PMCID: PMC7086061.
20. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology* 2020 Sep;10(9):200223. doi:10.1098/rsob.200223
21. Chang M. Restructuring of the extracellular matrix in diabetic wounds and healing: A perspective. *Pharmacol Res*. 2016 May;107:243-248. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.008. Epub 2016 Mar 24. PMID: 27033051.
22. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):665-706. doi: 10.1152/physrev.00067.2017. PMID: 30475656; PMCID: PMC6442927.
23. Chicharro-Alcántara D, Rubio-Zaragoza M, Damiá-Giménez E, Carrillo-Poveda JM, Cuervo-Serrato B, Peláez-Gorrea P, et al. Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management. *J Funct Biomater*. 2018 Jan 18;9(1):10. doi: 10.3390/jfb9010010. PMID: 29346333; PMCID: PMC5872096.
24. Leme KC, Neri GM, Biscaro GG, Bulgareli AA, Duran N, Parisi MCR, Luzo ACM. Full Diabetic Foot Ulcer Healing and Pain Relief Based on Platelet-Rich-Plasma gel Formulation Treatment and the Involved Pathways. *Int J Low Extrem Wounds*. 2022 Jul 3:15347346221109758. doi: 10.1177/15347346221109758. Epub ahead of print. PMID: 35786036.
25. Davis FM, Kimball A, Boniakowski A, Gallagher K. Dysfunctional Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers: New Crossroads. *Curr Diab Rep*. 2018 Jan 23;18(1):2. doi: 10.1007/s11892-018-0970-z. PMID: 29362914.

26. Shao S, Pan R, Chen Y. Autologous Platelet-Rich Plasma for Diabetic Foot Ulcer. *Trends Endocrinol Metab.* 2020 Dec;31(12):885-890. doi: 10.1016/j.tem.2020.10.003. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33199085.
27. Le ADK, Enweze L, DeBaun MR, Dragoo JL. Current Clinical Recommendations for Use of Platelet-Rich Plasma. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2018 Dec;11(4):624-634. doi: 10.1007/s12178-018-9527-7. PMID: 30353479; PMCID: PMC6220007.
28. Graiet H, Lokchine A, Francois P, Velier M, Grimaud F, Loyens M, et al. Use of platelet-rich plasma in regenerative medicine: technical tools for correct quality control. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2018 Nov 13;4(1):e000442. doi: 10.1136/bmjsem-2018-000442. PMID: 30498575; PMCID: PMC6241975.
29. Ramaswamy Reddy SH, Reddy R, Babu NC, Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018 Sep-Dec;22(3):367-374. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_93\_18. PMID: 30651682; PMCID: PMC6306612.
30. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood.* 2013 Oct 10;122(15):2550-4. doi: 10.1182/blood-2013-05-468694. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23963043.
31. Perez AG, Lichy R, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, et al. Prediction and modulation of platelet recovery by discontinuous centrifugation of whole blood for the preparation of pure platelet-rich plasma. *Biores Open Access.* 2013 Aug;2(4):307-14. doi: 10.1089/biores.2013.0015. PMID: 23914337; PMCID: PMC3731689.
32. Perez AG, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, Santana MH. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. *ISRN Hematol.* 2014 Mar 25;2014:176060. doi: 10.1155/2014/176060. PMID: 25006472; PMCID: PMC4005024.
33. Luzo ACM, Leme KC, Fávaro WJ, Durán N, Biscaro GG, Oliveira ALR, Boumediene K, Hammad M, Baugé C. Chapter 11 - Platelet-rich plasma, their growth factors, cytokines and clinical use. Editor(s): Santana MH, Souto EB, Shegokar R. *Nanotechnology and*

Regenerative Medicine, Academic Press, 2023, Pages 265-314, ISBN 9780323904711. doi:10.1016/B978-0-323-90471-1.00015-3

34. Zubair M, Ahmad J. Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: A detailed review. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019 Jun;20(2):207-217. doi: 10.1007/s11154-019-09492-1. PMID: 30937614.

35. Rainys D, Cepas A, Dambrauskaite K, Nedzelskiene I, Rimdeika R. Effectiveness of autologous platelet-rich plasma gel in the treatment of hard-to-heal leg ulcers: a randomised control trial. *J Wound Care.* 2019 Oct 2;28(10):658-667. doi: 10.12968/jowc.2019.28.10.658. PMID: 31600109.

36. Croisé B, Paré A, Joly A, Louisy A, Laure B, Goga D. Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: Literature review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2020 Apr;121(2):150-154. doi: 10.1016/j.jormas.2019.07.001. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31299341.

37. Hirase T, Ruff E, Surani S, Ratnani I. Topical application of platelet-rich plasma for diabetic foot ulcers: A systematic review. *World J Diabetes.* 2018 Oct 15;9(10):172-179. doi: 10.4239/wjd.v9.i10.172. PMID: 30364787; PMCID: PMC6198285.

38. Rosenberger DC, Blehschmidt V, Timmerman H, Wolff A, Treede RD. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *J Neural Transm (Vienna).* 2020 Apr;127(4):589-624. doi: 10.1007/s00702-020-02145-7. Epub 2020 Feb 8. PMID: 32036431; PMCID: PMC7148276.

39. Teixeira JM, Dos Santos GG, Neves AF, Athie MCP, Bonet IJM, Nishijima CM, et al. Diabetes-induced Neuropathic Mechanical Hyperalgesia Depends on P2X4 Receptor Activation in Dorsal Root Ganglia. *Neuroscience.* 2019 Feb 1;398:158-170. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.003. Epub 2018 Dec 8. PMID: 30537520.

40. Kuffler DP. Platelet-Rich Plasma Promotes Axon Regeneration, Wound Healing, and Pain Reduction: Fact or Fiction. *Mol Neurobiol.* 2015 Oct;52(2):990-1014. doi: 10.1007/s12035-015-9251-x. Epub 2015 Jun 6. PMID: 26048672.

41. Ahmed M, Reffat SA, Hassan A, Eskander F. Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Clean Diabetic Foot Ulcers. *Ann Vasc Surg.* 2017 Jan;38:206-211. doi: 10.1016/j.avsg.2016.04.023. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27522981.
42. Gonchar IV, Lipunov AR, Afanasov IM, Larina V, Faller AP, Kibardin AV. Platelet rich plasma and growth factors cocktails for diabetic foot ulcers treatment: State of art developments and future prospects. *Diabetes Metab Syndr.* 2018 Apr-Jun;12(2):189-194. doi: 10.1016/j.dsx.2017.09.007. Epub 2017 Sep 21. PMID: 29050916.
43. Chong DLW, Trinder S, Labelle M, Rodriguez-Justo M, Hughes S, Holmes AM, et al. Platelet-derived transforming growth factor- $\beta$ 1 promotes keratinocyte proliferation in cutaneous wound healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2020 Apr;14(4):645-649. doi: 10.1002/term.3022. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32068954; PMCID: PMC7216944.
44. Noh KC, Liu XN, Zhuan Z, Yang CJ, Kim YT, Lee GW, et al. Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma-Derived Growth Factors Enhance Human Fibroblast Proliferation In Vitro. *Clin Orthop Surg.* 2018 Jun;10(2):240-247. doi: 10.4055/cios.2018.10.2.240. Epub 2018 May 18. PMID: 29854349; PMCID: PMC5964274.
45. Cho JW, Kim SA, Lee KS. Platelet-rich plasma induces increased expression of G1 cell cycle regulators, type I collagen, and matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2012 Jan;29(1):32-36. doi: 10.3892/ijmm.2011.803. Epub 2011 Sep 30. PMID: 21964487.
46. Cho EB, Park GS, Park SS, Jang YJ, Kim KH, Kim KJ, Park EJ. Effect of platelet-rich plasma on proliferation and migration in human dermal fibroblasts. *J Cosmet Dermatol.* 2019 Aug;18(4):1105-1112. doi: 10.1111/jocd.12780. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30280483.
47. Xia Y, Zhao J, Xie J, Lv Y, Cao DS. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma Dressing for Chronic Nonhealing Ulcers: A Meta-Analysis of 15 Randomized Controlled Trials. *Plast Reconstr Surg.* 2019 Dec;144(6):1463-1474. doi: 10.1097/PRS.0000000000006281. PMID: 31764670.
48. Del Pino-Sedeño T, Trujillo-Martín MM, Andía I, Aragón-Sánchez J, Herrera-Ramos E, Iruzubieta Barragán FJ, et al. Platelet-rich plasma for the treatment of diabetic foot ulcers: A

meta-analysis. *Wound Repair Regen.* 2019 Mar;27(2):170-182. doi: 10.1111/wrr.12690. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30575212.

49. Liao X, Liang JX, Li SH, Huang S, Yan JX, Xiao LL, Song JX, Liu HW. Allogeneic Platelet-Rich Plasma Therapy as an Effective and Safe Adjuvant Method for Chronic Wounds. *J Surg Res.* 2020 Feb;246:284-291. doi: 10.1016/j.jss.2019.09.019. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31622885.

50. Lee HW, Choi KH, Kim JY, Kim KO, Haotian B, Yuxuan L, et al. Proteomic Classification and Identification of Proteins Related to Tissue Healing of Platelet-Rich Plasma. *Clin Orthop Surg.* 2020 Mar;12(1):120-129. doi: 10.4055/cios.2020.12.1.120. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32117548; PMCID: PMC7031431.

51. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 21;21(20)

## ANEXOS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Ação do plasma rico em plaquetas (PRP) em feridas de pé diabético

**Pesquisador:** Ângela Cristina Malheiros Luzo

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 94921018.3.0000.5404

**Instituição Proponente:** Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.618.086

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação de uma Emenda ao projeto CAAE 94921018.3.0000.5404

#### Objetivo da Pesquisa:

Apresentar uma Emenda

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios não foram alterados em relação ao projeto original.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Data da aprovação do projeto por este CEP: 15/10/2018 (parecer número 2.961.228, em 'PB\_PARECER\_CONSUBSTANCIADO\_CEP\_2961228.pdf', de 15/10/2018 09:21:44).

Através da Emenda apresentada, o pesquisador informa que a pesquisa tem sido benéfica aos voluntários, e solicita a inclusão de mais voluntários.

Informa assim o pesquisador (campo 'Justificativa da Emenda', arquivo 'PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1432078\_E1.pdf', de 09/09/2019 17:11:15): "A importante melhora na cicatrização com a utilização do gel de PRP autólogo ficou muito evidente nos casos onde foi utilizado assim como houve uma importante diminuição da dor. O projeto inicial previa a realização do procedimento em 6 pacientes, conseguimos realizar em 3. Devido a melhora do quadro com cicatrização persistente das úlceras destes pacientes fica nítida a importância de proporcionar o tratamento para um maior número de pacientes".

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.618.086

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador inclui também dois arquivos adicionais:

- 'Resultados.pdf' (de 09/09/2019 17:02:18), onde são apresentados resultados para os 3 voluntários que participaram da pesquisa

- 'Emenda.pdf' (de 09/09/2019 17:00:41) onde, por sua vez:

a) é solicitada a inclusão da pesquisadora 'Krissia Caroline Leme' na equipe de pesquisa

b) a adição de "17 pacientes em decorrência aos resultados obtidos que se encontram descritos no Relatório Final do projeto de Iniciação Científica do aluno Guilherme Martins Neri, já aprovado pelo PIBIC".

**Recomendações:**

Solicitamos que em uma próxima emenda a pesquisadora faça a alteração do número de participantes de 8 para 20 junto aos documentos gerados na Plataforma Brasil.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Lista de pendências e inadequações emitidas no parecer CEP nº3.598.007:

1- Inserir o nome da pesquisadora 'Krissia Caroline Leme' no campo 'Equipe de Pesquisa' no documento Informações Básicas do Projeto gerado pela Plataforma Brasil.

Resposta:O nome da aluna já foi adicionado no documento, Informações Básicas do Projeto, gerado na Plataforma Brasil. Não o colocamos a priori pois pensávamos que teríamos primeiro que ter a anuência deste CEP.

Análise:Pendência Atendida.

2- Apresentar, de modo claro, mais informações sobre a solicitação de adicionar ao projeto outros 17 pacientes em decorrência aos resultados obtidos que se encontram descritos no Relatório Final do projeto de Iniciação Científica do aluno Guilherme Martins Neri, pois não temos acesso ao relatório Final PIBIC. Esclarecer também, se os 8 participantes que seriam recrutados neste projeto já concluíram a pesquisa e encaminhar o relatório parcial deste projeto através de notificação.

Resposta:Estamos adicionando para maior esclarecimento quanto a eficácia do procedimento nos 3 pacientes que foram submetidos ao tratamento, o relatório PIBIC completo. Na realidade temos liberação pelo CEP para realizarmos 8 pacientes, fizemos em 3, portanto ainda faltam.

Precisamos de autorização para inserir mais 12 pacientes para que o n de 20 pacientes seja atingido. Saliento que não alteramos o n de pacientes , mantendo os 8 iniciais em toda a

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.618.086

documentação do projeto existente na Plataforma Brasil.

Análise: A pesquisadora esclarece que dos 8 participantes previstos no projeto original, somente 3 foram submetidos ao tratamento. Nesta emenda a pesquisadora solicita o aumento do tamanho amostral de 8 participantes para 20, ou seja, solicita a inclusão de mais 12 participantes na pesquisa.

Aprovado com "Recomendações" (Vide item acima "Recomendações")

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.618.086

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento  | Arquivo                               | Postagem               | Autor                          | Situação |
|---|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1432078 E1.pdf | 26/09/2019<br>15:52:46 |                                | Aceito   |
| Outros  | RELATORIOPIBIC.pdf                    | 26/09/2019<br>15:50:29 | Ângela Cristina Malheiros Luzo | Aceito   |
| Outros  | CartaResposta.pdf                     | 26/09/2019<br>15:49:01 | Ângela Cristina Malheiros Luzo | Aceito   |
| Outros  | Emenda.pdf                            | 09/09/2019<br>17:00:41 | Ângela Cristina Malheiros Luzo | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEatual.pdf                         | 09/10/2018<br>16:56:35 | Ângela Cristina Malheiros Luzo | Aceito   |
| Outros  | Vinculo_Universidade.pdf              | 26/09/2018<br>17:45:39 | Ângela Cristina Malheiros Luzo | Aceito   |
| Folha de Rosto  | folhaderosto.pdf                      | 31/07/2018<br>12:58:32 | Ângela Cristina Malheiros Luzo | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | PRP.pdf                               | 31/07/2018<br>12:11:07 | Ângela Cristina Malheiros Luzo | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.618.086

CAMPINAS, 03 de Outubro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Renata Maria dos Santos Celeghini**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br