

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROTÓCOLOS DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM
ENXERTOS CUTÂNEOS EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*)**

Carlos Alfredo Calpa Oliva
Médico Veterinário Zootecnista

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROTÓCOLOS DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM
ENXERTOS CUTÂNEOS EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*)**

**Carlos Alfredo Calpa Oliva
Orientador: Profº. Dr. Andriago Barboza De Nardi**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

2017

C164p Calpa Oliva, Carlos Alfredo
Protocolos de plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Carlos Alfredo Calpa Oliva. – Jaboticabal, 2017
xviii, 34 p : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Andriago Barboza de Nardi

Banca examinadora: Jorge Luiz Costa Castro, Rafael Ricardo Huppel, Pamela Rodrigues Reina Moreira, Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias

Bibliografia

1. Cirurgia reconstrutiva. 2. Concentração plaquetária. 3. Inflamação. 4. Ferida. 5. Neovascularização. 6. Protocolos PRP. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-089.843:636.92



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PROTOCOLOS DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM ENXERTOS CUTÂNEOS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

AUTOR: CARLOS ALFREDO CALPA OLIVA

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JORGE LUIZ COSTA CASTRO
Departamento de Cirurgia Veterinária / PUC/Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Curitiba/PR

Prof. Dr. RAFAEL RICARDO HUPPEL
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNICESUMAR - Maringá/PR

Profa. Dra. PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARLOS ALFREDO CAPA OLIVA – nascido em *Guachucal* (Nariño, Colômbia) em 1958, ingressou no Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia em 1981 na *Universidade de Caldas* (Manizales, Colômbia) concluindo-o em 1987. Trabalhou na Clínica de Pequenos Animais até meados de 1996. Prestou concurso público para ingressar como Professor Efetivo na *Faculdade de Ciências Agropecuárias da Universidade de Nariño* (Pasto, Colômbia), em Março de 1997 onde atua como Professor Assistente no *Departamento de Salud Animal do Programa de Medicina Veterinária*. Tornou-se mestre em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal em Junho de 2007, sob a orientação do Professor Dr. Carlos Roberto Daleck. Foi liberado da *Universidade de Nariño* e ingressou no Programa de Pós-graduação em Clínica Médica Veterinária da FCAV/Unesp Câmpus de Jaboticabal, no curso de doutorado, em Agosto de 2013, terminando o mesmo no ano de 2017, sob a orientação do Professor Dr. Andriago Barboza de Nardi.

DEDICATORIA

A minha esposa Vicky,

Companheira da vida, a quem devo totalmente a sustentação emocional desta caminhada. Agradeço imensamente pelo amor, carinho e apoio incondicional. Você faz e fará sempre parte da minha vida.

A meus filhos Felipe e Sofia,

Por renovar minha fé a cada dia, a cada abraço, a cada sorriso. Por ser minha fonte inesgotável de incentivo e esperanças. Por tornar feliz até o mais nebuloso e estressante dos dias. Por me mostrar que o importante é estar perto de quem se ama.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A vida, por me oferecer a oportunidade de terminar mais uma etapa na minha formação acadêmica.

De forma especial agradecer ao Professor Andriago Barboza de Nardi, pela orientação, a oportunidade e por acreditar em mim. Pessoa de bom coração, sempre oferecendo além de orientação, amizade e apoio incondicional.

A Josiane Morais Pazzini, por compartilhar seus conhecimentos sem egoísmo algum e me brindar apoio para a realização do meu trabalho, além de sua amizade durante o tempo todo.

A minha equipe do experimento (Ricardo Ramirez Uscategui, Eduardo Luis Serafim, Viviam Tavares e Oscar Rodrigo Sierra) pela sua ajuda para que o trabalho desse certo.

Aos meus colegas de pós-graduação (Rafaela Bartolotti Viéra, Jorge Alvarez, Talita Raposo, Bruna Fernanda Firmo, Ana Pascoli, Nazilton Reis Filho, Giovani Hernandez) pelo apoio e colaboração, no âmbito profissional e pessoal.

Ao Professor João Ademir de Oliveira pela sua ajuda na análise estatística do trabalho.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UNESP, Jaboticabal (Arnildo, Anésia, Isilda e Edson) pelo auxílio nas atividades relacionadas com meu experimento.

A Renata e Cláudia por sua colaboração no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária.

Aos amigos que tive a felicidade de conhecer durante a pós-graduação e pude crescer junto e me ajudaram a passar os dias difíceis durante este período.

A todos os familiares e amigos na Colômbia, que a distância sempre torceram pelo meu sucesso e sempre me incentivaram.

A Universidade de Nariño – UDENAR, pelo apoio e concessão da comissão de estudos.

A Universidade Estadual Paulista – UNESP/FCAV Câmpus Jaboticabal, pela oportunidade de cursar o Doutorado e de utilizar sua estrutura para desenvolver este trabalho de pesquisa.

A AUIP (Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado) e PAIDEX (Programa de Apoio a Estudantes de Doutorado do Exterior), pela concessão da bolsa de estudo.

E, a todos que de uma forma ou outra, fizeram parte deste caminhar de quatro anos aqui no Brasil.



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Protocolos de plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em lamina em coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*)**", protocolo nº 3.759/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barbosa De Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 07 de abril de 2016.

Vigência do Projeto	20/04/2016 a 10/05/2016
Espécie / Linhagem	Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
Nº de animais	32
Peso / Idade	2,5 – 3,5 Kg / 160 – 180 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Unesp "Julio de Mesquita Filho" - Botucatu

Jaboticabal, 07 de abril de 2016.

Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
CAPITULO 1 – Considerações gerais	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Revisão de Literatura.....	2
1.2.1 Anatomia da Pele.....	2
1.2.2 Irrigação da Pele.....	4
1.2.3 Cicatrização das Feridas.....	4
1.3 Cirurgias Reconstitutivas.....	7
1.4 Enxertos cutâneos.....	8
1.5 Plasma Rico em Plaquetas.....	11
1.5.1 Ativação das Plaquetas.....	12
1.5.2 Fatores de Crescimento.....	13
1.5.3 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas.....	14
1.6 Referências.....	17
CAPITULO 2 – EFEITOS DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE ENXERTOS DE PELE EM COELHOS (<i>Oryctolagus Cuniculus</i>)	21
Abstract.....	21
Resumo.....	21
Introdução.....	22
Material e métodos.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	28
Conclusões.....	30

Agradecimentos.....	30
Referências.....	30
APÊNDICE	33
Apêndice 1.Instruções aos autores.....	33

PROTOSCOLOS DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM ENXERTOS CUTÂNEOS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMO - A cirurgia reconstrutiva em pequenos animais é especialidade que vem ganhando importância nas últimas duas décadas devido ao manejo das feridas traumáticas. Uma variedade de procedimentos da cirurgia reconstrutiva estão disponíveis para prevenir complicações e evitar custos desnecessários. Grandes defeitos podem exigir que o tecido seja mobilizado a partir de outros locais, retalhos pediculados ou enxertos. O plasma rico em plaquetas (PRP) é tido como produto adjuvante no processo cicatricial de cirurgias reconstrutivas, devido ao seu potencial auxílio nos processos de hemostasia e estimulação da formação de novos vasos sanguíneos. Neste estudo, objetivou-se avaliar os resultados da aplicação de diferentes protocolos de PRP nos enxertos cutâneos de coelhos. Foram utilizados 32 coelhos da raça Nova Zelândia branco, distribuídos em quatro grupos de 8 animais, sendo: grupo controle (GC) no enxerto foi adicionado soro fisiológico, grupo PRP adicionado Gluconato de cálcio (PRP-G), grupo PRP adicionado 100µL de zona neva e hemácias (PRP-ZN) e grupo PRP sem adição de nenhuma substância (PRP-L). Coletou-se sangue de cada animal e centrifugou-se conforme cada protocolo proposto. A avaliação macroscópica foi feita no 3º, 7º, e 14º dia do procedimento cirúrgico. Na sequência, com 14 dias do procedimento cirúrgico os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do material e confecção das lâminas histológicas para posterior análise microscópica. Na análise macroscópica demonstrou que o grupo PRP-G apresentou menor reação inflamatória que o GC e os grupos PRP-ZN e PRP-L. Na avaliação histológica, observou-se que não houve significância entre o GC e os grupos experimentais para a proliferação vascular. Porém, o PRP-G apresentou maior intensidade entre os grupos tratados. Quanto a inflamação observou-se que o grupo PRP-G teve menor inflamação apresentando diminuição de macrófagos e neutrófilos. Desta forma sugere-se que o protocolo PRP adicionado de gluconato de cálcio propiciou melhores resultados na cicatrização dos enxertos em coelhos com relação aos tratamentos PRP-ZN e PRP-L.

Palavras-chave: Cirurgia reconstrutiva, concentração plaquetária, inflamação, ferida, neovascularização, protocolos PRP.

PROTOCOLS OF PLATELETS-RICH PLASMA IN SKIN GRAFTS IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)

ABSTRACT – Reconstructive surgery in small animals is a specialty that has gained importance in the last two decades due to the management of traumatic wounds. Varieties of reconstructive surgery procedures are available to prevent complications and avoid unnecessary costs. Large defects may require tissue to be mobilized from other sites, pedicle flaps, or grafts. Platelet rich plasma (PRP) is seen as an adjunct in the healing process of reconstructive surgeries, due to its potential aid in the processes of hemostasis and stimulation of the formation of new blood vessels. The objective of this study was to evaluate the results of the application of different PRP protocols in rabbit skin grafts. A total of 32 white New Zealand rabbits were distributed in four groups of 8 animals, the control group (GC) in the graft was added physiological saline, PRP group added calcium gluconate (PRP-G), PRP group added 100 μ L zinc (PRP-ZN) and PRP group without addition of any substance (PRP-L). Blood was collected from each animal and centrifuged according to each proposed protocol. Macroscopic evaluation was performed on the 3rd, 7th, and 14th day of the surgical procedure. After 14 days of the surgical procedure, the animals were submitted to euthanasia for collection of the material and preparation of the histological slides for later microscopic analysis. In the macroscopic analysis it was shown that the PRP-G group had a lower inflammatory reaction than the CG and the PRP-ZN and PRP-L groups. In the histological evaluation, it was observed that there was no significance between GC and experimental groups for vascular proliferation. However, PRP-G presented greater intensity among the treated groups. As for the inflammation, it was observed that the PRP-G group had lower inflammation with a decrease in macrophages and neutrophils. In this way it is suggested that the PRP protocol added calcium gluconate provided better results in the healing of the grafts in rabbits in relation to PRP-ZN and PRP-L treatments

Keywords: Inflammation, neovascularization, platelet concentration, protocol PRP, reconstructive surgery, wound.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

Cm: Centímetros

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra – Acético

EGF: Fator de Crescimento Epidermal Derivado de Plaquetas

Fcs: Fatores de crescimento

FGF: Fator de Crescimento Fibroblástico 2

GPS: Sequestro gravitacional das plaquetas

HE: Hematoxilina Eosina

IGF: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

ILs: Interleucinas

IM: Intramuscular

Kg: Quilogramas

LD: Local Doador

LR: Local Receptor

MEC Moléculas da Matriz Extracelular

Mg: Miligramas

mL: Mililitro

MKs: Megacariócitos

NO: Óxido nítrico

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PPP: Plasma Pobre em Plaquetas

PPM: Células Progenitoras Mesenquimais

PRP: Plasma Rico em Plaquetas

PRP-G: Grupo PRP gel

PRP-L: Grupo PRP Líquido

PRP-ZN: Grupo PRP da Zona Névoa

TGF β : Fator transformador do crescimento beta

TNF: Fator de necrose tumoral

μL : microlitros

μm : micra

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	
Medianas das variáveis dos grupos apresentadas no 3 ^{er} , 7 ^o e 14 ^o dia da avaliação macroscópica em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) realizada na Universidade Estadual Paulista (UNESP) FCAV, Câmpus de Jaboticabal, 2017. A letra (a) depois da mediana indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, por tempo.....	26

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Resultados da avaliação macroscópica ($p = 0,048$) de edema em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) entre o GC e o grupo PRP-G no 3 ^{er} dia após realização de enxertos cutâneos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista (UNESP) FCAV, Câmpus de Jaboticabal, 2017.....	27
Figura 2	<p>Fotomicrografia da intensidade de proliferação vascular em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) realizada na Universidade Estadual Paulista (UNESP) FCAV, Câmpus de Jaboticabal, 2017.</p> <p>A) Note-se no grupo controle(GC) a ausência de vasos sanguíneos.</p> <p>B) Observe-se no grupo tratado com PRP adicionado de gluconato de cálcio (PRP-G) a presença moderada de vasos sanguíneos no círculo (46%).</p> <p>C) Observe-se no grupo tratado com PRP-ZN a presença discreta de vasos sanguíneos no círculo (375%).</p> <p>D) Observe-se no grupo tratado com PRP líquido a presença discreta de vasos sanguíneos no círculo (37,5%).....</p>	27

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

A cirurgia reconstrutiva de pequenos animais é uma especialidade que vem ganhando importância nas últimas duas décadas devido a perdas teciduais secundárias das feridas traumáticas, decorrentes da exérese de neoplasias ou defeitos estéticos (CASTRO et al., 2015).

O importante em cirurgias reconstrutivas é escolher a técnica mais apropriada para cada situação, evitando complicações e custos desnecessários. Grandes defeitos ou aqueles sobre as extremidades podem exigir que o tecido seja mobilizado a partir de outros locais, retalhos pediculados de padrão axial ou subdérmico e enxertos, podem ser realizados no reparo destas lesões (MACPHAIL, 2015). Os objetivos da cirurgia reconstrutiva em Medicina Veterinária são o reparo do defeito, permitir a cicatrização, mantendo seu funcionamento local e estética (AMSELLEM, 2011).

Em muitos estudos, o plasma rico em plaquetas (PRP) é tido como produto adjuvante no processo cicatricial de cirurgias reconstrutivas, devido ao seu potencial auxílio nos processos de hemostasia e estimulação da formação de novos vasos sanguíneos (VENDRAMIN et al., 2010). O PRP é uma fração de plasma de sangue autólogo, com concentração de plaquetas acima dos valores basais. PRP é obtido por centrifugação separando os diversos componentes do sangue e aumentando a concentração de plaquetas, potencializando o processo de cicatrização, principalmente a mitose e angiogênese (SOMMELING et al., 2013).

As plaquetas por ter papel hemostático no organismo, essenciais no processo inflamatório, na reparação tecidual e liberação de mediadores químicos, atualmente estão sendo pesquisadas e descobertas novas utilidades para as mesmas, Visando com isso, o aperfeiçoamento de técnicas terapêuticas com melhores resultados no tratamento de lesões (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

Considerando a utilidade do PRP como produto adjuvante na reparação tecidual quanto a hemostasia e estimulação na formação de novos vasos sanguíneos, a grande variação na metodologia do seu preparo e as complicações pós-operatórias apresentadas nos enxertos cutâneos nos membros torácicos e pélvicos dos animais de estimação, esse trabalho objetivou-se avaliar o efeito de diferentes protocolos de PRP na reparação tecidual em enxertos cutâneos em coelhos.

1.2 Revisão de Literatura

1.2.1 Anatomia da Pele

A pele cobre toda a superfície do corpo e é considerado o maior órgão do corpo do animal. Funcionalmente, é responsável pela defesa do corpo contra microrganismos, produção de vitamina D, reservatório de eletrólitos, água, lipídios, carboidratos e proteínas (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL; 2013).

É constituída basicamente de epiderme, derme e anexos (folículos pilosos, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas) e subcutâneo (VAN DIJK J.E et al., 2008). Na epiderme inclui os estratos basal ou germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, além de melanócitos, células de Merkel e células de Langherans. A derme pode ser dividida em camada papilar (mais externa) e camada reticular (mais

interna) e fornece base firme, além de nutrir a epiderme e os anexos cutâneos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A estrutura histológica varia intensamente entre os distintos locais e entre as diferentes espécies animais. A pele recoberta por pelos tem epiderme mais fina, ao passo que a pele sem pelos do nariz e coxins possui epiderme mais espessa. O tecido subcutâneo, constituído por lóbulos de tecido adiposo e fáscia, conecta as camadas mais superficiais (epiderme e derme) à fáscia e à musculatura subjacentes. A pele apresenta diferenças de espessura por todo o corpo sendo maior na região dorsal (HARGIS; GINN, 2013).

A epiderme organiza-se em camadas e à medida que as mais superficiais são eliminadas as camadas profundas são restauradas por divisão celular. A camada germinativa é a mais profunda e faz limite com a derme e a camada córnea é a mais superficial. A camada córnea, constituída por células escamosas, cheias de queratina, proporciona proteção contra traumas físicos e químicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. Nesta camada situam-se os anexos da pele, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, dividindo-se em camada papilar, mais externa e camada reticular, mais interna. A derme contém diferentes tipos de células, incluindo fibroblastos e fibrócitos, macrófagos, mastócitos e leucócitos provenientes do sangue, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Esta camada fornece uma base firme para a epiderme e para os anexos cutâneos (CONCEIÇÃO; SANTOS, 2011).

1.2.2 Irrigação da Pele

Ocorre por meio das artérias cutâneas diretas que dão origem a três plexos vasculares: profundo, médio e superficial. O plexo profundo supre o tecido subcutâneo e as porções profundas dos folículos e glândulas apócrinas; o plexo médio supre as glândulas sebáceas, a porção média dos folículos e dos músculos eretores dos pelos, e o plexo superficial provê as porções superficiais dos folículos e a epiderme. Os capilares linfáticos superficiais surgem na epiderme superficial e se juntam ao plexo linfático profundo no tecido subcutâneo. Os vasos linfáticos convergem, então, para formar canais maiores aferentes que, eventualmente se estendem até os linfonodos periféricos eferentes (HARGIS; GINN ,2013; CONCEIÇÃO; SANTOS, 2011).

1.2.3 Cicatrização das Feridas

É um fenômeno complexo, porém ordenado, envolvendo diversos processos, que inicia-se quase imediatamente após a ocorrência de uma lesão. O tecido lesado passa por quatro fases temporais de reparo da ferida: hemostasia, inflamação aguda, proliferação (granulação) remodelamento e maturação (ACKERMANN, 2013). Essas fases ocorrem nessa sequência reguladas por processo dinâmico que envolve complexa interação de vários tipos celulares (plaquetas, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos), moléculas da matriz extracelular (MEC) e compostos solúveis, em coordenada cascata de eventos celulares: moleculares, fisiológicos e bioquímicos. São mediados pela quimiotaxia, neovascularização, proliferação, depósito e reorganização da matriz extracelular levando a reparação da pele (KUMAR; ABBAS; FAUSTO; ASTER, 2010).

A hemostasia ocorre logo após a lesão dependendo da ativação das plaquetas e do endotélio lesado para ativar a cascata de coagulação e é controlada por vasoespasmo, logo após os vasos sanguíneos lesados se relaxam, permitindo mais sangramento, caso não haja ativação de plaquetas. No início da vasoconstrição as plaquetas se agregam e aderem ao colágeno exposto das células endoteliais lesionadas. Depois de aderidas, as plaquetas secretam substâncias vasoconstritoras para manter a constrição dos vasos seccionados, iniciar o processo de trombogênese para conter o extravasamento e iniciar a cicatrização do vaso sanguíneo (ACKERMANN, 2013).

As plaquetas liberam grânulos que contém fator transformador do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de necrose tumoral (TNF), prostaglandinas e tromboxanas que atraem neutrófilos à ferida. Forma-se o coágulo, cuja função é aderir às bordas da ferida e atuar como matriz provisória para que neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais possam ingressar na ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A inflamação caracteriza-se pela ativação de neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos produzem radicais livres, dentre eles o óxido nítrico (NO) e enzimas proteolíticas, que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. A ativação de células inflamatórias é crítica, especialmente para os macrófagos, que fagocitam bactérias, direcionam o desenvolvimento do tecido de granulação, sintetizam e liberam NO, também são liberadas a partir da ativação de células inflamatórias, enzimas, como collagenases

que debridam a ferida, e citocinas, como as interleucinas (ILs), TNF, os quais estimulam os fibroblastos a produzir colágeno além de promover a angiogênese (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; ACKERMANN, 2013; KUMAR ; ABBAS; FAUSTO; ASTER, 2010).

Os leucócitos podem chegar aos locais da ferida tanto por extravasamento dos vasos rompidos como por aderência ao endotélio pela mediação da matriz extracelular, durante as primeiras seis horas (PITZER; PATEL, 2011). A vasodilatação local, extravasamento de líquido para o espaço extra vascular e a oclusão dos vasos linfáticos são responsáveis pelos sinais clássicos da inflamação: rubor, tumor e calor. A pressão, e talvez a estimulação química produzem o quarto sinal, a dor (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013).

A fase proliferativa envolve angiogênese, fibroplasia e epitelização. Inicia-se dentre três a cinco dias após trauma e o processo torna-se responsivo a lesão proporcionando estímulo celular migratório e proliferativo a partir das margens lesadas com invasão de fibroblastos e aumento de colágeno no leito da ferida (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). Estes eventos vão formar tecido de granulação, que atua como superfície para a migração das células epiteliais e como barreira protetora (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014). A angiogênese, estimulada pelo TNF, é marcada pela migração de células endoteliais e a formação de capilares que ativam os fatores de crescimento dos fibroblastos para posterior síntese do colágeno (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; HOSGOOD, 2007).

O processo de remodelamento da pele envolve produção, digestão e orientação das fibras colágenas. A celularidade do tecido de granulação é reduzida e

as fibras de colágeno tornam-se mais espessas. A taxa de síntese de colágeno aumentada durante a cicatrização da ferida não ocorre apenas em decorrência da maior quantidade de fibroblastos, mas também pelo aumento na síntese de colágeno por cada célula individualmente. Com o tempo, os fios de colágeno iniciais tipo III são reabsorvidos e substituídos por colágeno mais espesso tipo I, que confere maior organização e resistência. Estas mudanças resultam em uma ferida com força tênsil aumentada (HOSGOOD, 2007). Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga e a cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga (FAHIE; SHETTKO, 2007; ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; SONNEMANN; BEMENT, 2011).

1.3 Cirurgias Reconstrutivas

São comumente realizadas para fechar defeitos secundários a traumatismos, corrigir ou melhorar anomalias congênitas ou após a remoção de neoplasias. Existem vários procedimentos reconstrutivos, sendo importante escolher a técnica ou as técnicas apropriadas para evitar complicações e custos desnecessários. Defeitos extensos ou irregulares podem, às vezes, ser fechados usando-se incisões relaxantes após organização das bordas e posterior utilização de aproximação primária das bordas e em casos mais graves com retalhos subdérmicos ou dérmicos incisões relaxantes. Defeitos extensos ou aqueles localizados nas extremidades podem exigir a utilização de enxertia ou retalhos cutâneos (MACPHAIL, 2015).

A evolução da cirurgia reconstrutiva proporciona novas opções no uso dos tecidos para o fechamento de defeitos de tamanho moderado e grande. Existe uma

extensão de procedimentos cirúrgicos realizados em cães e gatos, como: hemipelvectomy, orbiectomia, craniectomia, ressecções orofaciais e de extremidades são rotina e elas apresentam na maioria dos casos, uma relativa facilidade de encerramento e manutenção da função (SZENTIMREY, 1998).

A cirurgia reconstrutiva é indicada nas lesões de grande extensão secundária a traumas ou ampla ressecção por técnica minimamente invasiva de pele. Para ter sucesso na reconstrução dos tecidos é fundamental conhecer os fatores que afetam a cicatrização, como saúde geral e nutricional do paciente. Nos animais submetidos a tratamentos por câncer deve-se considerar alguns fatores de risco como a hipoproteinemia, uremia, infecção da ferida, hiperadrenocorticism, efeitos da quimioterapia e tipo de tumor (AMSELLEM, 2011).

1.4 Enxertos Cutâneos

São segmentos de pele separados completamente de um local do corpo e utilizados para cobrir outro local desprovido de superfície epitelial. Carecem de conexões vasculares após a transferência e devem sobreviver absorvendo fluidos do leito receptor por ação capilar durante as primeiras 48 a 72 horas após o transplante. Novos capilares crescem posteriormente no interior do enxerto, através dos canais de remodelação vascular. Além disso, o tecido conjuntivo fibroso formado proporciona maior firmeza ao enxerto no local. Enxertos com pouca irrigação sanguínea têm tonalidade cianótica até que a circulação melhore (PAVLETIC, 2010).

Enxertos cutâneos na cirurgia reconstrutiva são usados para correção de defeitos que não podem ser reconstruídos por justaposição direta nem por retalhos

de pele, normalmente nos membros e grandes defeitos no tronco (MACPHAIL, 2015; PAZZINI; MORAES, 2015; TOBIAS, 2011).

A associação do PRP com técnicas de cirurgia reconstrutiva na realização dos enxertos é uma boa opção para favorecer a formação de vasos sanguíneos (angiogênese), crescimento de novo tecido e maior aderência do enxerto ao local receptor (ANDREASSI et al., 2005; CASSELL et al., 2002; VENDRAMIN et al., 2009).

Os enxertos classificam-se pela relação do doador para o receptor. Autoenxertos é quando os locais receptor e doador provém do mesmo animal e são mais úteis; aloenxertos (também conhecidos como homoenxertos) é quando os locais receptor e doador pertencem a animais geneticamente diferentes, mas da mesma espécie; xenoenxertos (heteroenxertos) os locais receptor e doador encontram-se em animais de espécies diferentes que acabam por serem rejeitados e isoenxertos é o enxerto entre gêmeos idênticos ou cepas altamente puras. O Autoenxerto é o tipo mais comum utilizado na prática da clínica veterinária (BRISTOL, 2005; GREGORY; BERNSTEEN, 2007).

Um requisito primordial para que o enxerto cutâneo possa realizar-se, tem que dispor de leito receptor bem vascularizado para um bom sucesso da cicatrização, que ocorre no sétimo ou oitavo dia pós-operatório. Um tecido de granulação saudável ou uma ferida limpa e recente, e sem infecções nem resíduos, podem servir como leito para o enxerto. Ossos, cartilagens, tendões e nervos despojados de seu tecido conjuntivo subjacente não toleram enxertos cutâneos. Feridas criadas cirurgicamente e limpas aceitam prontamente um enxerto cutâneo (ANDREASSI et al., 2005, AUER; STICK, 2006).

O insucesso de enxertos cutâneos ocorre sobre tecido subcutâneo, lesões por esmagamento, tecidos infectados, tecido irradiado, tecido de granulação hipertrófico ou antigo e úlceras crônicas. Tecido de granulação crônico deve ser excisado para permitir que se forme um novo tecido antes do procedimento (aproximadamente quatro a cinco dias) (MACPHAIL, 2015).

Dependendo da espessura, os enxertos podem ser de espessura total ou de espessura parcial. O de espessura total contém a epiderme e toda a derme, sem tecido subcutâneo e os enxertos de espessura parcial podem conter epiderme e porção variável da derme (BRISTOL, 2005; PAZZINI; MORAES, 2015). Os enxertos de espessura total preferem-se em pequenos animais, pois proporcionam, após a sua cicatrização, cobertura resistente e com função glandular e pilosa preservadas, não é necessário o uso de instrumental especializado, e, devido à abundância de pele dos locais doadores, é possível a realização de síntese direta do defeito doador (STANLEY et al., 2013).

Enxertos em camada de espessura total são indicados para evitar contratura de defeitos na face distal dos membros e sobre superfícies flexoras (TONG; SIMPSON, 2012). Devem ser usados somente sobre leitos de granulação não infectados e quando se espera uma produção mínima de líquido, porque seu acúmulo ou drenagem impede a adesão. Geralmente usa-se a pele da parede lateral e dorsal do tórax e entre as escápulas (MACPHAIL, 2015). A principal indicação para este tipo de enxerto é a reconstrução de tecido em locais com poucas possibilidades de reparo (SWAIM, 2007).

A enxertia passa por quatro fases: embebição plasmática, aderência, inosculação e neo-angiogênese. A embebição corresponde a absorção do líquido

acumulado no leito do local receptor pelo enxerto, o qual ocorre por capilaridade após vasodilatação iniciada no momento de sua aplicação. Esse líquido irá nutrir o enxerto e causar edema que atinge seu ponto máximo por volta de 48 a 72 horas (ANDREASSI et al., 2005). A aderência inicia-se com a absorção do plasma que transuda da área receptora para o enxerto, formando uma malha de fibrina que vai servir para a fixação e nutrição. Essa malha de fibrina é convertida em tecido fibroso por invasão dos fibroblastos, eritrócitos, leucócitos e polimorfonucleares (LOFÊGO et al., 2006). Na sequência, pequenos capilares se anastomosam comunicando a superfície do enxerto à do leito receptor (fase inosculatória). O enxerto encontra-se ainda fragilmente fixado, podendo estar cianótico. O surgimento e proliferação de novos vasos é que irá garantir a sobrevivência da pele transplantada. A reorganização vascular ocorre do quinto ao sétimo dia do pós-operatório (JENSEN et al., 2008; LOFÊGO et al., 2006).

1.5 Plasma Rico em Plaquetas

Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é produto derivado da centrifugação do sangue autógeno para concentrar maior quantidade de plaquetas no menor volume de plasma (MARX, 2004). As plaquetas são componentes sanguíneos muito conhecidos por seu papel hemostático no organismo, porém sua função não se limita apenas a isso, e atualmente estão sendo pesquisadas e descobertas novas utilidades para as mesmas, como a reparação de tecidos lesados. Visando com isso, o aperfeiçoamento de técnicas terapêuticas com melhores resultados no tratamento de lesões (PAGLIOSA; ALVES, 2007).

O PRP foi desenvolvido originalmente em unidades de transfusão sanguínea para separar as hemácias e plasma do sangue. Foi usado pela primeira vez como hemostático durante procedimentos cirúrgicos. É conhecido também como concentrado rico em plaquetas, gel de plaquetas autólogo e concentrado plaquetário (GOBBI; VITALE, 2012). Existem relatos do PRP autólogo usado como terapia única ou associado em cirurgias odontológicas, ortopédicas, oftálmicas, neurológicas, laparoscópicas, reconstrutivas, promovendo a proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação celular e angiogênese (WROBLESWKI et al., 2010; ALEIXO et al., 2011). Além disso, as elevadas concentrações de leucócitos podem aumentar o desbridamento local e a atividade antibacteriana em feridas crônicas. Recentes estudos indicam que o PRP autólogo pode ser útil como terapia adjuvante em cirurgia não oncológica e lesões cutâneas complexas não cicatrizantes, constituindo-se no método de tratamento fácil e rápido (KIM; PARK; PARK, 2008).

1.5.1 Ativação das Plaquetas

As plaquetas derivam de megacariócitos (MKs), células gigantes residentes na medula óssea. A liberação de plaquetas é posterior à reorganização no citoplasma dos MKs em extensões filiformes, chamados proplaquetas. Antes da liberação das plaquetas na circulação os grânulos sintetizados no corpo dos MKs, são transportados e armazenados pelas proplaquetas (GOBBI; VITALE, 2012). Na fase final, as plaquetas são células anucleadas funcionalmente caracterizadas como efetoras primárias da hemóstasia, essenciais no processo inflamatório, na reparação tecidual e na liberação de mediadores químicos, contendo muitos grânulos de tipos diferentes (MAIA; SOUZA, 2009).

No interior das plaquetas encontram-se o glicogênio, os lisossomos e dois tipos de grânulos: os densos, que contém substâncias fisiologicamente ativas, tais como adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio; e grânulos alfa que contém fatores de crescimento (GFs), fatores de coagulação e outras proteínas (EVERTS et al., 2006; KAZAKOS et al., 2009).

A ativação das plaquetas pode ser realizada por agentes fisiológicos como: trombina, tromboxano, colágeno, ADP, fator ativador de plaquetas, serotonina e epinefrina e farmacológicos como: o ionóforo de cálcio e o cloreto de cálcio. Após ativação, as plaquetas mudam sua forma emitindo novas projeções membranosas, conhecidas como pseudópodes e os grânulos localizados no seu interior são liberados (degranulação). Com isso liberam para a matriz extracelular diversas substâncias como serotonina, fibrinogênio, trombina, tromboxano A², tromboplastina, catecolaminas, cálcio e principalmente, os fatores de crescimento (EVERTS et al., 2006; MAIA; SOUZA, 2009).

1.5.2 Fatores de Crescimento

São vários os fatores de crescimento originados nas plaquetas, tais como Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Epidermal Derivado de Plaquetas (EGF) e Fator de Crescimento Fibroblástico 2 (FGF-2). Cada um desses fatores age de maneira específica no processo de reparação tecidual (BECA et al., 2007).

PDGF e TGF- β são os fatores de crescimento de maior importância presentes no PRP. PDGF junto com DNA aceleram a síntese protéica, atua como agente mitogênico para as células mesenquimais e como fator quimiotático das células do músculo liso, fibroblastos, leucócitos e as Células Progenitoras Mesenquimais (PPM). TGF- β presente em concentrações elevadas no interior das plaquetas, promove a migração de muitas populações de células por seu potente estímulo quimiotático (KIM; PARK; PARK, 2009).

A evidência clínica sugere que o PRP pode ter efeitos terapêuticos na cicatrização de tecidos moles e ósseos, devido ao conteúdo de fatores de crescimento armazenados nas plaquetas. Quando estes GFs são liberados desencadeiam um processo de regeneração de tecidos. Além disso, o PRP contém outros componentes intra e extra plaquetário que também contribuem para a regeneração. Um exemplo é o fibrinogênio que é precursor da rede de fibrina necessária para o implante e multiplicação celular posterior (MARTINEZ et al., 2009).

1.5.3 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas

A relativa facilidade de preparação do PRP levou a variedade de sistemas comerciais disponíveis, cada um dos quais operam por meio de diferentes técnicas e rendimento, variando a concentração de plaquetas. A maioria das técnicas baseiam-se no sequestro gravitacional das plaquetas (GPS) por meio de sistema de centrifugação, é a técnica mais comum usada em preparação do PRP para separar o sangue em camadas distintas: Plasma, cobertura amarelada e as células

vermelhas do sangue, o volume do PRP que resulta da técnica GPS é de aproximadamente 10% do sangue total (WROBLEWSKI; MEJIA; WRIGHT, 2010).

O sangue é submetido a primeira centrifugação formando-se três frações, uma inferior (vermelha com as hemácias) e outra superior (amarela com plasma e plaquetas). Entre essas duas colunas existem a estreita faixa esbranquiçada, chamada de zona névoa (com um pouco de hemácias), que contém plaquetas maiores e células brancas (VANAT et al., 2012). Após a primeira centrifugação, são aspiradas a coluna superior e a zona névoa, realizando a segunda centrifugação, obtendo plasma pobre em plaquetas (PPP) e um botão eritrocítico plaquetário no fundo. Retira-se 80% do PPP e as plaquetas dispersam-se com agitação do tubo, formando o PRP líquido. O gel de plasma rico em plaquetas é obtido por meio da adição da trombina autóloga ou trombina bovina com cloridrato de cálcio na proporção de 1:5 e o tempo de 1 minuto é necessário para que o gel se forme (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009).

A função do gel é formar uma rede de fibrina incorporada ao PRP capaz de permitir sua aderência ao local do implante, bem como impedir a migração de células epiteliais e do tecido conjuntivo para fora da região de enxerto (PAGLIOSA; SILVEIRA, 2007).

A concentração de plaquetas no PRP para fins terapêuticos deve ser significativamente maior que a plasmática para proporcionar a liberação adequada de GFs no local do enxerto. PRP autólogo deve ter uma concentração de plaquetas de aproximadamente $1.407.640 \mu\text{L}$, os rendimentos variam em quanto à viabilidade (30 – 85 %) e concentração de plaquetas 2 a 8 vezes sobre o nível normal. É provável que o efeito do PRP sobre a cicatrização da ferida seja em função de

muitas variáveis, entre elas a concentração de plaquetas, volume de PRP, extensão e tipo de lesão. Alguns pesquisadores sugerem que o PRP deveria alcançar concentrações de três a cinco vezes superior ao nível normal (RODRIGUEZ; PALOMAR; TORRES, 2012).

1.6 Referências

- ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. **Surgery**, v.29, n. 10, p. 491-495, 2011.
- ACKERMANN M.R. Inflamação e cicatrização. In: ZACHARY J.F; MCGAVIN M.D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 3, p. 89 – 135.
- ALEIXO, G.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; TEIXEIRA, M.N.; MESQUITA, E.P.; OLIVEIRA, F.F.; ZUBIETA, L.M.V.; ALMEIDA, T.L.C.; GUIMARÃES, A.L.N.; MAIA, F.C.; ZACARIAS, T.F.L.; SANTOS, S.M.L.G.; LIMA, C.P.S. Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.567-573, 2011.
- AMSELLEM, P. Complications of Reconstructive Surgery in Companion Animals. **Veterinary Clinical Small Animal**, Chertsey, v. 41, p. 995 – 1006, 2011.
- ANDREASSI, A.; BILENCI, R.; BIAGIOLI, M.; D'ANIELLO, C. Classification and pathophysiology of skin grafts. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 332-337, 2005.
- AUER, J. A.; STICK, J.A. Skin Grafting. In: SCHUMACHER, J. **Equine Surgery**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. cap. 25, p. 269 – 287.
- BECA, T.; HERNANDEZ, T.; MORANTE, G.; BASCONES, S. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. **Avances en periodoncia**, Madrid, v. 19, n. 1, p. 39 – 52, 2007.
- BRISTOL, D.G. Skin Grafts and Skin Flaps in the Horse. **Veterinary Clinic Equine Practice**, Hillsborough, v. 21, p.125–144, 2005.
- BROUGHTON, G. I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7, p. 1e-S-32e-S, 2006.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.
- CASTRO J.L.C., HUPPES R.R., De NARDI A. B., PAZZINI J. M. Introdução à anatomia. In:_____. **Princípios e Técnicas de Cirurgias Reconstructivas da Pele de Cães e Gatos**. Curitiba: Medvet, 2015. cap. 1, p. 10 – 15.
- CASSELL, O. C. S.; HOFER, S. O. P.; MORRISON, W. A.; KNIGHT, K. R. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. **British Journal of Plastic Surgery**, n. 55, p. 603 – 610, 2002.

CONCEIÇÃO L.G.; SANTOS R.L. Sistema Tegumentar. In: SANTOS R.L.; ALESSI A.C. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2011. cap.7, p. 423 – 524.

EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J. P. A. M.; HOFFMANN, J.; PVERDEVEST. E. P.; BOX, H. A. M.; ZUNDERT, A. Platelet rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of The American Society of Extra-Corporeal Technology**, v. 38, n. 2, p. 174-187, 2006.

EXPOSITO, J.A.; RODRIGUEZ, L.; GARCIA, J. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. **Tansfusion**, Barcelona, v. 49, p. 44 – 56, 2009.

FAHIE, M.A.; SHETTKO, D. Evidence-based wound management: A systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelialization. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v.37, n. 1, p. 559-577, 2007. GOBBI, G.; VITALE, M. Platelet – Rich Plasma preparations for biological therapy: Applications and limits. **Operative Techniques in Orthopedics**, Parma, v. 22, p. 10 – 15, 2012.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, p 1 – 16, 2014.

GREGORY, C.R.; BERNSTEEN, L. Transplante de Órgãos na Prática Clínica Veterinária. In: Slatter D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. vol. 1. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 7, p. 122 – 136.

GRIFFIN C.E.; CAMPBELL K.L.; Structure and function of the skin. In:_____. 7. ed. **Small Animal Dermatology**. St. Louis, 2013. cap. 1, p. 1 – 56.

HARGIS A.M.; GINN P.E. O Tegumento. In: ZACHARY J.F; MCGAVIN M.D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap.17, p. 975 – 1012.

HOSGOOD G. Reparo de Feridas e Resposta Tecidual Específica à Lesão. In: Slatter D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. vol. 1. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 4, p. 66 – 88.

JENSEN, A.R.; KLEIN, M. B.; VER HALEM, J.P.; WRIGHT, A.S.; HARVATH K.D. Skin Flaps and Grafts: A Primer for the National Technical Skills Curriculum Advanced Tissue-Handling Module. **Journal of Surgical Education**, vol 65, n. 3, p. 191 – 199, 2008.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. Pele e Anexos. In:_____. 12. ed. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2013. cap. 18, p. 354 – 365.

KAZAKOS, K.; LYRAS, D.N.; VERETTAS, D.; TILKERIDIS, K.; TRYFONIDIS, M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. **Injury**, Vrissilia, v. 40, p. 801 – 805, 2009.

KIM, J.H.; PARK, C.; PARK, H.M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. **Journal Compilation**, Seoul, v. 20, p. 123 – 126, 2009.

KUMAR V.; ABBAS A. K.; FAUSTO N.; ASTER J.C. Renovação, regeneração e Reparo dos tecidos. In:_____. 8.ed. **Patologia. Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap. 3, p. 79 – 110.

LOFÊGO, J.A.; DADALTI, P.; COTRIM, D.; COTRIM, P.L.; LEIROS DA SILVA M.A.; TAKIYA, C. M. Enxertia de pele em oncologia cutânea. **Anais Brasileiros Dermatologia**, n.5, p. 465-72, 2006.

MACPHAIL C.M. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. cap.16, p. 190 – 278.

MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1279-1286, 2009.

MARTINEZ-ZAPATA, M.J.; MARTI-CARVAJAL, A.; SOLA, I.; BOLIBAR, I.; VANAT, N.; MEDEIROS, T.N.; BALARIN, M.R.S.; PEREIRA, P.M.; BIASI, F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 313 – 322, 2012.

MILLER W.H.; MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, n. 62, p. 489 – 496, 2004.

PAGLIOSA, G.M.; ALVES, G.E.S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1202 – 1205, 2007.

PAVLETIC, M.M. Free Grafts. In:_____. 3. ed. **Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. Iowa: Wiley – Blackwell, 2010. cap. 14, p. 404 – 431.

PAZZINI, J.M.; MORAES, P.C. Princípios e técnicas para realização de enxertos cutâneos. In: CASTRO J.L.C., HUPPES R.R., De NARDI A. B., PAZZINI J. **Princípios e Técnicas de Cirurgias Reconstructivas da Pele de Cães e Gatos**. Curitiba: Medvet, 2015. cap. 8, p. 95 – 102.

PITZER, G.B.; PATEL, K.G. Proper care of early wounds to optimize healing and prevent complications. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**. v.19, n.3, p. 491-504, 2011.

RODRIGUEZ, J.; PALOMAR, M.A.; TORRES, J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. **Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial**. v. 34, n.1, p. 8 – 17, 2012.

SOMMELING, C.E.; HEYNEMAN, A.; HOEKSEMA, H.; VERBELEN, J.; STILLAERT, F.B.; MONSTREY, S. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: A systematic review. **Journal of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery**, Ghent, v. 66, p. 301 – 312, 2013.

SONNEMANN, K. J.; BEMENT, W. M. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. **Annual Reviews Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 237- 263, 2011.

STANLEY, B. J.; PITT, K. A.; WEDER, C. D.; FRITZ, M. C.; HAUPTMAN, J. G.; STEFICEK, B. A. Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 42, n. 5, p. 511-522, 2013.

SWAIM, S.F. Enxertos Cutâneos. In: Slatter D.; **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. vol 1. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. cap. 24, p. 321 – 338.

SZENTIMERY, D. Principles of reconstructive surgery for the tumor patient. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Calgary, v. 13, n. 1, p. 70 – 76, 1998.

TOBIAS, K.M. Enxertos em Malha de Espessura total. In:_____. **Manual de cirurgia de tecidos moles pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2011. cap. 5, p. 44 – 52.

TONG, T.; SIMPSON, D. J. Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, n. 9, p. 520-525, 2012.

VAN DIJK J.E.; GRINWIS G.C.M.; MOUWEN J.M.V.M. A pele. Em:_____.2. ed. **Atlas Colorido de Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 13, p. 161 – 176.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; FRANCO, T.R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 212 – 218, 2009.

WROBLEWSKI, A.P.; MEJIA, H.A.; WRIGHT, V.J. Application of Platelet-Rich Plasma to Enhance Tissue Repair. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 20, n. 20, p. 98 – 105, 2010.

CAPITULO 2. Efeitos de diferentes preparações de plasma rico em plaquetas sobre a cicatrização em enxertos de pele em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)¹.

Carlos Alfredo Calpa Oliva^{2*}, Josiane M. Pazzini³, Eduardo Luis Serafim³, Ricardo Ramirez Uscategui³, João A. Oliveira⁴, Fernando Sanzon⁵, Fatima Gartner⁶, Andriago Barboza De Nardi³.

ABSTRACT. –Oliva C. A., Pazzini J. M., Serafim E. L., Uscategui R. R., Oliveira J. A., Sanzon F., Gartner F., De Nardi A. B. (**Effects of different preparations of platelet-rich plasma on healing of skin grafts in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)**). Efeitos de diferentes preparações de plasma rico em plaquetas sobre a cicatrização de enxertos de pele em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

Av. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: calpaa@yahoo.es
Skin grafts are an alternative to reconstructive surgery in the correction of defects in places that do not allow direct juxtaposition or skin flaps. The platelet-rich plasma is concentrated platelets and growth factors (CSF), which are released by platelets which function to accelerate healing and stimulate angiogenesis. The objective of this study was to evaluate the results of the application of PRP in rabbit skin grafts. For this, we used 32 rabbits White New Zealand breed, divided into four groups of 8 animals each: GC (control, saline solution), PRP-G (PRP, calcium gluconate), PRP-ZN (PRP, 100 µl of mist zone and red blood cells), PRP-L (without adding any substance). Animals blood was collected and centrifuged as each proposed protocol. The macroscopic assessment was made on 3rd, 7th, and 14th days of surgery. Following with 15 days of surgery, the animals were euthanized to collect material for the manufacture of histological slides and subsequent microscopic analysis. The results revealed that the macroscopic analysis was no significant difference between groups for the variables color and flushing ($p = 0.007$ and $p = 0.004$ respectively) when analyzed by Kruskal-Wallis test. The PRP-G showed the lower intensity of inflammation when compared with the other groups. Histological evaluation was not significant between the groups for vascular proliferation. But the PRP-G showed a higher degree of angiogenesis with 46%. Already PRP-ZN and PRP-L groups were 37.5% each. In the histological analysis, although the groups were not significant to inflammation, it was observed that the PRPC had less severe inflammation represented by mononuclear cells and polymorphonuclear 12.5% to 45.8%. Thus it can be said that the PRP protocol by adding calcium gluconate provided the greater intensity of epithelialization and angiogenesis in skin grafts in rabbits compared with the PRP protocol by adding mist zone and red blood cells and the liquid PRP protocol.

INDEX TERMS: Reconstructive surgery, neovascularization, inflammation, platelet concentration, wound, tissue regeneration.

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuárias, Programa de Medicina Veterinária, Pasto, Colômbia; *Autor para correspondência: calpaa@yahoo.es

³ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil.

⁴ Departamento de Estatística, FCAV-Unesp, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900. E-mail: jaoliv@fcav.unesp.com.br

⁵ Hospital San Pedro. Laboratório de Patologia. Pasto, Colômbia

⁶ Departamento de Patologia Veterinária da Universidade do Porto, Portugal

RESUMO. - Enxertos cutâneos são uma alternativa da cirurgia reconstrutiva na correção de defeitos em locais que não permitem justaposição direta nem retalhos da pele. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas e fatores de crescimento (Fcs), os quais são liberados pelas plaquetas com função de acelerar a cicatrização e estimular a angiogênese. Neste estudo, objetivou-se avaliar os resultados da aplicação do PRP nos enxertos cutâneos de coelhos. Para isso, foram utilizados 32 coelhos da raça Nova Zelândia branco, distribuídos em quatro grupos de oito animais, sendo: grupo controle (GC)

no enxerto foi adicionado soro fisiológico, grupo plasma rico em plaquetas adicionado gluconato de cálcio (PRP-G), grupo plasma rico em plaquetas adicionado 100µL de zona nevoa e hemácias (PRP-ZN) e grupo plasma rico em plaquetas sem adição de nenhuma substância (PRP-L). Coletou-se sangue dos animais e centrifugou-se conforme cada protocolo proposto. A avaliação macroscópica foi feita no 3º, 7º, e 14º dia do procedimento cirúrgico. Na sequência, com 14 dias do procedimento cirúrgico foi realizada a eutanásia nos animais para coleta do material e confecção das lâminas histológicas e posterior análise microscópica. Os resultados revelaram que na análise macroscópica houve diferença significativa entre os grupos para as variáveis coloração e rubor ($p= 0,007$ e $p= 0,004$ respectivamente) quando analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. O PRP-G apresentou menor intensidade da inflamação quando comparado com os demais grupos. Na avaliação histológica não houve significância entre os grupos para a proliferação vascular. Porém, o PRP-G apresentou maior intensidade de angiogênese com 46%. Já os grupos PRP-ZN e PRP-L tiveram 37,5% cada um. Na análise histológica, apesar dos grupos não apresentarem significância para inflamação, houve diferenças biológicas entre os grupos, o PRP-G com menor intensidade de inflamação representada pelas células mononucleares com 12,5% e polimorfonucleares com 45,8%. Desta forma é possível sugerir que o protocolo PRP adicionado de gluconato de cálcio propiciou maior intensidade de reepitelização e angiogênese nos enxertos cutâneos em coelhos, quando comparado com o protocolo PRP adicionado de zona nevoa e hemácias e o protocolo PRP líquido.

TERMOS DA INDEXAÇÃO: Cirurgia reconstrutiva, concentração plaquetária, ferida, inflamação, neovascularização, regeneração tecidual.

INTRODUÇÃO

A perda da viabilidade dos tecidos e a cicatrização por segunda intenção em feridas de grandes extensões são situações onde se faz necessário o emprego de técnicas cirúrgicas reconstrutivas (Pavletic 2010). A evolução da cirurgia reconstrutiva proporciona novas opções para a cicatrização de defeitos com moderado e grande tamanho (Szentimrey 1998). Enxertos cutâneos são uma alternativa na correção de defeitos extensos ou localizados nas extremidades que não podem ser reconstruídos por justaposição direta nem por retalhos de pele, sendo importante determinar a técnica mais adequada para evitar custos desnecessários. A sobrevivência dos enxertos cutâneos depende da absorção do líquido tecidual e da neovascularização (Tobias 2011, Macphail 2015).

Variados estudos indicam que o plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo pode ser usado como terapia adjuvante no processo cicatricial das cirurgias reconstrutivas, bem como em lesões cutâneas complexas, devido ao seu potencial auxílio nos processos de hemostasia e estimulação da formação de novos vasos sanguíneos, apresentando-se como método de tratamento simples e econômico (Kim, Park, Park, 2009, Vendramin et al. 2010, Pazzini et al. 2016 a).

PRP é um gel rico em proteínas, que possui fatores de crescimento (GFs), armazenados em grânulos no interior das plaquetas, os quais auxiliam nos processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação, crescimento das células mesenquimatosas pluripotenciais e produção da matriz extracelular (Viegas et al. 2006). Esse produto é obtido por centrifugação, que ao término desse processo resulta em concentração de plaquetas em menor volume de plasma (Sommeling et al. 2013).

Diversos protocolos tem sido utilizados para concentrar plaquetas. Silva et al. (2011), concentraram plaquetas utilizando os primeiros 100 µL da zona vermelha e 900 µL de plasma com única centrifugação obtendo concentrações de plaquetas de 1,5 vezes superior a sangue basal, sendo aceitável para obter efeitos biológicos nas feridas. Vendramin et al. (2009), concentraram maior número de plaquetas usando a coluna superior (Plasma e plaquetas) e a zona nevoa (com um pouco de hemácias) realizando duas centrifugações e adicionando gluconato de cálcio para o PRP gel.

Nesse sentido, este trabalho teve o objetivo de estabelecer a eficiência do PRP na cicatrização nos enxertos cutâneos no membro torácico esquerdo na região do antebraço de coelhos utilizando três protocolos diferentes de Plasma Rico em Plaquetas (PRP).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, no Setor de Técnica Cirúrgica Veterinária, e no laboratório de pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp) Câmpus de Jaboticabal.

Foram utilizados 32 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, fêmeas, com idade entre 160 e 180 dias e peso corpóreo variando entre 2,5 e 3,5 kg, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (Unesp) Câmpus de Botucatu. Os animais foram mantidos no biotério do curso de Pós-graduação em Clínica Médica Veterinária, em gaiolas individuais com dimensões de 80 cm x 50 cm x 35 cm, obedecendo-se os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Eles foram alimentados com ração comercial própria para a espécie e água *ad libitum*. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 3.759/16).

Os 32 coelhos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, cada qual com oito animais, que foram designados de:

GC – Grupo controle. Os animais foram submetidos à cirurgia de enxertos em lâmina de espessura total e não foi aplicado tratamento nenhum.

PRP-G – Grupo enxerto em lâmina associado a PRP autólogo contendo 0,3mL de gluconato de cálcio.

PRP-ZN – Grupo enxerto associado a PRP autólogo com 100 µL da zona neva e camada inferior (hemácias) e adicionado 0,3 mL de gluconato de cálcio.

PRP-L – Grupo enxerto associado a PRP autólogo, sem adição de gluconato de cálcio

Em todos os animais foram realizados enxertos cutâneos em camada, sendo que nos grupos tratados empregou-se um mililitro de PRP em diferentes protocolos antes da síntese da ferida cirúrgica, e no GC, utilizou-se o mesmo volume de solução fisiológica¹. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sempre pelo mesmo cirurgião.

As amostras de sangue foram coletadas de cada animal após a sedação (Midazolam 0,5mg/Kg e Cloridrato de Tramadol 5mg/Kg via IM.) para o procedimento cirúrgico. As amostras de sangue do GC não foram processadas no preparo do PRP, apenas coletadas para não haver diferenças entre os grupos quanto ao volume de sangue corpóreo. Após tricotomia da região cervical, realizou-se a antisepsia com clorexidina e solução de álcool a 90%, para posterior realizar-se a coleta de sangue através da punção da veia jugular com seringa e agulha, para isso utilizam-se dois tubos estéreis com citrato de sódio² preenchidos com 4mL de sangue cada, sendo estes destinados à preparação do PRP e, um terceiro tubo com EDTA³ preenchido com 1mL de sangue destinada à contagem de plaquetas. A preparação do PRP foi realizada por um único pesquisador.

Em um primeiro momento realizou-se a contagem plaquetária da amostra de sangue com EDTA em analisador automático⁴. Após deu-se início a preparação do PRP com o protocolo de dupla centrifugação em centrífuga laboratorial⁵ conforme descrito por (Pazzini et. al., 2016b). Os tubos contendo citrato de sódio foram centrifugados a uma força de 430 g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Ocorreu a separação do sangue em três componentes básicos, hemácias no fundo do tubo, zona névoa no intermédio e plasma com concentrado de plaquetas na porção superior.

Em capela de fluxo laminar⁶, o plasma foi aspirado de cada tubo com pipeta estéril até o limite das hemácias e transferido para um tubo estéril. O plasma pipetado foi centrifugado novamente à 671 g por 10 minutos resultando em duas partes de plasma: botão plaquetário na parte inferior e o plasma pobre em plaquetas (PPP) na superior. O PPP foi descartado de modo que permanecesse apenas 1 mL de PPP e o botão plaquetário. Com agitação leve promoveu-se a resuspensão das plaquetas, resultando assim na produção do PRP. Para finalizar o processo, determinou-se o número de plaquetas em analisador

¹Fisiológico 0,9% - JP Indústria Farmacêutica S.A. - Ribeirão Preto - SP.

²Tubo BD Vacutainer® Citrato de Sódio – BD - São Paulo - SP.

³Tubo pediátrico BD Vacutainer® EDTA BD - São Paulo - SP.

⁴Poch - 100iV Diff - Médica Comércio Representações e Importações Ltda – Recife - PAE.

⁵Modelo 206 I centrífuga/Fanem® - São Paulo - SP.

⁶Vecoflow Ltda - Modelo bio 12 – Campinas - SP.

automático de células sanguíneas, a partir de alíquota de 80µL da amostra do PRP. Após a contagem da concentração de plaquetas, o PRP foi ativado pela adição de 0,3mL de gluconato de cálcio⁷, tornando-se um gel, estando dessa forma, pronto para aplicação no enxerto ao grupo PRP-G. O processo do PRP para o grupo PRP-ZN se diferencia pela adição de 100µL da zona névoa e vermelha antes da segunda centrifugação. Já o PRP para o grupo PRP-L foi aplicado no enxerto sem adicionar gluconato de cálcio. O período entre a coleta do sangue dos coelhos e a preparação do PRP não ultrapassou 6 horas, visto que a vida média dos fatores de crescimento é de 4,2 horas (Sáez – Torres et al., 2007).

Não foi necessário submeter os animais ao jejum alimentar e hídrico. Os coelhos receberam medicação pré-anestésica (MPA) composta por Midazolam⁸, na dose de 0,5mg/kg por via intramuscular (IM) e Cloridrato de Tramadol⁹, na dose de 5mg/kg pela mesma via. Realizou-se venopunção da veia auricular com cateter 24¹⁰, para fluidoterapia de manutenção com solução de ringer lactato¹¹ e procedeu-se indução e manutenção anestésica via máscara facial vedada, com Isoflurano¹² na dose de 3% diluído em 100% de oxigênio.

Os coelhos foram preparados com tricotomia da região lateral esquerda do tórax para o local doador (LD) e do membro torácico esquerdo para o local receptor (LR), seguida de antisepsia prévia e cirúrgica, ambas com clorexidina degermante 2% e álcool 70%.

Antes do procedimento cirúrgico realizou-se um desenho com caneta cirúrgica¹³ e régua estéril no LD de 4 x 4 cm e de 4 x 4 cm no LR. No LR procedeu-se a incisão de pele com lâmina de bisturi número 15¹⁴, seguida da divulsão do tecido subcutâneo de maneira romba e sendo descartado o fragmento de pele, o defeito foi coberto com gaze humedecida com soro fisiológico. No LD foi realizado o mesmo procedimento, porém, no fragmento de pele foi removida toda a porção subcutânea até que permanecesse somente a derme e epiderme para o fragmento ser utilizado como enxerto.

Após posicionar o enxerto no LR, a síntese das bordas foi realizada utilizando pontos em padrão simples separados e fio de sutura náilon 4-0¹⁵. Antes da síntese completa do enxerto adicionou-se o PRP, o qual foi distribuído de maneira homogênea entre o LR e o enxerto. A síntese do LD realizou-se com pontos simples separados e fio de sutura náilon 4/0, apresentando o aspecto da ferida cirúrgica no formato de X.

Todos os pacientes foram tratados com Cloridrato de Tramadol por via subcutânea na dose de 4mg/kg, com intervalos de 12 horas, durante 7 dias, para analgesia, e Pentabiótico¹⁶ pela mesma via na dose de 0,06mg/kg, com intervalo de 48 horas para nova dose, por 5 dias, como antibioticoterapia. E terapia anti-inflamatória com Meloxicam¹⁷, uma vez ao dia, durante 3 dias, na dose de 0,2mg/kg no primeiro dia e 0,1mg/kg no segundo e terceiro dia, também por via subcutânea.

A avaliação macroscópica foi realizada durante 14 dias após procedimento cirúrgico por um único avaliador, às cegas, no 3º, 7º e 14º dias. A avaliação da cicatrização foi realizada seguindo o preenchimento de questionário por meio de avaliações dimensionadas (0 - 4) como segue: Exsudato, 0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = intenso. Coloração, 0 = branca; 1 = rósea; 2 = hemorragia discreta; 3 = hemorragia intensa. Edema, 0 = ausente; 1 = discreto; 2 = moderado; 3 = intenso. Rubor, 0 = ausente; 1 = presente. Aspectos cosméticos, 1 = excelente; 2 = bom; 3 = regular; 4 = ruim.

Os curativos das feridas foram realizados no pós-operatório juntamente com as avaliações macroscópicas consistindo em limpeza da ferida com solução fisiológica, remoção de exsudato, cobertura com gaze¹⁸, atadura¹⁹ e esparadrapo²⁰.

⁷Gluconato de cálcio 100mg/ml/Hipolabor – Sabará - MG.

⁸Midazolam-Medley Industria Farmacêutica Ltda – Campinas - São Paulo – Brasil.

⁹Tramal - Medley Industria Farmacêutica Ltda – Campinas - São Paulo – Brasil.

¹⁰Cateter BD Angiocath 24 – Becton - Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda - Juiz de Fora - MG.

¹¹Ringer lactato - JP Indústria Farmacêutica S.A - Ribeirão Preto - SP.

¹²Isoflurine – Cristália – Itapira - SP.

¹³Skins - T Surgical Skin Marker - Batrik Medical Manufacturing Inc. - Quebec - Canadá

¹⁴Lâmina de bisturi N15 – Solidor - São Paulo - SP.

¹⁵Nylon monofilamentar - Point Suture do Brasil Indústria de Fios Cirúrgicos Ltda – Fortaleza - CE.

¹⁶Modigipen - Jofadel Industria Farmacêutica - S/A, Monte Mar - São Paulo - Brasil.

¹⁷Maxicam - OuroFino Agronegócios – Cravinhos - SP.

¹⁸Gaze hidrófila estéril - Herika - América Medical Ltda – Curvelo - MG.

No 14^o dia todos os animais foram anestesiados com propofol²¹ na dose de 10mg/kg por via endovenosa, e quando apresentavam ausência de reflexos corneal e pupilar, realizou-se a eutanásia com cloreto de potássio na dose de 20 mL pela mesma via.

Após eutanásia, foram removidos os fragmentos de pele enxertada por meio de incisão com bisturi e posterior divulsão em forma romba abrangendo pequena porção de pele não enxertada. As amostras foram identificadas individualmente e armazenadas em formol à 10%²² por 48 horas e transferidas para solução de álcool à 70%²³, para o processamento histopatológico. As peças foram incluídas em blocos de parafina, submetidos à cortes transversais de 5µm e coradas com hematoxilina- eosina (HE).

Na análise microscópica²⁴, a classificação dos dados foi realizada de acordo com a intensidade em que eram encontrados e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice (Ausente = 0, Discreto = 1, Moderado = 2, Acentuado = 3) para o achado histológico das variáveis: Proliferação Vascular, células mononucleares, células polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, colagenização, reepitelização e hemorragia, segundo os critérios preconizados por (Garros et al., 2006).

Foram calculadas as proporções de coelhos, em cada grupo, apresentando as manifestações macro e microscópicas avaliadas no presente estudo. Avaliaram-se também as intensidades das manifestações observadas. Para comparação entre os grupos (GC, PRP-G, PRP-ZN, PRP-L) dentro de cada tempo (3^o, 7^o e 14^o dias) em relação as variáveis macroscópicas (exsudato, coloração, edema, rubor e aspectos cosméticos) e para às variáveis microscópicas (Proliferação Vascular, células mononucleares, células polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, colagenização, reepitelização e hemorragia) foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Para todos os testes, valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Para essas análises foi utilizado o programa GraphPad Prism (Versão 5.00, 2007).

RESULTADOS

Todos os animais avaliados não apresentaram complicações clínicas e o processo de cicatrização de cada animal foi evidenciado gradativamente.

As avaliações macroscópicas demonstraram que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) no 3^o dia para coloração, edema e rubor, no 7^o dia para rubor e no 14^o dia para coloração. Porém exsudato e aspecto não demonstraram diferença significativa (Quadro 1).

A variável coloração no 3^o dia apresentou diferença significativa ($p = 0,006$) quando comparados os grupos tratados e o GC, indicando a presença de processo inflamatório na ferida cirúrgica. A coloração apresentou-se rósea em 75% dos animais do grupo PRP-L e em 50% do GC, sendo maior a ocorrência para o grupo PRP-L, os grupos PRP-G e PRP-ZN tiveram 62,5 e 37,5% dos animais respectivamente. No 14^o dia da avaliação macroscópica, a coloração foi significativa ($p < 0,005$) quando comparados os grupos GC e PRP-G. A ocorrência da coloração rósea foi maior no grupo GC com 37,5% dos animais, já no grupo PRP-G nenhum paciente apresentou essa coloração.

O edema no 3^o dia de pós-operatório apresentou diferença significativa ($p = 0,048$) quando comparados GC e grupo PRP-G. Observou-se que a ocorrência do edema foi maior no grupo PRP-G apresentando-se como discreto e moderado em 50% dos animais contra 12,5% do GC que apresentaram edema discreto, moderado e intenso, já nos grupos PRP-ZN e PRP-L todos os animais apresentaram edema discreto (Figura 1).

Em relação ao rubor, observou-se diferença significativa no 3^o e 7^o dia de avaliação quando comparados o GC com os grupos PRP-ZN e PRP-L ($p < 0,05$ e $p = 0,01$ no 3^o dia e $p = 0,01$ no 7^o dia respectivamente). No 3^o dia de avaliação macroscópica encontrou-se que 25% dos animais do GC apresentaram rubor contra 87,5% do grupo PRP-ZN e 100% do grupo PRP-L sendo maior a intensidade nesse grupo. Entretanto, no 7^o

¹⁹Atadura Cremer – Blumenau - SC.

²⁰Esparadrappo – Cremer – Blumenau - SC.

²¹Diprivan - Zeneca Farmacêutica do Brasil Ltda - São Paulo - SP.

²²Formol tamponado 10% - Indaiá Laboratório Farmacêutico Ltda - Dores do Indaiá - MG.

²³Álcool etílico 70% - Emfal Especialidades Químicas – Betim - MG.

²⁴Microscópio Nikon eclipse - E200.

dia o rubor foi maior para os grupos PRP-ZN e PRP-L com 100% de ocorrência. Já, no GC 25% dos animais apresentaram rubor.

Tabela 1. Medianas das variáveis dos grupos apresentadas no 3^{er}, 7^o e 14^o dia da avaliação macroscópica em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) realizada na Universidade Estadual Paulista (UNESP) FCAV, Câmpus de Jaboticabal, 2017. A letra a depois da mediana indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, por tempo.

Dia	GC			PRP-G			PRP-ZN			PRP-L		
	3 ^o	7 ^o	14 ^o	3 ^o	7 ^o	14 ^o	3 ^o	7 ^o	14 ^o	3 ^o	7 ^o	14 ^o
Aspecto	2	3	3	2	3	4	2	2,5	3	2,5	2	3
Exsudato	1	0	0	0	1	0	2	1	0	1,5	1	0
Edema	0a	0	0	1,5a	1	0	1	1	0	1	1	1
Coloração	1	1	0,5a	2a	1	3a	2a	1	2	1a	1	0,5
Rubor	1a	1a	1	2	1	1	2a	2a	1	2a	2a	1

Na análise microscópica, de modo geral todos os grupos tratados e controle apresentaram características histológicas esperadas de feridas como: presença de células mononucleares e polimorfonucleares, fibroblastos, colágeno e angiogênese.

A análise histopatológica indicou que houve diferenças significativas na cicatrização das feridas entre os grupos tratados com diferentes protocolos de PRP e o GC para as variáveis: Células mononucleares ($p = 0,0187$), proliferação fibroblástica ($p = 0,001$), colagenização ($p = 0,0001$), reepitelização ($p = 0,0001$) e hemorragia ($p = 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos para as variáveis: proliferação vascular e células polimorfonucleares.

A avaliação histopatológica da proliferação vascular, não demonstrou diferença significativa quando comparados os grupos tratados com o grupo controle ($p = 0,496$). Porém microscopicamente ao comparar as médias observou-se que o PRP-G teve 46% de intensidade de angiogênese contra 33% do GC. Já, os grupos PRP-ZN e PRP-L tiveram 37,5% cada um (Figura 2).

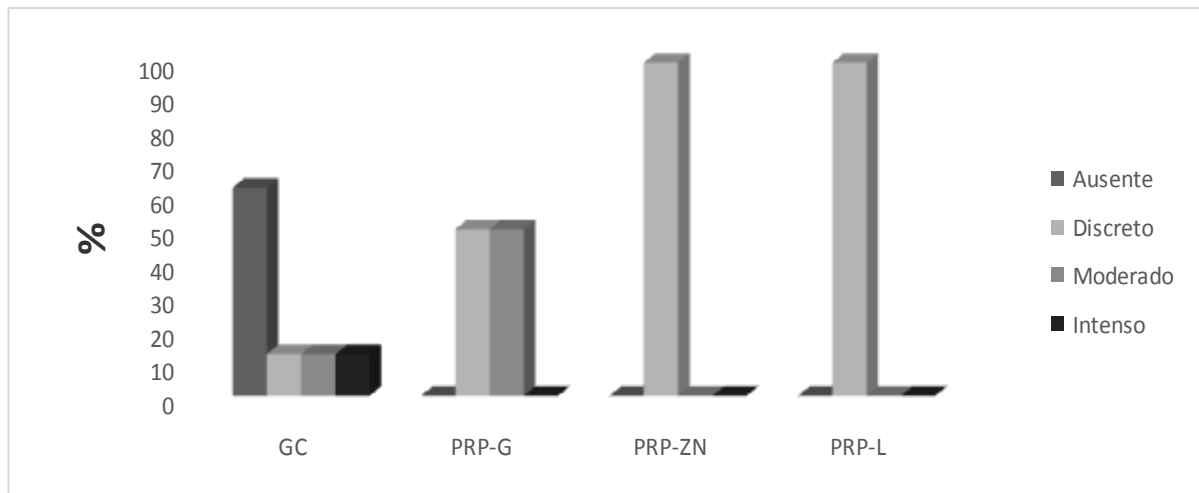


Figura 1. Resultados da avaliação macroscópica ($p = 0,048$) de edema em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) entre o GC e o grupo PRP-G no 3º dia após realização de enxertos cutâneos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual Paulista (UNESP) FCAV, Câmpus de Jaboticabal, 2017.

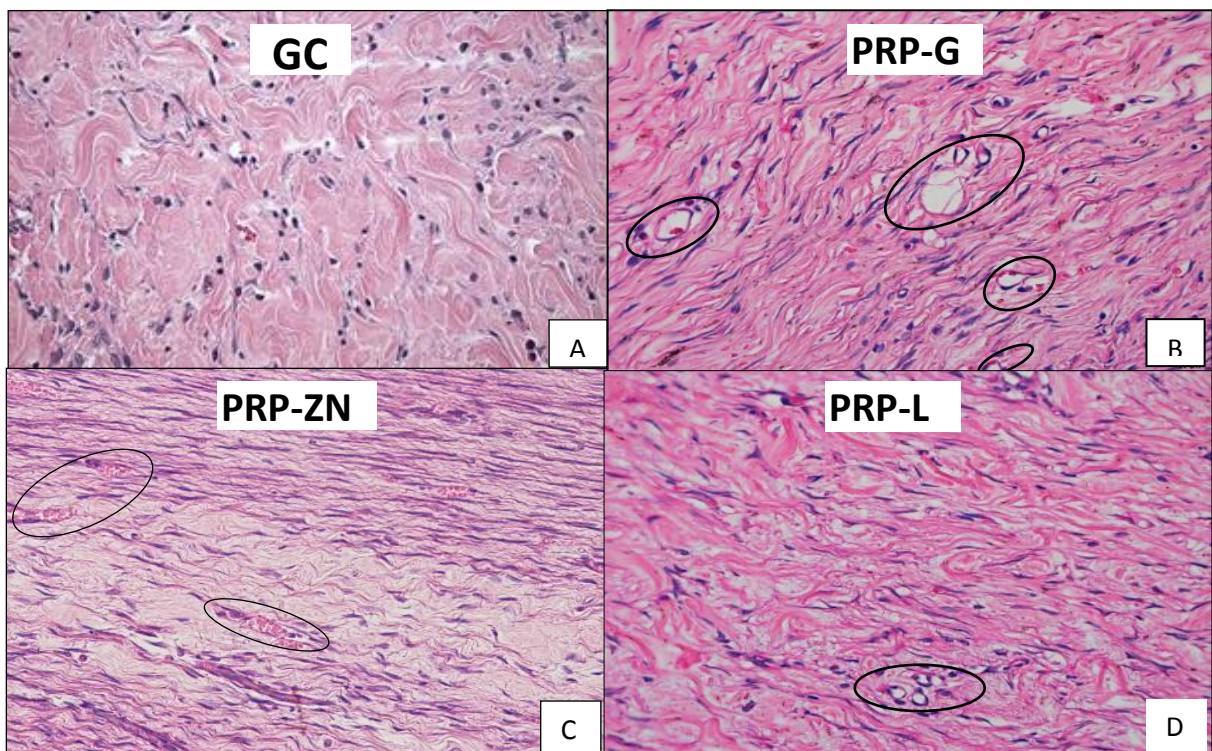


Figura 2. Fotomicrografia da intensidade de proliferação vascular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) realizada na Universidade Estadual Paulista (UNESP) FCAV, Câmpus de Jaboticabal, 2017.

- E) Note-se no grupo controle (GC) a ausência de vasos sanguíneos.
- F) Observe-se no grupo tratado com PRP adicionado de gluconato de cálcio (PRP-G) a presença moderada de vasos sanguíneos no círculo (46%).
- G) Observe-se no grupo tratado com PRP-ZN a presença discreta de vasos sanguíneos no círculo (37,5%).
- H) Observe-se no grupo tratado com PRP líquido a presença discreta de vasos sanguíneos no círculo (37,5%).

Os grupos tratados não apresentaram diferença significativa quando comparados com o GC a respeito da intensidade das células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares. Apesar de não apresentarem diferenças significativas quanto à presença de reação inflamatória entre os grupos, observou-se que o PRP-G teve menor intensidade nas células inflamatórias entre os grupos tratados; mononucleares com 12,5% e polimorfonucleares com 45,8%. Sendo este o grupo que apresentou menor número de células inflamatórias representadas por macrófagos e neutrófilos.

A proliferação fibroblástica mostrou significância ($p= 0,001$) quando comparados o GC e o grupo PRP-G observando-se maior intensidade para o GC com 75%, o PRP-G teve menor intensidade com 33,33%, os outros dois grupos PRP-ZN e PRP-L tiveram 46 e 42% respectivamente.

Quanto a colagenização, os grupos tratados com PRP apresentaram diferenças significativas quando comparados com o GC ($p= 0,0001$). Os achados microscópicos indicaram maior intensidade para o GC com 67% e entre os grupos tratados, o grupo PRP-L teve maior intensidade de colagenização com 42%, os grupos PRP-G e PRP-ZN tiveram 33% cada um.

A intensidade da reepitelização foi significativa entre os grupos tratados e o grupo controle ($p= 0,0001$). Entre os grupos tratados o PRP-G teve maior intensidade com 46% e menor reepitelização no PRP-L com 8%. Os resultados histopatológicos dos grupos PRP-G e PRP-ZN indicaram intensidade discreta e moderada em todos os animais.

A hemorragia não mostrou diferença significativa entre os grupos tratados com PRP e o GC mais houve significância entre os grupos tratados, sendo maior a intensidade de hemorragia no grupo PRP-G com 75% e menor nos grupos PRP-ZN e PRP-L com 21% de intensidade.

DISCUSSÃO

A concentração de plaquetas no PRP para fins terapêuticos deve ser significativamente maior que a plasmática para proporcionar a liberação adequada de Fcs no local do enxerto (Pagliosa & Alves 2007). É provável que o efeito do PRP sobre a cicatrização da ferida seja função de muitas variáveis, entre elas a concentração de plaquetas, volume de PRP e tempo de aplicação demonstraram o efeito coadjuvante do PRP na angiogênese (Bauer et al. 2009, Silva et al. 2011, Vendruscolo et al. 2012, Garcez et al. 2013) quando aplicado em tecidos moles, osso e tegumento (Wroblewski, Mejia, Wright 2010). As propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial para melhora da integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de tecido adiposo (Mazzuco et al. 2004).

A degranulação plaquetária permite a liberação de grande quantidade de fatores de crescimento principalmente PDGF e VEGF que permitem o início da cicatrização das feridas, estimulando a coagulação e principalmente a angiogênese. Este último processo é um dos eventos biológicos mais críticos observados durante a reparação tecidual, aumentando o crescimento dos vasos sanguíneos na ferida. A angiogênese requer a ação dos fatores de crescimento, os quais atuam em relação fisiológica apropriada para assegurar a restauração funcional dos vasos sanguíneos (Martinez et al. 2015). Por isto, neste trabalho utilizaram-se três protocolos diferentes de PRP em enxertos cutâneos nos coelhos para avaliar os diferentes processos da cicatrização, principalmente a angiogênese.

O PRP deve apresentar concentração plaquetária de pelo menos duas a cinco vezes maior do que os valores sanguíneos iniciais, a fim de apresentar efeito terapêutico e melhorar assim a cicatrização (Vanat et al. 2012). No presente trabalho, as plaquetas foram superiores aos valores normais em todos os grupos, porém os efeitos dependem de muitos fatores (anticoagulantes utilizados, presença ou ausência de células brancas do sangue, o uso de ativadores como trombina exógena ou gluconato de cálcio, número de centrifugações, velocidade de centrifugação e tempo de aplicação) que podem mudar a liberação dos fatores de crescimento e a reparação tecidual, assim como relatado por Duymus et al. 2016.

Na análise morfológica deste estudo observou-se que as variáveis edema, coloração e rubor foram significativas entre os grupos experimentais tratados com diferentes protocolos do PRP. A coloração no 3º dia de avaliação o grupo PRP-ZN foi o único que apresentou diferença significativa quando comparado ao GC, indicando que o processo inflamatório foi mais intenso no início da reparação tecidual nos animais do PRP-ZN possivelmente porque o protocolo aplicado concentra maior número de leucócitos, além de ter em sua composição um número pequeno de hemácias, segundo manifestado por Silva et al. (2011), quando utilizaram o método de tubo para concentrar plaquetas com única centrifugação em cães.

Quanto ao edema, essa variável estatisticamente não apresentou diferenças entre os grupos, mais no 3º dia de avaliação pode-se determinar que o edema teve menor intensidade nas feridas do GC. Concordando com Vendramin et al. (2010), quando avaliaram o PRP líquido e em gel evidenciando aumento na resposta inflamatória no local enxertado nos primeiros dias pós cirurgia, o que potencializa a cicatrização. Respeito dos protocolos, eles obtiveram melhores resultados com PRP líquido, contrário ao encontrado neste estudo onde os melhores resultados foram com o PRP gel que apresentou menor intensidade do edema. Condizente também com o relatado por Sommeling et al. (2013), quando revisaram 82 publicações sobre o uso de PRP adicionados de ativadores de plaquetas concluindo que entre muitos dos benefícios do PRP é diminuir o edema, equimose e dor.

O rubor no 3º e 7º dia de avaliação foi estatisticamente significativo sendo maior a intensidade nos grupos PRP-ZN e PRP-L quando comparados com o GC, porém, no PRP-G o rubor foi menos expressivo, assim pode-se inferir que a aplicação do PRP com gluconato de cálcio diminui a intensidade do rubor concordando com trabalhos que concluem que os ativadores do PRP como gluconato de cálcio, tromboplastina ou trombina bovina aceleram a degranulação plaquetária, liberando os fatores de crescimento e promovendo a proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporcionam a formação da matriz extracelular (Barbosa et al. 2008, De Rossi et al. 2009, Sardari et al. 2011). A intensidade aumentada nos grupos PRP-ZN e PRP-L do rubor também pode-se relacionar com os sinais de inflamação (rubor, calor, tumor e dor) conforme descrito por Pavletic (2010).

Por meio da análise histopatológica das lâminas foi possível observar ainda células inflamatórias em alguns animais dos grupos tratados, representadas por células mononucleares e polimorfonucleares, lembrando que as amostras foram coletadas no 14º dia pós cirúrgico. Estas variáveis não demonstraram diferenças significativas entre os grupos experimentais, porém, foi possível estabelecer que a inflamação manifestou-se com menor intensidade nos animais do PRP-G já os animais dos grupos PRP-ZN e PRP-L manifestaram intensidade moderada. Esses resultados concordam com Fathi (2012), que avaliou o PRP adicionado de gluconato de cálcio e ácido hialurônico em pele de coelhos, e ao final da segunda semana os animais tratados com PRP gel a inflamação diminuiu possivelmente devido ao aumento dos FC contidos nos grânulos de plaquetas. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular (VEGF) e fator de crescimento transformante (TGF- β), contribuem na resolução da ferida por atração de células indiferenciadas, as quais agem com macrófagos na matriz extracelular e diminuem as citocinas o que limita a inflamação melhorando assim a reepitelização e a regeneração dos tecidos.

A presença da inflamação é devido ao desequilíbrio de citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias por níveis baixos dos FC. Por tanto o PRP gel aumenta a atividade dos FC acelerando a reepitelização e diminuindo a inflamação. A diminuição da inflamação da ferida é um processo essencial para o desbridamento e resolução da ferida (Karayannopoulou et al. 2015).

Neste estudo, a intensidade de proliferação de fibroblastos, colagenização e reepitelização foi maior nos grupos que receberam PRP quando comparados com o grupo controle. Sendo assim, os resultados obtidos são concordantes com os de Vendramin et al. 2010, que utilizaram PRP em enxertos cutâneos em coelhos e encontraram aumento da proliferação fibroblástica e de colágeno, proporcional à concentração plaquetária, aumentando assim a angiogênese, a síntese de matriz extracelular e melhorando a cicatrização de um modo geral.

Vários estudos clínicos tanto na medicina humana como veterinária demonstraram o positivo papel das plaquetas contidas no PRP. Utilizado na forma de gel ou líquida sobre a pele, tem mostrado que a angiogênese é promovida pela ação dos FC que atuam em relação fisiológica apropriada para assegurar a restauração funcional dos vasos sanguíneos. Principalmente: VEGF, fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e PDGF, esses fatores regulam a diferenciação e proliferação celular, estimulam a angiogênese, a quimiotaxia e síntese de componentes da matriz extracelular (Ostvar et al. 2015).

Lee et al. (2008), encontraram aumento da resposta neo-angiogênica e da epitelização quando aplicaram diferentes quantidades de PRP em feridas incisionais em coelhos. Por outro lado, Ostvar et al. (2015), avaliaram os efeitos do PRP em feridas cutâneas agudas e crônicas em 30 coelhos, o tamanho da ferida, epitelização e neovascularização nos dias 7,14 e 21 pós tratamento, encontraram que a angiogênese melhorou tanto no início como ao final do experimento. Resultados similares encontraram Hom et al. (2007), quando avaliaram PRP em feridas de pele em humanos, que através da angiogênese conseguiram diminuir no 14º dia a cicatrização das feridas, frente ao 17º dia do grupo controle. Esses

trabalhos concordam com este estudo, onde a angiogênese manifestou-se em todos os grupos tratados com PRP. No entanto, estatisticamente não apresentou diferenças significativas com o grupo controle quanto a intensidade da angiogênese. O PRP-G mostrou maior intensidade que os outros grupos, possivelmente por ter maior concentração de plaquetas por mililitro (1.425.500/mL) no processo de confecção do PRP, condizente com Pazzini et al. (2016b), que avaliaram a concentração de plaquetas com duas centrifugações e adicionado de 0,3mL de gluconato de cálcio, promovendo a concentração três vezes maior em relação à amostra de sangue inicial. Por outro lado, a maior intensidade da angiogênese no PRP-G pode ser por ação do gluconato de cálcio adicionado ao PRP que permite a conversão de protrombina em trombina promovendo assim a cascata da coagulação e melhorando a cicatrização (Duymus et al. 2016).

Tendo como base os presentes achados neste estudo e concordando com Dong et al. (2016), pode-se inferir que pelo menos três fatores poderiam contribuir ao mecanismo de aumento da angiogênese em presença de uma ferida. Primeiro, a formação de novos brotos de vasos sanguíneos devido a resposta inflamatória da cicatrização de feridas cirúrgicas. Segundo, a liberação endógena de fatores de crescimento pelas células locais como uma reação a hipóxia e terceiro, pela liberação exógena desses fatores contidos no PRP.

Por outro lado, inúmeros estudos encontraram que a concentração de plaquetas do PRP pode variar devido a diferentes fatores como: volume do sangue, proporção de plasma considerado como PRP, número de centrifugações, tempo de centrifugação, concentração inicial de plaquetas no sangue e substâncias utilizadas para gelificar o PRP (Butterfield et al. 2005, Anitua et al. 2006, Del Carlo et al. 2009, Vendruscolo et al. 2012).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo PRP-G que foi adicionado de gluconato de cálcio teve maior eficiência na cicatrização que os protocolos PRP-ZN e PRP-L, garantindo maior intensidade da epitelização e angiogênese no 14º dia pós cirúrgico nos enxertos cutâneos em coelhos.

Agradecimentos. - À UDENAR (Universidad de Nariño), por conceder a comissão de estudos. À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus Jaboticabal, pela concessão de estrutura física e equipamentos utilizados para a realização do experimento, e à Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP), España, pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- Anitua E., Sanchez M., Nurden A.T., Nurden P., Orive G. & Andia I. 2006. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *TRENDS in Biotechnology*. 24(5): 227 - 234.
- Barbosa A.L., Del Carlo R.J., Gomes C.H., Oliveira A.C., Monteiro B. & Del Carlo B. 2008. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural*. 38(5):1335 - 1340.
- Bauer J.A., Correa J., Lima F.L., Lima L.A. & Pustiglioni F.E. 2009. Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. *Revista Periodontia*. 19(3):98-108.
- Butterfield K., Bennett J., Gronowicz G. & Adams D. 2005. Effect of Platelet-Rich Plasma With Autogenous Bone Graft for Maxillary Sinus Augmentation in a Rabbit Model. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63:370 - 376.
- De Rossi R., Coelho A.C., De Mello G., Frazilio F., Leal C.R., Facco G. & Brum K. 2009. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Act. Cirúr. Bras.* 24(4):276 - 280.
- Del Carlo R. J., Monteiro B.S., Silva P. S., Argolo N. & Serakides R. 2009. Aspectos microscópicos da reparação mediada por plasma rico em plaquetas e autoenxerto esponjoso em falhas ósseas experimentais no crânio de coelhos. *Vet. E. Zootec.* 16(1):152 - 160
- Dong Z., Li B., Liu B. Bai S., Guoguan L., Ding A., Zhao J. & Liu Y. 2012. Platelet-rich Plasma Promotes Angiogenesis of Prefabricated Vascularized Bone Graft. *Oral Maxillofac. Surg.* 70:2191 - 2197.

- Duymus M. E., Temel S., Ozer H., Urhan M.K., Kaya F., Aslan F., Celepli P., Senes M., Dogan K., Kuru S., Barlas A.M. & Kismet K. 2016. Comparasion of the Effects of Platelet-rich Plasma Prepared in Various Forms on the Healing of Dermal Wounds in Rats. *Wounds*. 28(3):99 – 108.
- Fathi W.K. 2012. The effect of Hyaluronic Acid and Platelet-Rich Plasma on Soft Tissue Wound Healing: An Experimental Study on Rabbits. *Al-Rafida in Dent. J.* 12(1):115 – 125.
- Garcez T.N., Paz A.H., Magrisso A.B., Mello H.F., Gonçalves F.C., Meyer F.S., Contesini E.A. & Cirne-Lima E.O. 2013. Comparação entre três protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) utilizando coelho como modelo experimental. *Acta Scientia e Veterinariae*. 41:1134.
- Garros I.C., Campos A.C.L., Tâmbara E.M., Tenório S.B., Torres O.J.M., Agulham M.A., Araújo A.C.F., Santis-Isolan P.M.B., Oliveira R.M. & Arruda E.C.M. 2006. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Act. Cirúr. Bras.* 21(3):55 – 65.
- Hom D.B., Bradley M.L. & Huang T.C. 2007. The Healing of Autologous Platelet Gel on Acute Human Skin Wounds. *Arch. Facial. Plast. Surg.* 9(3):174 – 183.
- Karayannopoulou M., Psalla D., Kasakos G., Loukopoulos P., Giannakas N., Savvas I., Kritsepi-Konstantinou M., Chantes A. & Papazoglou L.G. 2015. Effect of locally injected autologous platelet-rich plasma on second intention wound healing of acute full-thickness skin defects in dogs. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 3:172 – 178.
- Kim J.H., Park C. & Park, H.M. 2009. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Journal Compilation Seoul.* 20:123 – 126.
- Lee H. W., Reddy M. S., Geurs N., Palcanis K.G., Lemons J.E., Rahemtulla F.G., Ho K., Ghen D., Davis C.R. & Feldman D.S. 2008. Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Wound Healing in Rabbits. *J. Periodontol.* 79:691 – 696.
- Macphail C.M. 2015. Cirurgia do Sistema Tegumentar, p.190 – 278. In: Fossum T.W. (Ed.), *Cirurgia de Pequenos Animais*. 4a ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Martinez C.E., Smith P.C. & Palma V.A. 2015. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Fornt. Physiol.* 6:1 – 7.
- Mazzuco L., Medici D., Serra M., Panizza R., Rivara G., Orecchia S., Libener R., Cattana E., Levis A., Betta P. & Borzini P. 2004. The use of autologous platelet gel to treat difficult – to – heal wounds: a pilot study. *Transfusion.* 44:1013 – 1018.
- Ostvar O., Shadva S., Yahaghi E., Azma K., Farshid A. & Ahmadi K. 2015. Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinic-histopathologic study in rabbits. *Diagnostic Pathology.* 10:85 – 91.
- Pagliosa G.M. & Alves G.E.S. 2007. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. *Ciência Rural.* 37(4):1202 – 1205.
- Pavletic M.M. 2010. Free Grafts, p. 357 – 400. In: Pavletic M.M. (Ed.). *Small Animal Wound Magementand Reconstructive Surgery*. 3a ed. Wiley – Blackwell, Iowa.
- Pazzini J. M., De Nardi A. B., Huppés R.R., Gering A.P., Ferreira M.G., Silveira C.P., Luzzi M. C. & Oliveira J.A. 2016a. Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Pesq. Vet. Bras.* 36(2):108 – 118.
- Pazzini J.M., De Nardi A. B., Huppés R.R., Gering A.P., Ferreira M.G., Silveira C.P., Luzzi M.C. & Santos R. 2016b. Method to obtain platelet – rich plasma from rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Pesq. Vet. Bras.* 36(1):39 – 44.

- Sáez – Torres C., Calvo J. & Gayá A. 2007. Platelet – rich plasma quality: a study on platelet activation. *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.* 29(4):240 – 248.
- Sardari K., Emami M.R., Kazemi H., Movasagi A.R., Goli A.A., Lotfi A., & Malekzadeh S. 2011. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on cutaneous regeneration and wound healing in dogs treated with dexamethasone. *Comp. Clin. Pathol.* 21:155 – 162.
- Silva R.F., Rezende C.M.F., Paes-Leme F.O. & Carmona J.U. 2011. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. *Arch. Med. Vet.* 43:95 – 98.
- Sommeling C.E., Heyneman A., Hoeksema H. Verbelen J., Stillaert F.B., & Monstrey S. 2013. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: A systematic review. *Journal of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery.* 66:301 – 312.
- Szentimery D. 1998. Principles of reconstructive surgery for the tumor patient. *Clinical Techniques in Small Animal Practice.* 13(1):70 – 76.
- Tobias K.M. 2011. Enxertos em Malha de Espessura total, p. 44 – 52. In: Tobias K.M. (Ed.), *Manual de cirurgia de tecidos moles pequenos animais.* Roca, São Paulo.
- Vanat N., Medeirosl T., Balarin M.R., Pereira P. & Biasi, F. 2012. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. *Ciências Agrárias.* 33(1):313 – 322.
- Vendramin F.S., Franco D. & Franco T.R. 2009. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 24(2):212 – 218.
- Vendramin F.S., Franco D., Schamall R. F. & Franco T.R. 2010. Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 25(19):4 – 10.
- Vendruscolo C.P., Carvalho A.M., Moraes L.F., Maia L., Queiroz D.L., Watanabe M.J., Yamada A.L. & Alves A.L. 2012. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pesq. Vet Bras.* 32(2):106-110.
- Viegas C.A., Dias M.I., Azevedo J.M., Ferreira A.J., San Roman F. & Cabrita A.M. 2006. Utilização de Plasma Rico em Plaquetas na regeneração do tecido ósseo alveolar e cortical. Estudos experimentais num modelo de defeito ósseo periodontal em cão Beagle (*Canis familiaris*) e num modelo de defeito ósseo cortical na ovelha (*Ovis aries*). *Rev. Port. Cien. Vet.* 101:193 – 213.
- Wroblewski A.P., Mejia H.A. & Wright V.J. 2010. Application of Platelet-Rich Plasma to Enhance Tissue Repair. *Oper. Tech. Orthop.* 20(20):98 – 105.

APÊNDICE

Apêndice 1.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peerreview).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) O **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) **sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) **OABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) **ORESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) **AINTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) **Em MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) **Em RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) **Na DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) **As CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) **A lista de REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não

deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) A Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçados, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.