

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 23/03/2019.

**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 Huppes, 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 Reconstructivas.....	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 contratatura 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.