UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ENXERTOS CUTÂNEOS AUTÓLOGOS E HOMÓLOGOS TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

BERNARDO KEMPER

BOTUCATU – SP
Janeiro 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ENXERTOS CUTÂNEOS AUTÓLOGOS E HOMÓLOGOS TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Bernardo Kemper

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.ª. Adjunto Cláudia Valéria Seullner Brandão

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Kemper, Bernardo.
Enxertos cutâneos autólogos e homólogos tratados com plasma rico em plaquetas : estudo experimental em coelhos / Bernardo Kemper. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão
Capes: 50501003

1. Plasma Rico em Plaquetas. 2. Pele - Enxerto. 3. Transplante homólogo. 4. Substâncias de crescimento.

Palavras-chave: PRP; fatores de crescimento; integração do enxerto;

Nome do Autor: Bernardo Kemper

Título: ENXERTOS CUTÂNEOS AUTÓLOGOS E HOMÓLOGOS TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.ª. Dra. Cláudia Valéria Seullner Brandão_____

Presidente e Orientadora, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária – área de Oftalmologia, FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.ª. Dra Sheila Canevese Rahal _____

Membro, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária –FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira _____

Membro, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária – FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Fernando de Biasi_____

Membro, Departamento de Clinicas Veterinárias- Área de Cirurgia de pequenos animais UEL

Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto _____

Membro, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAVJ – UNESP– Jaboticabal

Data da defesa: 08/01/2015

DEDICATÓRIA

``*A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim,*

fazendo a vida valer cada vez mais a pena``

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha esposa Daniela e meu filho Eduardo, pela paciência, amor, dedicação e apoio incondicional em todas as situação.

Aos meus pais Maria e Bernhard Kemper pelo amor e formação recebidos durante a vida.

À Professora Dra. Cláudia Valéria Seullner Brandão, pela oportunidade e confiança em mim depositado, pela paciência e dedicação que me passou durante toda a realização do doutorado.

Ao Professor Dr. Werner Okano, que sempre foi um grande amigo e incentivador.

A professora Dra. Monica Vicky Bahr pelo constante incentivo, pela sua amizade e conselhos.

Aos professores Flavio Barca e Alexey pela valiosa contribuição na realização do experimento.

Aos grandes amigos Flavia Navas e Pedro Henrique de Carvalho que sempre estiveram presentes e disponíveis para ajudar em todas as etapas.

Ao Alfailton que tanto contribuir na realização dos procedimentos durante a execução do experimentos.

Ao Prof. Dr. José Joaquim Titton Ranzani, pelos conselhos, amizade e confiança.

Ao professor Dr. Juliano de Conti, pela amizade e incentivo.

Aos amigos Natalie, Cinthia e Victor Rossetto pela disponibilidade e constante ajuda em todas as etapas da realização do experimento, muito obrigado.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do doutorado.

A UNOPAR e todo os seus funcionário pela oportunidade e da realização do experimento.

A todos os demais amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização e finalização de mais uma etapa em minha vida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores da contagem plaquetária no sangue total e no PRP, bem como o incremento plaquetário obtido nos diferentes animais.....27

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão dos escores de avaliação quanto à presença de secreção, nos diferentes tratamentos e momentos de avaliação pós-operatória.....29

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão dos escores de avaliação quanto a coloração, nos diferentes tratamentos e momentos de avaliação pós-operatória.....30

Tabela 4 – Valores médios e desvios padrões dos escores de avaliação quanto a aspecto cosmética, nos diferentes tratamentos e momentos de avaliação pós-operatória.....32

Tabela 5- Mediana e valores mínimos e máximo das variáveis intensidade de fibras de colágenos e vasodilatação, nos diferentes grupos experimentais.....38

Tabela 6.-Frequência das alterações teciduais observadas na avaliação histológica de G1, G2, G3 e G4…….....39

Tabela 7. Coeficiente de correlação (r) e valores de p entre as variáveis: fibras de colágenos, dilatação do vaso, alteração histológica e fibroblasto..39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem fotográfica do resultado das etapas da centrifugação do sangue dos coelhos A: Primeira etapa de centrifugação a (200G/10min.). Observar separação do plasma e das células vermelhas; B: Segunda etapa de centrifugação (400G/10min.), notar a formação do botão plaquetário (seta).).....19

Figura 2- Representação esquemática da formação dos grupos experimentais, em dois animais. G1: enxerto autólogo tratado com PRP, G2: enxerto autólogo, G3: enxerto homólogo tratado com PRP, G4: enxerto homólogo.....20

Figura 3- Imagens fotográficas, A: tricotomia e antissepsia da superfície cutânea. B: demarcação dos enxertos dos coelhos. C: aplicação do PRP, após colocação dos campos. D: aspecto final imediato da colocação dos quatro enxertos.....21

Figura 4-Imagem fotografica do pós-operatório dos coelhos. A observar a aplicação e fixação da bandagem rayon e em B, o apecto final da bandagem.....22

Figura 5.-Frequência absoluta dos escores de coloração nos diferentes tratamentos, no 5 de pós-operatório.....30

Figura 6.-Frequência absoluta dos escores de coloração nos diferentes tratamentos, no 19 de pós-operatório.....31

Figura 7. Valor médio + desvio padrão de macrófagos e fibroblastos contados em três campos de observação de cada tratamento, sendo: G1 enxerto autólogo com PRP, G2 enxerto autólogo sem PRP, G3 enxerto homologo com PRP e G4 enxerto homologo sem PRP. (a) Contagem de macrófagos por campo, com diferenças entre os grupos de enxerto autólogo, G1 e G2, do grupo de enxerto homologo, G3 e G4, ($P < 0,001$). (b) Contagem de fibroblastos por campo, com G1 e G2 diferindo de G3 ($P = 0.004$). Letras diferentes sobre as colunas indicam significância estatística ($P<0,05$), pelo teste ANOVA seguido por teste de Tukey.....33

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

%	= por cento
°C	=grau Celsius
µL	=microlitro
µm	=micrometro
aFGF	=Fator de Crescimento fibroblástico ácido
bFGF	=Fator de Crescimento fibroblástico básico
cm	=centímetros
EDTA	=ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	=Fator de Crescimento epidermal
FC	=Fatores de Crescimento
FMVZ	=Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G	=gravidades
G1	=enxerto autólogo com PRP
G2	=enxerto autólogo sem PRP
G3	=enxerto homologo com PRP
G4	=enxerto homologo sem PRP
HGF	=Fator de Crescimento dos hepatócitos
IGF	=Fator de Crescimento semelhante à insulina
IGF-I	=Fator de crescimento semelhante à insulina I
kg	=quilograma
mg/kg	=miligrama por quilograma
min.	=minutos
mL	=mililitros
mm	=milímetros
PDGF	=Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PPP	=Plasma Pobre em plaquetas
PRP	=Plasma Rico em Plaquetas
TGF-α	=Fator de Crescimento transformador alfa
TGF-β	=Fator de Crescimento transformador beta
UNESP	=Universidade Estadual Paulista
UNOPAR	=Universidade Norte do Paraná
VEGF	=Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....
ABSTRACT.....
1.INTRODUÇÃO.....1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....4
2.1 Pele.....4
2.1.1. Função da pele.....4
2.1.2 Anatomia da pele.....4
2.2. Cicatrização cutânea.....5
2.2.1.Fases da cicatrização.....6
2.2.1.1.Fase inflamatória.....6
2.2.1.2. Fase de debridamento.....7
2.2.1.3. Fase de reparação.....7
2.2.1.4 Fase de maturação.....8
2.3. Plasma rico em plaquetas na reparação cutânea.....8
2.3.1. Plasma rico em plaquetas (PRP).....8
2.3.2. Aplicações clinicas gerais do PRP.....10
2.3.3. Aplicações clinicas em feridas cutâneas.....12
2.3.4. Aplicações clinicas do PRP em enxertos.....13
3. OBJETIVO.....16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....17
4.1 Grupos experimentais e ambiente de experimentação.....17
4.2. Preparo do PRP.....17
4.3. Grupos de tratamento.....19
4.4. Preparo pré-cirúrgico e protocolo anestésico.....20
4.5. Procedimento cirúrgico.....21
4.6. Avaliação dos animais.....23
4.7.Avaliação clínica macroscópica.....23
4.8. Avaliação Histológica.....24
5. ANALISE ESTATÍSTICA.....26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....27
6.1. Animais e PRP.....27
6.2. Avaliação Macroscópica.....28
6.2.1 Secreção.....28
6.2.2. Coloração.....29
6.2.3. Variável aspecto cosmético.....32
6.3. Avaliação Histológica.....32
6.4. Limitações do estudo.....39
7. CONCLUSÕES.....42
8. BIBLIOGRAFIA.....43
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....56

KEMPER B. **Enxertos cutâneos autólogos e homólogos tratados com plasma rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos.** Botucatu, 2015, 91p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar clínica e histologicamente, os efeitos do uso do PRP na viabilidade de enxertos cutâneos autólogos e homólogos de espessura total em coelhos. Para isso foram constituídos quatro grupos experimentais (n=9), designados como: G1: o enxerto autólogo tratado com o PRP; G2: enxerto autólogo; G3: enxerto homólogo tratado com PRP e G4: enxerto homólogo. Deste modo, cada coelho foi submetido ao tratamento com PRP e seu controle dos enxertos autólogos e homólogos, totalizando 36 amostras**.** Todas a etapas foram documentadas para a avaliação clínica macroscópica e no 19º dia foi coletado da área central, um fragmento de cada enxerto para a avaliação histomorfológica. O tratamento do enxerto autólogo com o PRP promoveu influência positiva na fase inicial ou de “pega” do enxerto, demonstrada por coloração avermelhada à avaliação macroscopia e aspecto cosmético comparado aos demais tratamentos. Na avaliação histomorfométrica, o número de macrófagos foi superior nos enxertos homólogos em relação aos autólogos. Porém, não houve diferença no número de macrófagos e fibroblastos com a instituição do tratamento com PRP. O tratamento do enxerto autólogo com o PRP, na forma líquida, promove influência positiva na fase inicial ou de “pega” do enxerto

Palavras-chave: integração do enxerto, fatores de crescimento, pele, PRP

KEMPER B. **Autologous and homologous skin grafts treated with platelet-rich plasma. Experimental study in rabbits**. Botucatu, 2015, 91p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate clinically and histologically, the effect of PRP on the viability of the autologous and homologous full thickness grafts in rabbits. Four experimental groups (n=9) were studied and designated as G1: autologous graft treated with PRP; G2: autograft; G3: homograft treated with PRP and G4: homograft. Each rabbit was subjected to treatment with PRP and its control of autologous and homologous grafts, representing 36 samples. All steps were documented for the macroscopic clinical assessment and at 19th postoperative days, skin biopsy was collected from the central area, for histomorphological evaluation. The treatment of graft with PRP resulted positive influence in the initial phase or "handle" of the graft, demonstrated by the reddish macroscopic and cosmetic appearance compared to others treatments. The histomorphometric evaluation, the number of macrophages in the grafts was higher in homologs compared to autologous. However, there was no difference in the number of macrophages and fibroblasts with the PRP treatment. The treatment of the graft with PRP in liquid form, promotes a positive influence on the initial phase or "take" of the graft

Keywords: graft integration, growth factors, skin, PRP.

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo biológico que restaura a continuidade dos tecidos após um ferimento. Envolve processos físicos, químicos e eventos celulares para reparar o tecido lesado ou substituí-lo por colágeno (FAHIE, 2012).

A cicatrização ideal de feridas na pele deve ser um processo bem orquestrado, incorporando eventos biológicos e moleculares complexos, que incluem atração de células para o local da ferida, proliferação celular, diferenciação e angiogênese (MARTIN, 1997; SINGER e CLARK, 1999).

Considerando o aspecto econômico associado ao manejo e tratamento de feridas crônicas e complexas na Medicina, nos EUA cerca de 20 bilhões de dólares anuais são empregados no tratamento destas afecções. Portanto, inúmeros esforços têm sido feitos, especialmente desde os anos 1980, para melhorar os resultados clínicos, com enfoque especial no uso de terapias baseadas nos fatores de crescimento (ROBERT et al., 2010).

Os fatores de crescimento (FC) atuam nos receptores de superfície celular e contribuem para a ativação dos mecanismos de transdução de sinal (PAVLETIC, 2010). Assim, os fatores liberados pelos grânulos plaquetários possuem efeitos na proliferação celular, modificam a resposta inflamatória, tem ação antibacteriana, são quimiotáticos para macrófagos e fibroblastos e promovem a secreção de enzimas proteolíticas que facilitam a reparação e remodelação do tecido (BERNUZZI et al., 2007). A base da terapia utilizando o plasma rico em plaquetas (PRP) é o aumento da concentração de plaquetas e, consequentemente, de fatores de crescimento, liberados na ferida com o intuito de potencializar sua cicatrização (FREYMILLER e AGHALOO, 2004).

A introdução de procedimento que favoreçam a pega dos enxertos é sempre positivo, pois várias complicações associadas a essa cirurgia podem

impedir ou retardar a revascularização e resultar em necrose do enxerto. Dentre estas cita-se movimentação entre o enxerto e o leito receptor, presença de pus, seroma, sangue ou corpo estranho entre o enxerto e seu leito e fibrinólise secundária à infecção bacteriana (PAVLETIC, 2010). Tais aspectos estimularam o desenvolvimento do presente estudo, o qual objetivou avaliar a ação do PRP em enxertos cutâneos autólogos e homólogos em coelhos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Pele

2.1.1 Funções da pele

O tegumento é o maior órgão do corpo, e a primeira barreira defensiva contra microrganismos. Considerando sua proporção este corresponde a 24% do peso corpóreo nos filhotes, e a 12% do peso corpóreo no adulto (PAVLETIC, 2010).

A pele é um receptor de contato, pressão, vibração, dor, calor, e frio. Entre as suas múltiplas funções destacam-se a produção de vitamina D, o armazenamento de água, gordura, eletrólitos, carboidratos e proteínas, e ainda em conjunto com a gordura subcutânea fornece isolamento térmico (PAVLETIC, 2010).

2.1.2 Anatomia da pele

A pele é formada por duas camadas básicas: a epiderme e a derme, bem como subjacente a esta última, a hipoderme, tecido subcutâneo rico em adipócitos e tecido conectivo (FAHIE, 2012). A epiderme é avascular e recebe seus nutrientes através de fluidos que penetram as camadas mais profundas vindos dos capilares da derme. A espessa e vascularizada derme encontra-se profundamente a epiderme. A derme é composta de fibras colágenas, reticulares e elásticas, envolvidas por substancia fundamental de mucopolissacarídeos. Fibroblastos, macrófagos, plasmócito e mastócitos são encontrados nesta camada; contém ainda sangue e vasos linfáticos, nervos, folículos pilosos, glândulas, ductos e fibras musculares lisas (HEDLUND, 2007).

O suprimento vascular da pele é dividido em três níveis interconectados: plexo subdermal profundo, o plexo médio ou cutâneo e o plexo subpapilar ou

superficial (PAVLETIC, 2010; FAHIE, 2012). O plexo subdermal é a maior rede vascular da pele sobrejacente. Quando a camada de musculo cutâneo está presente, o plexo percorre profundo e superficialmente ao músculo. Desta forma, a separação completa do músculo do panículo resulta em necrose do retalho, enquanto a preservação deste assegura a sobrevida pela preservação do plexo subdermal (PAVLETIC, 2010).

Ramos do plexo subdermal segundo Hunt (2012) acendem para derme para formar o plexo cutâneo, que nutre as glândulas sebáceas e reforça a rede de capilares em torno dos folículos pilosos. Ramos do plexo cutâneo acendem para suprir o plexo superficial, o qual localiza-se nas camadas superficiais da derme. Ramificações capilares deste plexo projetam-se nas papilas dérmicas para suprir as papilas epidermais e a epiderme adjacente. Contudo, este sistema é pouco desenvolvido no cão e gato, diferentemente do humano, primatas e suíno que o apresentam de forma bastante desenvolvida (HUNT, 2012).

2.2. Cicatrização cutânea

A cicatrização de feridas é um processo complexo e dinâmico, que integra funções de componentes sanguíneos, matriz extracelular, células parenquimatosas e mediadores solúveis. Avanços significativos em biologia molecular e celular, ao longo dos últimos anos, têm melhorado o entendimento sobre os processos de cicatrização e regeneração tecidual (PAVLETIC, 2010, FAHIE, 2012).

Em feridas não complicadas, o processo de reparação segue uma sequência bastante consistente, descritas segundo suas diferentes fases: fase de inflamação, fase de debridamento, fase de reparação e fase de maturação,

Estas fases se sobrepõem nos acontecimentos teciduais e são afetados por múltiplos fatores endógenos e exógenos (FAHIE, 2012).

Desta forma cada fase da cicatrização é regulada em grande parte por mediadores chamados citocinas. As citocinas podem agir nas células responsáveis pela sua liberação (autocrino), células adjacentes (paracrino) e células distantes (endócrino); e podem direcionar as células a produzirem proteínas, enzimas, proteoglicanos de adesão, e outros componentes requeridos na reparação de tecido extracelular (PAVLETIC, 2010).

2.2.1. Fases da cicatrização

2.2.1.1. Fase Inflamatória

A fase inflamatória é denominada de preparação para a cicatrização. Caracteriza-se pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células circulantes, liberação de citocinas e fatores de crescimento, e ativação celular. Após uma lesão, o coágulo formado preenche a ferida imediatamente; ocorre vasoconstricção por 5-10 minutos iniciais para limitar a hemorragia, mediada por catecolaminas, serotonina, bradicinina e histamina; a seguir ocorre vasodilatação, a qual permite o extravasamento de fibrinogênio e elementos coagulantes para a lesão (CORNELL, 2012).

A agregação plaquetária forma um coágulo que assegura a hemostasia, além de promover um ambiente para a migração celular. As plaquetas ainda liberam potentes quimioatrativos e fatores de crescimento que são necessários em fases mais tardias. O coágulo une as bordas da ferida e promove limitada resistência, além de prover uma barreira imediata à infecção e perda de fluido, como também permite um substrato para organização precoce da lesão. Células da fase inflamatória como plaquetas, mastócitos, macrófagos liberam fatores de crescimento e citocinas que iniciam e mantém a fase proliferativa.

Esta fase de inflamação inicia imediatamente após o trauma e persiste por aproximadamente cinco dias (FAHIE, 2012).

2.2.1.2 Fase de debridamento

A ferida durante a fase inicial de debridamento está constituída por exsudato, células sanguíneas, tecido necrótico e fluídos. As substâncias quimiotáxicas mobilizam os neutrófilos e monócitos para o ferimento, e assim iniciam o debridamento. Neutrófilos degenerados liberam enzimas e produtos que facilitam a lise de bactérias, debris extracelulares e material necrosado. A presença de macrófagos é responsável pela liberação de colágenase removendo tecido necrótico, bactérias e material estranho. Estes também secretam quimiotáticos e fatores de crescimento, o quais podem iniciar, manter e coordenar a formação de tecido de granulação. Durante esta fase, as plaquetas liberam ainda fatores de crescimento importantes para atividade dos fibroblastos (HEDLUND, 2007).

2.2.1.3 Fase de reparação

A fase de reparação inicia aproximadamente quatro a cinco dias após o trauma. As citocinas em conjunto com as moléculas da matriz extracelular estimulam os fibroblastos do tecido circunvizinho a se proliferar e migrar para a ferida. O fator de crescimento derivado das plaquetas e o fator de crescimento de fibroblasto estão envolvidos neste processo de migração celular (CORNELL, 2012).

Associada a migração dos fibroblastos, desenvolve-se o processo de angiogênese. Este é complexo, e dependente da interação da matriz extracelular com as citocinas que estimulam a migração e proliferação de células endoteliais. Os fibroblastos, que invadem a ferida seguidos dos

capilares, sintetizam e depositam colágeno, elastina e proteoglicanos que maturam para formar tecido fibroso (HEDLUND, 2007).

A combinação de novos capilares, fibroblastos e tecido fibroso formam um tecido de granulação de 3 a 5 dias após a lesão ter ocorrido. Este permite que ocorra a epitelização que é aleatória, porém guiada pelas fibras de colágeno (PAVLETIC, 2010).

2.2.1.4 Fase de maturação

A maturação da ferida inicia uma vez que tenha ocorrido o depósito de colágeno na ferida e pode continuar por anos. O acúmulo de colágeno na ferida é o resultado do incremento do número de fibroblastos na ferida e acréscimo da produção individual celular de colágeno. A resistência da matriz progride de 3% do tecido normal para 30% em 21 dias. Três meses após o ferimento, o colágeno foi reabsorvido e rearranjado ao longo das linhas de tensão tecidual, atingindo 80% da resistência original (CORNELL, 2012).

2.3. Plasma rico em plaquetas na reparação cutânea

2.3.1. Plasma rico em plaquetas (PRP)

As plaquetas são conhecidas especialmente devido à sua fundamental importância na hemostasia. Após a sua ativação, liberam substâncias que promovem a reparação tecidual, estimulam angiogênese e regulam a inflamação (ANITUA et al., 2004). Desta forma, as plaquetas atuam na cicatrização de feridas e na neovascularização. Elas liberam diversos fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, promovendo crescimento vascular e proliferação de fibroblastos que, por sua vez, proporcionam aumento na síntese de colágeno. Fatores de crescimento (FCs) são polipeptídios específicos, presentes no plasma e em tecidos, que regulam a diferenciação e a proliferação celulares e, portanto, a regeneração de tecidos (MAX, 2004).

O PRP é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, com a consequente presença de FC liberados por estas plaquetas, além de proteínas osteocondutoras, que também servem de matriz para migração epitelial e formação óssea e de tecido conectivo (CROVETTI et al., 2004).

Entre outras vantagens o preparo do PRP apresenta baixo custo e por se tratar de uma técnica na qual se usa sangue autólogo, a transmissão de doenças infectocontagiosas e reações imunológicas é suprimida (ALIO et al., 2007; NIKOLIDAKIS e JANSEN, 2008).

Preparações contendo plaquetas são usadas para o tratamento de diversas doenças, e o plasma rico em plaquetas (PRP) tem se destacado como adjuvante em cirurgias ortopédicas e de implantes dentários, no tratamento de úlceras de pele, entre outras situações nas quais é altamente desejável a aceleração da epitelização (ALIO et al., 2007).

Os FC liberados pelos grânulos plaquetários atuam na proliferação celular, modificam a resposta inflamatória, tem ação antibacteriana, são quimiotáticos para macrófagos e fibroblastos e promovem a secreção de enzimas proteolíticas que facilitam a reparação e remodelação do tecido (BERNUZZI et al.,2007).

O PRP é considerado um reservatório de fatores de crescimento para a cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e a neovascularização. Os principais fatores de crescimento descritos no PRP são o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (VENDRAMIN et al., 2009).

O PRP apresenta concentração de plaquetas quatro a cinco vezes maior do que os níveis de plaquetas sanguíneas da linha de base periférica. Um coágulo normal em um ferimento ou enxerto apresentaria, em média, 94% de células sanguíneas vermelhas, 6% de plaquetas e menos de 1% de células brancas. Um coágulo de PRP apresentará, em média, 5% de células vermelhas, 95% de plaquetas e 1% de células brancas (VENDRAMIN et al., 2009).

Há vários métodos disponíveis no mercado para obter um concentrado de PRP na prática clínica e há muitos tipos de kits, centrífugas e frascos disponíveis. Os métodos usuais consistem em coletar o sangue do paciente e concentrar as plaquetas por centrifugação. Posteriormente, antes da reinserção no paciente, o PRP é ativado para produzir a degranulação das plaquetas e a formação do coágulo. As substâncias utilizadas na ativação são a trombina bovina (que podem induzir reações imunológicos e deficiências Fator V), trombina recombinante ou cálcio, as quais são opções mais segura (ANITUA et al., 2004).

2.3.2 Aplicações clínicas gerais do PRP

A aplicação de PRP foi amplamente difundida em diversos procedimentos médicos e cirúrgicos (ANITUA et al., 2004), especialmente nas áreas de cirurgia ortopédica (SAVARINO et al., 2006), cirurgia periodontal (PETRUNGARO, 2002; KAWASE et al., 2003; OKUDA et al., 2003), cirurgia maxilo-facial (SLATER et al.,1995; LIND,1996), cirurgia plástica (POWELL et al., 2001; ROZMAN e BOLTA, 2007; CERVELLI e GENTILE, 2009), cirurgia torácica (ENGLERT et al., 2005), cirurgia vascular (KNIGHTON et al., 1988; ROBINSON, 1993; CROVETTI et al., 2005), oftalmologia (DONATTI et al.,

2010), cardiologia, neurocirurgia e enxertos ósseos (ROZMAN e BOLTA, 2007; CERVELLI e GENTILE, 2009).

A evidência clínica sugere que o PRP apresenta efeitos terapêuticos benéficos sobre a cicatrização dos tecidos devido à presença de FC armazenados nas plaquetas. Quando esses fatores são liberados das plaquetas, eles desencadeiam o processo de reparação do tecido. Além disso, o PRP contém outros componentes que também contribuem para a reparação. Um exemplo é o fibrinogênio, que cria a rede de fibrina necessária para o implante celular e posterior multiplicação celular (MUNIRAH et al., 2007; MARTINEZ-ZAPATA et al., 2009).

Estudos realizado por Max (2004), mostraram um aumento na densidade mineral óssea em enxertos associados ao PRP de 1,5 a 2,2 vezes superior aos enxertos com ausência deste componente. O autor descreveu a formação mais rápida e amadurecimento precoce dos enxertos que foram estimulados pelo PRP. Embora o PRP tenha primeiramente sido pesquisado e clinicamente aplicado na cicatrização de enxertos ósseos e regeneração óssea, seus efeitos universais incluem o reparo de tecidos moles.

O uso do PRP tem várias indicações em cirurgias reconstrutivas. Tem se mostrado útil como matriz para reparo de tecido mole, adesivo para partículas de enxerto ósseo e para melhorar a hemostasia cirúrgica. Rosenberg e Torasian (2000) utilizaram o PRP em enxertos sinusais e observaram aumento na velocidade de cicatrização dos pacientes operados, ressaltando que apesar dos resultados favoráveis destes procedimentos, estudos longitudinais deveriam ser efetuados para melhor avaliar a eficácia da técnica.

Bua et al. (2010) utilizaram o PRP em alvéolos dentários pós-extração e realizaram avaliações radiográficas e histológicas. Concluíram que os FC, em

especial os derivados de plaquetas associados à instalação em alvéolos pós-extração ou a enxertos autógenos ou com biomateriais, parecem estimular e diferenciar o processo de formação e indução de um novo tecido ósseo, ótimos resultados quando aplicados corretamente segundo um protocolo pré-estabelecido controlado. No tratamento da periodontite crônica, foi relatada melhora na retração gengival, segundo Martinez-Zapata et al. (2009).

2.3.3 Aplicações clínicas do PRP em feridas cutâneas

Em relação ao emprego de PRP em feridas cutâneas, pacientes humanos com úlceras crônicas tratadas com aplicação semanal de PRP apresentaram maior área de reparação do que as úlceras tratadas com solução salina fisiológica 0,9%, (CROVETTI et al., 2004; ANITUA et al., 2007). Kazakos et al. (2008) confirmaram os efeitos benéficos do PRP no tratamento de úlceras agudas de pele quando comparadas ao tratamento com soro fisiológico. Em contrapartida, segundo Bauer et al. (2009), não houve favorecimento da cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em ratos, após o emprego de PRP. Contudo, segundo estudo de Lee et al. (2008), os quais avaliaram o PRP em feridas de espessura total induzidas em coelhos, verificaram melhora na cicatrização, reduzindo a taxa de contração, com tendência para a aceleração da migração epitelial e resposta angiogênica. Corroborando com este autor, Han et al. (2012) concluíram que o PRP foi benéfico no tratamento de ferida de grande extensão em modelo roedor (*Rattus norvegicus)*.

Nos retalhos de tecidos, Finndikcioglu et al. (2012) compararam o efeito do PRP associado a cola de fibrina na viabilidade de retalhos cutâneos de ratos; e observaram que o PRP reduziu a porcentagem de área necrótica quando comparado aos demais grupos. Em estudo realizado por Jeon et al. (2014), utilizando enxertos condrocutâneos em coelhos, os autores sugerem

que o PRP restabelece a perfusão dos mesmos por meio do aumento da revascularização e pode exercer efeito terapêutico na fase de “pega” do enxerto. Entretanto, na comparação do uso do PRP com cola de fibrina em enxertos cutâneos de cães, verificou-se melhores resultados utilizando a cola de fibrina (HERMETO et al., 2012).

Em uma revisão sistemática realizada por Martinez-Zapata et al (2009), na qual foram avaliados os principais estudos clínicos envolvendo PRP em diversas áreas, os autores concluíram que o PRP no tratamento de úlceras de pele promoveu aumento na porcentagem de recuperação total, mas não de forma significativa. Contudo, os autores ressaltam a necessidade de mais ensaios clínicos randomizados para determinar o papel do PRP para a reparação de tecidos.

2.3.3 Aplicações clínicas do PRP em enxertos

Os enxertos de pele foram introduzidos como uma opção de reconstrução tecidual, no século XIX. Embora tenham se desenvolvido como um procedimento padrão para recobrimento de defeitos na pele, sua fisiologia e os mecanismos de reparação após a enxertia ainda não são totalmente compreendidos (ZUHAILI et al., 2010).

Na Medicina Veterinária, a utilização dos enxertos cutâneos é indicada principalmente quando há a perda de grandes áreas de pele após traumas, queimaduras ou excisão de neoplasias. Ainda há benefícios no seu uso em lesões em extremidades, nestas a ausência de pele disponível impede a mobilização local da mesma. A grande maioria dos enxertos empregados na medicina veterinária é de origem autóloga (SWAIM, 2003; FOWLER, 2006). O uso de enxertos homólogos (mesma espécie, porém de diferentes individuos) tem sido descritos e usados para fins específicos na reconstrução de feridas

cutâneas, no entanto tem um papel pequeno no manejo rotineiro de feridas em pequenos animais (FOWLER, 2006)

A cicatrização da ferida após a enxertia de pele se processa por dois eventos característicos e sequenciais: aderência e nutrição. As características clínicas da integração dos enxertos autólogos são adesão, perfusão e viabilidade do segmento de pele transferido, o que depende obrigatoriamente de sua vascularização. Nas primeiras 24 horas após a enxertia, o plasma que transuda da área receptora é absorvido pelo enxerto formando uma malha de fibrina que serve para sua fixação e nutrição (fase de embebição plasmática) (WHITE, 1999).

Assim o enxerto bem sucedido depende da formação de uma conexão vascular, que deve ocorrer no sétimo ou oitavo dia de pós-operatório, caso contrário o mesmo irá necrosar (HEDLUND, 2007). Maior integração vascular foi comprovada em trabalhos realizados por Findikcioglu et al. (2012) estes observaram aumento do número de arteríolas nos grupos tratados com PRP, quando aplicado no período intra-operatório, bem como maior sobrevida do retalho. Imediatamente após sua transferência, o enxerto é nutrido por um processo conhecido como embebição plasmática. Fluido semelhante ao plasma que desloca-se entre o leito receptor e o enxerto, provendo nutrientes para as células do enxerto. Após cerca de três a cinco dias inicia-se a revascularização. Novos brotos capilares invadem a derme diretamente ou pela formação de anastomoses entre os capilares do enxerto, sendo este processo conhecido como inosculação (FOWLER, 2006). Foram identificados pelo menos sete fatores de crescimento diferentes que são secretados ativamente pelas plaquetas na fase inicial da cicatrização (VENDRAMIN et al., 2006). Desta forma, o PRP suprime a liberação de citocinas e modula a inflamação

por interagir com os macrófagos, o que irá melhorar a cicatrização e regeneração tecidual (MISHRA et al., 2009) por promover a neovascularização (MCALER et al., 2006).

Segundo Vendramin et al. (2010), a utilização do PRP, na forma líquida ou gel em enxertias cutâneas, promoveu aumento na resposta inflamatória e na intensidade de depósito de colágeno, com aumento do número de fibroblastos, permitindo melhor cicatrização do enxerto. Assim o plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido amplamente estudado para melhorar a integração de enxertos cutâneos (HERMETO el al., 2012; JEON et al,. 2014).

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, clínica e histologicamente, os efeitos do uso do PRP na viabilidade de enxertos cutâneos autólogos e homólogos de espessura total em coelhos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.Grupos experimentais e ambiente de experimentação

Os procedimentos experimentais desenvolvidos no presente estudo estão de acordo com os Princípios éticos na experimentação animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (protocolo nº 192/2011) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Estadual Paulista-Campus de Botucatu (FMVZ- Unesp- Botucatu).

Foram utilizados nove coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Albino, fêmeas, com idade variando entre 300 e 400 dias e peso entre 3,0 e 4,0 Kg. Os animais foram previamente examinados clinicamente para confirmar as condições de saúde e a ausência de lesões cutâneas. Todos os animais do experimento foram acondicionados em gaiolas metálicas individuais, com alimentação de ração industrial, balanceada e peletizada[1], e água *ad libitum*. O ambiente de experimentação permaneceu iluminado com luz artificial por 12 horas contínuas diárias. Os coelhos foram fornecidos pelo biotério central da UEM (Universidade estadual de Maringá), Fazenda Experimental Iguatemi BR 376, Distrito Iguatemi-PR.

4.2.Preparação do plasma rico em plaquetas

Para a obtenção do PRP foram coletados 10 ml de sangue arterial de cada coelho, através da canulação da artéria central da orelha com cateter 20G. Em seguida, a volemia foi reposta com 20 ml de solução cristaloide de Ringer lactato. Desta forma, o sangue foi coletado de maneira asséptica e distribuído em dois frascos estéreis a vácuo contendo citrato de sódio 3,2%, com cada um contendo 4,5 ml de sangue total. Cerca de 1ml do sangue foi separada para a contagem de plaquetas, e os 9 ml restantes foram

[1] Presence Coelhos, Purina. Descalvado/SP

homogeneizados, protegidos da luminosidade durante 30 minutos, de modo a minimizar a agregação plaquetária, para posterior centrifugação. A preparação do plasma rico em plaquetas foi feita seguindo rigorosa condição de esterilidade, utilizando material estéril e descartável e sendo realizada dentro de capela de fluxo laminar.

A primeira etapa da centrifugação foi feita a 200G, durante 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 22ºC (Modelo: Hermle Z326K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Os 50% da fase superior do plasma sobrenadante foram descartados e os outros 50%, colocados em um outro tubo para nova centrifugação. A segunda etapa foi responsável pela separação do PRP. Nesta etapa, os tubos de ensaio contendo aproximadamente 3 ml cada foram centrifugados, a 400G por 10 minutos. Após esta centrifugação foram descartados 2/3 do sobrenadante, como plasma pobre em plaquetas (PPP) e o 1/3 restante foi homogeneizado para constituir o PRP (FIGURA 1). Seguindo o protocolo descrito por Vendramin et al. (2010)

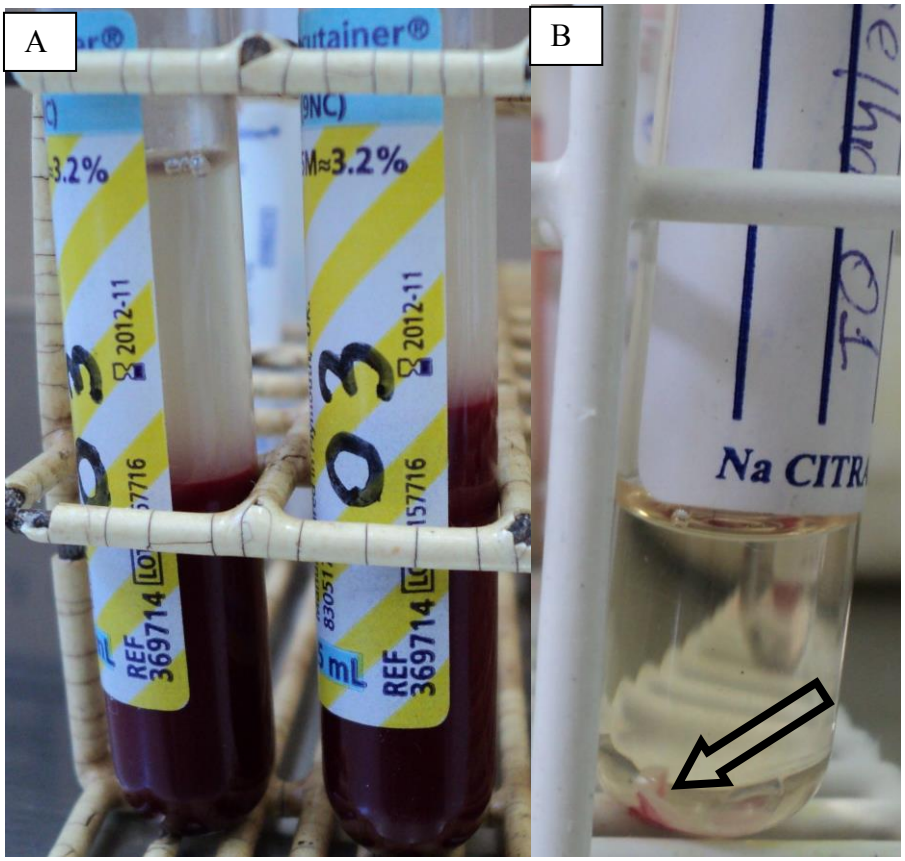


FIGURA 1.Imagem fotográfica do resultado das etapas da centrifugação do sangue dos coelhos A: Primeira etapa de centrifugação a (200G/10min.). Observar separação do plasma e das células vermelhas; B: Segunda etapa de centrifugação (400G/10min.), notar a formação do botão plaquetário (seta).

Para a verificação do incremento plaquetário foi utilizado o método de contagem plaquetaria do PRP em câmara de Newbauer, na diluição 1:100, sendo 20 microlitros do PRP em 2 ml de solução de Brecher (oxalato de amônia 1%), resultando no número de plaquetas por microlitro.

4.3. Grupos de tratamento

Foram constituídos quatro grupos experimentais (n=9), designados como: G1: o enxerto autólogo tratado com o PRP; G2: enxerto autólogo; G3: enxerto homólogo tratado com PRP e G4: enxerto homólogo. Deste modo, cada coelho foi submetido ao tratamento com PRP e seu controle (FIGURA 2) dos enxertos autólogos (lado direito) e homólogos (esquerdo), totalizando 36 amostras.

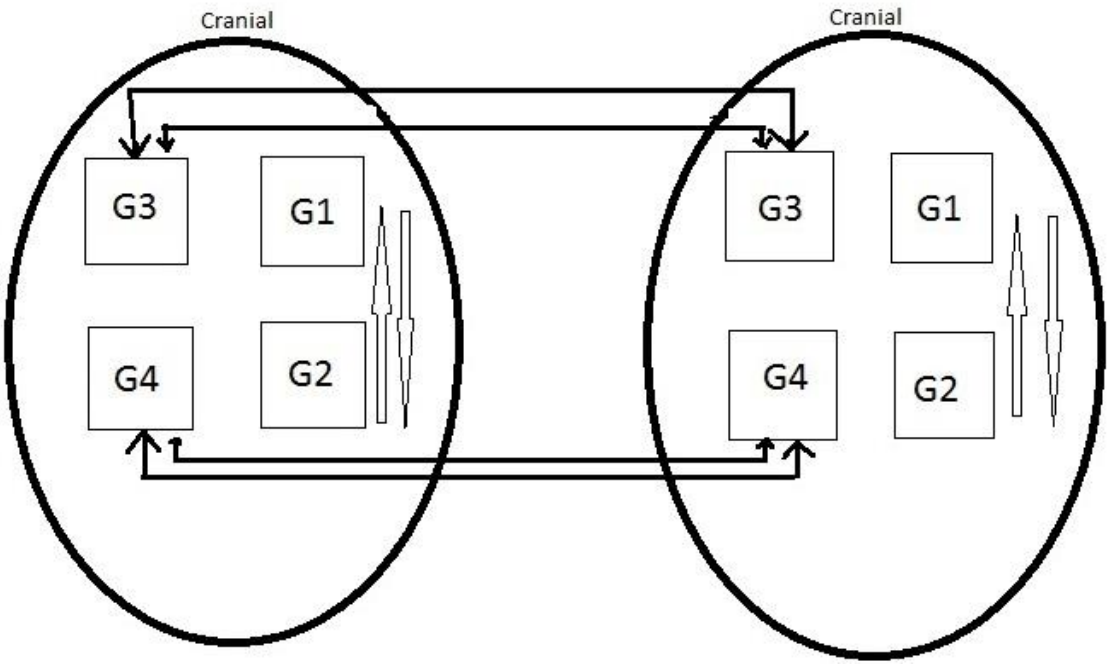


FIGURA 2. Representação esquemática da formação dos grupos experimentais, em dois animais. G1: enxerto autólogo tratado com PRP, G2: enxerto autólogo, G3: enxerto homólogo tratado com PRP, G4: enxerto homólogo.

4.4 Preparação pré-cirúrgica e protocolo anestésico

Para a realização dos procedimentos, os animais foram preparados aos pares. Todos os coelhos foram pré-anestesiados com acepromazina[2] (0,5 mg/kg/IM) e morfina[3] (0,5 mg/kg/IM), seguido de anestesia dissociativa com 25mg/kg de quetamina[4] e 2,5 mg/kg de xilazina[5], ambos por via intramuscular (IM). Como analgésico transoperatório, administrou-se lidocaína, quetamina e morfina; na taxa de infusão de 50 mcg/kg/min, 5 mg/kg/h, e 0,1 mg/kg/h, respectivamente. Posteriormente, realizou-se a tricotomia na região dorsal dos coelhos, iniciando na região escapular até a área íliaca, e antissepsia com solução de clorexidine 0,5%. Utilizou-se de um gabarito (2X2cm) e um marcador estéril para a delimitação do defeito a ser criado (FIGURA 3, A e B).

[2] Acepran® 0,2% - Syntec
[3] Dimorf® - Cristália
[4] Ketamin - S(+) 50mg/ml solução injetável – Cristália.
[5] Virbaxyl 2% - Virbac

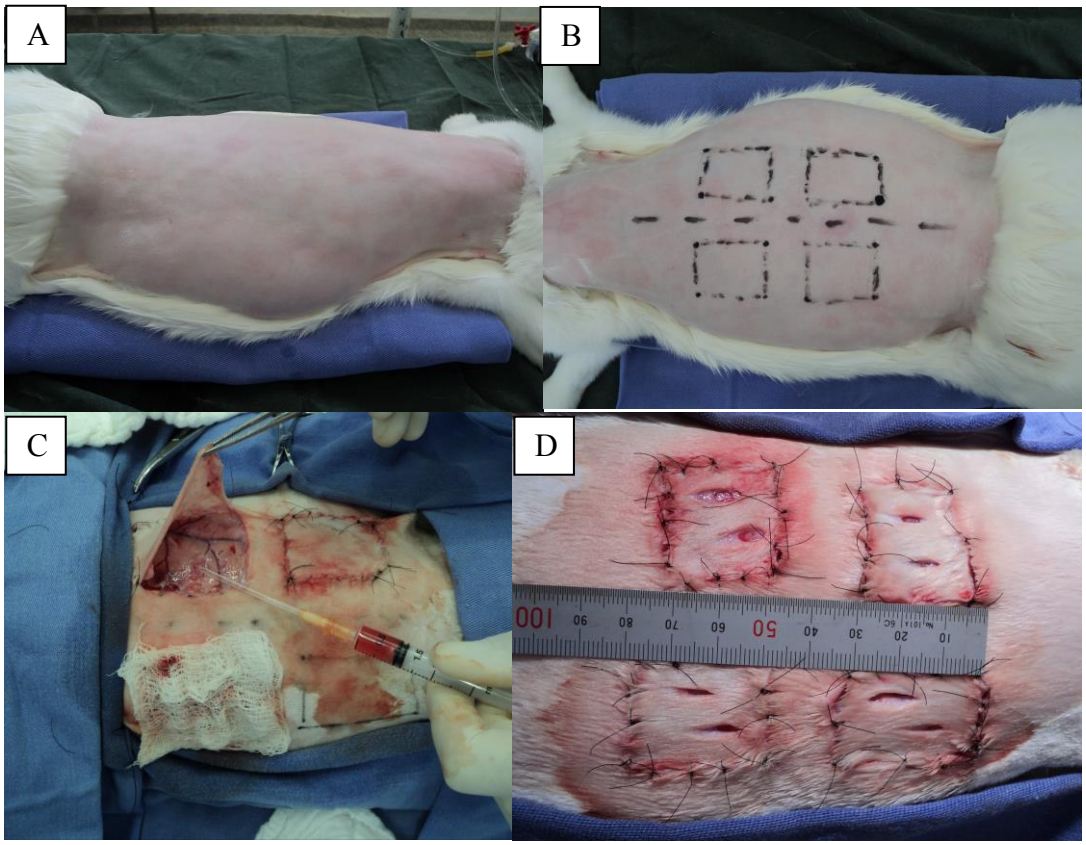


FIGURA 3. Imagens fotográficas, A: tricotomia e antissepsia da superfície cutânea. B: demarcação dos enxertos dos coelhos. C: aplicação do PRP, após colocação dos campos. D: aspecto final imediato da colocação dos quatro enxertos.

4.5. Procedimento cirúrgico

Após a preparação da superficie cutânea, foram confeccionados inicialmente dois quadrados de 2x2 cm de pele de espessura total na região dorsal do lado direito de cada animal seguindo prévia marcação, com 1.5 cm de distancia entre os defeitos. Para isso utilizou-se bisturi com lamina n.15, que permitu a delimitação do enxerto, seguida da divulsão cuidadosa, empregando-se tesoura de Metzenbaum e preservando o músculo cutâneo do tronco. Em todos os enxertos a camada de gordura subcutanea foi removida com auxilio de uma tesoura. E em seguida estes foram trocados de posição para a formação de dois enxertos autólogos, assim o cranial foi tratado com 0,5ml de PRP e o caudal com 0,5ml de solução de ringer. Em ambos os enxertos foram

feitos duas incisões longitudinais de 4 mm de comprimento e estes foram fixados com pontos isolados simples. Em seguida, foram preparados dois enxertos do lado esquerdo da linha media dorsal seguindo o protocolo anteriormente descrito, porém os fragmentos de pele coletados foram trocados entre os coelhos formando, em cada um, dois enxertos homólogos. Assim, o cranial foi tratado com 0,5ml de PRP e o caudal com 0,5ml de solução de Ringer. (FIGURA 3, C e D). Para a realização desta etapa foram sempre preparados dois colehos e operados por dois cirurgiões simultaneamente.

Toda a area dos enxertos foi revestidos com bandagem oclusiva de *rayon* (Curatec AGE 30 *Rayon*) fixada a pele com pontos isolados cobertos com uma camada absolvente de compressa e enfaixados com atadura de crepe por 96 horas (FIGURA 4). Para a identificação dos os coelhos, estes foram numerados com caneta dermatológica na face interna da orelha com números correspondente de 1 a 9.

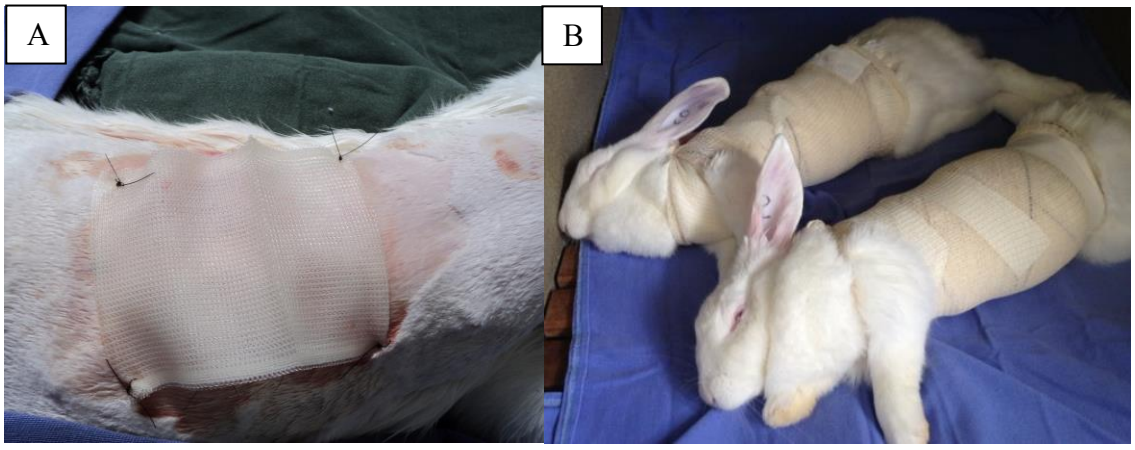


FIGURA 4. Imagem fotográfica do pós-operatório dos coelhos. A: Observar a aplicação e fixação da bandagem rayon. B, Aspecto final da bandagem.

Todos os animais receberam antibioticoterapia (penicilina G, na dose única de 40000 UI/Kg) pela via intramuscular, e para a analgesia dos mesmos

utilizou-se de cloridrato de tramadol (2 mg/kg/IM), imediatamente após a cirurgia e meloxicam (0,2mg/kg/SC),a cada 24 horas, por três dias.

4.6. Avaliação dos animais

O acompanhamento clínico geral dos animais foi realizado diariamente, e a avaliação macroscópica dos enxertos de pele nos dias 5, 12 e 19 após o procedimento cirúrgico. O primeiro curativo foi realizado no quinto dia pós-operatório e, após este período, em dias alternados, utilizando-se solução fisiológica esteril e gaze para limpeza, e *rayon* associado a atadura de crepe fixada com esparadrapo para a proteção.

Todas a etapas foram documentadas por fotografia. No 19º dia do pós-operatório os animais foram eutanasiados, após anestesia com acepromazina[6] (1,5mg/Kg/IM) e quetamina[7] (20 mg/Kg/IM), seguida pela administração intravenosa de tiopental (25 mg/kg) e de cloreto de potássio 19,1% (2 ml/Kg). Em seguida, foram coletados da área central, um fragmento de cada enxerto com auxílio de um punch (0.8 cm). Esses foram fixados em solução de formalina 10% por 48 horas, para posterior avaliação histológica do processo de reparação.

4.7. Avaliação clínica e macroscopica

A avaliação das imagens fotográficas dos enxertos foi realizada sempre pelo mesmo examinador. Esse não teve conhecimento da identificação das amostras e foi submetido a um período de padronização para esta avaliação. Desta forma, a evolução clínico-macroscópica dos enxertos foi estudada, e os sinais relacionados à presença de secreção, coloração e a aspecto cosmético foram qualiquantificados utilizando-se escores. A secreção foi quantificada

[6] Acepran 0,2% - Univet – São Paulo – SP.
[7] Ketamin - S(+) 50mg/ml solução injetável – Cristália.

como: ausente (0); leve (1); moderado (2); grave (3), a coloração foi qualificada em: rósea (1); roxa (2) e preta (3), conforme Vendramin et al. (2010). Para a aparência cosmética estabeleceu-se os escores: excelente (1), quando toda a área do enxerto estava preenchida por pele saudável; boa (2), quando até 20% do enxerto apresentava formação de crostas; razoável (3), quando o enxerto apresentava subsituição de 20% a 80% do enxerto por crostas e pobre (4), quando mais que 80% do enxerto foi substituido por crostas.

4.8. Avaliação histopatológica

Após a fixação dos fragmentos de pele em solução de formalina tamponada a 10%, os mesmos foram processados rotineiramente, incluídos em parafina, submetidos a cortes de 5 µm de espessura e corados pela técnica de Hematoxilina-eosina. Os cortes foram analisados por patologista veterinário no laboratório de histopatologia do Hospital Veterinário da UNOPAR (Unidade de Arapongas – PR), em microscopia óptica de luz.

Os métodos aplicados para análise dos resultados foram realizados por um único avaliador que não teve conhecimento da identificação das amostras e que foi submetido a um período de padronização, sendo que a mesma metodologia aplicada nesta pesquisa foi realizada em outro trabalho (VEMDRAMIN et al 2010).

As variáveis tiveram suas mensurações fundamentadas nos estudos realizados por Vendramin et al. (2010) e Hermeto et al. (2012), que realizaram trabalhos semelhantes em coelhos e em cães, respectivamente. Assim foi possível identifica e avaliar as seguintes variáveis:

- intensidade de fibras colágenas: utilizando-se os escores: discreta (0), moderada (1) e acentuada (2);

- intensidade da vasodilatação: discreta (0) quando o vaso tinha menos de 33% de preenchimento por hemácias, moderada (1) quando o preenchimento correspondia de 33-66% e acentuada (2) quando mais de 66% do vaso estavam preenchidos por hemácias;

- número de fibroblastos por campo (objetiva de 100x) foram contados três campos por lâmina, sendo a média deste, considerado o valor final;

- número de macrófagos por campo (objetiva de 100x) foram contados três campos por lâmina, sendo a média deste, considerado o valor final;

- Na integridade tecidual, foram avaliados as amostras observando-se a ausência ou presença de alterações teciduais, associadas á presença de necrose e hemorragia.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre os diferentes grupos analisados, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para as variáveis fibras colágenas e vasodilação, seguida pelo Teste de Dunn. Para a avaliação do número de fibroblastos e macrófagos foi aplicado ANOVA e comparação múltipla pelo teste de Tukey (MOTULAKY, 2007). As variáveis Macrófago x Fibroblasto foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson, enquanto nas outras variáveis foi realizado o teste de correlação de Spearman.

Os escores das variáveis clínica macroscópica foram analisados pelo teste exato de Fisher, com nível mínimo de significância de 0,05% (ZAR, 2010).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Animais e Plasma rico em plaquetas

O uso do coelho em experimento apresentou a vantagem como modelo experimental para estudos do PRP por possibilitar a coleta de um volume de sangue suficiente para o preparo de um PRP autólogo, sem prejuízo no estado geral sistêmico (EFEOGLU et al., 2004). Estas propriedades justificam a escolha desta espécie para este estudo, pois assim foi possível usar um número reduzido de animais e aplicar controladamente todos os tratamentos. Entre outras vantagens apresentadas pelo coelho como modelo experimental, destacam-se também o baixo custo e a facilidade de obtenção, manuseio e manutenção (EFEOGLU et al., 2004).

Os valores obtidos após a contagem de plaquetas no sangue total e no PRP estão apresentados na Tabela 1. Com o protocolo adotado, observou-se incremento plaquetário mínimo de quatro vezes nos nove animais do experimento, segundo o recomendado por Max (2004).

TABELA 1: Valores da contagem plaquetária no sangue total e no PRP, bem como o incremento plaquetário obtido nos diferentes animais.

Número do animal	**sangue total** (plaquetas/µl)	**PRP** (plaquetas/µl)	**Incremento plaquetário**
1	290690	1208900	4,1
2	280000	1272000	4,4
3	290000	1189000	4,1
4	330700	1551200	4,6
5	370600	1778800	4,7
6	280700	1140210	4,1
7	440755	2247850	5,0
8	357950	1610770	4,5
9	400930	1603800	4,0
Média			4,4

No projeto piloto de PRP realizado, o acréscimo no tempo da segunda centrifugação de 10 para 15 minutos promoveu aumento não significativo ($p>0,05$) na concentração plaquetária (de 438% para 397%), por isso adotou-

se o protocolo com 10 minutos; corroborando ao descrito por Vendramin et al. (2009), de que o tempo de preparo do PRP deve ser o menor possível, e o seu preparo realizado imediatamente antes da cirurgia, ou até mesmo no transoperatório inicial.

Corroborando aos achados de Vendramin et al. (2010), que empregaram preparados distintos de PRP em enxertos cutâneos em coelhos, quando da sua utilização na forma líquida; esta mostrou-se fácil e rápida, não necessitou da trombina usada no preparado da forma em gel. Sua aplicação na forma líquida, depositada sob a ferida foi simples e permitiu distribuição uniforme, mesmo com volume reduzido. Os mesmos autores citaram ainda que na comparação entre as formas de PRP líquido ou gel, as maiores perdas ocorrem na forma de gel, pois este acumula nas áreas de relevo mais baixo, interferindo em sua distribuição; bem como em decorrência do gel, alocado na interface entre o leito da ferida e o enxerto de pele separando os mesmos, os autores verificaram resultado menos satisfatórios, sendo que 28,6% dos casos ocorreu perda do enxerto (VENDRAMIN et al., 2010). Baseado nestas observações, optou-se pela utilização do PRP na forma líquida não ativada, com a expectativa que o tecido traumatizado tenha capacidade de ativar de maneira satisfatória o PRP utilizado.

6.2. Avaliação macroscópica

6.2.1. Secreção

Os principais fatores associados a falha do enxerto são a sua separação do leito receptor, presença de infecção e movimentação do mesmo. Esta rompe as conexões de fibrina que aderem o enxerto ao seu leito, impedindo assim a revascularização e nutrição (BOHLING e SWAIM, 2012). Objetivando a redução destes fatores, optou-se pelo uso de antibióticos sistêmicos e

bandagem compressiva não aderente durante os cinco primeiros dias, sendo então iniciada a avaliação macroscópica. Os valores referentes a evolução da secreção, nos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2–Valores médios e desvio padrão dos escores de avaliação quanto à presença de secreção, nos diferentes tratamentos e momentos de avaliação pós-operatória.

Secreção	Dia 5	Dia 12	Dia 19
G1	0,11±0,33	0,00±0,00	0,00±0,00
G2	0,11±0,33	0,11±0,33	0,00±0,00
G3	0,44±0,73	0,11±0,33	0,00±0,00
G4	0,44±0,73	0,11±0,33	0,11±0,33
Geral	0,28±0,57	0,08±0,28	0,03±0,17

Grupos de enxertos: G1: autólogo tratado com PRP, G2: autólogo; G3: homologo tratado com PRP; G4: homólogo. Escores: ausente (0), leve, (1) moderado (2); grave (3); p≥0,05.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos instituídos e momentos de avaliação, para a variável secreção. Estes achados diferem dos relatados por Hermeto et al. (2012), que compararam cola de fibrina com o PRP em enxertos autólogos de cães; neste o grupo com PRP apresentou menor quantidade de secreção. A secreção observada nos coelhos foi sempre do tipo serosa, sem presença de aspecto purulento ou sanguinolento.

6.2.2. Coloração

Em relação à variável coloração observada nos dias 5, 12 e 19, ressalta-se predominância da coloração rósea no momento 5 para o grupo G1 ($p<0,05$), em relação aos demais grupos (Tabela 3). A coloração rósea está associada a uma adequada revascularização (WHITE, 1999; FOWLER, 2006; BOHLING e SWAIM, 2012), e foi observada na fase inicial do enxerto, inferindo que o tratamento do enxerto autólogo com o PRP promoveu influência positiva na fase de “pega” do enxerto. O G1 permaneceu com este padrão de coloração nas diferentes fases (momentos) da revascularização do enxerto, ao contrário dos outros grupos. Essa diferença significativa não se repetiu nas avaliações

subsequentes entre os grupos tratados ou não com PRP, mas foi evidente quando considerado o tipo de enxerto empregado.

TABELA 3–Valores médios e desvio padrão dos escores de avaliação quanto a coloração, nos diferentes tratamentos e momentos de avaliação pós-operatória.

Coloração	Dia 5	Dia 12	Dia 19
G1	1,00±0,00*	1,11±0,33*	1,22±0,67*
G2	1,33±0,50	1,44±0,88*	1,22±0,67*
G3	1,33±0,50	2,11±0,60	2,67±0,50
G4	1,89±0,33	2,67±0,50	2,89±0,33
Geral	1,39±0,49	1,83±0,85	2,00±0,96

Grupos de enxertos: G1: autólogo tratado com PRP, G2: autólogo não tratado com PRP; G3: homologo tratado com PRP; G4: homólogo não tratado com PRP. Escores: rósea (1); roxa (2) e preta (3). *comparação entre grupos, fixado o momento de avaliação p≤0,05.

No gráfico da Figura 5 e 6, verificada a distribuição de frequência da coloração, nos momentos 5 e 19 dias, respectivamente. Assim houve diferença estatística nos momentos de avaliação 12 e 19, considerando enxertos autólogos e homólogos, com as melhores colorações verificadas na primeira modalidade.

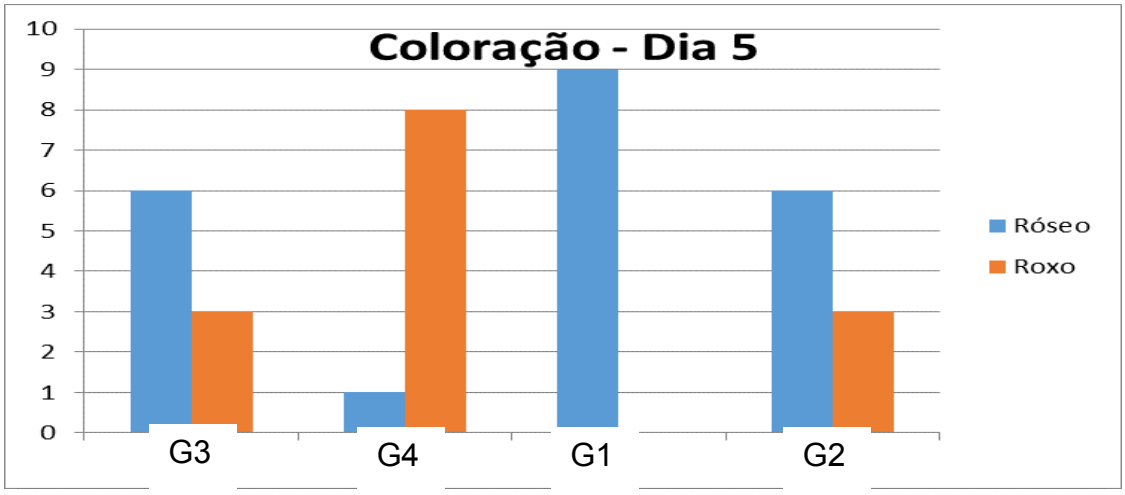


FIGURA 5. Frequência absoluta dos escores de coloração nos diferentes tratamentos, no 5 de pós-operatório

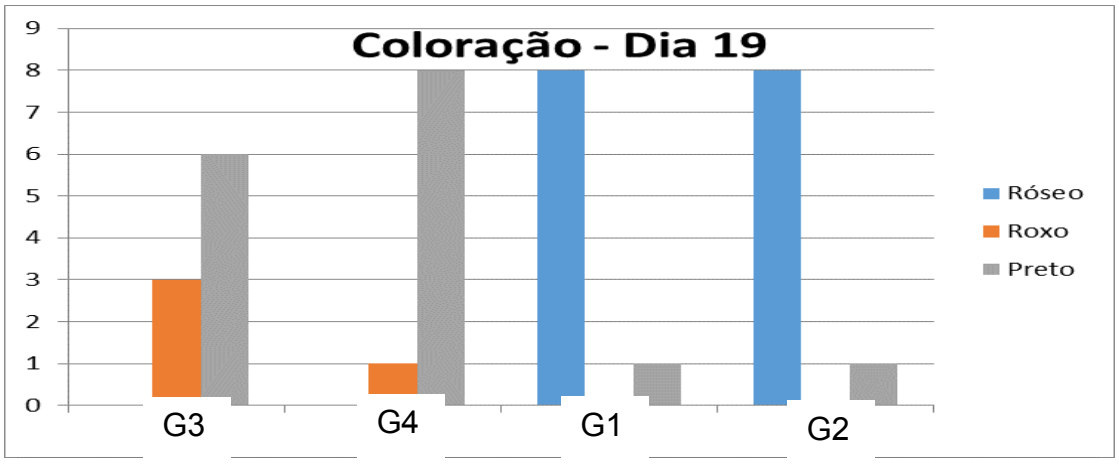


Figura 6. Frequência absoluta dos escores de coloração nos diferentes tratamentos, no 19 dia de pós-operatório.

O enxerto coletado iniciará imediatamente após ser destacado do seu leito um processo de degradação tecidual, e a regeneração não tem início até o momento em que este receba nutrientes do seu leito (BOHLING e SWAIM, 2012). Considerando os achados referentes a coloração, importante característica utilizada na avaliação clínica dos enxertos, pode-se assinalar que nos enxertos homólogos não estabeleceram as conexões necessárias para impedir a degradação tecidual, que foi evidenciada pelo escurecimento despontando (Figura 6), assim, a necrose do tecido nos grupos G3 e G4, nos dias 12 e 19 da avaliação ($p<0,05$). Salienta-se, entretanto que os enxertos homólogos, em geral, são rejeitados pelo organismo do receptor, mas podem ser empregados para cobrir e proteger temporariamente grandes áreas queimadas ou sem revestimento (HEDLUND, 2007: PAVLETIC, 2010), podendo ser aplicados sem intervenção cirúrgica em outras partes do organismo e favoravelmente estarão prontamente disponíveis caso tenha-se um banco de tecidos. No momento 5, o enxerto homólogo tratado com o PRP apresentou numericamente um comportamento mais favorável em relação ao homólogo não tratado com o PRP porém sem diferença significativa (Tabela 3),

sugerindo que talvez possa ter tido alguma influência na reparação tecidual. Assim o uso de um número maior de amostras poderia confirmar estatisticamente este resultado.

6.2.3. Variável aspecto cosmético

Durante o período de pega do enxerto, o mesmo passa por mudanças variadas de aparência cosmética que podem ser difíceis de interpretar (WHITE, 1999). Os achados referentes ao aspecto cosmético estão descritos na Tabela 4.

TABELA 4: Valores médios e desvios padrões dos escores de avaliação quanto a aspecto cosmética, nos diferentes tratamentos e momentos de avaliação pós-operatória

Aparência	Dia 5	Dia 12	Dia 19
G1	1,67±0,71	1,56±0,73*	1,33±0,71*
G2	1,78±0,67	1,89±1,05*	1,44±1,01*
G3	2,00±0,71	2,89±0,78	3,33±0,71
G4	2,11±0,60	3,22±0,83	3,67±0,50

Grupos de enxertos: G1: autólogo tratado com PRP, G2: autólogo não tratado com PRP; G3: homólogo tratado com PRP; G4: homólogo não tratado com PRP; Escores: excelente (1); boa (2) razoável (3) e pobre (4). p≥0,05.

Quando se observa os valores entre os grupos tratados ou não com PRP, não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos momentos de avaliação (dia 5, 12 ou 19). Entretanto, considerando-se o tipo de enxerto empregado (autólogo ou homólogo), a variável aparência repete os resultados já mencionados na variável coloração. Portanto, o enxerto autólogo foi o que apresentou superioridade da variável aspecto cosmético, quando comparado ao enxerto homólogo de pele.

6.3. Avaliação histológica

A avaliação histomorfométrica relacionada a contagem de fibroblastos e macrófagos por campo está apresentada na Figura 7. Não houve diferença entre os grupos tratados ou não com PRP considerando o tipo de enxerto,

entretanto, o número de macrófagos foi inferior nos autólogos quando comparado aos homólogos.

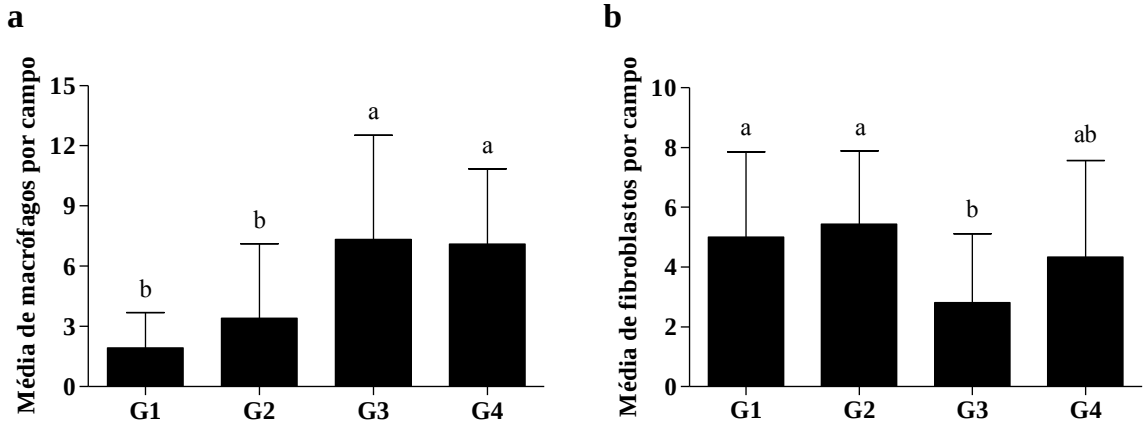


Figura 7. Valor médio e desvio padrão da quantidade de fibroblastos (a) e macrófagos (b), no 19º de pós-operatório, nos diferentes tratamentos, sendo: G1 enxerto autólogo com PRP, G2 enxerto autólogo, G3 enxerto homólogo com PRP e G4 enxerto homólogo. Letras diferentes sobre as colunas indicam significância estatística (p≤0,05), pelo teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

Considerando a análise histológica das fibras colágenas (Tabela 5), houve diferença estatística (p=0,0078) entre os grupos G1 e G2 quanto a intensidade fibras colágenas, sendo que o G2 (moderada) demonstrou maior colagenização do que o G1 (leve); o G2 foi similar aos demais grupos experimentais (G3 e G4).

Quanto a vasodilatação (diâmetro geral dos vasos), a diferença significativa observada entre os grupos experimentais foi a presença de dilatação moderada no G2 comparando-se a leve no G1 (p=0,0293), conforme Tabela 5. Quando analisada a integridade tecidual, foi observado diferença (p=0,0003) apenas entre os grupos autólogos e homólogos, independentes do tratamento como o PRP; nos homólogos foram visibilizadas maiores número de região com necrose e hemorragia.

A cicatrização visa restabelecer a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado com os fenômenos celulares, vasculares e moleculares interagindo de forma coordenada para a reconstituição tecidual (MARTIN e LEIBOVICH, 2005; RAITZ, 2008). Kumar et al. (2010) classificam o processo cicatricial em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação. O PRP suprime a liberação de citocinas e limita a inflamação por interagir com os macrófagos, o que irá melhorar a cicatrização e regeneração tecidual (MISHRA et al., 2009) por promover a neovascularização (MCALER et al, 2006) e, desta forma, nutrem e oxigenam o tecido em crescimento, sintetizando PDGF, TGFβ e TGF que atuarão em eventos subsequentes da cicatrização (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2011).

Na resposta inflamatória ocorrem diferentes fenômenos entre eles a vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia. Nas primeiras 24–48 horas após a lesão chegam os neutrófilos, sendo posteriormente substituídos pelos macrófagos que migram para a ferida após 48–96 horas do evento inicial. Estes macrófagos auxiliam a angiogênese, a fibroplasia assim como a síntese da matriz extracelular o que dará início a fase proliferativa (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). O número de fibroblastos e macrófagos dos diferentes enxertos realizados estão apresentados na Figura 4. Nota-se que houve maior número de macrófagos no G3 e G4 quando comparados com G1 e G2 ($p < 0,01$). Misha et al. (2009) e Roman e Boltd (2007) escrevem que o PRP inibe o processo inflamatório por suprimir a citocinas, neste estudo a atuação do tratamento nos macrófagos não pode ser verificado, provavelmente devido ao fato do mesmo ter sido estudado histologicamente no período de 19 dias. Krana et al. (2007) relataram efeito positivo do gel de plaquetas nos fibroblastos, sobre o crescimento de

fibroblastos dérmicos humanos *in vitro,* durante 5 dias. A ativação das plaquetas e o controle *in vitro* do experimento possivelmente tenham contribuídos para os resultados positivos apresentados. Os mesmos achados não foram encontrados quando utilizou-se o PRP não ativado em enxertos autólogos e homólogos. Ressalta-se que no presente estudo, a análise foi efetuada aos 19 dias do pós-operatório, considerando que pico do processo de reparação é descrito como 5 dias após o trauma (HOSGOOD, 2006).

Na pesquisa de Bauer et al. (2009), a análise histomorfométrica realizada não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle em relação à celularidade, espaço em branco e matriz colagênica nos quatro períodos de observação. Os resultados desta pesquisa sugeriram que embora não ofereçam efeitos tóxicos ou prejudicial sobre os tecidos moles, o PRP não favorece a reparação de feridas dérmicas, em ratos. No entanto Donatti et al. (2013) realizaram o tratamento, com colírio de PRP, de úlceras corneais profundas em coelhos, e observaram maior epitelização no período inicial (dias) da reparação, além da aceleração da cicatrização ao término do tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Vendramin et al. (2010) na enxertia cutânea de coelhos, ou seja, aumento da resposta inflamatória e da intensidade de colagenização com aumento do número de macrófagos e fibroblastos no local enxertado. Neste estudo o aumento da intensidade de colagenização no grupos tratados com PRP não foi observado aos 19 dias do pós-operatório, e o diâmetro dos vasos no enxertos autólogos sem tratamentos foram moderados em comparação a leve no grupo tratados com PRP. Por outro lado, Broughton et al. (2006) descreveram o papel fundamental dos macrófagos no debridamento tecidual, corroborando aos achados em G3 e G4 pois os mesmos tratam-se de enxertos homólogos e,

consequentemente, atuariam como curativos biológicos temporários (HEDLUND, 2007), e teriam maiores índices de necrose tecidual observadas histologicamente e maior número destas células.

Em um estudo de enxertos homólogos em cães, observou-se sinal de rejeição inicial do transplante no dia 12. Esta progrediu para a trombose e perda do enxerto nos dias 15 a 30 (MATHES et al., 2010). Essa também foi notada na avaliação histológica de biópsias da pele nos coelhos, aos 19 dias do pós-operatório, corroborando aos achados histopatologia de rejeição celular, evidenciado pela infiltração linfocítica e necrose descritos por Mathes et al. (2010). Achados clínicos e histológicos semelhantes foram encontrados nas amostras coletadas dos enxertos homólogos tratados ou não com PRP.

No entanto, em pacientes humanos a sobrevivência desses transplantes depende de imunossupressão crônica. Mesmo com a utilização desta, todos os pacientes experimentam episódios de rejeição da pele que necessita de terapia adicional e muitas vezes o aumento dos níveis de imunossupressão (LANZETTA et al, 2007). No atual estudo, não foi realizado nenhum grau de imunossupressão, o que explica facilmente os resultados negativos sobre os enxertos homólogos, os quais atuaram apenas como curativos biológicos temporários. No entanto, considerando os macrófagos e fibroblastos e momento de avaliação, o PRP também não proporcionou resultado favorável positivo quando comparado ao homólogo sem tratamento.

Durante a fase proliferativa (granulação) há aumento de fibroblastos e células endoteliais preenchendo a solução de continuidade da ferida, produzindo a matriz extracelular e a angiogênese (SINGER e CLARK, 1999). Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e tem a função primordial da manutenção do tecido conjuntivo, por meio da síntese de

componentes da matriz extracelular. Fibrócitos são fibroblastos inativos e podem ser recrutados do tecido adjacente, sendo reativado para o estado de fibroblastos com a capacidade da síntese da matriz extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2011).

No experimento realizado ressalta-se maior número de fibroblastos nos grupos G1 e G2 em comparação ao G3 (p=0,04), entretanto sem diferença significativa quando comparados os grupos autólogos tratados ou não. Vendramin et al. (2010) descreveram que o PRP aumenta a proliferação de fibroblastos, diferente do observado neste estudo. A diferença dos grupos autólogos frente ao G3, pode estar associada a presença da necrose tecidual (Tabela 6), sendo que dos nove tecidos analisados, sete apresentaram necrose com ou sem hemorragia.

Segundo Tonnessen et al. (2000), com a evolução do tempo há transformação da matriz extracelular e sua substituição por fibronectina e ácido hialurônico e posteriormente por colágeno I e II. Deste modo, Sethi et al. (2002) descreveram 12 tipos de colágeno, sendo o mais importante o tipo IV. Assim a função do colágeno é promover a força de tensão do tecido cicatricial e modular funções celulares. No G1 (autólogo com PRP) verificou-se discreta formação de colágeno em relação aos demais grupos (p=0,0078), demonstrando que o PRP em enxerto autólogo teve aumento significativo na remodelação tecidual, o que concorda com Vendramin et al. (2010).

TABELA 5-Mediana e valores mínimos e máximo das variáveis intensidade de fibras de colágenos e vasodilatação, nos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Fibras colágenas	Vasodilatação
G1	0 (0-1) a	0 (0-1)a
G2	1(0-1) b	1(0-2)b
G3	1(0-1)b	0 (0-2)ab
G4	1 (0-2)b	0 (0-1)ab
p	0,0078	0,0293

Escores: 0- discreto; 1 moderada; 2 acentuado. no 19º de pós-operatório, nos diferentes tratamentos, sendo: G1 enxerto autólogo com PRP, G2 enxerto autólogo, G3 enxerto homólogo com PRP e G4 enxerto homólogo

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0.05$).

O diâmetro dos vasos também foi menor no G1 em relação ao G2 (Tabela 5), indicando a atuação do PRP nesta variável, aos 19 dias de pós-operatório, porém sem diferença significativa entre os enxertos homólogos com ou sem tratamento. Em um estudo semelhante realizado em ratos por Bauer et al (2009) no grupo teste a vascularização foi menos expressiva no período de 24 horas e maior em ordem crescente nos períodos de 3 dias, 7 dias e 14 dias.

Os grupos autólogos diferenciaram-se do homólogos ($p\leq0,05$), entretanto, sem diferença entre a presença ou não de tratamento com o PRP, ou seja, a presença de necrose/hemorragia foi significativamente maior nos enxertos homólogos (Tabela 6), o que já seria esperado tendo em vista o seu caráter homólogo e ausência de imunossupressão realizada, como já foi citado anteriormente (LANZETTA et al., 2007).

TABELA 6-Frequência das alterações teciduais observadas na avaliação histologica de G1, G2, G3 e G4.

Tratamentos	Tecido normal	Alterações teciduais	Alterações histológicas		Total
			Necrose	Necrose/hemorragia	
G1	8[a]	1	1 (11.1%)	0 (0.00%)	9
G2	8[a]	1	0 (0.00%)	0 (0.00%)	9
G3	2[b]	7	5 (55.6%)	2 (22.2%)	9
G4	2[b]	7	5 (55.6%)	1 (11.1%)	9

χ^2 = 12.96; P = 0.0003.PRP: Plasma rico em plaquetas

Foram estudadas a correlação entre as variáveis fibras colágenas, dilatação do vaso, alteração histológica e fibroblasto, (Tabela 7). Notou-se correlação positiva significativa (p=0,0082) entre a alteração histológica e o número macrófagos, ou seja quanto maior alteração histológica maior o número de macrófagos. A correlação negativa também foi observada entre o número de fibroblastos e macrófagos (p=0,0004).

Tabela 7. Coeficiente de correlação (r) e valores de p entre as variáveis: fibras de colágenos, dilatação do vaso, alteração histológica e fibroblasto.

Variáveis		Variáveis			
		Fibras de colágeno	Dilatação do vaso	Alt. histológica	Fibroblastos
Dilatação do vaso	r	0,2126			
	p	0,2132			
Alt. histológica	r	0,2619	-0,119		
	p	0,1229	0,4895		
Fibroblastos	r	0,1232	0,2349	-0,1941	
	p	0,4742	0,1679	0,2566	
Macrófagos	r	0,3156	-0,0679	0,4339	-0,338
	p	0,0608	0,694	0,0082*	0,0004*

* Diferença estatística significativa.

6.4.Limitações do estudo

A realização da coleta de material para a avaliação histomorfometrica em um único momento (dia19) pode ter contribuído quanto a ausência de comprovação da atuação dos PRP. Outros trabalhos similares que avaliaram o

efeito do PRP em ratos identificaram influência positiva na comparação com o grupo controle. As diferenças foram significativas em relação as variáveis observadas nos períodos iniciais, como três, sete e 14 dias, sendo estas mais expressivas no período de 3 dias e posteriormente seguido pela ordem decrescente (BAUER et al., 2009). Porém, Karayannopoulou et al. (2014), usando como modelo experimental cães, não encontraram diferenças estatísticas na avaliação histológica em retalhos tratados ou não com PRP no dia 4 e 10 após aplicação. Acredita-se que que a coleta de material para a histomorfometria em períodos mais precoces ao procedimento de enxertia seria um aspecto interessante a ser estudado.

Segundo Vendramin et al. (2010), o PRP não ativado com trombina teve melhores resultados clínicos e microscópicos em enxertos de coelhos quando comparado ao PRP em gel após sua ativação, resultados estes não foram observados neste estudo na histopatologia, apesar de ser verificado na fase clínica precoce, associado com a variável coloração.

Para a obtenção do PRP em coelhos utilizou-se protocolo com duas centrifugações refrigeradas, como descrito por Donatti et al. (2013) e diferente de Alió et al. (2012) que utilizam apenas uma centrifugação, em humanos.

O incremento plaquetário obtido variou de 4,0 a 5,0 vezes, com média de 4,4 vezes, atingindo a concentração necessária para a resposta celular adequada ao PRP, que segundo Marx (2004) inicia-se quando há um aumento no número basal de plaquetas de quatro a cinco vezes. Froum et al. (2002) defendem que o aumento na concentração de plaquetas no PRP pode variar de três a oito vezes, enquanto Alió et al. (2012) referem boa resposta terapêutica com concentrações de 1,6-2,5 vezes a quantidade basal de plaquetas. Portanto, diversos métodos descritos para a obtenção do PRP estão

disponíveis, entretanto cada processo resulta em um produto final com um potencial de usos distintos, tornando sua eficiência controvérsia (EHRENFEST et al., 2009). Neste experimento teve-se o cuidado de verificar pelo menos a quantidade mínima de incremento de quatro vezes, embora alguns trabalhos já descrevam como interessante dosar alguns dos principais fatores de crescimento, o que foi uma limitação deste estudo. Kim et al. (2012) obtiveram altas concentrações dos fatores de crescimento EGF e TGF-β e boa resposta terapêutica com incremento plaquetário de apenas 1,5 vezes.

Mudanças qualitativas e quantitativas das plaquetas podem prejudicar o potencial regenerativo do PRP (MESSORA et al., 2007). Estudos demonstrando ausência de benefícios do uso do PRP podem ser decorrentes da baixa qualidade do PRP produzido (MARX, 2004). Neste estudo, com PRP verificou efeitos benéficos na fase inicial no enxerto, na variável coloração sendo esta umas das mais importantes na avaliação clínica, e como já descrito que poderá ter um efeito fundamental no resultado final favorável.

De acordo com a literatura, o PRP pode ser aplicado diretamente na ferida e exercer seu efeito local (KARAYANNOPOULOU et al., 2014). A ativação das plaquetas, necessária para ocorra a liberação dos fatores de crescimento, na teoria poderia ocorrer por meio das substâncias geradas pelo traumatismo do tecido e principalmente pelo colágeno tecidual (DIONYSSIOU et al., 2013), e baseando-se neste princípio optou-se por esse método. Entretanto, Vendramin et al. (2014) questionaram se os fatores acima citados seriam suficientes para ativar as plaquetas.

Entretanto, mais estudos devem ser estimulados considerando esse assunto, em especial a ativação do PRP que eventualmente poderia

potencializar a influência positiva nos enxertos aplicados especialmente com relação a sua integração, considerando aspectos clínicos e histopatológicos.

7 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que o projeto foi desenvolvido, pode se concluir que:

- O tratamento do enxerto autólogo com o PRP, na forma líquida, promove influência positiva na fase inicial ou de “pega” do enxerto, demonstrada por coloração avermelhada à macroscopia e aspecto cosmético comparado aos demais tratamentos; entretanto, não influenciou na secreção.
- Na avaliação histopatológica, o uso do PRP não influencia quanto ao aumento do diâmetro geral dos vasos (vasodilatação) nas duas modalidades de enxerto estudadas. Nos enxertos homólogos, verifica-se maior grau de necrose e hemorragia quando comparado aos autólogos.
- Há maior remodelação tecidual, representada pela intensidade de formação de colágeno, nos enxertos autólogos tratados com PRP frente aos demais tratamentos instituídos.
- Verifica-se correlação positiva significativa entre a alteração histológica (necrose/hemorragia) e o número macrófagos, bem como negativa entre o número de fibroblastos e macrófagos.

REFERÊNCIAS[8]

ALIÓ, J.L., ARNALICH-MONTIEL, F., RODRIGUEZ, A.E. The Role of “Eye Platelet Rich Plasma” (E-Prp) for Wound Healing in Ophthalmology. **Current Pharmaceutical Biotechnology,** v.13, p.1257-1265, 2012.

ALIO, J.L.; ABAD, M.; ARTOLA, A.; RODRIGUEZ-PRATS, J.L.; PASTOR, S.; COLECHA, J.R. Use of autologous platelet-rich plasma in treatment of dormant corneal ulcers. **Ophthalmology**, v.114, n.7, p.1286-1293, 2007.

ALMEIDA, A. R. H.; MENEZES, J.A.; ARAÚJO, G. K M.; MAFRA, A. V. CORREA Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. **Revista Brasileira de cirurgia plástica.** v.23 n.2, p. 82-88, 2008.

ANDRADE, M. G.S.; DANTAS, D. B.; SADIGURSKY, M. Efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.6, n.2, p. 204-213, 2007.

ANITUA E, ANDIA I, ARDANZA B, NURDEN P, NURDEN AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and haemostasis**, v.92, n.1, p.14-15, 2004

ANITUA, E.; AGUIRRE, J. J.; ALGORTA, J.; AYERDI, E.; CABEZAS, A. I.; ORIVE G.; ANDIA, I. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. **Journal of Biomedical Materials Research** v. 84, n. 2, p. 415–421,Fev 2008.

[8] NORMA ABNT NBR 6023: 2002.

BAUER J. A, CORREA, L.; LIMA, F.L.M.; LIMA, L.A. P. A.; PUSTIGLIONI, F. E Effect of platelet-rich plasma on the standardizd dermal wound healing in rats **Revista. Periodontia** - v19, n.3, p.98-108, 2009

BAUER, J. A.; CORREA, L.; LIMA, F. L. M.; LIMA, L.A.P.A.; PUSTIGLIONI, F.E.; Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. **Revista de Periodontia,** v. 19, n. 3, p.98-108, 2009.

BERNUZZI, G., TARDITO, S., BUSSOLATI. O, ADORNI D, CANTARELLI, S., FAGNONI, F., ROSSETTI, A., AZZARONE M., FICARELLI, E., CALEFFI, E., GAZZOLA. G., FRANCHINI, M. Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma**. Blood Transfusion**, v. 8, n.4 p. 237-247, 2010.

BOHLING, M.W.; SWAIM, S.F. Skin Grafts. In: **Veterinary Surgery Small Animal**. TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S.A. St Louis: Saunders. 2012, p1271-1290.

BROUGHTON G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 117, n.7, p. 1-32, 2006.

BÚA, J.A.; REY, R.L.; SOLIVA, S.S.; SEIJAS, B.P.; ROZADO, A.G.; SASTRE, R.M.; GRANADOS, J.F.;FRANCO, F.L.; MAHÍA, I.V.; CEDRÚN, J.L.L. A comparative study of platelet-rich plasma, hydroxyapatite, demineralized bone matrix and autologous bone to promote bone regeneration after mandi- bular impacted third molar extraction, **Medecina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v.15, n.3, p. 483-489, 2010.

CERVELLI, V., GENTILE, P. Use of cell fat mixed with platelet gel in progressive hemifacial atrophy. **Aesthetic Plastic Surgery** v. 33, n.1 p.22–27, 2009.

CHOI, J.; MINN, K. W.; CHANG, H. The efficacy and safety of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells: an update. **Archives of plastic surgery,** v.39, n.6, p. 585-592 2012.

CORNELL, K. Wound Healing. In: **Veterinary Surgery Small Animal**. TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S.A. St Louis: Saunders. 2012, p.125-134.

CROVETTI, G.; MARTINELLI, G.; ISSI, M.; BARONE, M.; GUIZZARDI, M.; CAMPANATI, B.; MORONI, M.; ENGLERT, SJ.; ESTEP, T.H.; ELLIS-STOLL, C.C. Autologous platelet gel applications during cardiovas- cular surgery: effect on wound healing. **The Journal of Extra Corporeal Technology**, v. 37, n. 2, p.148-152, 2005.

CROVETTI. G.; MARTINELLI, G.; ISSI, M.; BARONE, M.;GUIZZARDI, M.; CAMPANATI, B.; MORONI, M.; CARABELLI, M. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 30, n. 2, p.145-151, 2004.

DIONYSSIOU D, DEMIRI E, FOROGLOU P, P, CHEVA, A.; SARATZIS, N.; AIVAZIDIS, C.; KARKAVELAS, G. The effectiveness of intralesional injection of platelet- rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers. An experimental and clinical study. **International Wound Jounal**, v.10, n. 4, p. 397–406, 2013.

DONATTI, C.; BRANDÃO, C.V.S.; RANZANI, J.J.T.; PERCHES, C.S.; PADOVANI, C.R.; PELLIZZON, C.H.; SERENO, M.G. Uso do plasma rico em

plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.65, n.3, p.809-818, 2013.

EFEOGLU, C.; AKCAY, Y.D; ERTURK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery,** 62:1403-1407. 2004

EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSON, L.; ALBREKTSSON, T. 2009. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**. v.27, n.3, p.158-167.

EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. Platelet rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. **Plastic Reconstructive Surgery**, v. 118, n.6, p. 147-156, 2006.

FAHIE, M.A Skin and reconstruction. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S.A.; **Veterinary Surgery: Small Animal**. St Louis: Saunders. 2012, p1197-1209.

FINDIKCIOGLU F.; FINDIKCIOGLU K.; YAVUZER R.; LORTLAR N.; ATABAY K. Effect of intraoperative platelet-rich plasma and fibrina glue application on skin flap survival. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.23, n.5, p.1513-1517, 2012.

FOWLER, D Distal limb and paw injuries in SWAIN, S.F; KRAHWINKEL, D.J **Veterinary Clinics of North America Wound management**. Saunders v.36, n.4 p. 819-845, 2006.

FOWLER, D.; WILLIAMS, J.M. **Manual of canine and feline wound Management and Reconstruction** BSAVA, Hapshire, 1999, p160.

FREYMILLER, E.G.; AGHALOO, T.L.; Platelet-rich plasma: Ready or not? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n.4, p.484-488, 2004.

FROUM, S.J.; WALLACE, S.S.; TARNOW, D.P.; CHO, S.C. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry,** v.22, n.1, p.45-54, 2002.

FRYKBERG, R. G; DRIVER,V. R.; CARMAN, D.; LUCERO, B.; BORRIS-HALE, C.; FYLLING C. P.; RAPPL, L. M.; CLAUSEN, P. A, Chronic wounds treated with a physiologically relevant concentration of platelet-rich plasma gel: A prospective case series. **Ostomy Wound Management**, v.56, n. 6, p.36–44, 2010.

GAUDRIC, A.; MASSIN, P.; PAQUES, M.; SANTIAGO, PY.; GUEZ, J.E.; LE GARGASSON, J.F.; MUNDLER O.; DROUET, L. Autologous platelet concentrate for the treatment of full-thickness macular holes. **Graefe´s Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology**. v.233, n.9 ,p.549-554, 1995.

GOSS, J. R. Regeneration versus repair. In: COHEN, I. K.; DIEGELMANN, R.F.; LINDBLAD, W.J. **Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects.** Philadelphia: W.B. Saunders; 1992:40-62.

HAN, T.; WANG, H.; ZHANG, Y.Q. Combining Platelet-Rich Plasma and Tissue-Engineered Skin in the Treatment of Large Skin Wound **The Journal of Craniofacial Surgery,** v. 23, n. 2, p. 439-443, 2012.

HEDLUND, C.S. Surgery os the integumentary system. In: FOSSUM, T.W. **Small animal surgery** 3 ed. St. Louis: Elsevier 2007. p.159-259.

HEDLUNG, C.S. Skin Grafts, In: FOSSUM, T.W. **Small animal surgery**, St Louis: Mosby, 2007, p. 224-228.

HERMETO, L.C.; ROSSI, R.; PÁDUA, S. B.; PONTES, E.R.J.; SANTANA, A.E. Estudo comparativo entre a cola de fibrina e o plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27,n.11, p. 789-794, 2012.

HUNT, G.B. Local or Subdermal plexus flaps In: **Veterinary Surgery Small Animal.** TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S.A. St Louis: Saunders. 2012, p1243-1255.

JEON, Y.R.; KANG, E.H.; YANG, C.E.; IN SIK YUN, I.S.; LEE, W.J.; LEW, D.H. The Effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on Composite Graft Survival. **Plastic and Reconstructive Surgery Advance** v.41, n. 6, p.647-653, 2014.

KARAYANNOPOULOU, M.; PAPAZOGLOU, L.G.; LOUKOPOULOS, P.; KAZAKOS, G.; CHANTES, A.; GIANNAKAS, N.; SAVVAS, I.; PSALLA, D.; KRITSEPI-KONSTANTINOU, M.; DIONYSSIOU, D. Locally injected autologous platelet-rich plasma enhanced tissue perfusion and improved survival of long subdermal plexus skin flaps in dogs. **Veterinary comparative orthopedics and traumatology journal** v. 27, n. 5, p.379-386, 2014

KAWASE, T.; OKUDA, K.; WOLFF, L.F.; YOSHIE, H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. **Journal of Periodontalogy**, v.74, n. 6, p. 858-864, 2003.

KAZAKOS, K.; LYRAS, D.N.; VERETTAS, D.; TILKERIDIS, M.; TRYFONIDIS, M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. **Injury**, v.40, n.8, p.801-805, 2009.

KNIGHTON, D.R.; DOUCETTE, M.; FIEGEL, V.D.; CIRESI, K.; BUTLER, E.; AUSTIN, L. The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. **Progress in Clinical and Biological Research,** v. 266, p.319-329, 1988.

KOROBELNIK, J.F.; HANNOUCHE, D.; BELAYACHI, N.; BRANGER, M.; GUEZ, J.E.; HOANG-XUAN, T. Autologous platelet concentrate as an adjunct in macular hole healing: a pilot study. **Ophthalmology**, v.103, n.4, p. 590-594, 1996.

KRANA, M.; DOMANOVI, D.; TOMI A.; VAJGER,U.; JERAS, M Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. **Acta Dermatoven APA** v. 16, n. 3, p.105-110, 2007

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. **Robibins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 8 ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2010. 1458p.

LANZETTA, M.;PETRUZZO, P.; DUBERNARD, J.M.; MARGREITER, R.; SCHUIND, F.; BREIDENBACH, W.;NOLLI, R.;SCHNEEBERGER, S.; VAN HOLDER, C.; GORANTLA, V.S.; PEI, G.; ZHAO, J.; ZHANG, X. Second report (1998–2006) of the international registry of hand and composite tissue transplantation. **Transplant immunology** v.18, n.1, p. 1-6, 2007.

LEE H.W.; REDDY M.S.; GEURS N.; PALCANIS K.G.; LEMONS J.E.; RAHEMTULLA F.G.; HO K.J.; CHEN D.T.;DAVIS C.R.; FELDMAN D.S.

Efficacy of platelet-rich plasma on wound healing in rabbits. **Journal of Periodontology,** v. 79, n. 4, p.691-696, 2008.

LIND, M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. **Acta Orthopaedica Scandinavica,** v. 67, n. 4, p. 407-417, 1996.

LOFÊGO, J. A.; DADALTI, P.; COTRIM, D.; COTRIM, P. R.; LEIROS, D. A.; , M. A.; TAKYIA, C. M. Enxertia de pele em oncologia cutânea **Anais Brasileiros de Dermatologia.** v. 81,n.5 p. 465-472, 2006.

LYNCH, S.E.; DE CASTILLA, G.R.; WILLIAMS, R.C.; KIRITSY, C.P.; HOWELL, T.H.; REDDY, M.S.; ANTONIADES, H.N. The effects of short-term application of a combination of platelet- derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **Journal of Periodontology**, v. 62, n.7, p.458-467, 1991.

LYNCH, S.E.; WILLIAMS, R.C.; POLSON, A.M.; HOWELL, T.H.; REDDY, M.S.; ZAPPA, U.E.; ANTONIADES, H.N. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **Journal of Clinical Periodontology**, v.16, n.8, p.545-548, 1989.

MARTIN, P. Wound healing–aiming for perfect skin regeneration. **Science,** v. 4, n. 276, p. 75-81, 1997.

MATHES, D.W.; NOLAND, M.; GRAVES, S.; SCHLENKER, R.; MIWONGTUM, T.; STORB, R, A preclinical canine model for composite tissue transplantation, **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 26, n.3, p201-207, 2010.

MAX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal Oral Maxillo facial Surgery**, v.62, n.4, p. 489-496, 2004.

MCALEER, J.P.; SHARMA, S.; KAPLAN, E.M.; PERSICH, G. Use of autologous platelet concentrate in a nonhealing lower extremity wound. **Advances in Skin Wound Care**. v. 19 n. 7, p. 354-363, 2006.

MESSORA M.R; NAGATA M.J.H., MARIANO R.C., DORNELLES R.C.M., BOMFIM S.R.M., FUCINI S.E., GARCIA V.G.; BOSCO A.F. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in a rat calvaria. **Journal of Periodontal Research**. v. 43, n. 2, p. 217-223, 2008

MISHRA, A.; WOODALL, J. J.R.; VIEIRA, A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. **Clinical Sports Medicine**, v. 28, n.1, p.113-125, 2009.

MOTULKY, H.J. Prism 5 Statistics Guide, 2007. GraphPad Software Inc., San Diego CA; Graphpad software Inc. < http://www.graphpad.com >

MUNIRAH, S.; SAMSUDIN, O.C.; CHEN, H.C.; SALMAH, S.H.; AMINUDDIN, B.S.; RUSZYMAH, B.H. Articular cartilage res- toration in load-bearing osteochondral defects by implan- tation of autologous chondrocyte-fibrin constructs. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 89, n. 8, p.1099-1109, 2007.

NIKOLIDAKIS, D.; JANSEN, J.A. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. **Tissue Engineering: Part B**, v.14, n.3, p.249-258, 2008.

OBARRIO, J.J.; ARAUZ, J.J.; CHAMBERLAIN, T.M.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel

biotechnology a case reporter. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 20, n. 5, p. 486-497, 2000.

OKUDA, K.; KAWASE, T.; MOMOSE, M.; MURATA, M.; SAITO, Y.; SUZUKI, H.; WOLFF, L.F.; YOSHIE, H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-b and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 6, p. 849-857, 2003.

PAVLETIC, M.M , The Skin. In: PAVLETIC, M.M **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery** 3 ed, Philadelphia: W.B. Saunders; 2012:3-15.

PETRUNGARO, P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. **Dental Implantology Update**, v. 12, n. 6, p. 41-46, 2001.

POWELL, D.M.; CHANG, E.; FARRIOR, E.H. Recovery from deep- plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel: a pilot study. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v. 3, n.4, p. 245-250, 2001.

ROBINSON, C.J. Growth factors: therapeutic advances in wound healing. **Annals of Medicine**, v. 25, n. 6, p.535-538, 1993.

ROSENBERG, E. S.; TORASIAN, J. Sinus grafting using platelet-rich plasma-Initial case presentation. **Practical Periodontics and Aesthetic Dentry**, v.12, n. 9, p. 843-850, 2000.

ROUBELAKIS, M.G.; TROHATOU, O.; ROUBELAKIS, A.;MILI, E.; KALAITZOPOULOS, I.; PAPAZOGLOU, G.; PAPPA, K.I.; ANAGNOU, N.P. Platelet-Rich Plasma (PRP) Promotes Fetal Mesenchymal Stem/Stromal Cell

Migration and Wound Healing Process. **Stem Cell Reviews,** , v. 10, n.3, p.417-428, 2014.

ROZMAN, P.; BOLTA, Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft tissue injuries. **Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 16, n. 4, p. 157-164, 2007.

SAMPSON, S., GERHARD, M., MANDELBAUM, B., Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. **Current reviews in musculoskeletal medicine**, v.1, n. 3, p.165-174, 2008.

SAVARINO, L.; CENNI, E.; TARABUSI, C.; DALLARI, D.; STAGNI, C.; CENAC-CHI, A.; FORNASARI, P.M.; GIUNTI, A.; BALDINI, N. Evaluation of bone healing enhancement by lyophilized bone grafts supplemented with platelet gel: a standardized methodology in patients with tibial osteotomy for genu varus. **Journal of Biomedical Material Research B Applied Biomaterial**, v. 76, n. 2, p. 364-372, 2006.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing**. New England Journal of Medicine,** v. 341, n. 49, p. 738–746, 1999.

SLATER, M.; PATAVA, J.; KINGHAM, K.; MASON, R.S. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **Journal Orthopaedic Research**, v.13, n. 5, p. 655-663, 1995.

SWAIM, S.F. Skin Grafts. In: SLATTER, D.H. **Textbook of small animal surgery**. Cap.2, 2003. 3ed, p.321-338.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRAM. S.; FRANCO, T.R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de

preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 33, n.1, p. 24-28, 2006.

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

VENDRAMIN, S.P.; FRANCO, D.; SCHAMALL, R.F.;FRANC, T.R. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 1, p. 4-10, 2010,

WANG, H.; PAPPERT, T.D.; CASTELLI, W.A.; CHIEGO, D.J.; SHYR, Y.; SMITH, B.A. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiography study on dogs**. Journal of Periodontology,** v. 65, n. 5, p. 429-436, 1994.

WHITE, R.A.S Skin Grafting In: FOWLER, D.; WILLIAMS, J.M. **Manual of canine and feline wound management and reconstruction**, Shurdington, BSAVA, p.83-94. 1999.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet gel: an autolo- gous alternative to fibrin glue applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 11, p. 1294-1299, 1997

ZAPATA, M.J.A.; CARVAJAL, A.M.; SOLÀ, I.; BOLIBAR, I.; EXPÓSITO, J.A.; RODRIGUEZ, L.; GARCIA, J. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. **Transfusion,** v. 49, n.1, p.44-56, 2009.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis** 5 ed. Upper Saddle River New Jersey: Prentice Hall, 2010

ZUHAILI, B.; AFLAKI, P.; KOYAMA, T.; FOSSUM, M.; REISH, R.; SCHMIDT, B.; POMAHAC, B.; ERIKSSON, A. Meshed skin grafts placed upside down can take if desiccation is prevented. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.125, n.3, p.855–865, 2010.

9. TRABALHO CIENTIFICO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins. Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

• Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.

55

• Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.

• Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

• A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.

• Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.

• Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.

• É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.

• O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

• Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract,
Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão),
Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.
56
O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.
O número de Referências não deve exceder a 30.
• Relato de caso
Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.
Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract,
Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes),
Agradecimentos (quando houver) e Referências.
O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.
O número de Referências não deve exceder a 12.
• Comunicação
É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.
O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster's Third New International

57

Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

• O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.

• Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

• Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

• Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.

2. o texto do artigo em pdf não deve conter o nome dos autores e filiação.

• Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

• Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

58

• Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

• Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

• Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

• Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

• Figura. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida

no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

• Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

• As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

59

• Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

• Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

• Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

• Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

• Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

• autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

• dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

• mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

• mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

• Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

60

• Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

61

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <http://www. org/critca16.htm>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <http://www.summit.fiu.edu/ MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

• Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

• O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

• Taxa de submissão. A taxa de submissão de R$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

• Taxa de publicação. A taxa de publicação de R$70,00, por página impressa em preto e R$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

• No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

62

• No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

Trabalho a ser enviado para a revista "Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)"

ENXERTOS CUTÂNEOS AUTÓLOGOS E HOMÓLOGOS TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Kemper, B.; C. V. S. Brandão[1]*,

[1]Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP_-Botucatu, SP;

email:valeriasb@fmvz.unesp.br

Rua Eurico Hummig 89, T2, Ap903, 86050464 Londrina PR

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar clínica e histologicamente, os efeitos do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) na viabilidade de enxertos cutâneos autólogos e homólogos de espessura total em coelhos. Para isso foram constituídos 04 grupos experimentais (n=9), designados como: G1: o enxerto autólogo tratado com o PRP; G2: enxerto autólogo; G3: enxerto homólogo tratado com PRP e G4: enxerto homólogo. Deste modo, cada coelho foi submetido ao tratamento com PRP e seu controle dos enxertos autólogos e homólogos, totalizando 36 amostras**.** Todas a etapas foram documentadas para a avaliação clínica macroscopica e no 19º dia foi coletado da area central, um fragmentos de cada enxerto para a avaliação histomorfologica. O tratamento do enxerto autólogo com o PRP promoveu influência positiva na fase inicial ou de "pega" do enxerto, demonstrada por coloração avermelhada à macroscópica e aspecto cosmético comparado aos demais tratamentos. Na avaliação histomorfométrica, o número de macrófagos foi superior nos enxertos homólogos em relação aos autólogos. Porém, não houve diferença no número de macrófagos e fibroblastos com a instituição do tratamento com PRP. O tratamento do enxerto autólogo com o PRP, na forma líquida, promove influência positiva na fase inicial ou de "pega" do enxerto

Palavras-chave: integração do enxerto, fatores de crescimento, pele, PRP

AUTOLOGOUS AND HOMOLOGOUS SKIN GRAFTS TREATED WITH PLATELET-RICH PLASMA. EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS

The objective of this study was to evaluate clinically and histologically, the effect of PRP on the viability of the autologous and homologous full thickness grafts in rabbits. Four experimental groups (n=9) were studied and designated as G1: autologous graft treated with PRP; G2: autograft; G3: homograft treated with PRP and G4: homograft. Each rabbit was subjected to treatment with PRP and its control of autologous and homologous grafts, representing 36 samples. All steps were documented for the macroscopic clinical assessment and at 19th postoperative days, skin biopsy was collected from the central area, for histomorphological evaluation. The treatment of graft with PRP resulted positive influence in the initial phase or "handle" of the graft, demonstrated by the reddish macroscopic and cosmetic appearance compared to others treatments. The histomorphometric evaluation, the number of macrophages in the grafts was higher in homologs compared to autologous. However, there was no difference in the number of macrophages and fibroblasts with the PRP treatment. The treatment of the graft with PRP in liquid form, promotes a positive influence on the initial phase or "take" of the graft

Keywords: graft integration , growth factors, skin, PRP

INTRODUÇÃO

A cicatrização ideal de feridas na pele deve ser um processo bem orquestrado, que incorpore eventos biológicos e moleculares complexos que incluem atração de células para o local da ferida, proliferação celular, diferenciação e angiogênese (Martin, 1997; Singer e Clark, 1999).

Inúmeros esforços têm sido feitos, especialmente a partir da década de 80, para melhorar os resultados clínicos, com enfoque especial no uso de terapias baseadas nos fatores de crescimento (Robert et al., 2010).

A base da terapia utilizando o plasma rico em plaquetas (PRP) é o aumento da concentração de plaquetas, e consequentemente de fatores de crescimento, liberados na ferida com o intuito de acelerar sua cicatrização (Freymiller e Aghaloo, 2004). Os estudos sugerem que o PRP pode atuar como um regulador da migração celular e cicatrização de feridas, estimulando o desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas na prática clínica (Roubelakis et al., 2014), tendo sido associado a resultados clínicos positivos (Crovetti et al., 2004, Roubelakis et al., 2014).

Entre as possibilidades de recobrimento das feridas podem ser empregados os retalhos ou enxertos cutâneos (Pavletic, 2010). Estas técnicas podem ser empregadas em defeitos que não podem ser reconstruídos primariamente (Hedlund, 2007; Boholing e Swaim, 2012).

Na Medicina Veterinária, a utilização dos enxertos cutâneos é indicada principalmente quando há a perda de grandes áreas de pele após traumas, queimaduras ou excisão de neoplasias. Ainda há benefícios no seu uso em lesões em extremidades, nestas a ausência de pele disponível impede a mobilização local da mesma. A grande maioria dos enxertos empregados na medicina veterinária é de origem autóloga (Swaim, 2003; Fowler, 2006).

Assim o PRP é um produto com grande potencial para melhorar a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de gordura (Vendramin et al., 2006, Almeida et al., 2008). Segundo Fulya et al. (2012), o PRP usado no trans-cirúrgico aumentou a sobrevida dos retalhos em coelhos, bem como resultados favoráveis foram descritos em enxertos cutâneos (Vendramin et al, 2010; Fulya et al., 2012

A introdução de procedimento que favoreçam a reparação dos enxertos é sempre positivo, pois várias complicações associada a essa cirurgia podem impedir ou retardar a revascularização e resultar em necrose do enxerto. Dentre estas cita-se movimentação

entre o enxerto e o leito receptor, presença de pus, seroma, sangue ou corpo estranho entre o enxerto e seu leito, fibrinólise secundária a infecção bacteriana (Pavletic, 2010).

Tais aspectos estimularam o desenvolvimento deste estudo, o qual tem por objetivo avaliar a ação do PRP em enxertos cutâneos experimentais, de espessura total, autólogos e homólogos em coelhos.

MATERIAL E METODO

Os procedimentos experimentais desenvolvidos no presente estudo estão de acordo com os Princípios éticos na experimentação animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (protocolo nº 192/2011) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu (FMVZ- Unesp- Botucatu).

Foram utilizados nove coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Albino, fêmeas, com idade variando entre 300 e 400 dias e peso entre 3,0 e 4,0 Kg. Os animais foram previamente examinados clinicamente para confirmar as suas perfeitas condições de saúde e a ausência de lesões cutâneas.

Para a obtenção do PRP foram coletados 10 ml de sangue arterial de cada coelho através da canulação da artéria central da orelha com cateter 20G. Em seguida, a volemia foi reposta com 20 ml de solução cristaloide de Ringer lactato. O sangue foi coletado de maneira asséptica e distribuído em dois frascos estéreis a vácuo contendo citrato de sódio 3,2%, com cada um contendo 4,5 ml de sangue total. Cerca de 1ml do sangue foi separada para a contagem de plaquetas, e os 9 ml restantes foram homogeneizados, protegidos da luminosidade durante 30 minutos, para posterior centrifugação. A primeira etapa da centrifugação foi feita a 200G, durante 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 22ºC (Modelo: Hermle Z326K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Os 50% da fase superior do plasma sobrenadante foram descartados e os outros 50%, colocados em um outro tubo para nova centrifugação. A segunda etapa foi responsável pela separação do PRP. Nesta, os tubos contendo aproximadamente 3 ml cada foram centrifugados, a 400G por 10 minutos. Foram então descartados 2/3 do sobrenadante, como plasma pobre em plaquetas (PPP) e o 1/3 restante foi homogeneizado para constituir o PRP.

Foram constituídos quatro grupos experimentais (n=9), designados como: G1: o enxerto autólogo tratado com o PRP; G2: enxerto autólogo; G3: enxerto homólogo tratado com PRP e G4: enxerto homólogo. Deste modo, cada coelho foi submetido ao

tratamento com PRP e seu controle (fig. 1) dos enxertos autólogos (lado direito) e homólogos (esquerdo), totalizando 36 amostras.

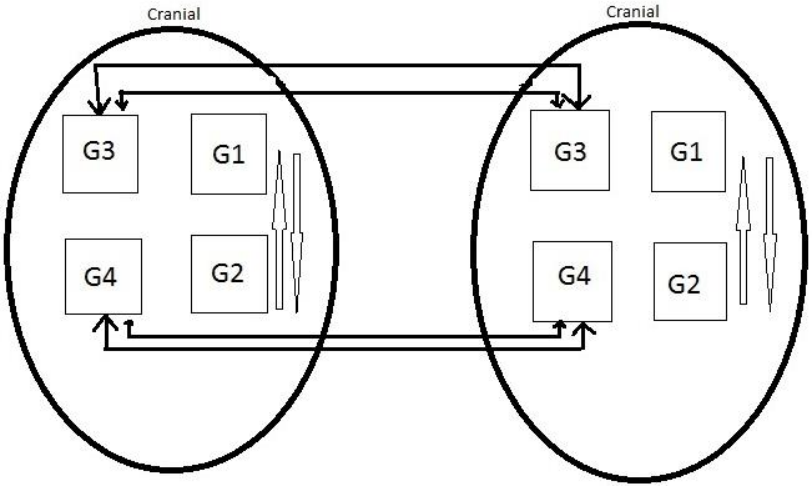


Figura 1. Representação esquemática da formação dos grupos experimentais, em dois animais. G1: enxerto autólogo tratado com PRP, G2: enxerto autólogo, G3: enxerto homólogo tratado com PRP, G4: enxerto homólogo.

Preparação pré-cirúrgica e protocolo anestésico

Após anestesia e preparação da superfice cutânea, foram confeccionados inicialmente dois quadrados de 2x2 cm de pele de espessura total na região dorsal do lado direito de cada animal seguindo prévia demarcação, o espaçamento entre foi de 1.5 cm. Para isso usou-se bisturi com lamina n.15, que permitu a delimitação do enxerto, seguida da divulsão empregando-se tesoura de metzenbaum e preservando o músculo cutâneo do tronco. Em seguida, estes foram trocados de posição para a formação de dois enxertos autólogos, assim o cranial foi tratado com 0,5ml de PRP e o caudal com 0,5ml de solução de ringer. Em ambos os enxertos foram feitos duas incisões longitudinais de 4 mm de comprimento e estes foram fixados com pontos isolados simples. Em seguida foram preparados dois enxertos do lado esquerdo da linha media dorsal seguindo o protocolo anteriormente descrito, porém os fragmentos de pele coletados foram trocados entre os coelhos formando, em cada um, dois enxertos homólogos. Do mesmo modo, o cranial foi tratado com 0,5ml de PRP e o caudal com 0,5ml de solução de ringer. Todos os enxertos foram suturados com pontos isolados simples empregando mononáilon 5-0.

O acompanhamento clínico geral dos animais foi realizado diariamente, e a avaliação macroscópica dos enxertos de pele nos dias 5, 12 e 19 após o procedimento cirúrgico. Todas a etapas foram documentadas por fotografia. No 19º dia do pós-operatório, foram coletados da área central, um fragmentos de cada enxerto com auxílio

de um punch (0.8 cm) e fixados em solução de formalina 10% por 48 horas para posterior avaliação histológica do processo de reparação.

A avaliação das imagens fotográficas dos enxertos foi realizada sempre pelo mesmo examinador, sem conhecimento da identificação das amostras (Vemdramin et al., 2010). Desta forma, a evolução clínico-macroscópica dos enxertos foi estudada, e os sinais relacionados à presença de secreção, coloração e a aspecto cosmético foram qualiquantificados utilizando-se escores. A secreção foi quantificada como: ausente (0); leve (1); moderado (2); grave (3), a coloração foi qualificada em: rosea (1); roxa (2) e preta (3), conforme Vendramin et al. (2010). Para a aparência cosmética estabeleceu-se os escores: excelente (1), quando toda a área do enxerto estava preenchida por pele saudável; boa (2), quando até 20% do enxerto apresentava formação de crostas; razoável (3), quando o enxerto apresentava subsituição de 20% a 80% do enxerto foi substituido por crostas e pobre (4), quando mais que 80% do enxerto foi substituido por crostas.

Na avaliação histomorfométrica, foram avaliadas as variáveis: a intensidade de fibras colágenas: utilizando-se os escores: discreta (0), moderada (1) e acentuada (2); intensidade da vasodilatação: discreta (0) quando o vaso tinha menos de 33% de preenchimento por hemácias, moderada (1) quando o preenchimento correspondia de 33-66% e acentuada (2) quando mais de 66% do vaso estavam preenchidos por hemácias; número de fibroblastos por campo (objetiva de 100x) e número de macrófagos por campo (objetiva de 100x), neste foram contados três campos por lâmina, sendo a média deste, considerado o valor final; adicionalmente, foi analisada a presença de necrose.

Para a comparação entre os diferentes grupos analisados, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para as variáveis fibras colágenas e vasodilação, seguida pelo Teste de Dunn; enquanto para a avaliação do número de fibroblastos e macrófagos foi aplicado ANOVA e comparação múltipla pelo teste de Tukey (Motulaky, 2007). As variáveis Macrófago x Fibroblasto foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson, enquanto nas outras variáveis foi realizado o teste de correlação de Spearman

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística entre os tratamentos instituídos e momentos de avaliação, para a variável secreção. Estes achados diferem dos relatados por Hermeto et al. (2012) em cães, que compararam cola de fibrina com o PRP em enxertos autólogos de cães; neste o grupo com PRP apresentou menor quantidade secreção. A secreção

observada nos coelhos foi sempre do tipo serosa, sem presença de aspecto purulento ou sanguinolento.

Em relação à variável coloração observada nos dias 5, 12 e 19, ressalta-predominância da coloração rósea no momento 5 para o grupo G1 ($p<0,05$), em relação aos demais grupos (Tab. 1). A coloração rósea está associada a adequada revascularização (White, 1999; Fowler, 2006;Bohling e Swaim, 2012) e foi observada na fase inicial do enxerto, inferindo que o tratamento do enxerto autólogo com o PRP promoveu influência positiva na fase de "pega" do enxerto. O G1 permaneceu com este padrão de coloração nas diferentes fases (momentos) da revascularização do enxerto, ao contrário dos outros grupos. Essa diferença significativa não se repetiu nas avaliações subsequentes entre os grupos tratados ou não com PRP, mas foi evidente quando considerado o tipo de enxerto empregado.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão dos escores de avaliação quanto a coloração, nos diferentes tratamentos e momentos de avaliação pós-operatória.

Coloração	**Dia 5**	**Dia 12**	**Dia 19**
G1	1,00±0,00*	1,11±0,33	1,22±0,67
G2	1,33±0,50	1,44±0,88	1,22±0,67
G3	1,33±0,50	2,11±0,60	2,67±0,50
G4	1,89±0,33	2,67±0,50	2,89±0,33

Grupos de enxertos: G1: autólogo tratado com PRP, G2: autólogo não tratado com PRP; G3: homologo tratado com PRP; G4: homólogo não tratado com PRP. Escores: rósea (1); roxa (2) e preta (3). *comparação entre grupos, fixado o momento de avaliação $p\leq0,05$.

O enxerto coletado iniciará imediatamente após ser destacado do seu leito um processo de degradação tecidual, e a regeneração não tem início até o momento em que o enxerto receba nutrientes do seu leito (Bohling e Swaim, 2012). Considerando os achados referentes coloração, importante característica utilizada na avaliação clínica dos enxertos, pode ser assinalar que nos enxertos homólogos não se estabeleceram as conexões necessárias para impedir a degradação tecidual, que foi possível ser evidenciada pelo escurecimento despontando, sendo verificada a necrose do tecido nos grupos G3 e G4 no dia 19º da avaliação. Salienta-se, entretanto que eventualmente são rejeitados pelo organismo do receptor, mas podem ser empregados para cobrir e proteger temporariamente grandes áreas queimadas ou sem revestimento (Hedlund, 2007; Pavletic, 2010), sendo aplicados sem intervenção cirúrgica em outras partes do organismo e prontamente disponíveis caso tenha-se um banco de tecidos. No momento 5, o enxerto homólogo tratado com o PRP apresentou numericamente um comportamento mais favorável em relação ao homólogo não tratado com o PRP, porém

sem diferença significativa, sugerindo que talvez possa ter tido alguma influência na reparação tecidual.

Durante o período de pega do enxerto, o mesmo passa por mudanças variadas de aparência cosmética que podem ser difíceis de interpretar (White, 1999). Quando se observa os valores entre os grupos tratados ou não com PRP, não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos momentos de avaliação (dia 5, 12 ou 19). Entretanto, ao se considerar o tipo de enxerto empregado (autólogo ou homólogo), a variável aparência repete os resultados já mencionados nas outras variáveis analisadas. Os resultados assinalam que o enxerto autólogo foi o que apresentou superioridade na avaliação da variável aspecto cosmético, quando comparado ao enxerto homólogo de pele.

Para a obtenção do PRP em coelhos utilizou-se protocolo com duas centrifugações refrigeradas, como descrito por Donatti et al. (2013) e diferente de Alió et al. (2012) que utilizam apenas uma centrifugação, em humanos.

O PRP pode ser aplicado diretamente na ferida e exercer seu efeito local (Karayannopoulou et al., 2014). A ativação das plaquetas, necessária para ocorra a liberação dos fatores de crescimento, na teoria poderia ocorrer por meio das substâncias geradas pelo traumatismo do tecido e principalmente pelo colágeno tecidual (Dionyssiou et al., 2013), entretanto, Vendramin et al. (2014) questionam os fatores acima citados seriam suficientes para ativar as plaquetas. Sendo está uma presumível limitação aos resultados obtidos durante a execução do experimento com o PRP, sem a sua ativação previa a aplicação sob os enxertos cutâneos.

Assim mudanças qualitativas e quantitativas das plaquetas podem prejudicar o potencial regenerativo do PRP (Messora et al., 2007). Estudos demonstrando ausência de benefícios do uso do PRP podem ser decorrentes da baixa qualidade do PRP produzido (Marx 2004). Neste estudo, com PRP verificou efeitos benéficos na fase inicial no enxerto, umas das mais importantes na avaliação clínica e como já descrito que poderá ter um efeito fundamental no resultado final favorável. Entretanto, mais estudos devem ser estimulados considerando esse assunto, em especial ativação do PRP eventualmente poderia promover alguma alteração em todos os enxertos aplicados e sua influência na ausência de resposta na integração dos enxertos nas fases mais tardia do processo.

A avaliação histomorfométrica relacionada a contagem de fibroblastos e macrófagos por campo está apresentada na fig 2. Não houve diferença entre os grupos

tratados ou não com PRP considerando o tipo de enxerto, entretanto, o número de macrófagos foi inferior nos autólogos quando comparado aos homólogos.

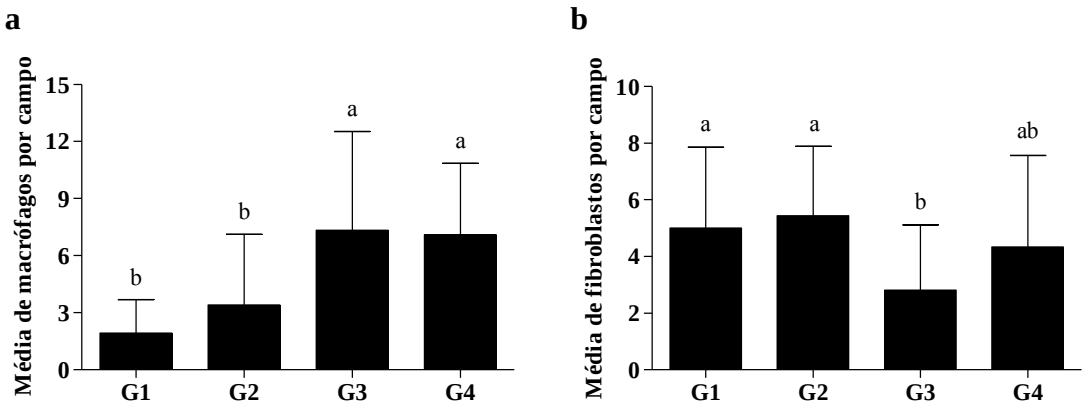


Figura 2. Valor médio e desvio padrão de macrófagos (a) e fibroblastos(b), sendo: G1 enxerto autólogo com PRP, G2 enxerto autólogo, G3 enxerto homologo com PRP e G4 enxerto homologo. Letras diferentes indicam significância estatística ($p<0,05$), pelo teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

Considerando a análise histológica das fibras colágenas, houve diferença estatística ($p=0,0078$) entre os grupos G1 e G2 quanto a intensidade fibras colágenas, sendo que o G2 (moderada) demonstrou maior colagenização do que o G1 (leve); o G2 foi similar aos demais grupos experimentais (G3 e G4).

Quanto a vasodilatação (diâmetro geral dos vasos), a diferença significativa observada entre os grupos experimentais foi a presença de dilatação moderada no G2 comparando-se a leve no G1 ($p=0,0293$). Analisada a integridade tecidual, foi observado diferença ($p=0,0003$) apenas entre os grupos autólogos e homólogos, independentes do tratamento como o PRP; nos homólogos foram visibilizadas maiores número de região com necrose e hemorragia.

Na resposta inflamatória ocorrem diferentes fenômenos entre eles a vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia. Nas primeiras 24–48 horas após a lesão, chegam os neutrófilos sendo posteriormente substituídos pelos macrófagos que migram para a ferida após 48–96 horas do evento inicial. Estes macrófagos auxiliam a angiogênese, a fibroplasia assim como a síntese da matriz extracelular o que dará início a fase proliferativa (Broughton et al., 2006). Nota-se que houve maior número de macrófagos no G3 e G4 quando comparados com G1 e G2 ($p< 0,01$). Misha et al. (2009) e Roman e Boltd (2007) relatam que o PRP inibe o processo inflamatório por suprimir a citocinas, neste estudo a atuação do tratamento nos macrófagos não pode ser verificado, provavelmente devido ao fato do mesmo ter sido estudado histologicamente no período de 19 dias.

No trabalho de Bauer et al. (2009), a análise histomorfométrica realizada não mostrou diferenças significantes entre os grupos teste e controle em relação à celularidade e matriz colagênica nos quatro períodos de observação. Os resultados desta pesquisa sugeriram que embora não ofereçam efeitos tóxicos ou prejudicial sobre os tecidos moles, o PRP não favorece a reparação de feridas dérmicas, em ratos. No entanto, Donatti et al. (2013) realizaram o tratamento, com colírio de PRP, de úlceras corneais profundas em coelhos, e observaram maior epitelização no período inicial (dias) da reparação, além da aceleração da cicatrização ao término do tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Vendramin et al. (2010) na enxertia cutânea de coelhos, ou seja, aumento da resposta inflamatória e da intensidade de colagenização com aumento do número de macrófagos e fibroblastos no local enxertado. Neste estudo o aumento da intensidade de colagenização nos grupos tratados com PRP não foi observado aos 19 dias do pós-operatório, e o diâmetro dos vasos nos enxertos autólogos sem tratamento foram moderados em comparação aos tratados com PRP. Por outro lado, Broughton et al. (2006) descreveram o papel fundamental dos macrófagos no debridamento tecidual, corroborando aos achados em G3 e G4 pois os mesmos tratam-se de enxertos homólogos e consequentemente, atuariam como curativos biológicos temporários (Hedlund, 2007), e teriam maiores índices de necrose tecidual observadas histologicamente e maior número destas células.

Em um estudo de enxertos homólogos em cães, observou-se sinal de rejeição inicial do transplante no dia 12. Esta progrediu para a trombose e perda do enxerto nos dias 15 a 30 (Mathes et al., 2010). Essa também foi notada na avaliação histológica de biópsias da pele nos coelhos, aos 19 dias do pós-operatório, corroborando aos achados histopatologia de rejeição celular, evidenciado pela infiltração linfocítica e necrose descritos por Mathes et al. (2010). Achados clínicos e histológicos semelhantes foram encontrados nas amostras coletadas dos enxertos homólogos tratados ou não com PRP.

Em humanos no entanto, a sobrevivência desses transplantes depende de imunossupressão crônica. Mesmo com a utilização desta, todos os pacientes experimentam episódios de rejeição da pele que necessita de terapia adicional e muitas vezes o aumento dos níveis de imunossupressão (Lanzetta et al., 2007). Neste estudo, não foi realizado nenhum grau de imunossupressão, o que explica os resultados negativos sobre os enxertos homólogos usados, os quais atuaram apenas como curativos biológicos temporários. No entanto, considerando os macrófagos e fibroblastos e

momento de avaliação, o PRP também não proporcionou resultado favorável positivo quando comparado ao homólogo sem tratamento.

No experimento realizado ressalta-se maior número de fibroblastos nos grupos G1 e G2 em comparação ao G3 (p=0,04), entretanto sem diferença significativa quando comparados os grupos autólogos tratados ou não. Vendramin et al. (2010) descreveram que o PRP aumenta a proliferação de fibroblastos, diferente do observado neste estudo. A diferença dos grupos autólogos frente ao G3, pode estar associada a presença da necrose tecidual, sendo que dos 9 tecidos analisados, sete apresentaram necrose com ou sem hemorragia.

Krana et al. (2007) relataram efeito positivo do gel de plaquetas nos fibroblastos, sobre o crescimento de fibroblastos dérmicos humanos *in vitro,* durante 5 dias. A ativação das plaquetas e o controle *in vitro* do experimento possivelmente tenham contribuídos para os resultados positivos apresentados. Os mesmos achados não foram encontrados quando utilizou-se o PRP não ativado em enxertos autólogos e homólogos. Ressalta-se que no presente estudo, a análise foi efetuada aos 19 dias do pós-operatório, diferentemente do ápice do processo de reparação descrito como 5 dias após o trauma (Hosgood, 2006).

Segundo Tonnessen et al. (2000), com a evolução do tempo há transformação da matriz extracelular e sua substituição por fibronectina e ácido hialurônico e posteriormente por colágeno I e II. Deste modo, Sethi et al. (2002) descreveram 12 tipos de colágeno, sendo o mais importante o tipo IV. Assim a função do colágeno é promover a força de tensão do tecido cicatricial e modular funções celulares. No G1 (autólogo com PRP) verificou-se discreta formação de colágeno em relação aos demais grupos (p=0,0078), demonstrando que o PRP em enxerto autólogo teve aumento significativo na remodelação tecidual, o que concorda Vendramin et al. (2010).

O diâmetro dos vasos também foi menor no G1 em relação ao G2 (Tab.4), indicando a atuação do PRP nesta variável, aos 19 dias de pós-operatório, entretanto sem diferença significativa entre os enxertos homólogos com ou sem tratamento. Em um trabalho semelhante realizado em ratos Bauer et al (2009) dias, No grupo teste, a vascularização foi menos expressiva no período de 24 horas e maior em ordem crescente nos períodos de 3 dias, 7 dias e 14 dia.

Os grupos autólogos diferenciaram-se do homólogos ($p \leq 0,05$), entretanto sem diferença entre a presença ou não de tratamento com o PRP, ou seja, a presença de necrose/hemorragia foi significativamente maior nos enxertos homólogos, o que já seria

esperado tendo em vista o seu caráter homologo e ausência de imunossupressão realizada, como já foi citado anteriormente (Lanzetta et al, 2007).

A correlação entre as variáveis fibras colágenas, dilatação do vaso, alteração histológica e fibroblasto foram estudadas. Notou-se correlação positiva significativa (p=0,0082) entre a alteração histológica e o número macrófagos, ou seja quanto maior alteração histológica maior o número de macrófagos. A correlação negativa também foi observada entre o número de fibroblastos e macrófagos (p=0,0004). Nas demais variáveis não houve correlação significativa.

A realização da coleta de material para a avaliação histomorfométrica em um único momento (dia19) pode ter contribuído quanto a ausência de comprovação da atuação dos PRP. Outros trabalhos similares que avaliaram o efeito do PRP em ratos identificaram influência positiva na comparação com o grupo controle. As Diferenças foram significativas em relação as variáveis observadas nos períodos iniciais, como três, sete e 14 dias, sendo estas mais expressivas no período de 3 dias e posteriormente seguido pela ordem decrescente (Bauer et al., 2009). Porém, Karayannopoulou et al. (2014), usando como modelo experimental cães, não encontraram diferenças estatísticas na avaliação histológica em retalhos tratados ou não com PRP no dia 4 e 10 após aplicação. Acredita-se que que a coleta de material para a histomorfometria em períodos mais precoces ao procedimento de enxertia seria um aspecto interessante a ser estudado.

Segundo Vendramin et al. (2010), o PRP não ativado com trombina apresentou melhores resultados clínicos e microscópicos em enxertos de coelhos quando comparado ao PRP em gel após sua ativação, resultados estes não observados neste estudo na histopatologia, apesar de ser verificado na fase clínica precoce, associado com a variável coloração.

Mudanças qualitativas e quantitativas das plaquetas podem prejudicar o potencial regenerativo do PRP (Messora et al. 2007). Estudos demonstrando ausência de benefícios do uso do PRP podem ser decorrentes da baixa qualidade do PRP produzido (Max 2004). Neste estudo, com PRP verificou efeitos benéficos na fase inicial no enxerto, na variável coloração.

De acordo com a literatura, o PRP pode ser aplicado diretamente na ferida e exercer seu efeito local (Karayannopoulou et al., 2014). A ativação das plaquetas, necessária para ocorra a liberação dos fatores de crescimento, na teoria poderia ocorrer por meio das substâncias geradas pelo traumatismo do tecido e principalmente pelo colágeno tecidual (Dionyssiou et al., 2013), e baseando-se neste princípio optou-se por

esse método, entretanto Vendramin et al. (2010) questionam se os fatores acima citados seriam suficientes para ativar as plaquetas.

Entretanto, mais estudos devem ser estimulados, em especial considerando a ativação do PRP que eventualmente poderia potencializar a influência positiva nos enxertos aplicados especialmente com relação a sua integração, considerando aspectos clínicos e histopatológicos.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que o projeto foi desenvolvido, pode se concluir que:

O tratamento do enxerto autólogo com o PRP, na forma líquida, promove influência positiva na fase inicial ou de "pega" do enxerto, demonstrada por coloração avermelhada à microscopia e aspecto cosmético comparado aos demais tratamentos; entretanto, não influenciou na secreção.

REFERÊNCIAS

ALIÓ, J.L., ARNALICH-MONTIEL, F., RODRIGUEZ, A.E. The Role of "Eye Platelet Rich Plasma" (E-Prp) for Wound Healing in Ophthalmology. **Current Pharmaceutical Biotechnology,** v.13, p.1257-1265, 2012.

ALMEIDA, A. R. H.; MENEZES, J.A.; ARAÚJO, G. K M.; CORREA, A. V. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. **Revista Brasileira de cirurgia plástica**. v.23 n.2, p. 82-88, 2008.

BAUER, J. A.; CORREA, L.; LIMA, F. L. M.; LIMA, L.A.P.A.; PUSTIGLIONI, F.E.; Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. **Revista de Periodontia**, v. 19, n. 3, p.98-108, 2009.

BERNUZZI, G., TARDITO, S., BUSSOLATI. O, ADORNI D, CANTARELLI, S., FAGNONI, F., ROSSETTI, A., AZZARONE M., FICARELLI, E., GAZZOLA. G., FRANCHINI, M. Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma. **Blood Transfusion**, v. 8, n.4 p. 237-247, 2010.

BOHLING, M.W.; SWAIM, S.F. Skin Grafts. In: **Veterinary Surgery Small Animal.** TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S.A. St Louis: Saunders. 2012, p.1271-1290.

CROVETTI. G.; MARTINELLI, G.; ISSI, M.; BARONE, M.;GUIZZARDI, M.; CAMPANATI, B.; MORONI, M.; CARABELLI, M. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 30, n. 2, p.145-151, 2004.

DIONYSSIOU D, DEMIRI E, FOROGLOU P, et al. The ef- fectiveness of intralesional injection of platelet- rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers. An experimental and clinical study. **International Wound Jounal**; v.10, n. 4, p. 397–406, 2013.

DONATTI, C.; BRANDÃO, C.V.S.; RANZANI, J.J.T.; PERCHES, C.S.; PADOVANI, C.R.; PELLIZZON, C.H.; SERENO, M.G. Uso do plasma rico em plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.65, n.3, p.809-818, 2013.

FOWLER, D Distal limb and paw injuries in SWAIN, S.F; KRAHWINKEL, D.J **Veterinary Clinics of North America Wound management**. Saunders v.36, n.4 p. 819-845, 2006.

HEDLUNG, C.S. Skin Grafts, In: FOSSUM, T.W. **Small animal surgery**, St Louis: Mosby, 2007, p. 224-228.

HERMETO, L.C.; ROSSI, R.; PÁDUA, S. B.; PONTES, E.R.J.; SANTANA, A.E. Estudo comparativo entre a cola de fibrina e o plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27,n.11, p. 789-794, 2012.

KRANA, M.; DOMANOVI, D.; TOMI A.; VAJGER,U.; JERAS, M Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. **Acta Dermatoven APA** v. 16, n. 3, p.105-110, 2007.

LANZETTA, M.;PETRUZZO, P.; DUBERNARD, J.M.; MARGREITER, R.; SCHUIND, F.; BREIDENBACH, W.;NOLLI, R.;SCHNEEBERGER, S.; VAN HOLDER, C; PEI, G.; ZHAO, J.; ZHANG, X. Second report (1998–2006) of the International Registry of Hand and Composite Tissue Transplantation. **Transplant immunology** v.18, n.1, p. 1-6, 2007.

MARTIN, P. Wound healing–aiming for perfect skin regeneration. **Science,** v. 4, n. 276, p. 75-81, 1997.

MATHES, D.W.; NOLAND, M.; GRAVES, S.; SCHLENKER, R.; MIWONGTUM, T.; STORB, R, A Preclinical Canine Model for Composite Tissue Transplantation, **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 26, n.3, p201-207, 2010

MAX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal Oral Maxillo facial Surgery**, v.62, n.4, p. 489-496, 2004.

MESSORA M.R; NAGATA M.J.H., MARIANO R.C., DORNELLES R.C.M., BOMFIM S.R.M., FUCINI S.E., GARCIA V.G.; BOSCO A.F. Bone healing in critical-

668 size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in a rat
669 calvaria. **Journal of Periodontal Research.** v. 43, n. 2, p. 217-223, 2008
670 MISHRA, A.; WOODALL, J. J.R.; VIEIRA, A. Treatment of tendon and muscle using
671 platelet-rich plasma. **Clinical Sports Medicine**, v. 28, n.1, p.113-125, 2009.
672 MOTULKY, H.J. Prism 5 **Statistics Guide,** 2007. GraphPad Software Inc., San Diego
673 CA; Graphpad software Inc. < http://www.graphpad.com >
674 PAVLETIC, M.M , The Skin. In: PAVLETIC, M.M **Atlas of small animal wound**
675 **management and reconstructive surgery 3** ed, Philadelphia: W.B. Saunders; 2010,
676 p.3-15.
677 ROUBELAKIS, M.G.; TROHATOU, O.; ROUBELAKIS, A.;MILI, E.;
678 KALAITZOPOULOS, I.; PAPAZOGLOU, G.; PAPPA, K.I.; ANAGNOU, N.P.
679 Platelet-Rich Plasma (PRP) Promotes Fetal Mesenchymal Stem/Stromal Cell Migration
680 and Wound Healing Process. **Stem Cell Reviews,** v. 10, n.3, p.417-428, 2014.
681 SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **New England Journal of**
682 **Medicine,** v. 341, n. 49, p. 738–746, 1999.
683 SWAIM, S.F. Skin Grafts. In: SLATTER, D.H. **Textbook of small animal surgery**.
684 Cap.2, 2003. 3ed, p.321-338.
685 VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRAM. S.; FRANCO,
686 T.R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização
687 em cirurgia plástica. **Revista do colégio brasileiro de cirurgia**, v. 33, n.1, p. 24-28,
688 2006.
689 VENDRAMIN, S.P.; FRANCO, D.; SCHAMALL, R.F.;FRANC, T.R. Utilização do
690 plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos, **Revista**
691 **Brasileira de Cirurgia Plástica,** v. 25, n. 1, p. 4-10, 2010,
692 WHITE, R.A.S Skin Grafting In: FOWLER, D.; WILLIAMS, J.M. **Manual of canine**
693 **and feline wound management and reconstruction**, Shurdington, BSAVA, p.83-94.
694 1999.
695 ZAR, J.H. Biostatistical Analysis 5 ed. Upper Saddle River New Jersey: Prentice Hall.
696 2010.
697 FINDIKCIOGLU F.;FINDIKCIOGLU K.;YAVUZER R.;LORTLAR N.;ATABAY K.
698 Effect of intraoperative platelet-rich plasma and fibrina glue application on skin flap
699 survival. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.23, n.5, p.1513-1517, 2012.
700 KARAYANNOPOULOU, M.; PAPAZOGLOU, L.G.; LOUKOPOULOS, P.;
701 KAZAKOS, G.; CHANTES, A.; GIANNAKAS, N.; SAVVAS, I.; PSALLA, D.;

KRITSEPI-KONSTANTINOU, M.; DIONYSSIOU, D. Locally injected autologous platelet-rich plasma enhanced tissue perfusion and improved survival of long subdermal plexus skin flaps in dogs **Veterinary comparative orthopedics and traumatology journal** v. 27, n. 5, p.379-386, 2014.