

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS EMPREGADO NA
CIRURGIA RECONSTRUTIVA EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*): AVALIAÇÃO DA EXEQUIBILIDADE DA
TÉCNICA, ACHADOS MACROSCÓPICOS E
HISTOPATOLÓGICOS**

Josiane Moraes Pazzini

Médica Veterinária

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS EMPREGADO NA
CIRURGIA RECONSTRUTIVA EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*): AVALIAÇÃO DA EXEQUIBILIDADE DA
TÉCNICA, ACHADOS MACROSCÓPICOS E
HISTOPATOLÓGICOS**

Josiane Moraes Pazzini
Orientador: Profº Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

2014

Pazzini, Josiane Moraes
P348p Plasma rico em plaquetas empregado na cirurgia reconstrutiva em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*): Avaliação da exequibilidade da técnica, achados macroscópicos e histopatológicos / Josiane Moraes Pazzini. – – Jaboticabal, 2014
xvi 88 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Andriago Barboza De Nardi
Banca examinadora: Paola Castro Moraes, Geórgia Modé Magalhães
Bibliografia

1. Cirurgia reconstrutiva. 2. Coelhos. 3. Ferida. 4. Neo-vascularização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.92

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JOSIANE MORAIS PAZZINI – filha de Antonio Celso Pazzini e Roseli Prado de Moraes Pazzini, nasceu em São José dos Campos – SP, no dia 02 de Dezembro de 1988. Formada pela Faculdade Doutor Francisco Maeda – FAFRAM, em julho de 2012. Em agosto de 2012 iniciou o curso de Mestrado em Cirurgia Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Experimental, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP. Atende no Serviço de Oncologia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP.

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais
Antônio Celso Pazzini e Roseli Prado de Moraes Pazzini,
e a minha irmã Juliana Moraes Pazzini,
que com amor e carinho
sempre me apoiaram na realização do meu sonho*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador

Profº Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Pela sua orientação, incentivo, amizade e contribuição na minha
formação profissional

AGRADECIMENTOS

À DEUS que sempre esteve me guiando e iluminando durante o caminho para que tudo desse certo.

Aos meus familiares pela força e incentivo na minha formação.

Ao meu namorado Eduardo pela força, carinho e compreensão durante toda essa caminhada.

Aos amigos e companheiros das cirurgias, anestesiologia, patologia e estatística, Rafael Ricardo Huppes, Camila Pinto Baltazar da Silveira, Marília Ferreira, Ana Paula Gering, Mayara Luzzi, Rafaela Viéra Bortolotti, Roberta Renzo, Romeu dos Santos, João Ademir de Oliveira.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Serviço de Oncologia Veterinária e a Pós Graduação.

Àqueles que, direta e indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELA.....	xvi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão de literatura.....	2
1.2.1 Feridas	2
1.2.2 Cicatrização das feridas	2
1.2.3 Irrigação da pele	6
1.3 CIRURGIAS RECONSTRUTIVAS	7
1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	9
1.4.1 Obtenção do plasma rico em plaquetas	9
1.4.2 Mecanismo de ativação das plaquetas	11
1.4.3 Fator de crescimento	11
1.5 Referências	13
CAPITULO 2 - Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT	21
2.1 Introdução	23
2. 2 Material e Método.....	24
2.2.1 Instalações.....	24
2.2.2 Seleção dos pacientes	24
2.2.3 Grupos experimentais	25
2.2.4 Protocolo anestésico e obtenção do plasma rico em plaquetas.....	25
2.2.5 Procedimento cirúrgico.....	27
2.2.6 Pós-operatório.....	31
2.2.7 Curativos e avaliação macroscópica	32

2.2.8 Eutanásia e colheita de material	33
2.2.9 Avaliações microscópicas	34
2.2.10 Análise estatística	35
2.3 Resultados e Discussão	36
2.3.1 Preparação do PRP	36
2.3.2 Avaliação física	39
2.3.3 Avaliação macroscópica.....	40
2.3.4 Avaliação microscópica.....	51
2.4 Conclusões.....	60
2.5 Referências	61
ANEXO I.....	66
ANEXO II.....	67
ANEXO III.....	68
ANEXO IV	69
CAPÍTULO 3 – Método de obtenção do plasma rico em plaquetas em coelhos (<i>Oryctogalus cuniculus</i>).....	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT	71
3.1 Introdução	72
3.2 Material e Método.....	73
3.2.1 Seleção dos pacientes	73
3.2.2 Obtenção do plasma rico em plaquetas	74
3.2.3 Análise estatística.....	78
3.3 Resultados e Discussão	79
3.4 Conclusões.....	84
3.5 Referências	85



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 028406/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estimulação da angiogênese com plasma rico em plaquetas, em cirurgias reconstrutivas**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 14 de janeiro de 2013.

Jaboticabal, 14 de janeiro de 2013.

Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa
Vice-Coordenador - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

cm: Centímetro

EGF: Fator de crescimento de endotelial

Fcs: Fator de crescimento

FGF: Fator de crescimento fibroblástico

GC: Grupo controle

GPRP: Grupo plasma rico em plaquetas

HE: Hematoxilina e eosina

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

kg: Quilograma

KGF: Fator de crescimento de queratinócitos

L: Litro

mg: Miligrama

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

PDGF: Fator de crescimento derivado das plaquetas

PPP: Plasma pobre em plaquetas

PRP: Plasma rico em plaquetas

RPM: Rotação por minuto

TGF β : Fator de crescimento transformador beta

μ m: micrômetros

μ L: microlitros

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Imagens fotográficas e esquema ilustrativo da diérese do procedimento cirúrgico de reconstrução em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	29
Figura 2.2	Imagens fotográficas e esquema ilustrativo da síntese do procedimento cirúrgico de reconstrução em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	30
Figura 2.3	Imagem fotográfica da aplicação do gel de plasma rico em plaquetas em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) confeccionado no Laboratório de Patologia Clínica do Curso de pós Graduação em cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	31
Figura 2.4	Resultado da centrifugação para confeccionar o PRP em coelhos submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	38
Figura 2.5	Resultado da avaliação do ganho de peso médio no 1º e no 14º dia dos grupos experimentais submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	39

Figura 2.6	Imagens fotográficas demonstrando as variáveis macroscópicas em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) com 14 dias, que foram significativas entre os grupos ($p<0,05$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	41
Figura 2.7	Imagem fotográfica demonstrando ausência de rubor, necrose e integridade da pele em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) no 3º dia de pós-operatório no GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	42
Figura 2.8	Resultados da avaliação de exsudato em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) no 3º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	43
Figura 2.9	Resultados da avaliação de exsudato em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) no 7º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	44
Figura 2.10	Resultados da presença de rubor no 7º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	45

Figura 2.11	Resultados da coloração da pele em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) no 14º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	46
Figura 2.12	Resultados da presença de exsudato em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) no 14º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	47
Figura 2.13	Aspecto histológico da Intensidade de proliferação vascular na porção distal do flape no grupo GC e GPRP submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	51
Figura 2.14	Aspecto histológico da presença de reação inflamatória em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>). Fotomicrografia óptica da derme de animais do GPRP submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	53
Figura 2.15	Aspecto histológico da proliferação de colágeno, fibroblastos e hemorragia em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>). Fotomicrografia óptica da derme de animais do GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	55

Figura 2.16	Aspecto histológico da intensidade de reepitelização em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>). Fotomicrografia óptica da porção distal derme de animais do GPRP submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	57
Figura 2.17	Aspecto histológico de epitélio alterado em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>). Fotomicrografia óptica da derme de animais do GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	58
Figura 2.18	Aspecto histológico de necrose em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).. Fotomicrografia óptica da derme de animais do GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	59
Figura 3.1	Imagens fotográficas das etapas de obtenção do PRP em coelhos no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	76
Figura 3.2	Resultado da centrifugação para confeccionar o PRP em coelhos submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	81

LISTA DE TABELA

Tabela 2.1	Resultados da contagem plaquetária das amostras sanguíneas de coelhos utilizadas para o preparo do PRP e quantidade de plaquetas obtidas após o enriquecimento realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	36
Tabela 3.1	Resultados da contagem plaquetária das amostras sanguíneas de coelhos utilizadas para o preparo do PRP e quantidade de plaquetas obtidas após o enriquecimento realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.....	79

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

As feridas de pele apresentam alta prevalência no atendimento clínico de pequenos animais. As lesões mais frequentes são de origem traumática, por atropelamento, mordedura, projétil balístico, quedas, queimaduras, assim como as lesões neoplásicas. No entanto, diante de feridas de grandes extensões se faz necessário o uso de técnicas cirúrgicas reconstrutivas, a fim de permitir que o paciente retorne sua rotina normal com maior rapidez e com resultados estéticos satisfatórios. O importante em cirurgias reconstrutivas é escolher a técnica mais apropriada para cada situação, evitando o aparecimento de complicações e custos desnecessários (FOSSUM 2007; PAVLETIC 2010).

Em virtude de muitos problemas relacionados com a neo-vascularização em procedimentos cirúrgicos, alguns estudos já foram realizados em diversas áreas médicas, principalmente em ortopedia e odontologia, com o plasma rico em plaquetas (PRP) (SILVA et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2012; GARCEZ et al., 2013). Esse produto é resultado do processamento do sangue do paciente em centrífugas que promovem a separação dos seus constituintes e permite a extração do plasma com uma concentração maior de plaquetas. Estudos têm sugerido que a utilização do plasma de plaquetas potencializa o processo de cicatrização tecidual, por meio da liberação de mediadores biológicos denominados fatores de crescimento no local da aplicação. Acredita-se que eles sejam capazes de estimular vários processos envolvidos na recuperação tecidual entre eles a mitose e diferenciação celular, a quimiotaxia e angiogênese (SOMMELING et al., 2013).

Dessa forma, delineou-se um estudo a fim de utilizar o gel produzido a partir do plasma rico em plaquetas (PRP) em cirurgias reconstrutivas, para avaliar a possibilidade de favorecer a integração do retalho no leito receptor por meio da estimulação da angiogênese, bem como a redução de necrose na extremidade dos flapes.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Feridas

De acordo com Slatter (2007), ferida é uma lesão ocasionada pela perda da continuidade normal do tecido. Já o trauma, por definição, consiste de lesão física ou ferimento causado por força externa ou violência. No entanto, o trauma é usado para indicar os aspectos gerais de uma lesão física, enquanto ferida é usado para descrever com maior especificidade a lesão (PAVLETIC, 2010).

As feridas na pele, tecido subcutâneo, e musculatura estão entre as lesões mais comuns na veterinária, e podem ser divididas em duas categorias: acidentais e cirúrgicas. As acidentais são decorrentes da ação de um agente físico do meio exterior, como lesões provocadas por acidentes automobilísticos, traumas, mordedura, e arma de fogo. As feridas cirúrgicas compreendem não apenas as resultantes de intervenção cirúrgica, mas também aquelas ocasionadas por métodos terapêuticos como injeção, punção, biópsia, desbridamento ou exérese cirúrgica (REMY, 1994).

Todas as feridas são resultados da absorção da energia transferida para o corpo, seja a partir de um projétil, corrente elétrica, ou pelo cirurgião por meio do bisturi. A gravidade da lesão depende da força da fonte de energia, como é dispersado para o corpo, e o tecido específico que irá absorver a energia. O conhecimento dos processos de reparação de feridas é essencial para que haja abordagem cuidadosa no tratamento (PAVLETIC, 2010).

1.2.2 Cicatrização das feridas

De acordo com Albuquerque e colaboradores (2008), a cicatrização de feridas é resultado do conjunto de fenômenos celulares, moleculares, fisiológicos e bioquímicos, que por meio da quimiotaxia, neovascularização, proliferação, depósito e reorganização da matriz extracelular levam a reparação da ferida.

Um ponto importante no processo de cicatrização é a angiogênese, a qual consiste na formação de novos vasos. É responsável pela sobrevivência dos fibroblastos, os quais necessitam de circulação adequada para se multiplicarem e sintetizarem o colágeno, auxiliando no processo de reepitelização (PAVLETIC, 2010).

Durante a cicatrização das feridas ocorrem três processos fundamentais na consolidação da lesão, a inflamação, a proliferação (reepitelização, síntese da matriz e neo-vascularização) e maturação. Entretanto, isso não significa que as fases aconteçam em uma sequência, sendo assim, na maioria das vezes são fenômenos que ocorrem concomitantemente (TAZIMA et al., 2008).

A fase inflamatória tem como característica ativar o sistema de coagulação, promover o desbridamento e defender a ferida contra bactérias. Essa fase é caracterizada pelos sinais comuns do processo inflamatório: calor, rubor, dor e tumor, que ocorrem principalmente pela vasodilatação local, extravasamento de líquido para o espaço extravascular e a oclusão dos vasos linfáticos (SWAIM, 1980).

Segundo Slatter (2007), a fase inflamatória da cicatrização inicia-se no exato momento da lesão, ocorrendo a liberação de células inflamatórias no tecido, devido à hemorragia. Nessa fase ocorre a hemostasia do local lesionado por meio da ação de mediadores químicos oriundos da degranulação dos mastócitos (LEFKOVITS et al., 1995). Depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (TERKELTAUB et al., 1998). O resultado dessa sequência é a formação do trombo hemostático rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial (LEFKOVITS et al., 1995).

Em seguida, as plaquetas são ativadas por grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sanguínea. O colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação são fortes agonistas da ativação e agregação plaquetárias e ativação do processo de coagulação, transformando o fibrinogênio em fibrina, iniciando a formação de matriz provisória (DAVIES, 1990). Nesta etapa ainda ocorrem os eventos inflamatórios, predominando a fagocitose através de células granulocíticas

(polimorfonucleares) e macrófagos (mononucleares), caracterizando-se assim as etapas granulocítica e macrofágica, respectivamente (SLATTER, 2007).

De acordo com Slatter (2007), na etapa granulocítica, ocorre atração dos neutrófilos por substâncias quimiotáticas decorrentes dos produtos da clivagem dos complementos C3a e C5a, da fibrina e do colágeno que se desenvolvem durante a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea. Após atingirem o local da lesão, liberam enzimas proteolíticas como as collagenases, as elastases e as hidrolases ácidas. Devido a presença de todos estes elementos, o resultado é a ocorrência da fagocitose das bactérias, a decomposição de tecido necrótico e a limpeza da área lesada.

Na etapa macrofágica, os macrófagos são atraídos para o local lesionado pelos mesmos fatores quimiotáticos dos granulócitos. Na área lesada, os macrófagos são responsáveis pela fagocitose e também secretam substâncias biologicamente ativas como as proteases (enzimas digestivas) que atuam na remodelação da matriz extracelular; eles liberam também substâncias vasoativas e diversos fatores de crescimento, que desempenham papel importante nas fases subsequentes do processo (RODRIGUES et al., 2001; CÂNDIDO, 2007).

A fase proliferativa é responsável pela união das bordas da lesão. Nessa fase, os eventos importantes que ocorrem são a fibroplastia, neo-angiogênese, e reepitelização. A fase de fibroplastia é de intensa síntese de colágeno, o qual é responsável pela força da cicatriz e é substituído ao longo das semanas devido à formação de ligação cruzada entre os feixes de colágeno (MEDEIROS, 2005).

A formação de tecido de granulação (fibroblastos, células inflamatórias, componentes neovasculares, fibronectina, glicosaminoglicanas e colágeno) é muito importante, e os fibroblastos estão diretamente relacionados com a formação desse tecido de granulação. Além de produzir colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (VAN WINKLE, 1967). A eficiência de todas as atividades exercida pelo fibroblasto é necessária na formação de novos vasos sanguíneos (KNIGHTON et al., 1981).

A neo-angiogênese compreende a formação de novos vasos sanguíneos, responsáveis em manter o ambiente da cicatrização da ferida. Os novos vasos se formam em virtude de brotos endoteliais sólidos, capazes de migrar da periferia da ferida para o centro, sobre a malha de fibrina depositada em seu leito (MEDEIROS, 2005). A formação de neocapilar nesta fase resulta da liberação de fatores angiogênicos secretados pelos macrófagos que estimulam a proliferação de células endoteliais dos vasos sanguíneos (TAZIMA, et al., 2008).

Entretanto, a angiogênese é um processo complexo e depende de quatro fenômenos interrelacionados como: alteração no fenótipo celular, quimiotaxia, estimulação mitogênica e desenvolvimento local de uma matriz extracelular. O crescimento e os fatores quimiotáticos ocorrem dentro da ferida através da liberação de enzimas endoteliais, porém o ambiente local da ferida também é visto como um agente potencializador da angiogênese, através de alguns fatores que ocorrem como a pressão diminuída de oxigênio, presença de aminas e ácido láctico. Esta condição de hipóxia, e altas concentrações de ácido láctico são capazes de atrair os macrófagos para produzirem e secretarem fatores angiogênicos para a ferida (PAVLETIC, 2010).

Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenase e ativador de plasminogênio. Essas enzimas promovem hidrólise da membrana basal, liberando as células endoteliais, que permitem a migração e proliferação, formando novos vasos que migram em direção a região da lesão. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que em seguida uni-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (OLIVEIRA et al., 2010).

Já a fase de reepitelização ocorre nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão. Nessa fase, ocorre a migração de queratinócitos não danificados para as bordas da ferida e dos anexos epiteliais, os quais são responsáveis em restabelecer a integridade da epiderme e da derme, caracterizando-se pela granulação e reepitelização do tecido. A proliferação epitelial é proveniente da estimulação mitogênica e quimiotática do fator de crescimento transformador beta (TGF β), fator

de crescimento de epitelial (EGF) e fator de crescimento de queratinócitos (KGF) que serão responsáveis pela proliferação das células do epitélio, sendo capazes de sintetizar diversas citocinas que estimulam a cicatrização das feridas (MEDEIROS, 2005).

A fase de maturação ou contração ocorre por volta da 3ª semana, sendo caracterizada pelo aumento da resistência, sem aumento da quantidade de colágeno. Nessa fase, ocorre um processo de substituição dos tecidos lesados por cicatriz funcional (TAZIMA et al., 2008). A contração envolve o movimento do tecido existente na borda da ferida, e não a formação de nova pele (SWAIM, 1980).

Ao final desta etapa, o leito da ferida está completamente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática está se regenerando. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras de colágenas começando a melhorar a aparência da cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987).

1.2.3 Irrigação da pele

A irrigação da derme ocorre por meio da microcirculação cutânea, por pequenas artérias terminais que se ramificam progressivamente até originarem as arteríolas e metarteríolas e por fim, os capilares. Os capilares arteriais desembocam no sistema vascular venoso, dando origem às pré-vênulas, vênulas e pequenas veias (SLATTER, 2007).

Os vasos cutâneos são formados pelo plexo subdérmico, cutâneo e subpapilar. O subdérmico é caracterizado por ser o mais profundo, responsável em nutrir glândulas, folículo piloso e seus músculos eretores. Os vasos cutâneos são classificados como intermediários, que nutrem as glândulas sebáceas, as redes de capilares, os folículos, as glândulas tubulares e os músculos. Já os vasos subpapilares ou superficiais, são menos desenvolvidos, tendo apenas a função de suprir o interior da epiderme (FOSSUM, 2007).

1.3 CIRURGIAS RECONSTRUTIVAS

As feridas de grandes extensões provocadas por traumas, anormalidades congênitas e neoplasias que resultam em perda da viabilidade dos tecidos e retardo na cicatrização por segunda intenção, são casos onde se faz necessário o emprego de técnicas cirúrgicas reconstrutivas. Entretanto, o sucesso da técnica irá depender da extensão da lesão e a quantidade de estruturas comprometidas (SLATTER, 2007). No entanto, as cirurgias reconstrutivas devem ser planejadas, considerando a localização do ferimento, a elasticidade do tecido disponível, o suprimento sanguíneo e a qualidade do leito da ferida (FOSSUM, 2007).

Durante a execução das cirurgias reconstrutivas é fundamental a preservação da microcirculação da pele, para manutenção de sua viabilidade (MOTA et al., 2012). No entanto, quando a microcirculação não é preservada, em virtude de manipulação cirúrgica inadequada, pode-se iniciar um processo de isquemia, e posteriormente levar à necrose local da região cirúrgica comprometendo todo o procedimento (SLATTER, 2007; AMSELLEM, 2011).

Segundo Pavletic (2007), feridas que apresentam dificuldade em serem restauradas por suturas primárias, devem ser tratadas com técnicas reconstrutivas, podendo-se adotar flape cutâneo para correção. O emprego dessa técnica é alternativa terapêutica útil para reconstruir lesões resultantes de traumatismo, remoção de tumores, ou isquemias.

O flape consiste numa porção de tecido removido parcialmente do seu local de origem e transferido para outro (leito receptor) onde irá cobrir o defeito. A grande vantagem de se empregar os flapes cutâneos é devido ao fato deles permitirem a cobertura imediata da região afetada e reduzirem o tempo de cicatrização do tecido, proporcionando ao paciente melhores resultados estéticos e funcionais (HEDLUND, 2005).

De acordo com Pavletic (2010) os flapes mais utilizados em medicina veterinária são os de avanço, que podem ser pedículo único, bipediculado, H-plastia e Y-V, entretanto, ainda podem ser utilizados os flapes de transposição, interpolação, bolsa, dobradiça ou rotacional. Outras modalidades também podem ser

empregadas como os flapes de padrão axial, sendo esses representados de diversas formas de aplicação, como o modelo omocervical, toracodorsal, temporal superficial, entre outros.

Os retalhos de padrão axial proporcionam ao cirurgião a transferência segura de amplos segmentos cutâneos em um único estágio, sem a necessidade de prorrogação da intervenção (SLATTER, 2007). Esse tipo de flape é constituído por uma artéria e veia cutânea direta em sua base, e geralmente esses retalhos são retangulares ou em “L” (FOSSUM, 2007).

Os flapes de padrão axial toracodorsal são preferíveis em alguns casos, em virtude de serem mais robustos. São usados para corrigir defeitos que envolvem ombros, membros torácicos, cotovelos, axilas e tórax. É constituído de um ramo cutâneo da artéria toracodorsal e da veia associada, localizadas na depressão escapular caudal. Devido à presença de uma artéria calibrosa associada ao retalho, o mesmo pode ser utilizado para revestir defeitos maiores (SLATTER, 2007).

A realização da cirurgia reconstrutiva utilizando os retalhos de padrão axial requer planejamento adequado e cuidadoso, sendo recomendado fazer marcações prévias antes de incisar o tecido. Atribuindo tais cuidados durante o procedimento, as taxas de sobrevivência do retalho apresentam-se duas vezes maiores quando comparado com procedimentos utilizando os retalhos comuns sem planejamento, mas é importante ressaltar que complicações podem surgir como drenagem de secreção purulenta da ferida, deiscência parcial de sutura, necrose distal do retalho, infecções e formação de seroma (SLATTER, 2007; PAVLETIC, 2010).

Segundo Almeida e colaboradores (2007), a vascularização do flape é ponto importante e muito discutido, as proporções de comprimento e largura determinam sua viabilidade, pois quando este é extenso, ocorre comprometimento vascular e as regiões das extremidades ficam sem irrigação sanguínea, ocasionando a necrose nas margens distais do flape. Diante desse problema, muitos autores (VENDRAMIN et al., 2006) têm relatado o uso de componentes que visam melhorar a viabilidade do retalho, por meio da estimulação de angiogênese, a qual tem sido promovida pelo emprego do plasma rico em plaquetas (PRP) nas feridas cirúrgicas associado ao emprego de técnicas reconstrutivas em seres humanos.

1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto obtido pela centrifugação do sangue autógeno, que resulta em maior concentração de plaquetas em menor volume de plasma (PAGLIOSA E ALVES, 2007; SOMMELING et al., 2013). A comprovação da eficácia do uso do plasma rico em plaquetas é motivo para muitos estudos (SILVA et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2012; GARCEZ et al., 2013), visto que poucos são os experimentos relacionados ao plasma rico em plaquetas em medicina veterinária, justificado desta forma a realização de novos estudos com animais (MAIA E SOUZA, 2009; VENDRAMIN et al., 2010).

A produção do plasma rico em plaquetas inicialmente foi utilizada para reduzir a ocorrência de hemorragias durante a realização de procedimentos cirúrgicos, entretanto, o seu uso foi tornando-se cada vez mais difundido nas diversas modalidades cirúrgicas humanas, e em 1998, foi publicado um artigo relatando o sucesso da cicatrização de enxertos ósseos quando associados ao plasma rico em plaquetas (ALBUQUERQUE et al., 2008). Com esse episódio, o produto passou a ser usado com sucesso em cirurgias ortopédicas, cardíacas, plásticas, geral, vascular, neurológica, obstétrica, ginecológica e oftálmica (MARX, 2004; VENDRAMIN et al., 2010).

1.4.1 Obtenção do plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas é visto como produto de fácil obtenção e de baixo custo, entretanto, quando começou a ser produzido, sua obtenção era mais complexa e de alto custo, por necessitar de máquinas automatizadas e kits específicos (MAIA E SOUZA, 2009). Em virtude da dificuldade da obtenção do PRP, alguns protocolos foram criados para se obter pequenas quantidades do produto, utilizando-se centrífugas comuns e reduzindo consideravelmente os custos na preparação do hemoderivado (EFEOGLU et al., 2004).

Segundo Camargo et al. (2002), a obtenção do plasma rico em plaquetas de baixo custo e fácil obtenção consiste inicialmente na centrifugação, a qual pode ser

realizada em um único momento ou em duas etapas, dependendo dos protocolos empregados. Entretanto, Anitua (1999) preconiza o protocolo de única centrifugação, embora o aumento na concentração de plaquetas obtidas com esse procedimento não tenha sido demonstrado.

No entanto, o protocolo de dupla centrifugação é capaz de elevar a concentração das plaquetas durante o preparo do PRP. Nesse protocolo, a primeira etapa da centrifugação resulta na formação de três camadas dentro do tubo, sendo a parte superior composta pelo plasma pobre em plaquetas (PPP) 80%, a fração mediana constitui-se do plasma rico em plaquetas e parte inferior contém as hemácias, as quais tendem a depositar no fundo por terem peso estrutural maior (CAMARGO et al., 2002; FERRAZ et al., 2007; NUNES FILHO et al., 2007). Em seguida, é realizado o descarte das hemácias com uma pipeta, restando no tubo apenas o plasma, o qual é centrifugado novamente, e irá resultar na decantação das plaquetas e de poucas hemácias no fundo do tubo. Após este processo, a parte superior constitui em média de 80% de plasma pobre em plaquetas (PPP), que deve ser descartado, o botão plaquetário no fundo do frasco, deve ser resuspendido no restante do plasma, originando o plasma rico em plaquetas (PRP) (CAMARGO et al., 2002).

Após sua produção, deve-se realizar a contagem das plaquetas, sendo fundamental que a contagem seja superior ao do sangue total para que ocorra a adequada liberação dos fatores de crescimento no local da sua aplicação (PAGLIOSA E ALVES, 2007). A contagem deve apresentar concentração de plaquetas superior a 1.000.000/ μ L, que pode ser realizada em máquina automática, no hemocitrômetro ou ainda por contagem indireta em esfregaço sanguíneo (LEMOS et al., 2002)

Em seguida, é necessário ativar as plaquetas, por meio do processo de degranulação e conseqüentemente liberação dos fatores de crescimento (ALBUQUERQUE et al., 2008). Alguns protocolos recomendam a ativação das plaquetas com adição da trombina bovina, trombina autógena, tromboplastina ou gluconato de cálcio. Isso resulta na formação de substância gelatinosa similar a um trombo denominada gel de plaquetas (BOLTA, 2007).

O sucesso na obtenção do plasma rico em plaquetas se dá por boas práticas de coleta e centrifugação com precisão, sendo que, a fragmentação inadequada das plaquetas e a liberação precoce dos fatores de crescimento na solução reduz a eficácia do PRP. No entanto, a ativação das plaquetas deve ser realizada apenas na hora da aplicação do produto, pois após as plaquetas serem ativadas a liberação dos fatores de crescimento (FCs) ocorre imediatamente. Logo após a liberação dos FCs, o produto adquire uma consistência gelatinosa, a qual proporciona mais facilidade durante a aplicação no local desejado (ALBUQUERQUE et al., 2008).

1.4.2 Mecanismo de ativação das plaquetas

De acordo com Reece e Swenson (2006), o mecanismo de ativação das plaquetas consiste em mudar seu formato, para que apresente novas projeções membranosas, que partem da sua superfície conhecida como pseudópodes e os grânulos localizados no seu interior sejam rompidos levando a liberação do seu conteúdo. Os grânulos são responsáveis por secretarem mediadores biológicos após a ativação das plaquetas, as principais substâncias liberadas são a trombina, tromboxano A², adenosina difosfato, tromboplastina, fatores de coagulação, cálcio, serotonina, histamina, fator de Von Willebrand, fibrinogênio e catecolaminas. Entretanto, a substância mais importante na produção do plasma rico em plaquetas é o fator de crescimento (FC) (BOLTA, 2007; GOBBI E VITALE, 2012).

1.4.3 Fator de crescimento

Segundo Santos (2007) a produção do fator de crescimento ocorre em diversas células e tecidos como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, osteoblastos, leucócitos, glândulas salivares e lacrimais, entre outros. No entanto, em grande parte dos estudos que são realizados, as plaquetas são alvo de maior interesse, por serem relativamente de fácil obtenção e por possuírem outras substâncias importantes no processo de regeneração e reparação tecidual.

Os fatores de crescimento produzidos pelas plaquetas são fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador

beta (TGF β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (BOLTA, 2007). Dentre todos os fatores de crescimento, os mais abundantes e encontrados nos grânulos α -plaquetários, que apresentam atividades específicas como angiogênese, mitogênese e ativação dos macrófagos, são os fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF β) (CAMARGO et al., 2002).

As funções exercidas pelos fatores de crescimento são muito importantes para o funcionamento do organismo, sendo que a angiogênese adquire maior importância quando se trata de cicatrização de feridas cirúrgicas e redução das complicações pós-operatórias, principalmente a isquemia tecidual (CLIFFORD et al., 2001).

Pesquisas como estas são importantes para a elaboração de novos compostos terapêuticos que possam ser empregado em cirurgias reconstrutivas, visando à redução do índice de necrose após a execução do procedimento cirúrgico.

1.5 Referências¹

ALBUQUERQUE, D.P; OLIVEIRA, T.M.F; MARANHÃO FILHO, A.W.A; MILHOMENS FILHO, J; GUSMÃO, E.S. Aplicação clínico cirúrgica do plasma rico em plaquetas – estudo revisional. **Odontologia Clínica e Científica**, v.7, n.2, p. 119-122, 2008.

ALMEIDA, K.G; FAGUNDES, D.J; MANNA, M.C.B; MONTERO, E.F.S. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.6, 2007.

AMSELLEM, P. Complications of Reconstructive Surgery in Companion Animals. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 41, p. 995-1006, 2011.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use the preparation of sites for implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.14, n. 4, p. 529-535, 1999.

BOLTA, P.R.Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatoven APA**, v.16, n.4, p.156-165, 2007.

CÂNDIDO, L. C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Editora SENAC, p. 282, 2007.

CAMARGO, P.M; LEKOVIC, V; WEINLAENDER,M; VASILIC, N; MADZAREVIC, M; KENNEY, E.B. Platelet rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **Journal Periodontal Research**, v.37, p. 300-306, 2002.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

CLIFFORD, C.A; HUGHES, D; BEAL, M.W; MACKIN, A.J; HENRY, C.J; SHOFER, F.S; SORENMO, K.U. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, n. 2, p.131-135, 2001.

DAVIES, M.J. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. **Circulation**, v.82, p.38-46, 1990.

EFEUGLU, C.; AKCAY, Y.D.; ERTÜRK ,S. A modified method for preparing platelet rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.1, p.1403-7, 2004.

FERRAZ, V.C.M; FERRIGNO, C.R.A; SCHMANEDECHE, A. A platelet concentration of platelet rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Brazilian Journal Veterinary Research of Animal Science**, v. 44, n. 6, p.435-440, 2007.

FOSSUM, T.W (2007). **Cirurgia de pequenos animais**: In: HEDLUND, C.S. Cirurgias reconstrutivas. 3.ed. São Paulo: Roca. Cap.18, p. 135-186, 2007.

GARCEZ, T.N.A; PAZ, A.H.R; MAGRISSO, A.B; MELLO, H.F; GONÇALVES, F.C; MEYER, F.S; CONTESINI, E.A; CIRNE-LIMA, E.O. Comparação entre três protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) utilizando coelho como modelo experimental. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.1134, 2013.

GOBBI, G; VITALE, M. Platelet – Rich Plasma preparations for biological therapy: Applications and limits. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 22, p.10–15, 2012.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts on superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. **Revista de Odontologia da Universidade do Estado de São Paulo**, v.1, p. 6-8, 1987.

HEDLUND, C.S. Cirurgia do Sistema tegumentar. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 18, p.135-230.

KNIGHTON, D.R; SILVER, I; HUNT, T.K. Regulation of wound healing angiogenesis effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, p. 262-270, 1981.

LEFKOVITS, J; PLOW, E.F; TOPOL, E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **The New England Journal of Medicine**, v.332, p. 1553-1559, 1995.

LEMOES, J.J; JUNIOR ROSSI, R; PÍSPICO, R. (2002). **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado**. Disponível em: [HTTP://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id-225](http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id-225). Acesso em 21.09.12.

MAIA, L; SOUZA, M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1267-1274, 2009.

MARX RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.4, p.489-96, 2004.

MEDEIROS, C.A.F. Tratamento de úlcera varicose e lesões de pele com Calêndula officinalis e/ou com Stryphnodendron barbatiman (veloso) martius. **Revista de Ciência Farmacêutica**, São Paulo, v.17, p.181-186, 2005.

MOTA, A.K.R; LACERDA, M.A; ALEIXO, G.A; ANDRADE, L.S.S; COELHO, M.C.C.O. Integração de retalhos de plexo subdérmico para o recobrimento de feridas traumáticas em membros de cães – Avaliação clínica. **Medicina Veterinária**, v.6, n.2, p.1-9, 2012.

NUNES FILHO, D.P; LUPPINO, F; YAEDÚ, R.Y.F; CARVALHO, P.S.P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implate News**, v.4, n.3, p.263-262, 2007.

OLIVEIRA, L.B.O; GOMES, C.F; BAMPI, V. RHEINGANTZ, M.G; SOUZA, M.A.L. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Vittalle**, v.22, n.2, p.11-22, 2010.

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

PAVLETIC, M.M. Tegumento. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. Vol.I. São Paulo: Manole, 2007, Cap.23, p. 292-321.

PAVLETIC, M.M. **Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. In:_____. Axial parttner skin flaps. 3.ed. Iowa: Wiley – Blackwell, Cap. 13, p. 357– 378, 2010.

REECE, W.O; SWENSON, M.J. Composição e funções do sangue. In: REECE, W.O. **Dukes/Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap.3, p.24-48.

REMY, D. Classification et traitement des plaies: Chirurgie tissus mous. **Encyclopedie Vétérinaire**, 800, p.1-6. 1994.

RODRIGUES, F. R; CÂNDIDO, L. C; ASSAD, L. G; COSTA, M. C. A; COUTINHO, V. L. Curativos em cirurgia. In: MARQUES, R. G. **Cirurgia – instrumental e fundamentos técnicos**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p. 359-374.

SANTOS, L.A.U. **Efeitos da utilização do plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos**. 2007. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2007.

SILVA, R.F; REZENDE, C.M.F; PAES-LEME, F.O; CARMONA, J.U. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 43, p. 95-98, 2011.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais: Pele e órgãos anexos**. 3.ed. São Paulo: Manole.,Cap.22, p. 304-309, 2007.

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

SWAIM, S.F. Wound healing. In: SWAIM S.S. (Ed): **Surgery of traumatized skin: Management and reconstruction in the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 70, 1980.

TAZIMA, M.F.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIAY, T. **Biologia da ferida e cicatrização**. In: Simpósio: fundamentos em clínica cirúrgica - 1ª Parte, Medicina, Ribeirão Preto, v.41, n.3, p. 259-64, 2008.

TERKELTAUB, R.A; GINSBERG, M.H. Platelets and response to injury. In: CLARK, R.A.F; HENSON, P.M. (Ed). **The molecular and cellular biology of wound repair**, New York: Plenum Press, p.3-33, 1998.

VAN WINKLE, W. Jr. The fibroblast in wound healing. **Surgery Gynecology & Obstetrics**, v.124, n.2, p. 369-386, 1967.

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

VENDRUSCOLO, C.P; CARVALHO, A.M; MORAES, L.F; MAIA, L; QUEIROZ, D.L; WATANABE, M.J; YAMADA, A.L; ALVES, A.L. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.2, p.106-110, 2012.

CAPITULO 2 - Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMO - Feridas de grandes extensões, com perda da viabilidade tecidual e retardo na cicatrização por segunda intenção são casos que se faz necessário o emprego de técnicas cirúrgicas reconstrutivas. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto com maior concentração plaquetária, adjuvante no processo cicatricial de cirurgias reconstrutivas, auxiliando nos processos de hemostasia e estimulação da angiogênese. Dessa forma, delineou-se um estudo a fim de avaliar a eficácia do uso do gel produzido a partir do plasma rico em plaquetas (PRP) em flapes de avanço de padrão axial toracodorsal em coelhos, para avaliar a possibilidade de favorecer a integração do retalho no leito receptor. Utilizaram-se 30 coelhos da raça Nova Zelândia branco, separados em dois grupos de 15 animais, compreendendo os grupos plasma rico em plaquetas (GPRP), na qual empregou-se o gel antes da síntese da ferida cirúrgica, e controle (GC), na qual utilizou-se apenas solução fisiológica. Para obtenção do PRP, coletou-se sangue dos animais, e determinou-se a contagem plaquetária antes da preparação do gel. No início e término do experimento os animais foram pesados para posterior análise de ganho peso médio. Após o procedimento cirúrgico iniciou-se as avaliações macroscópicas no 3º, 7º e 14º dia, e avaliou-se presença ou ausência de exsudato, integridade da pele, edema, rubor e necrose. Após esta etapa, coletou-se o material da ferida cirúrgica para confecção das lâminas histológicas e posterior avaliação microscópica. Avaliou-se a proliferação vascular, presença de células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, colagenização, reepitelização e hemorragia. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (Teste t Student, t emparelhado, e Kruskal Wallis, sendo $p < 0,05$). O ganho de peso médio não foi significativo entre os grupos; a concentração plaquetária da amostra final do PRP foi significativamente maior quando comparada com a inicial; exsudato e necrose foram significativamente maior no grupo controle quando comparado ao grupo PRP; proliferação vascular e

reepitelização foram significativamente maior no grupo PRP, enquanto que a presença de mononucleares, polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos, colagenização e hemorragia não foram significativas entre os grupos. Obteve-se no terceiro dia, diferença significativamente maior quanto à variável exsudato no grupo controle quando comparado ao grupo PRP, no sétimo dia exsudato e rubor foram significativamente maior no grupo controle, e ao décimo quarto dia exsudato e integridade da pele foram significativamente maior no grupo controle. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a utilização do plasma rico em plaquetas na forma de gel em cirurgia reconstrutiva foi capaz de estimular a angiogênese na ferida favorecendo o processo de cicatrização.

Palavras – chave: Cirurgia reconstrutiva, ferida, neo-vascularização

ABSTRACT - Wounds of large tracts with loss of tissue viability and delayed healing by secondary intention are cases where it is necessary the use of reconstructive surgical techniques. The platelet rich plasma (PRP) is a product with a higher platelet concentration, adjuvant in the healing process of reconstructive surgeries, assisting in the processes of hemostasis and stimulation of angiogenesis. Thus, a study was devised to assess the efficacy of the gel produced from the platelet rich plasma (PRP) in the forward axial flaps thoracodorsal pattern in rabbits to evaluate the ability to promote the integration of the flap the recipient bed. We used 30 white rabbits New Zealand, separated into two groups of 15 animals, comprising the platelet rich plasma groups (GPRP), in which we used the gel before the synthesis of the surgical wound , and control (CG), in which only saline was used. To obtain the PRP, the blood was collected from the animals, was determined and the platelet count before preparation of the gel. At the beginning and end of the experiment the animals were weighed for analysis of average weight gain. After surgery began macroscopic in the 3rd, 7th and 14th day reviews, and we assessed the presence or absence of exudate, skin integrity, edema, redness and necrosis. After this step, yielded the material for the manufacture of surgical wound, followed by microscopic histological slides. We evaluated vascular proliferation, presence of polymorphonuclear and mononuclear cells, fibroblast proliferation, collagen deposition, reepithelialization and hemorrhage. The data were subjected to statistical analysis (Student t test, t paired, and Kruskal Wallis test, and $p<0.05$). The average weight gain was not significant between the groups; platelet concentration in the final sample of PRP was significantly higher when compared with the original; exudate and necrosis were significantly higher in the control group compared to PRP group, vascular proliferation and reepithelialization were significantly greater in PRP group, whereas the presence of mononuclear cells, polymorphonuclear cells, proliferation of fibroblasts, collagen and hemorrhage were not significant between groups. Obtained on the third day, as the difference significantly greater exudate variable in the control group compared to the PRP group; on the seventh day exudate and flushing were significantly higher in the control group, and the fourteenth day exudate and integrity of the skin were significantly higher in the control group. The results of this study

showed that the use of platelet rich plasma gel in the form of reconstructive surgery was able to stimulate angiogenesis in the wound favoring the healing process.

Key – words: Reconstructive surgery, wound, revascularization

2.1 Introdução

Segundo Pavletic (2007), o conhecimento anatômico da pele é fundamental no momento da aplicação de técnicas cirúrgicas reconstrutivas. Entretanto, em cães e gatos, a escolha pelo emprego de flapes cutâneos é dificultada, pois muitas vezes a neovascularização apresenta-se comprometida após a realização do procedimento cirúrgico. É importante ressaltar que a aplicação da mesma técnica em humanos apresenta resultados satisfatórios, devido a conformação anatômica dos vasos músculo cutâneos deslizarem-se perpendicularmente à superfície da pele e encontrarem-se em maior quantidade quando comparado com cães e gatos. Dessa forma, a melhor técnica cirúrgica reconstrutivas em cães e gatos ainda são os “flapes” deslizantes, devido à vascularização acompanhar um segmento de pele (PIPPI, 2009).

As feridas de grandes extensões provocadas por traumas, anormalidades congênitas e neoplasias, que apresentam a perda da viabilidade dos tecidos e demoram a cicatrizar por segunda intenção, são casos onde se faz necessário o emprego de técnicas cirúrgicas reconstrutivas. Entretanto, o sucesso da técnica irá depender da extensão da lesão e a quantidade de estruturas comprometidas (SLATTER, 2007; PAVLETIC, 2010).

Em muitos estudos, o plasma rico em plaquetas (PRP) é tido como produto adjuvante no processo cicatricial de cirurgias reconstrutivas, devido ao seu potencial auxílio nos processos de hemostasia e estimulação da formação de novos vasos sanguíneos (NUNES FILHO et al., 2007; VENDRAMIN et al., 2010).

O PRP é obtido por meio da centrifugação do sangue autógeno, que resulta em maior concentração de plaquetas em menor volume de plasma (PAGLIOSA E ALVES, 2007; SOMMELING et al., 2013). A comprovação da eficácia do uso do plasma rico em plaquetas já foi demonstrada em vários estudos (BAUER et al., 2009; SILVA et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2012; GARCEZ et al., 2013) e ainda pesquisadores buscam o conhecimento da eficácia dos efeitos biológicos do PRP quando aplicado em tecidos moles, osso e tegumento (ANITUA, 2007).

Objetivou-se avaliar a eficácia do uso do gel produzido a partir do plasma rico em plaquetas (PRP) em flapes de avanço de padrão axial toracodorsal. Bem como avaliar a angiogênese local onde o procedimento foi realizado, a redução da ocorrência de necrose na extremidade dos flapes e ainda avaliar a eficácia da fase reparação e integração do retalho no leito receptor em coelhos da raça Nova Zelândia Branco.

2. 2 Material e Método

2.2.1 Instalações

Os procedimentos cirúrgicos deste estudo foram realizados no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal.

As lâminas destinadas à análise histológicas foram confeccionadas no Laboratório VetPat em Campinas – SP.

2.2.2 Seleção dos pacientes

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal².

O modelo experimental utilizado para a realização das cirurgias reconstrutivas foi o coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Foram utilizados 30 coelhos da raça *Nova Zelândia Branco*, com a aproximadamente 170 dias de idade, fêmeas e peso médio de 3,45 Kg, provenientes de produtor especializado na criação da espécie. Os coelhos foram mantidos no biotério do Curso de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, em gaiolas individuais com dimensões de 80 cm x 50 cm x 35 cm, obedecendo-se os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Foi fornecido durante

² Protocolo número: 028406/12

todo o experimento aos animais ração comercial³ própria para a espécie e água *ad libitum*.

Durante o período experimental os animais foram pesados no 1º e no 14º dia, para avaliar a diferença relacionada ao ganho de peso médio dos animais de cada grupo, a fim de verificar se o procedimento cirúrgico provocaria resposta orgânica ao trauma que repercutisse no estado geral dos animais.

2.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram separados em dois grupos de 15 animais cada, compreendendo os grupos plasma rico em plaquetas (GPRP) e controle (GC). Em todos os animais foram realizados flapes de avanço de padrão axial toracodorsal, sendo que no GPRP empregou-se o gel de plasma rico em plaquetas antes da síntese da ferida cirúrgica, e no GC, apenas foi utilizado solução fisiológica⁴.

2.2.4 Protocolo anestésico e obtenção do plasma rico em plaquetas

Não foi necessário submeter os animais ao jejum alimentar e hídrico. O protocolo anestésico consistiu em Cloridrato de Clorpromazina⁵, na dose de 0,5 mg/kg, e Morfina⁶, na dose de 0,5mg/kg, diluídos na mesma seringa, por via intramuscular (IM) como medicação pré anestésica.

Após sedação, foram coletadas amostras de sangue dos 30 coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico. As amostras de sangue do GC não foram submetidas ao preparo de PRP, apenas coletadas para não haver diferenças entre os grupos quanto ao volume de sangue corpóreo. Realizou-se tricotomia da região cervical para acesso das veias jugulares, e procedeu-se antissepsia com clorexidine e solução de álcool a 90%. Os animais foram posicionados em decúbito esternal com o pescoço em extensão dorsal máxima para permitir a visualização adequada das veias jugulares (Anexo I). Procedeu-se venopunção e coleta de 8mL de sangue,

³ Nature multivida coelho - Socil - Sgh Ind. e Com, Ltda – Descalvado - São Paulo - Brasil.

⁴ Fisiológico 0,9% - JP Indústria Farmacêutica S.A – Ribeirão Preto - São Paulo – Brasil.

⁵ Clorpromazina® - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Itapira - São Paulo - Brasil.

⁶ Dimorf – Cristália – Itapira - São Paulo - Brasil

acondicionada em três tubos estéreis, dois com capacidade de 3,6mL contendo citrato de sódio⁷ (anticoagulante) destinados à preparação do PRP, e um terceiro tubo com capacidade de 1mL contendo EDTA⁸ (anticoagulante) foi preenchido com 0,8ml de sangue o qual foi destinado à contagem de plaquetas (Anexo I).

Após determinar em máquina automática⁹ a contagem plaquetária dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie, deu-se início a preparação do PRP por outro integrante da equipe, enquanto o procedimento cirúrgico foi realizado.

O frasco com citrato de sódio foi empregado na produção do plasma rico em plaquetas (PRP) pelo protocolo de dupla centrifugação em centrífuga laboratorial comum¹⁰ conforme descrito por Morato (2013). Os tubos foram centrifugados com tampa fechada, à 1600 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, resultando na separação de hemácias e plasma contendo leucócitos e plaquetas.

Em capela de fluxo laminar¹¹, os tubos eram destampados para que o plasma fosse pipetado e transferido para outro tubo estéril. O plasma era novamente centrifugado à 2000 rotações por minuto (RPM) por 10 minutos, resultando em duas partes de plasma: a superior, consistindo o plasma pobre em plaquetas (PPP) e a parte inferior, um botão plaquetário. O PPP foi descartado de modo que permanecesse apenas 1ml de PPP e botão plaquetário. Esse material foi levemente agitado para promover a ressuspensão das plaquetas, resultando assim na produção do plasma rico em plaquetas (PRP).

Ao término do processo de enriquecimento do plasma, a contagem da concentração de plaquetas foi realizada em máquina automática⁹, a partir de uma alíquota de 80µL da amostra do PRP. Ao término da contagem das plaquetas na amostra, com auxílio de seringa de 1mL, o PRP dentro do tubo estéril foi ativado por meio da adição de 0,3 mL de gluconato de cálcio¹², no momento de sua utilização terapêutica, adquirindo assim, propriedades semelhantes a um gel, estando dessa forma, pronto para ser utilizado (Anexo I).

⁷ Tubo BD vacutaneir® citrato de sódio – BD – São Paulo – São Paulo – Brasil.

⁸ Tubo pediátrico BD vacutaneir® EDTA – BD – São Paulo – São Paulo – Brasil.

⁹ Poch – 100iV Diff- médica comércio representações e importações LTDA – Recife – Pernambuco – Brasil.

¹⁰ Modelo 206 I centrifuge/Fanem® - SP.

¹¹ Vecoflow LTDA – Modelo bio 12 – Campinas – São Paulo – Brasil.

¹² Gluconato de cálcio 100mg/ml/ Hipolabor – Sabará – Minas Gerais - Brasil.

Em seguida, à coleta do sangue, realizou-se ampla tricotomia da face lateral esquerda do tórax e membro torácico ipilateral. Após o término da tricotomia realizou-se venopunção da veia auricular dos pacientes com cateter 24¹³ para fluidoterapia de manutenção com solução de ringer lactato¹⁴, e procedeu-se indução anestésica com propofol¹⁵, na dose de 10 mg/kg. Na sequência procedeu-se intubação orotraqueal com sonda de Magill de 3,0 mm de diâmetro, conectada ao aparelho de anestesia para fornecimento fluxo total de 1L/min de oxigênio a 100% por meio de circuito anestésico sem reinalação de gases¹⁶. Foi realizada anestesia geral inalatória com isofluorano¹⁷, na dose de 3%, diluído em 100% oxigênio.

2.2.5 Procedimento cirúrgico

Para a realização da ferida dermoepidérmica e demarcação do segmento de pele a ser retirado em região de cotovelo esquerdo, foi utilizada caneta cirúrgica¹⁸ (Figura 2.1A) e régua estéril para criar uma lesão de 4 cm de comprimento por 4 cm de largura, no formato de um quadrado. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº15¹⁹ foi excisado o fragmento cutâneo de 16 cm², 1 cm acima e 3 cm abaixo da extremidade do olecrano (Figura 2.1B).

Logo após a realização da lesão do cotovelo, o procedimento de cirurgia reconstrutiva foi realizado, confeccionou-se o flape de padrão axial toracodorsal com caneta cirúrgica (Figura 2.1B), com o paciente em decúbito lateral, e o membro torácico em extensão, perpendicular ao tronco. O flape foi criado por ampla incisão cutânea em “L” invertido, com limites determinados de acordo com as referências anatômicas descrita na literatura (FOSSUM, 2007) e conforme a espécie, as quais foram previamente palpadas e demarcadas na pele do paciente com caneta cirúrgica. Para tal, foi estimada a localização da artéria e veia toracodorsal (Figura

¹³ Cateter BD Angiocath 24 – Becton, Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda – Juiz de Fora - Minas Gerias – Brasil.

¹⁴ Riger lactato – JP Indústria Farmacêutica S.A – Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil.

¹⁵ Diprivan - zeneca Farmacêutica do Brasil Ltda. - São Paulo - São Paulo - Brasil.

¹⁶ Ohmeda – mod. Excel 210SE- Datex Ohmeda- Miami, EUA. (Processo FAPESP 97/10668-4)

¹⁷ Isoflurine - Cristália – Itapira - São Paulo Brasil

¹⁸ Skins – T Surgical Skin Marker - Batrik Medical Manufacturing Inc – Quebec – Canadá.

¹⁹ Lâmina de bisturi N15 - Solidor – São Paulo - São Paulo - Brasil.

2.1B) imediatamente caudal à articulação escápulo-umeral (Figura 2.1B). A partir deste ponto, seguindo em sentido dorsal, realizou-se duas incisões paralelas entre si: a primeira, 3 cm abaixo do processo espinhoso da coluna vertebral, iniciando sobre a espinha da escápula, estendendo-se 8 cm paralela a linha média dorsal, e a segunda iniciada 4 cm caudal a articulação do ombro e finalizada 7 cm caudal a lateral do tórax (Figura 2.1C). O flape foi finalizado formando um “L” invertido, e o limite considerado para profundidade da incisão, o qual determinou a espessura do flape, foi o músculo cutâneo do tronco. Suspendeu-se o flape para iniciar a confecção do tubo de comunicação (Figura 2.1D), era possível observar a presença da artéria e veia toracodorsal junto ao retalho criado (Figura 2.1E). O flape foi então mobilizado com sua porção caudal até a porção distal da ferida no cotovelo (Figura 2.1F) e acomodado de modo que se pudesse cobrir completamente a solução de continuidade oriunda da lesão induzida no cotovelo (Figura 2.2A).

Para realização da síntese cirúrgica das bordas da ferida à do flape no leito receptor utilizou-se náilon 4-0²⁰, em padrão simples separado. Não foi realizado suturas subcutâneas. O tubo de comunicação constituído da artéria e veia toracodorsal que interligava o leito doador com o leito receptor foi aproximado entre si com padrão de sutura simples separado utilizando náilon 4-0 (Figura 2.2B). A ferida do leito doador no tórax foi submetida à redução de espaço morto com fio absorvível sintético monofilamentar poliglecaprone 4.0²¹ (Figura 2.2C) e dermorrafia com náilon 4-0⁷, em padrão de sutura Wolf (Figura 2.2D).

O gel de plasma rico em plaquetas autólogo (0,7mL de PRP) (Figura 2.3A) foi colocado no GPRP antes da síntese da lesão no cotovelo com auxílio do cabo de bisturi²² e distribuído de maneira homogênea entre o subcutâneo do leito doador e o subcutâneo do leito receptor (Figura 2.3B), e os animais do GC receberam uma 0,7mL de solução fisiológica². Após aplicação das respectivas soluções procedeu-se a síntese da ferida cirúrgica.

²⁰ Nylon monofilamentar- Point Suture do Brasil IND. de fios cirúrgicos LTDA.-Fortaleza - Ceará - Brasil.

²¹ Caprofil - ETHICON™ Johnson & Johnson , São José dos Campos - São Paulo - Brasil.

²² Cabo de bisturi n4 – Brasmed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA – Paulínia – São Paulo – Brasil.

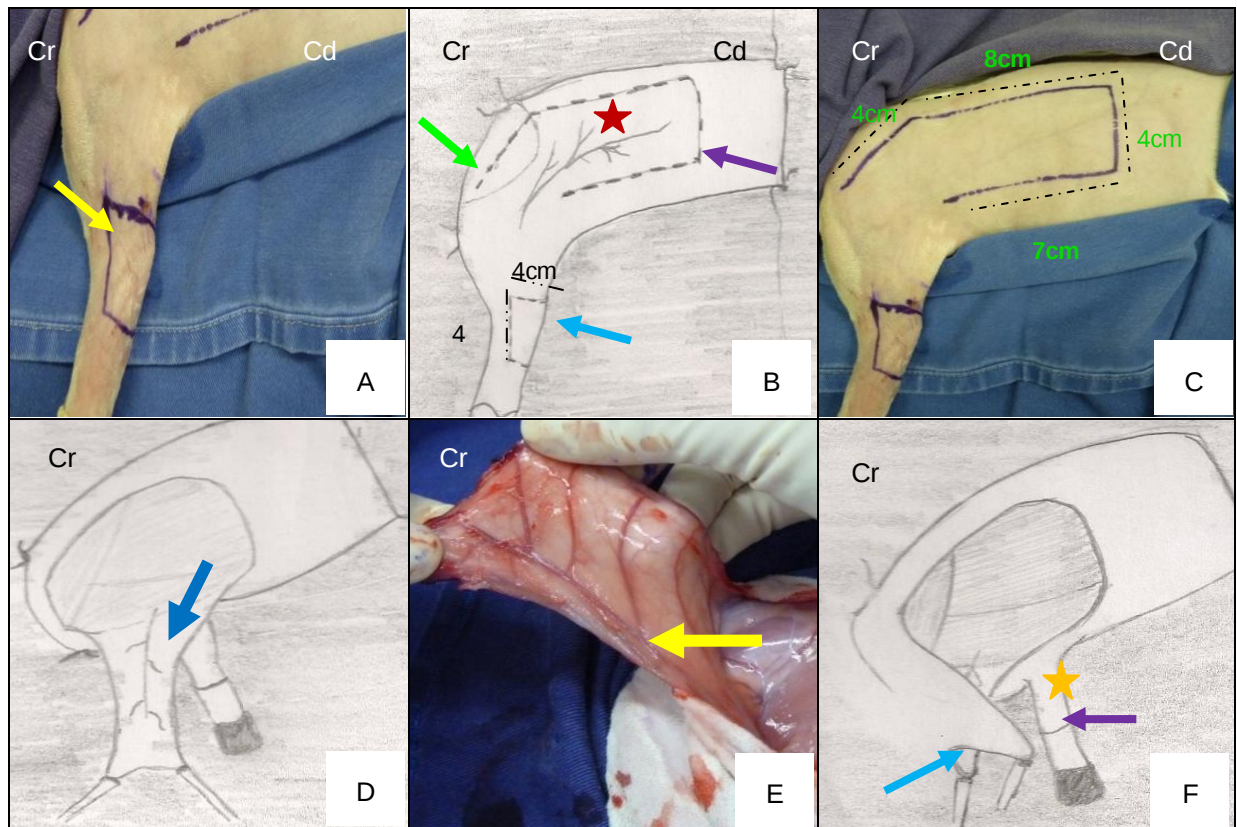


Figura 2.1 Imagens fotográficas e esquema ilustrativo da diérese do procedimento cirúrgico de reconstrução realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Demarcação do segmento de pele a ser retirado confeccionado com auxílio de caneta cirúrgica e régua estéril (seta). B) Criação da lesão com 4cm², no formato de um quadrado, com 1 cm acima e 3 cm abaixo da extremidade do olecrano (seta azul); confecção do flape de padrão axial toracodorsal com caneta cirúrgica (seta roxa); localização da artéria e veia toracodorsal (asterisco) caudal à articulação escápulo-umeral (seta verde). C) Finalização da marcação do flape formando um “L” invertido no tórax do lado esquerdo. D) Suspensão do flape para iniciar a confecção do tubo de comunicação. E) Presença da artéria e veia toracodorsal junto ao retalho criado (seta). F) Mobilização do retalho com sua porção caudal (seta azul) até a porção distal (seta roxa) da ferida no cotovelo (asterisco).

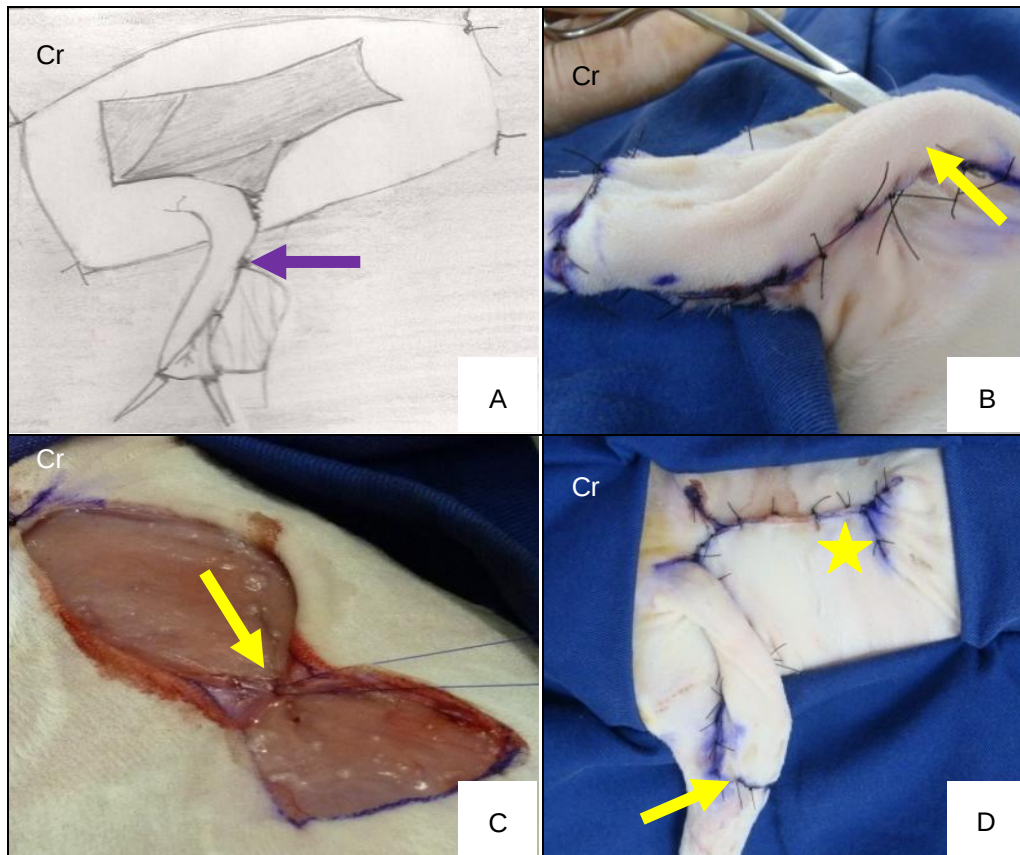


Figura 2.2 Imagens fotográficas e esquema ilustrativo da síntese do procedimento cirúrgico de reconstrução realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Acomodação do flape para o recobrimento da solução de continuidade no cotovelo (seta). B) Confeccção do tubo de comunicação do leito doador com o leito receptor (seta). C) Redução de espaço morto do leito doador com fio absorvível sintético monofilamentar poliglecaprone 4.0 em padrão “walking suture” (seta). D) Síntese da ferida cirúrgica com fio inabsorvível náilon 4.0, em padrão simples separado, no leito receptor (seta) e leito doador com padrão Wolf e com fio inabsorvível náilon 4.0 (asterico).

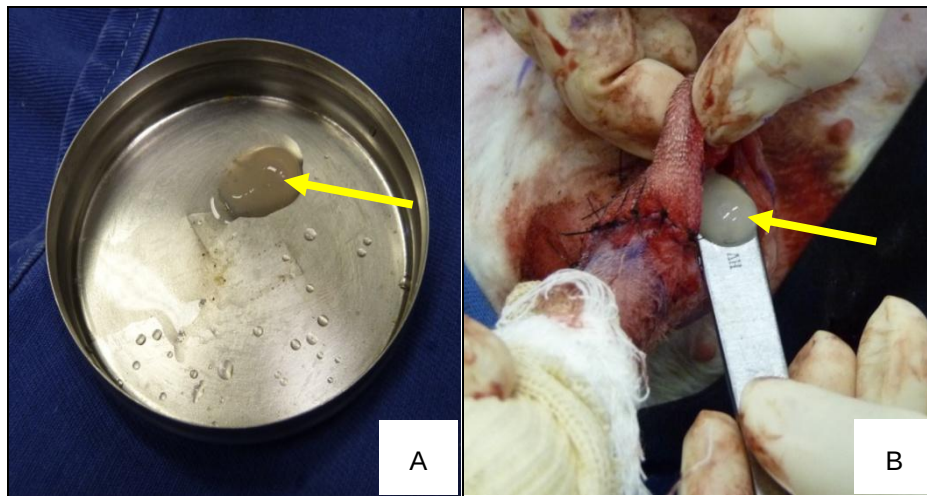


Figura 2.3 Imagem fotográfica da aplicação do gel de plasma rico em plaquetas em coelhos, confeccionado no Laboratório de Patologia Clínica do Curso de pós Graduação em cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Gel de plasma rico em plaquetas (seta). B) Aplicação do plasma rico em plaquetas (seta) na ferida cirúrgica antes da síntese completa.

2.2.6 Pós-operatório

Os animais foram recolocados nas suas respectivas gaiolas para observação da recuperação anestésica até a completa normalização da frequência respiratória e início da movimentação ativa e busca por alimentos e água. Além disso, foram identificados com o dia do procedimento cirúrgico e o tipo do tratamento que receberam (GPRP ou GC).

Como protocolo de analgesia, os animais receberam Morfina²³ na dose de 0,5 mg/kg, por via subcutânea, com intervalos de 12 horas, durante 7 dias, antibiótico

²³ Dimorf – Cristália – Itapira - São Paulo - Brasil.

terapia com Enrofloxacin 10%²⁴ na quantidade de 0,1 mL/kg (diluído em 0,7 mL de Solução fisiológica), por via subcutânea, com intervalo de 24 horas, durante 10 dias e anti-inflamatório Meloxicam²⁵ na dose de 0,1 mg/kg, por via subcutânea, com intervalos de 24 horas, durante 3 dias.

2.2.7 Curativos e avaliação macroscópica

Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram observados por período de 15 dias para realizar as avaliações macroscópicas da lesão, a qual foi feita por um observador cego. Ao término desse período, foi realizada eutanásia para avaliações microscópicas do local onde foi realizado o flape de padrão axial toracodorsal.

Em todos os animais de ambos os grupos os curativos foram realizados no pós-operatório imediato e trocados no 3º, 7º e 14º dias, juntamente foram realizadas as avaliações macroscópicas, até a data da eutanásia.

A limpeza e troca dos curativos eram conduzidas da seguinte maneira:

- 1 - Limpeza da ferida com solução fisiológica (NaCl 0,9%²⁶);
- 2 - Remoção de exsudato quando necessário;
- 3 - Cobertura com gaze²⁶;
- 4 - Fixação da gaze com atadura²⁷ e esparadrapo²⁸.

As avaliações macroscópicas da ferida consistiam em avaliar a presença ou ausência de exsudato, integridade da pele, edema, rubor e necrose.

A presença ou não de exsudato, para avaliar a instalação de provável processo inflamatório na ferida cirúrgica, foi avaliado e posteriormente graduado em: 0 ausência de exsudato, 1 discreta presença, 2 moderada presença e 3 intensa presença. A avaliação da integridade da pele consistia em graduar sua coloração, variando de 1 à 3, onde 1 representava pele rósea, 2 hemorragia leve, e 3 hemorragia intensa.

²⁴ Zelotril 10% – União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo - São Paulo - Brasil.

²⁵ Maxicam. OuroFino Agronegócios. Cravinhos - São Paulo - Brasil.

²⁶ Gaze hidrófila estéril – Herika – América Medical LTDA – Curvelo – Minas Gerais – Brasil.

²⁷ Atadura Cremer - Blumenau – Santa Catarina – Brasil.

²⁸ Esparadrapo – Cremer – Blumenau – Santa Catarina – Brasil.

Para avaliação do edema utilizou-se a graduação de 0 à 3, sendo 0 ausência de edema, 1 edema discreto, 2 edema moderado e 3 edema intenso. O rubor da pele foi graduada em 1 e 2, sendo 1 ausente e 2 presente. E para avaliação de necrose utilizou-se a graduação de 0 a 1, sendo ausência de necrose graduado em 0 e necrose presente 1. Os dados foram anotados em ficha própria, individual para cada coelho (Anexo II).

2.2.8 Eutanásia e colheita de material

No 15º dia de pós-operatório, os coelhos foram eutanasiados para colheita de material da avaliação microscópica. A eutanásia foi realizada com propofol, na dose de 10mg/kg, administrado por via intravenosa, a fim de aprofundar o plano anestésico, ato contínuo realizou-se a infusão de cloreto de potássio, obedecendo-se os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

Em seguida, as feridas foram excisadas com margem de 1 cm de pele íntegra em torno da lesão de 16 cm², e em relação à profundidade a fáscia muscular foi o limite. Dividiu-se o fragmento em três porções distintas, de aproximadamente 1,2 cm cada uma, as quais eram identificadas em: porção distal, média e proximal para avaliar histologicamente se houve diferença significativa entre elas.

Identificou-se os fragmentos individualmente, fixando-os em cartolina branca, e imersos em solução de formol²⁹ a 10%. Após 48 horas a solução que as amostras encontravam-se imersas foi substituída por álcool³⁰ à 70%, em seguida encaminhou-se o material fixado em cartolina branca para o Laboratório de Patologia Veterinária VetPat³¹ em Campinas –SP para a confecção das lâminas e posterior avaliação histológica.

²⁹ Formol tamponado 10% - Indaiá Laboratório Farmacêutico LTDA – Dolores do Indaiá – Minas Gerais – Brasil.

³⁰ Álcool etílico 70% - Emfal Especialidades Químicas – Betim – Minas Gerais – Brasil.

³¹ Laboratório de Patologia Veterinária VetPat – Campinas – São Paulo – Brasil.

2.2.9 Avaliações microscópicas

As amostras foram processadas conforme a rotina convencional de processamento histológico, com desidratação em diluições crescentes de álcoois e diafanização em xilol³², para inclusão em blocos de parafina histológica. Estes foram cortados em micrótomo, com espessura de 4 µm e corados pelo método histoquímico de rotina, pela hematoxilina e eosina, para análise em microscopia óptica.

A análise dos cortes histológicos foi realizada pelo mesmo patologista sem o conhecimento prévio da identificação dos grupos. A avaliação histológica das lâminas foi realizada em microscópio óptico³³ no aumento de 400x. As fotomicrografias foram realizadas no programa Motic Images Plus 2.0.

Os dados obtidos foram classificados de acordo com a intensidade em que eram encontrados e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico, conforme preconizado por Garros et al.(2006) e registrados em fichas individuais para cada animal (Anexo III).

³² Xilol – Quimidrol – Joinville – Santa Catarina – Brasil.

³³ Microscópio Nikon eclipse – E200.

2.2.10 Análise estatística

Os dados de PRP (concentração plaquetária) foram analisados pelo teste t emparelhado com grau de significância de 5%, e também foram analisados descritivamente por meio de gráfico diferenciando as médias dos valores da contagem plaquetária pré e pós enriquecimento do plasma rico em plaquetas (PRP).

A comparação entre os grupos (GPRP e GC) em relação às variáveis categóricas (exsudato, integridade da pele, edema, RUBOR, necrose, proliferação vascular, células mononucleares, células polimorfonucleares, proliferação de fibroblasto, colagenização, reepitelização e hemorragia) foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico), sendo que para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 as diferenças das medianas entre os grupos foram consideradas significativas. Para comparação entre os grupos GC e GPRP em termos de ganho de peso utilizou-se o teste t de Student. Para ambas as análises foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Preparação do PRP

Nas amostras de sangue dos coelhos do GPRP, a contagem inicial de plaquetas apresentava-se dentro dos padrões fisiológicos para a espécie, variando de 290.000 a 678.000 plaquetas/ μL . Obteve-se a partir de 7,2 mL de amostra de sangue total, um volume médio de PRP de 0,7mL, sendo que a contagem média de plaquetas obtidas após a centrifugação foi de 1.176.933 plaquetas/ μL (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Resultados da contagem plaquetária das amostras sanguíneas de coelhos utilizadas para o preparo do PRP e quantidade de plaquetas obtidas após o enriquecimento realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Coelho	Contagem de plaquetas da amostra $10^3\text{plq}/\mu\text{L}$	Contagem obtida após o enriquecimento ($\times 10^3\text{plq}/\mu\text{L}$)	Diferença entre os enriquecimentos
1	470	1.172	702
2	352	4.420	4.068
3	347	1.238	891
4	304	1.123	819
5	502	1.810	1.308
6	339	640	301
7	403	1.380	977
8	216	640	424
9	318	523	205
10	352	605	253
11	440	1.429	989
12	287	471	184
13	396	644	248
14	434	754	320
15	417	805	388
Média	371,8	1.176, 933	805,13

A contagem de plaquetas após o processo de enriquecimento do PRP apresentou-se maior quando comparada com a amostra inicial, com média de 1.176.933 plaquetas/ μ L. Os dados obtidos neste ensaio são semelhantes aos resultados encontrados por Silva e colaboradores (2011), visto que em seu estudo a contagem de plaquetas na amostra final, após a o enriquecimento do PRP, foi significativamente maior quando comparado com a amostra de sangue inicial.

Entretanto, alguns autores relatam que a contagem plaquetária deve-se apresentar valores superiores a 1.000.000 plaquetas/ μ L (DEL CARLO et al., 2009) embora outros autores obtiveram efeitos terapêuticos desejados com concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L (CARMONA et al., 2009 e DEL CARLO et al., 2009). Assim, os resultados obtidos nesta pesquisa foram condizentes com Carmona e colaboradores (2009) e Del Carlo e colaboradores (2009), em virtude da contagem plaquetária ter variado entre 470.000 a 4.420.000 plaquetas/ μ L no PRP final (desvio padrão = 980.546 plaquetas/ μ L), e alcançou nessas concentrações os efeitos terapêuticos desejados.

O protocolo da dupla centrifugação foi capaz de promover uma média de concentração plaquetária três vezes maior em relação ao valor inicial da amostra (desvio padrão = 980.546 plaquetas/ μ L). Na Figura 2.4 estão apresentadas as médias dos valores de contagem plaquetária pré e pós enriquecimento do plasma rico em plaquetas (PRP). Sendo assim, a amostra final de PRP quando comparada com a inicial foi significativamente maior no grupo PRP ($p=0,006$).

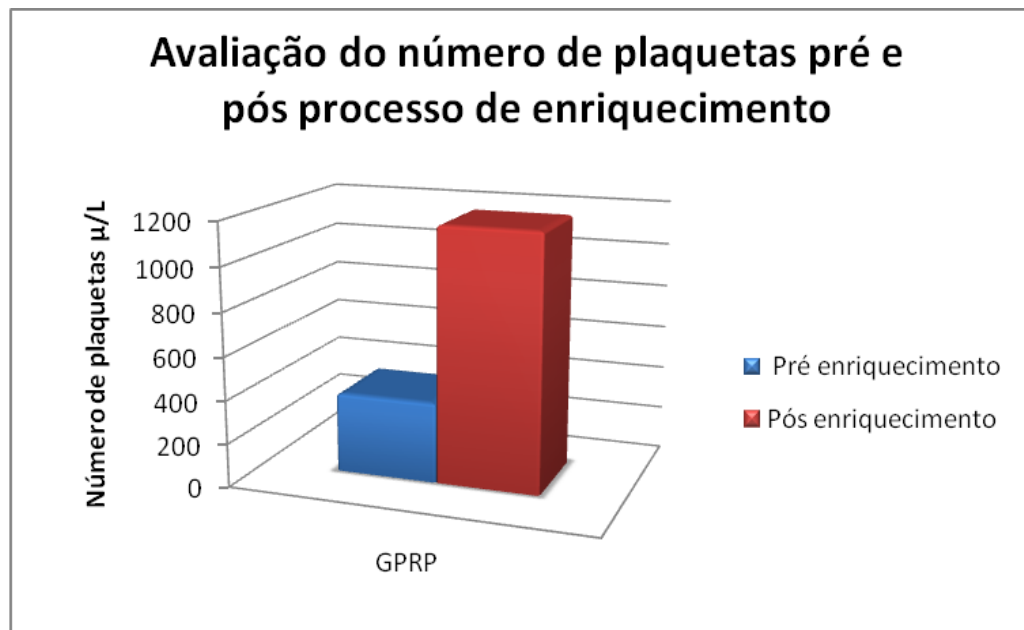


Figura 2.4 Resultado da centrifugação para obtenção do PRP em coelhos submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013, capaz de promover uma média de concentração plaquetária 3 vezes maior em relação ao valor inicial de sangue coletada nos animais do GPRP ($p=0,006$).

Nesta pesquisa, o protocolo de centrifugação foi adequado para obtenção de PRP de boa qualidade, semelhante ao descrito por Morato (2013), estudo este que utilizou o gel de PRP em enxerto ósseo em coelhos, obtido pelo método de dupla centrifugação, com tempos e velocidades semelhantes aos utilizados neste ensaio, proporcionou a obtenção de bons resultados seguindo esse protocolo.

Em relação ao citrato de sódio, utilizado como anticoagulante nesta pesquisa, obteve-se bons resultados quanto ao preparo do PRP. Entretanto, são citados na literatura outros anticoagulantes como solução de citrato de dextrose (LU et al., 2008) e heparina (KASTEN et al., 2008). Nesta pesquisa, optou-se em utilizar citrato de sódio devido sua fácil obtenção, e por adquiri-lo em tubos estéreis, diminuindo a contaminação no momento da colheita. Vanat e colaboradores (2012), testando a

modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães também utilizaram tubos estéreis contendo citrato de sódio e obtiveram bons resultados livre de contaminação.

2.3.2 Avaliação física

Durante todo o período experimental os animais foram acompanhados diariamente, não sendo observado incômodo, apatia, e anorexia em nenhum dos pacientes, e os pesos foram avaliados no 1º e no 14º dia de avaliação. Nos dois grupos, em relação ao peso dos coelhos entre o início e o fim do experimento (Figura 2.5), não houve diferença significativa ($p=0,66$).

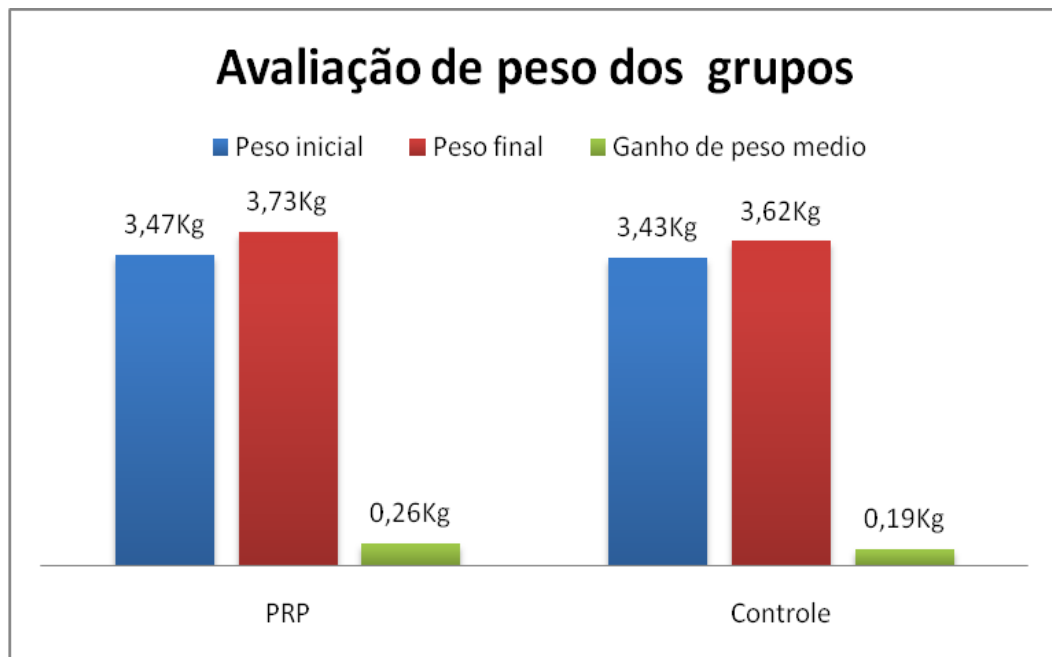


Figura 2.5 Resultado da avaliação do ganho de peso médio no 1º e no 14º dia dos grupos experimentais ($p=0,66$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Em ambos os grupos, o peso dos animais entre o início e o fim do experimento, manteve-se estável, evidenciando que os animais se alimentaram adequadamente e o procedimento cirúrgico não provocou resposta orgânica ao trauma que repercutisse no estado geral dos animais. Estes achados foram semelhantes aos de Salgado e colaboradores (2007), após os animais terem sido submetidos a procedimentos cirúrgicos reconstrutivos não apresentaram sinais de desconforto, anorexia e apatia, porém em relação ao peso dos animais encontraram variação significativa entre o início e o fim do experimento nos animais do grupo tratado em relação ao controle, e não utilizaram nenhuma terapia medicamentosa. Embora neste ensaio não se tenha encontrado diferença significativa quanto ao ganho de peso, os animais mantiveram-se bem, não apresentaram sinais de perda de peso, tampouco outras complicações como anorexia e apatia, e instituiu-se terapia medicamentosa (anti-inflamatório, analgésico e antibiótico).

2.3.3 Avaliação macroscópica

A avaliação do rubo, edema e integridade da pele, relacionando os grupos GPRP e GC não foram significativas ($p=0,40$; $p=0,10$; $p=0,47$ respectivamente). Entretanto, as variáveis exsudato (Figura 2.6A) e necrose (Figura 2.6B) no GC foram significativamente maiores em relação ao GPRP, sendo $p=0,001$ e $p=0,02$ nesta ordem.

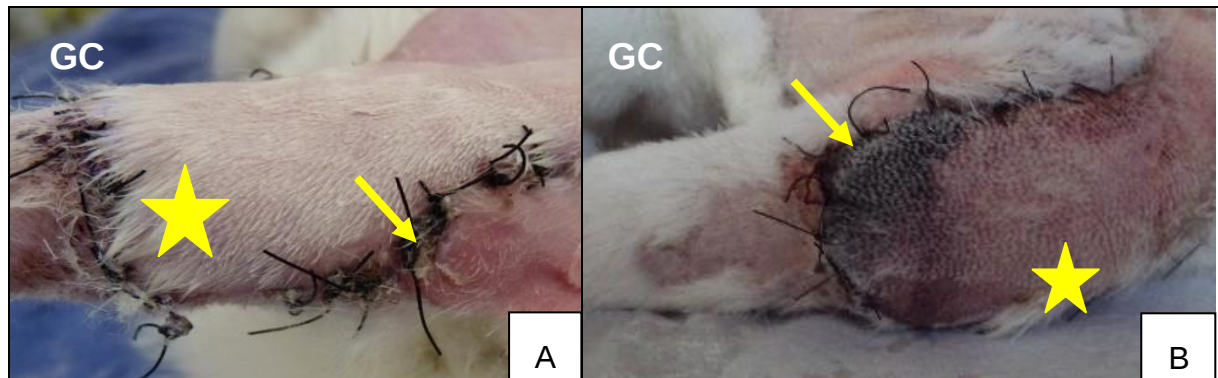


Figura 2.6 Imagens fotográficas da lesão do cotovelo de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) mostrando as variáveis macroscópicas exsudato com 14 dias que foram significativas entre os grupos ($p < 0,05$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Presença de exsudato (seta) no GC, presença de pelos (asterisco) indicando crescimento após procedimento cirúrgico. B) Presença de necrose (seta) no GC, presença de pelos (asterisco) indicando crescimento após procedimento cirúrgico.

No 3º dia, as avaliações macroscópicas de rubor, integridade da pele, edema e necrose não foram significativas entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 2.7). Porém exsudato apresentou-se significativamente maior no GC quando comparado com GPRP ($p = 0,01$).

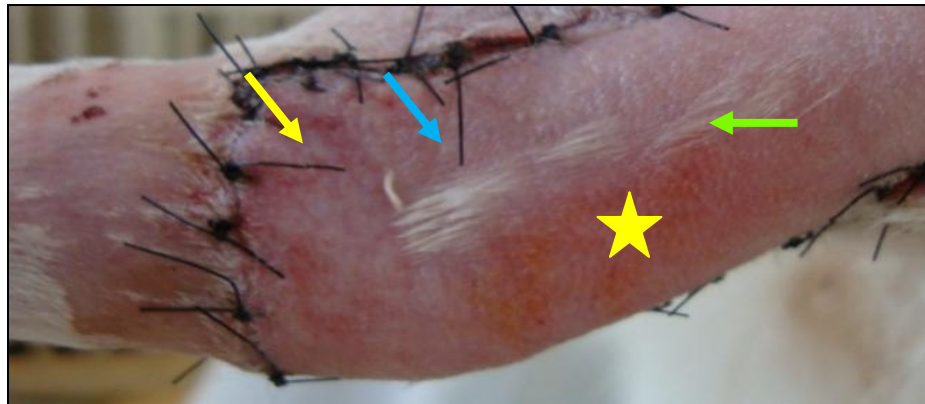


Figura 2.7 Imagem fotográfica da lesão do cotovelo de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) indicando ausência de rubor (asterisco), necrose (seta amarela) e integridade da pele (seta azul), presença de pelos (seta verde) em crescimento no 3º dia de pós operatório no GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Quanto a intensidade do exsudato no GC e GPRP indicando a presença de processo inflamatório exacerbado na ferida cirúrgica, observou-se que no GC em 20% dos animais a presença de exsudato era ausente, 47% apresentaram discreta ocorrência de exsudato purulento, 33% moderada e nenhum paciente apresentou exsudato intenso. No GPRP 47% das lesões não apresentaram exsudato, 47% presença discreta, 6% moderada e nenhum paciente apresentou exsudato intenso.

Os dados da variável exsudato indicaram que 80% dos animais do GC apresentaram exsudato purulento quando comparado com GPRP que apenas 53% manifestaram essa alteração (Figura 2.8).

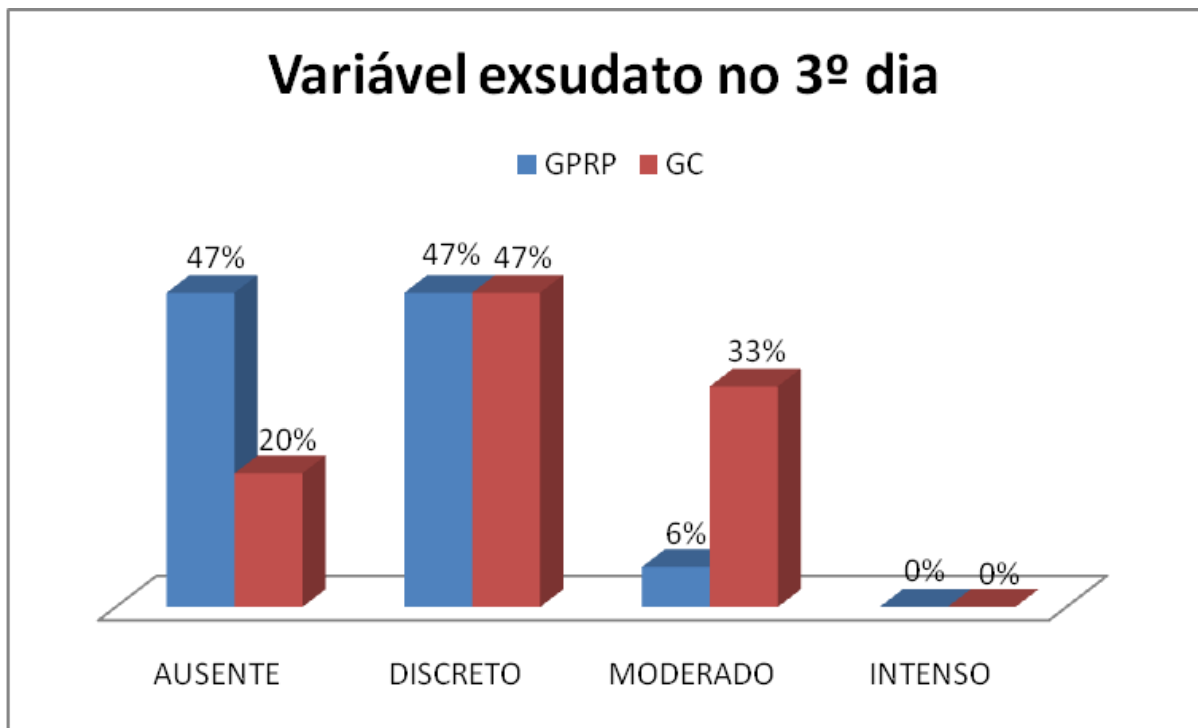


Figura 2.8 Resultados da avaliação de exsudato em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) no 3º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC ($p=0,01$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Nas avaliações do 7º dia, edema, integridade da pele e necrose não foram significativos entre os grupos ($p>0,05$). Entretanto, as variáveis exsudato e rubor apresentaram diferença significativa no GC ($p=0,01$ e $p=0,02$ respectivamente) quando comparado com o GPRP.

Independente dos dias de avaliação das feridas cirúrgicas, o método de graduá-las de acordo com a intensidade foi o mesmo, sendo assim, nos resultados de exsudato observou-se que no 7º dia, 70% dos animais do GPRP não apresentaram exsudato, 30% dos animais do mesmo grupo manifestaram presença discreta, e presença moderada e intensa não foram observadas nesse grupo. Comparando os dados do GPRP com o GC observou-se que em 20% dos animais o

exsudato foi ausente, 60% apresentaram exsudato discreto, 20% moderado, e intenso não foi observado em nenhum animal (Figura 2.9).

Em relação a intensidade de rubor no 7º dia observou-se que a variável foi significativamente maior no GC ($p=0,02$) quando comparado com GPRP. Os resultados indicaram que 54% dos animais do GPRP não apresentavam rubor contra 14% do GC. A presença de rubor nos animais do GPRP ocorreu em 46% das lesões e nos animais do GC foi 86% (Figura 2.10).

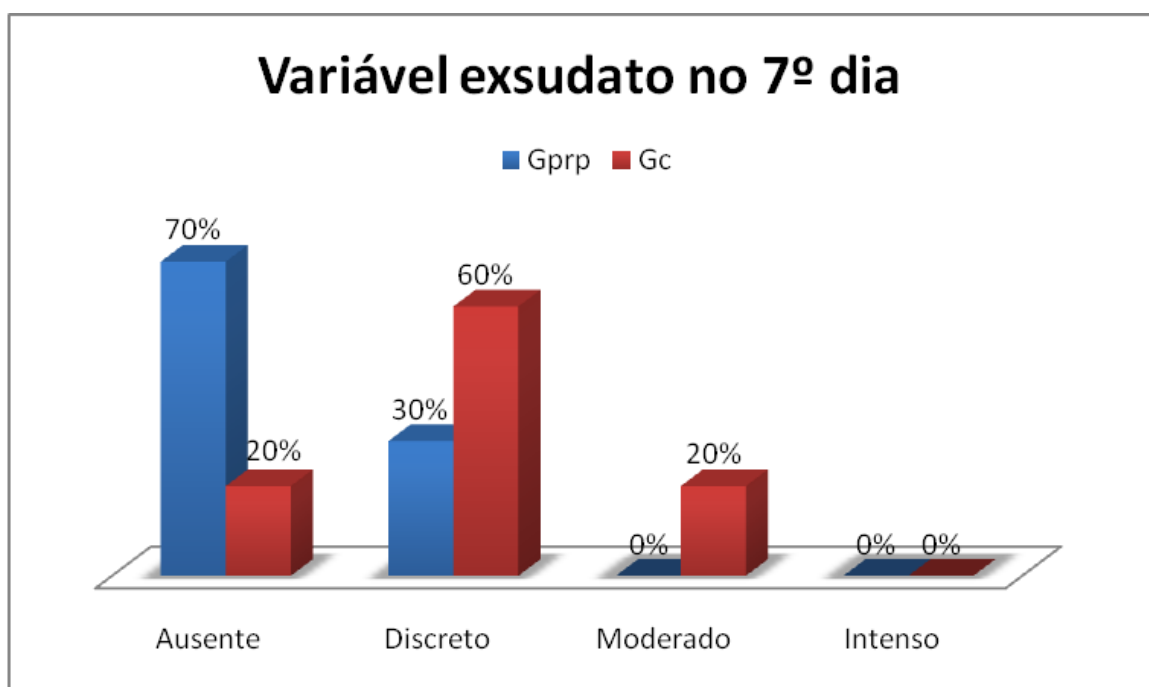


Figura 2.9 Resultados da avaliação de exsudato coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) no 7º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC ($p=0,01$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

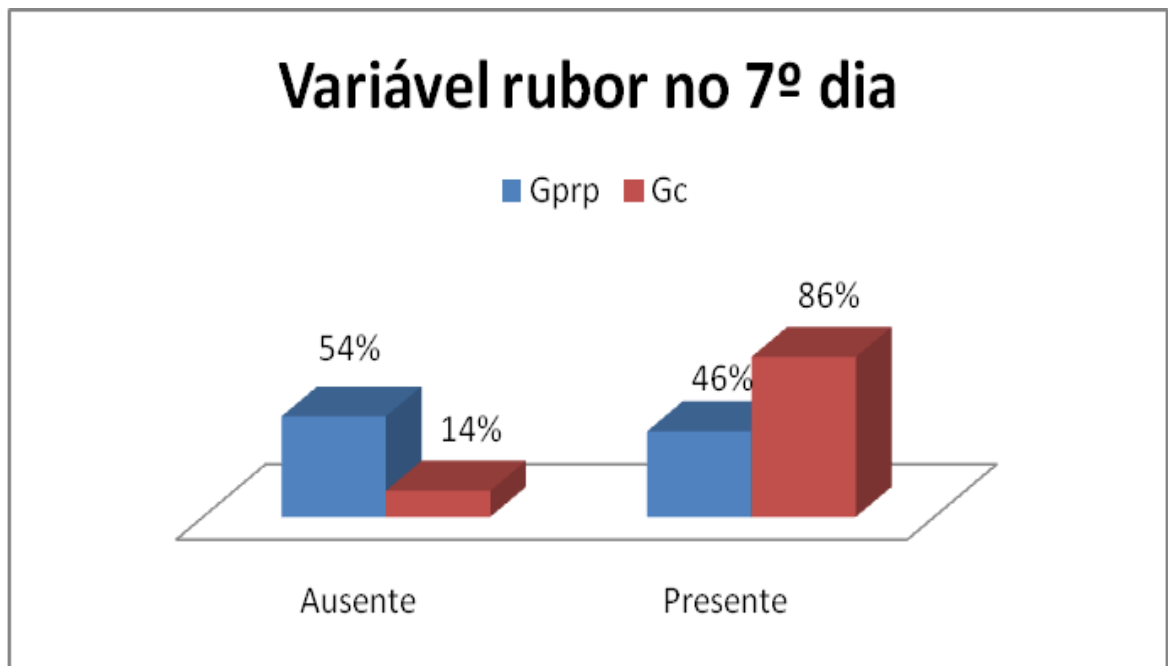


Figura 2.10 Resultados da presença de rubor em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) no 7º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC ($p=0,02$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Edema, rubor e necrose no 14º dia de pós-operatório não foram significativas entre os grupos analisados ($p>0,05$). No entanto, as variáveis integridade da pele ($p=0,01$) e exsudato ($p=0,01$) foram significativas no grupo controle quando comparado com o grupo PRP.

Em relação a avaliação da integridade da pele observou-se que 100% dos animais do GPRP apresentavam coloração rósea no 14º dia de pós-operatório, entretanto, no GC 66% dos animais apresentaram coloração rósea, 20% hematoma discreto e 14% hematoma intenso (Figura 2.11).

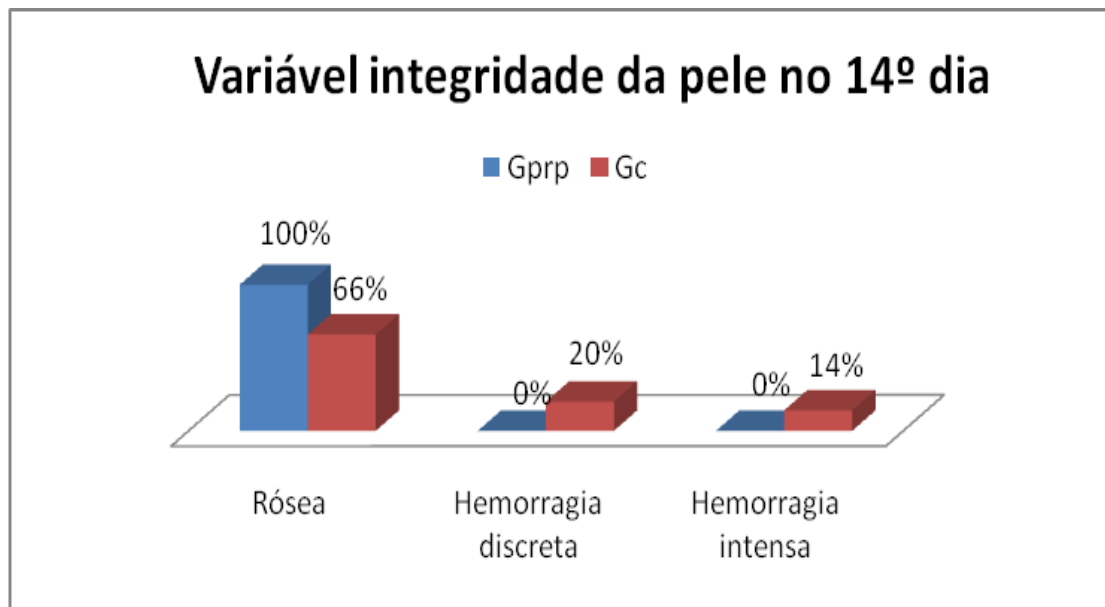


Figura 2.11 Resultados da coloração da pele em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) no 14º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC ($p=0,01$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Na variável exsudato, a graduação da intensidade seguiu os mesmos critérios adotados anteriormente no 3º e 7º dia. Observou-se que em 86% dos animais do GPRP não existia a presença de exsudato e em 14% das lesões houve presença discreta. Ocorrência de exsudato de forma moderada e intensa não foram observadas nesse grupo. Nos animais do GC em 40% dos animais não foi observado presença de exsudato, 40% apresentaram exsudato discreto, 20% moderado, sendo que exsudato intenso não ocorreu neste grupo (Figura 2.12).

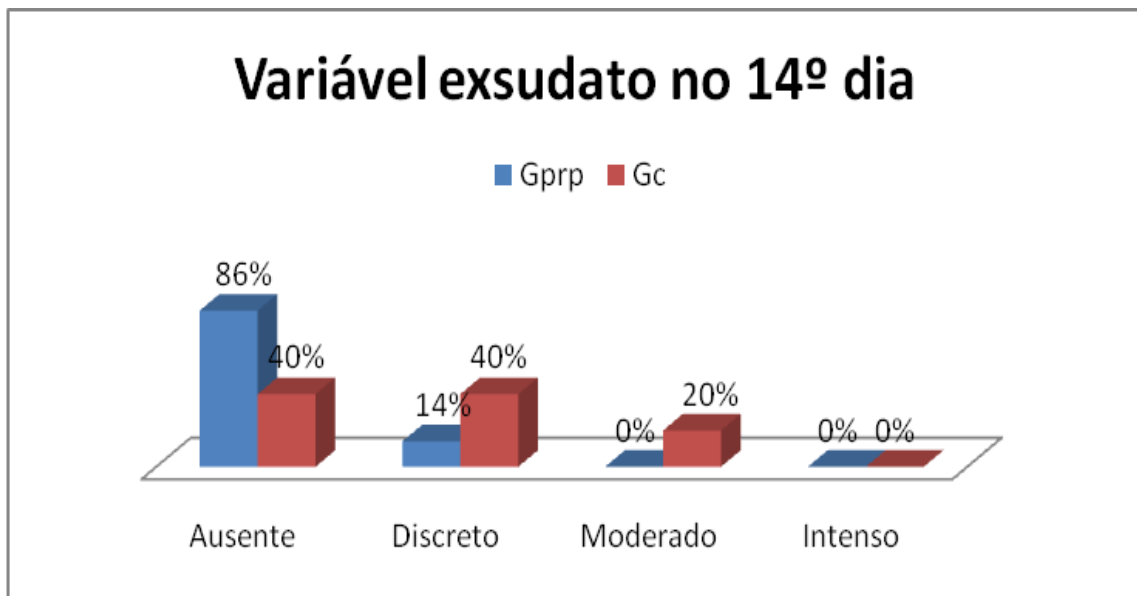


Figura 2.12 Resultados da presença de exsudato em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) no 14º dia de pós-operatório nos grupos experimentais GPRP e GC ($p=0,01$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa quanto as variáveis macroscópicas, presença de edema não foi significativa entre os grupos, diferentemente dos resultados encontrados por Bauer et al. (2009), que avaliaram os efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas em ratos e encontraram 24 horas após o procedimento cirúrgico intensa presença de edema no grupo tratado e controle. Porém é importante saber que os animais utilizados em seu estudo não receberam nenhum tipo de terapia medicamentosa.

Embora não tenha sido observado diferença significativa neste ensaio quanto ao edema, o processo de reparação tecidual seguiu um curso similar ao longo dos períodos observados em ambos os grupos. Nas feridas tratadas com PRP, o edema foi mais expressivo nos três primeiros dias e menor no 14º dia de pós operatório. Nas feridas tratadas com solução fisiológica o edema foi maior nas primeiras 24 horas e menor no 14º dia. A presença de edema mais intenso no início do processo de reparação e menor no período final de observação estão condizentes com as

descrições de Cotran et al. (1994) e Gregory (1999) que relataram a presença de edema em processo de cicatrização pode ser mais intensa no início, acompanhando os sinais da inflamação (calor, rubor, dor, tumor) e ao final da cicatrização apresenta-se em menor intensidade.

Quanto ao exsudato, essa alteração foi significativamente maior no GC durante as três avaliações. O exsudato presente por período prolongado no GC foi devido a inflamação local. No GPRP, exsudato em menor intensidade também foi encontrado, assim pode-se inferir que a aplicação do gel de PRP diminui a produção de exsudato. Entretanto os dados encontrados neste ensaio são contrários aos de Vendramin e colaboradores (2010), os quais estudaram a utilização de PRP autólogo em enxertos cutâneos em coelhos e observaram presença significativa de exsudato relacionado com maior reação inflamatória no grupo com gel de PRP quando comparado com grupo controle, justificando que melhor cicatrização nesse grupo ocorreu pela ação potencializada dos fenômenos decorrentes da fase de inflamação. Porém, SWAIM (1980), relata que os componentes relacionados com a fase inflamatória (macrófagos e neutrófilos) favorecem a cicatrização pela ação de enzimas proteolíticas capazes de destruir bactérias, tecidos necrótico e por serem responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular, e pela produção de tecido de granulação. Entretanto, se for observado inflamação intensa, esse evento será desfavorável para a cicatrização devido a produção de exsudato, presença de edema local e dor, fatores que causam complicações pós cirúrgicas como deiscência de sutura e retardo da cicatrização (PAVLETIC, 2010).

O rubor esteve presente significativamente maior no 7º dia no GC. Os resultados encontrados quanto ao rubor foram relacionados diretamente com os sinais da inflamação (calor, rubor, tumor e dor) conforme descrito por Pavletic (2010). Os resultados encontrados nesta pesquisa quanto a presença de exsudato e rubor não corroboram com Vendramin e colaboradores (2010), os quais em seu estudo utilizaram PRP autólogo em enxertos cutâneos e a intensidade de exsudato e rubor nos animais que receberam PRP foi maior quando comparado com o grupo controle.

É importante ressaltar que todos os animais que foram submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva neste ensaio, receberam no pós operatório anti-inflamatório, analgésicos e antibióticos, e ainda assim, observou-se presença de reação inflamatória local nos animais do GC. Os resultados obtidos nesta pesquisa quanto a reação inflamatória local e associação de medicação pós cirúrgicas são contrários aos resultados obtidos por Vendramin e colaboradores (2010) que encontraram presença de reação inflamatória local e não associaram nenhum tipo de terapia medicamentosa nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico. Já Morato (2013) em seu estudo avaliando a consolidação de enxertos ósseos com PRP, instituiu análgésico (Cloridrato de Tramadol) e antibiótico (Enrofloxacin 10%) nos animais submetidos ao procedimento cirúrgico, e não obteve reação inflamatória local. Sendo assim, a utilização de terapia antiinflamatória no pós operatório torna-se questionável, diferentes estudos utilizando o gel de PRP apresentaram resultados opostos quanto ao uso de anti-inflamatórios, porém de acordo com Fossum (2007) e Pavletic (2010) deve-se instituir terapia com anti-inflamatório por no mínimo três dias, antibióticoterapia de no mínimo sete dias e analgesia de no mínimo de 5 dias. Dessa forma, nesta pesquisa, a terapia medicamentosa instituída no pós operatório do procedimento cirúrgico foi conforme o preconizado pela literatura (FOSSUM 2007; PAVLETIC 2010).

Visto que ambos os grupos foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, diferindo apenas pela aplicação do PRP e solução fisiológica na ferida, e sabendo-se que o flape era constituído de uma artéria e veia, poder-se-ia esperar que complicações relacionadas com comprometimento vascular fossem mínimas, em virtude do leito receptor possuir irrigação adequada, e suturas intradérmicas ou no subcutâneo não terem sido realizadas, a fim de reduzir lesão nos tecidos. No entanto, os resultados no grupo controle foram significativamente maiores quanto a variável necrose ($p=0,02$), que pode ter ocorrido por situações inadequadas de irrigação sanguínea. Conforme citaram Pavletic (1998) e Fowler (2004) retalhos cutâneos de padrão axial incorporam uma artéria e uma veia cutânea direta, o que proporciona irrigação sanguínea com área de sobrevivência aproximadamente 50% maior que retalhos de plexos subdérmicos em cães, no entanto, alertam que

utilização de suturas intradérmicas e no subcutâneo podem predispor a ocorrência de necrose, em virtude de provocarem maior lesão no tecido, prejudicando a irrigação local e angiogênese, porém indicam que em casos que as suturas intradérmicas ou subcutâneas sejam indispensáveis, a melhor opção é a aplicação de bandagem compressiva.

Outros autores citam que embora os flapes de padrão axial sejam melhores por serem calibrosos, complicações podem surgir, como drenagem de secreção purulenta da ferida, deiscência parcial de sutura, necrose distal do retalho, infecções e formação de seroma (SLATTER, 2007). Os resultados encontrados neste ensaio quanto à variável necrose indicam que o GC apresentou complicações provenientes do comprometimento vascular do flape, visto que nenhum dos animais apresentou deiscência de pontos, infecção e formação de seroma. Também não utilizou-se suturas no subcutâneo que pudessem comprometer à irrigação local. Sendo assim, pode-se inferir que a necrose esteve presente em virtude de não ter ocorrido neo-angiogênese de maneira adequada no grupo controle conforme descrito na literatura (FOWLER, 2004; PAVLETIC 2010).

Quanto a coloração rosada nos flapes que receberam o PRP caracteriza a presença de elementos hemáticos (hemácias, leucócitos e plaquetas) nos vasos do leito receptor. Atribui-se tais características uso do gel de PRP sendo capaz de favorecer a microcirculação local. Este achado corrobora as evidências de Vendramin e colaboradores (2006) que relatam uso do PRP em enxertos cutâneos em membro pélvico de humanos sendo capaz de reduzir o tamanho da lesão, promovendo maior quantidade de tecido de granulação e apresentando aspecto rosado da pele quando comparado com pacientes que não receberam o produto. Dessa forma, pode-se presumir que a utilização do PRP resultou em melhor coloração neste grupo, relacionando assim com os aspectos macroscópicos de integridade da pele, ou seja, a pele ficou rósea (100%) quando comparado com o grupo controle (66%), no qual foi observada a presença de hemorragia discreta (20%) e hemorragia intensa (14%).

2.3.4 Avaliação microscópica

A avaliação histológica da intensidade de proliferação vascular foi significativamente maior ($p=0,001$) no GPRP (Figura 2.13A), quando comparado com o GC (Figura 2.13B). A proliferação vascular obteve índice de proliferação maior na porção distal relacionada com as demais porções. ($p=0,01$).

O emprego do gel de plasma rico em plaquetas no subcutâneo do leito receptor da ferida no GPRP proporcionou bons resultados, quando comparado com a solução fisiológica no GC, indicando que a diferença significativa encontrada quanto à proliferação vascular está relacionada com o uso do PRP, sugerindo a capacidade deste composto de promover angiogênese no local de aplicação.

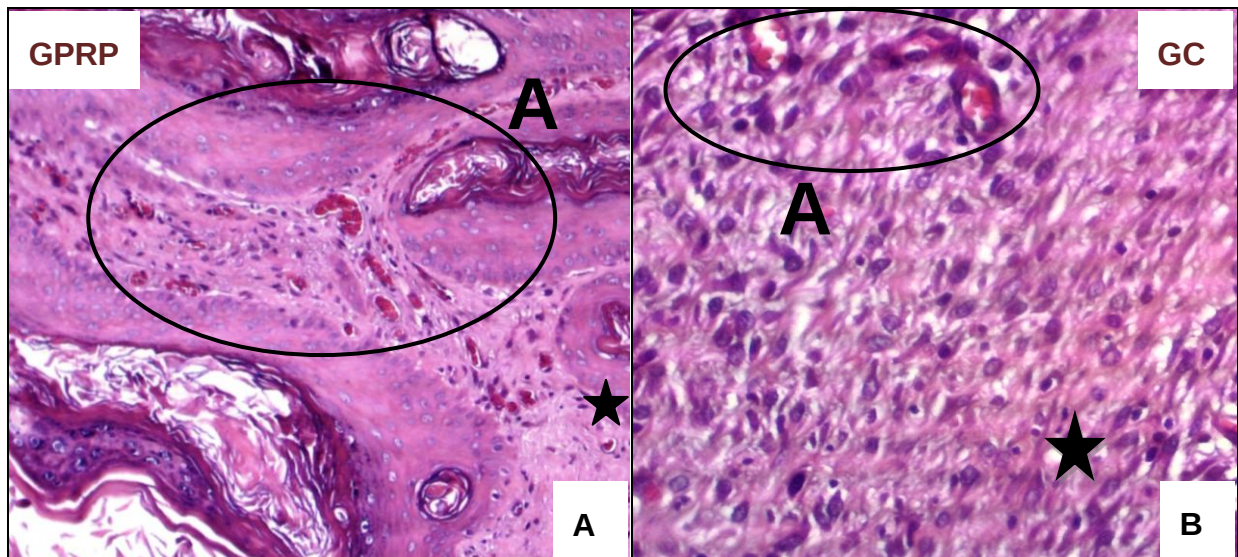


Figura 2.13 Aspecto histológico da Intensidade de proliferação vascular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Fotomicrografia óptica da porção distal derme de animais do GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. Fotomicrografia óptica da derme superficial (asterisco) dos animais do GC e GPRP após 15 dias da aplicação da solução fisiológica e Gel de PRP. A) Notar presença acentuada de neovascularização em A no GPRP, aumento de 200X. B) Notar presença discreta de neovascularização em A no GC. Aumento de 400X. Coloração HE.

Avaliando a intensa proliferação vascular nos animais tratados com PRP pode-se correlacionar tal fato com os fatores de crescimento presentes nas plaquetas, responsáveis em atuar na fase inicial da cicatrização. Dentre os inúmeros fatores de crescimento, o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) estimulam a angiogênese, mitogênese, permeabilidade vascular, e induzem crescimento de tecido epitelial (BOLTA, 2007). Os resultados encontrados neste ensaio indicaram que a proliferação vascular ocorreu principalmente pelos fatores presentes nas plaquetas, assim, promoveram o suprimento de oxigênio e nutrição da ferida, favorecendo o processo cicatricial.

A formação de novos vasos parece ser substancialmente favorecida pela aplicação do gel de PRP, o número relativamente maior de elementos de pequeno e médio calibre é observado no GPRP. Esse fato evidencia que o plasma rico em plaquetas é capaz de estimular a proliferação vascular no leito receptor da ferida e reduz as taxas de necrose por aumentar a irrigação local no leito receptor, fazendo-se alusão com os efeitos do PRP obtidos por Vendramin e colaboradores (2006) que testaram a aplicação do produto em enxertos cutâneos, ósseos e na cicatrização de feridas, observando diminuição no tamanho das feridas, bem como o desenvolvimento de um tecido de granulação de melhor qualidade, com uma vascularização mais intensa.

Quanto à reação inflamatória da ferida avaliou-se a presença das células mononucleares e polimorfonucleares (macrófagos e neutrófilos), porém não foram observado diferenças significativas ($p=0,65$ e $p=0,14$, respectivamente) entre os grupos experimentais. Apesar de não se observar diferença significativa quanto à presença de reação inflamatória, observou-se nos cortes histológicos de ambos os grupos a presença de macrófagos e neutrófilos, conforme ilustrado na Figura 2.14.

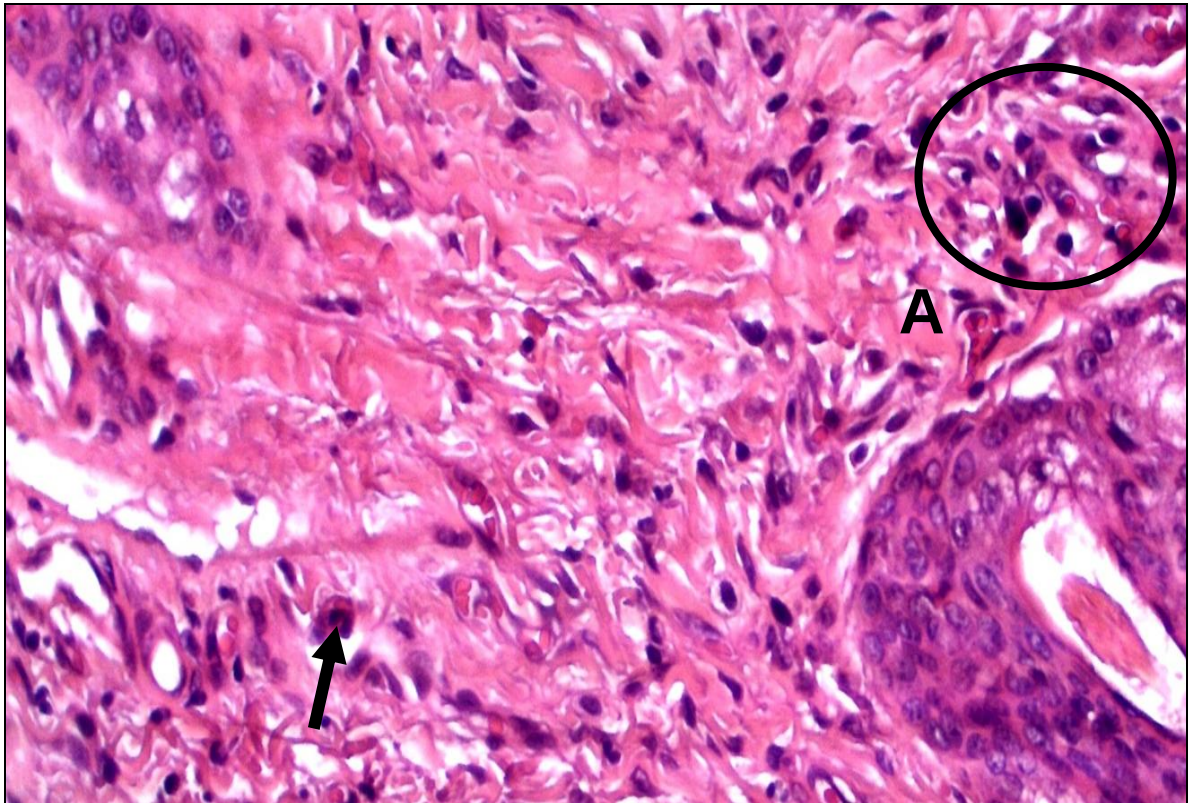


Figura 2.14 Aspecto histológico da presença de reação inflamatória em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Fotomicrografia óptica da derme de animais do GPRP submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. Notar presença discreta de polimorfonucleados (seta), além da presença discreta de mononucleados (A). Coloração HE. Aumento de 400X.

Em relação à reação inflamatória da ferida cirúrgica, avaliou-se a presença das células mononucleares e polimorfonucleares (macrófagos e neutrófilos), porém não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Os resultados encontrados neste ensaio são semelhantes ao obtidos por Vendramin e colaboradores (2010), que embora no seu estudo tenham utilizando o plasma rico em plaquetas autólogo em enxertos cutâneos em coelhos, observaram presença de infiltrado inflamatório nos cortes histológicos, porém as variáveis categóricas não demonstraram diferença estatisticamente significativa.

Portanto, a presença discreta de mononucleares e polimorfonucleares podem ser justificadas pelo tempo de evolução da ferida (14 dias). Os resultados encontrados neste ensaio foram semelhantes ao obtidos por Bauer et al. (2009), que avaliando efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas em ratos encontrou 24 horas após procedimento cirúrgico presença intensa de neutrófilos, e após três dias intensa presença de macrófagos, e após sete dias número intenso de fibroblastos. Correlacionando os achados encontrados neste ensaio com as fases da inflamação, sabe-se que logo após a ocorrência da lesão são recrutados polimorfonucleados para realizarem fagocitose das bactérias, decomposição de tecido necrótico e promover a limpeza da ferida, em seguida, por meio de fatores quimiotáticos recrutam-se os macrófagos, que atuam na remodelação da matriz extracelular, e também liberam substâncias vasoativas e fatores de crescimento para auxiliar nas fases subsequentes da inflamação (RODRIGUES et al., 2001; CÂNDIDO, 2007; SLATER, 2007). O estudo histológico comprovou que, mesmo não havendo diferença significativa entre as variáveis categóricas de presença de células mononucleares e polimorfonucleares, foi possível visibilizar na microscopia óptica que houve discreta reação inflamatória local com uso do PRP, que pode ter potencializado a reparação.

Quando se avaliou intensidade de proliferação de fibroblastos ($p=0,52$), colagenização ($p=0,87$) e hemorragia ($p=1,0$) os resultados foram semelhantes entre os grupos experimentais, não apresentando diferenças significativas. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre as variáveis, nas análises histológicas foi possível visualizar no GPRP discreta proliferação de fibroblastos, e colagenização (Figura 2.15A), hemorragia e vasos congestos no GC (Figura 2.15B).

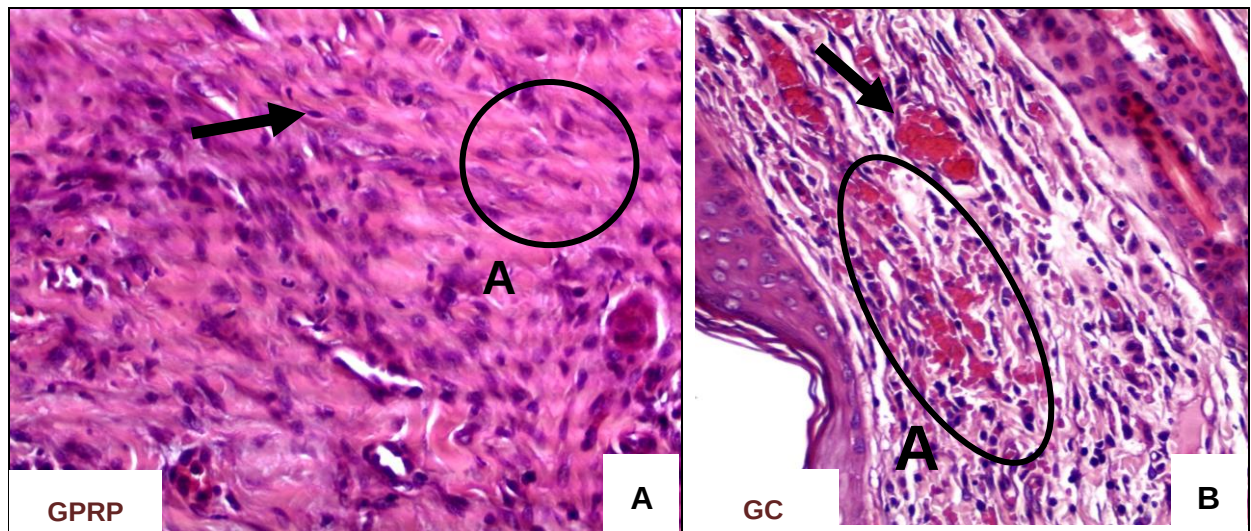


Figura 2.15 Aspecto histológico da proliferação de colágeno, fibroblastos e hemorragia em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Fotomicrografia óptica da derme de animais do GPRP e GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Notar presença acentuada de proliferação de fibroblastos bem diferenciados (seta) e presença acentuada de colágeno (A). B) Notar presença acentuada de hemorragia em A e presença de vasos congestos (seta). Coloração HE. Aumento de 400X e 200X.

O aumento no número de macrófagos e fibroblastos era esperado pelo efeito de quimiotaxia e dos fatores de crescimento, porém não foi significativo entre os grupos, mas foi visível nas lâminas. A maior quantidade de colágeno (colágeno imaturo) também observada foi devido ao estímulo dos fibroblastos pelos fatores de crescimento. Os achados deste ensaio são semelhantes aos de Liu e colaboradores (2002), que mostraram aumento da produção de macrófagos, proliferação de fibroblastos e colágeno são proporcional ao aumento da concentração plaquetária no PRP. Bhanot et al. (2002) e Man et al. (2001) também relataram que o PRP aumenta a taxa de produção de colágeno, angiogênese, proliferação de fibroblastos e síntese de matriz extracelular, melhorando a reparação de modo geral.

Quanto à hemorragia, os achados microscópicos indicaram discreta presença de hemorragia em ambos os grupos, sendo em alguns momentos mais intensa nos animais do GPRP. Pode-se inferir que em virtude da estimulação da angiogênese promovida pelo gel de PRP formando novos capilares de pequeno e médio calibre acabem sendo rompidos por serem frágeis, promovendo hemorragia local. Por outro lado, os animais do GC apresentaram hemorragia e vasos congestos, fato que pode ser correlacionado com os achados macroscópico quanto a presença de RUBOR no GC. Os resultados encontrados nesta pesquisa, são condizentes com os de Vendramin et al. (2006) e Bauer et al. (2009), utilizando PRP em enxertos ósseos e avaliando os efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas em ratos, não sendo observada a presença significativa de hemorragia nos grupos experimentais.

A intensidade da reepitelização no GPRP quando comparado com o GC foi significativa ($p=0,01$). No GPRP a reepitelização foi significativamente maior ($p=0,009$) na região distal quando comparada com as outras regiões (Figura 2.16).

A reepitelização, caracterizada pelo aumento das camadas epiteliais foi significativamente maior no GPRP. Ocorreu de maneira mais acentuada na porção distal da lâmina quando comparada com as outras porções. Sendo assim, a boa resposta vascular mediante aplicação do gel de plasma rico em plaquetas é considerada como fator positivo na reepitelização, visto que ocorreu de maneira progressiva, devido a nutrição sanguínea da ferida ter sido adequada. A reepitelização intensa presente nos animais do grupo PRP estão condizentes com Bauer e colaboradores (2009), em seu estudo avaliando os efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos encontrou maior reepitelização após 7 dias do procedimento cirúrgico nos animais tratados com o PRP.

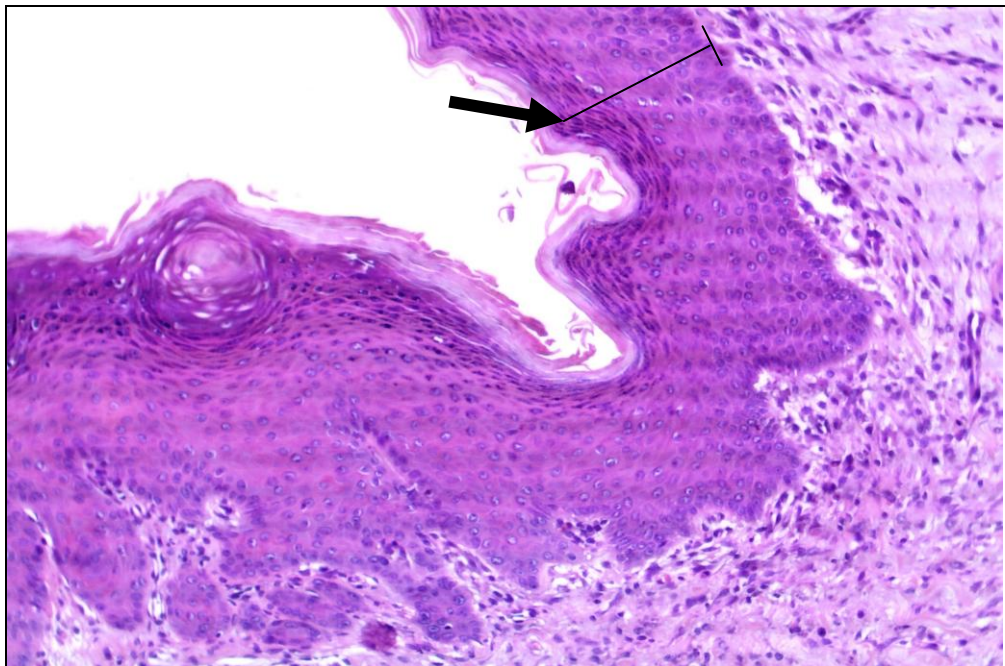


Figura 2.16 Aspecto histológico da intensidade de reepitelização em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Fotomicrografia óptica da porção distal derme de animais do GPRP ($p=0,009$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. Notar presença acentuada de reepitelização (seta). Coloração HE. Aumento de 200X.

Diante dos resultados encontrados neste ensaio, é importante ressaltar a semelhança entre a microscópica e a macroscópica quanto à presença de necrose nas lesões do GC (Figura 2.17), o qual apresentou diferença significativamente maior quando comparada com GPRP.

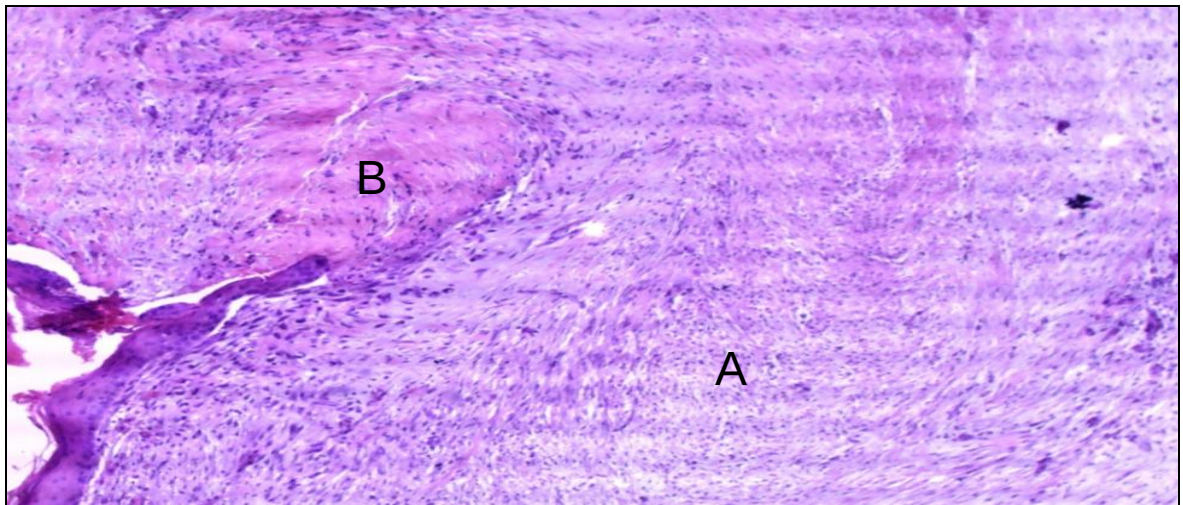


Figura 2.17 Aspecto histológico de epitélio alterado em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Fotomicrografia óptica da derme de animais do GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. Notar presença de necrose (A) e epitélio normal (B). Coloração HE. Aumento de 40X.

Conforme descrito por Bauer et al. (2009), existem casos que 24 horas e três dias após procedimento cirúrgico pode-se visualizar tecido necrótico superficial na epiderme e derme, e acima de sete dias tecido necrótico. Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo, são condizentes com a literatura, como as lâminas foram confeccionadas com material correspondente ao décimo quarto dia do pós operatório pode-se correlacionar os achados macroscópico com os microscópicos.

Observou-se neste estudo, as lâminas dos animais do GC com presença de tecido necrótico na região da epiderme, com fibroblastos em picnose, e áreas com destruição de colágeno (Figura 2.18) em derme.

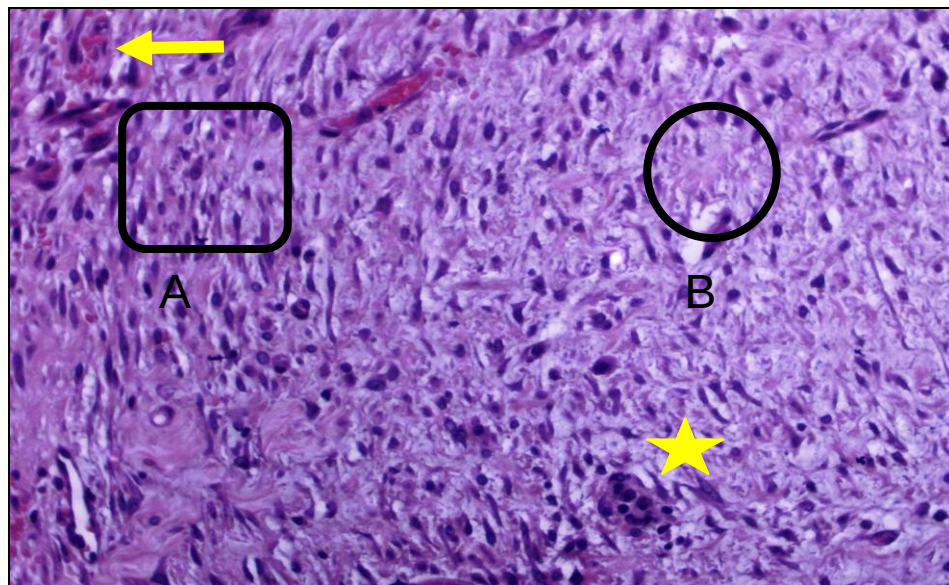


Figura 2.18 Aspecto histológico de necrose em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Fotomicrografia óptica da derme de animais do GC submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. Notar presença discreta de hemorragia (seta). Presença de fibroblastos em picnose em A. Ausência de colágeno em B e presença de mononucleares (asterisco). Coloração HE. Aumento de 200X.

Durante o processo de necrose ocorre morte celular de um organismo vivo. As principais causas da ocorrência de necrose no epitélio são obstrução vascular por isquemia (coloração esbranquiçada) e anóxia (coloração vermelho escuro). As principais alterações decorrentes do processo de autólise podem ser visualizadas à microscopia algum tempo após ter ocorrido a morte celular. Os achados encontrados podem ser picnose nuclear (intensa contração e condensação de cromatina, tornando o núcleo intensamente basófilo, de aspecto homogêneo e bem menor que o normal), cariólise (digestão da cromatina, com desaparecimento da afinidade

tintorial do núcleo a ponto de não identificá-lo em coloração de rotina) e cariorrexe (fragmentação e dispersão do núcleo no citoplasma) (BRASILEIRO FILHO, 2011). Os resultados encontrados neste ensaio são condizentes com a literatura, a presença de tecido necrótico observado nas lâminas apresentava áreas com destruição de colágeno e fibroblastos com núcleo picnótico, lesões características de presença de necrose tecidual.

2.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a utilização do plasma rico em plaquetas na forma de gel em cirurgia reconstrutiva é capaz de estimular a angiogênese na ferida favorecendo o processo de cicatrização.

O gel de PRP é capaz de reduzir a ocorrência de necrose na extremidade dos flapes, e favorece a fase de reparação e integração do retalho no leito receptor.

A utilização do plasma rico em plaquetas é uma boa opção em cirurgias reconstrutivas, por reduzir complicações decorrentes do procedimento cirúrgico.

2.5 Referências³⁴

ANITUA E. (2007). **Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers**. Disponível em: <http://www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 21.09.13.

BAUER, J.A; CORREA, J; LIMA, M.F.L; 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 Periodontia**, v.19, n. 3, p. 98-108, 2009.

BHANOT S, ALEX JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. **Facial Plastic Surgery**, v,18, n.1, p.27-33, 2002

BOLTA, P.R.Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatoven APA**, v.16, n.4, p.156-165, 2007.

BRASILEIRO FILHO G. **Adaptação, dano e morte celular**. In: Bogliolo Patologia Geral. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan S.A, Cap.1, 2011, p.1492.

CÂNDIDO, L. C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Editora SENAC, p. 282, 2007.

CARMONA, J.U; LÓPEZ, C; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías em caballos. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.41, p.175-176, 2009.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Information and repair. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic basis of diseases**. 5.ed. Philadelphia:W.B. Saunders, 1994. cap.3, p.85-8.

³⁴ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; SILVA.; ARGOLO, N.; SERAKIDES, R. Aspectos microscópicos da reparação mediada por plasma rico em plaquetas e auto enxerto esponjoso em falhas ósseas experimentais no crânio de coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.152-160, 2009.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. In: HEDLUND, C.S. Cirurgias reconstrutivas. 3.ed. São Paulo: Roca. Cap.18, p. 135-186, 2007.

FOWLER, D. Retalhos de pele. In: HARARA, J. **Segredos em cirurgia de pequenos animais**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 98-101.

GARCEZ, T.N.A; PAZ, A.H.R; MAGRISSO, A.B; MELLO, H.F; GONÇALVES, F.C; MEYER, F.S; CONTESINI, E.A; CIRNE-LIMA, E.O. Comparação entre três protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) utilizando coelho como modelo experimental. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.1134, 2013.

GARROS, I.C; CAMPOS, A.C.L; TÂMBARA, E.M; TENÓRIO, S.B; TORRES, O.J.M; AGULHAM, M.A; ARAÚJO, A.C.F; SANTIS-ISOLAN, P.M.B; OLIVEIRA, R.M; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, n. 3, p.55-65, 2006.

GREGORY, C.R. Wound healing and influencing factors. In: FOWLER, D; WILLIAMS J.M. **Manual of canine and feline wound management and reconstruction**. British Small Animal Veterinary Association, p. 13-24, 1999.

KASTEN, P.; VOGEL, J.; GEIGER, F.; NIEMEYER, P.; LUGINBÜHL, R.; SZALAV, K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 3983-3992, 2008.

LIU Y.; KALÉN A.; RISTO O.; WAHLSTRÖM O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. **Wound Repair and Regeneration**, v.10, n.5, p.336-40, 2002.

LU, H. H.; VO, J. M.; CHIN, H. S.; LIN, J.; COZIN, M.; TSAY, R.; EISIG, S.; LANDESBURG, R. Controlled delivery of platelet – rich plasma – derived growth factors for bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 86, n. 4, p. 1128-1136, 2008.

MAN D.; PLOSKER H.; WINLAND-BROWN JE. The use of autologous platelet rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plastic Reconstructive Surgery**.v.107, n.1, p.229-37, 2001

MORATO, G.O. **Osso esponjoso liofilizado de cão utilizado como enxerto puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo experimental**. 2013. 80f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2013.

NUNES FILHO, D.P; LUPPINO,F; YAEDÚ, R.Y.F; CARVALHO, P.S.P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implate News**, v.4, n.3, p.263-262, 2007.

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

PAVLETIC, M. M. Pele e órgãos anexos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**: 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. Cap.24, p. 323 – 333.

PAVLETIC, M.M. Tegumento. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. Vol.I. São Paulo: Manole, 2007, Cap.23, p. 292-321.

PAVLETIC, M.M. **Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. In: _____. Axial parttner skin flaps. 3. Ed., Lowa: Wiley – Blackwell, Cap. 13, p. 357– 378, 2010.

PIPPI, N.L. Técnicas reconstrutivas na cirurgia oncológica. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade De Veterinária. In: **II Simpósio Estadual de Oncologia Veterinária**, 2009. Palestra proferida em 17 de outubro de 2009.

RODRIGUES, F. R; CÂNDIDO, L. C; ASSAD, L. G; COSTA, M. C. A; COUTINHO, V. L. Curativos em cirurgia. In: MARQUES, R. G. **Cirurgia – instrumental e fundamentos técnicos**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. p. 359-374.

SALGADO, M.I; PRETOIANU, A; BURGARELLI, G.L; BARBOSA, A. J.A; ALBERTI, L.R. Cicatrização conduzida e enxerto de pele parcial no tratamento de feridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.53, n.1, p. 80-42007.

SILVA, R.F; REZENDE, C.M.F; PAES-LEME, F.O; CARMONA, J.U. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 43, p. 95-98, 2011.

SLATER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais: Pele e órgãos anexos**. 3.ed. São Paulo: Manole, Cap.22, p. 304-309, 2007.

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

SWAIM, S.F. Wound healing. In: SWAIM S.S. (Ed): **Surgery of traumatized skin: Management and reconstruction in the dog and cat.** Philadelphia: W.B. Saunders, p. 70, 1980.

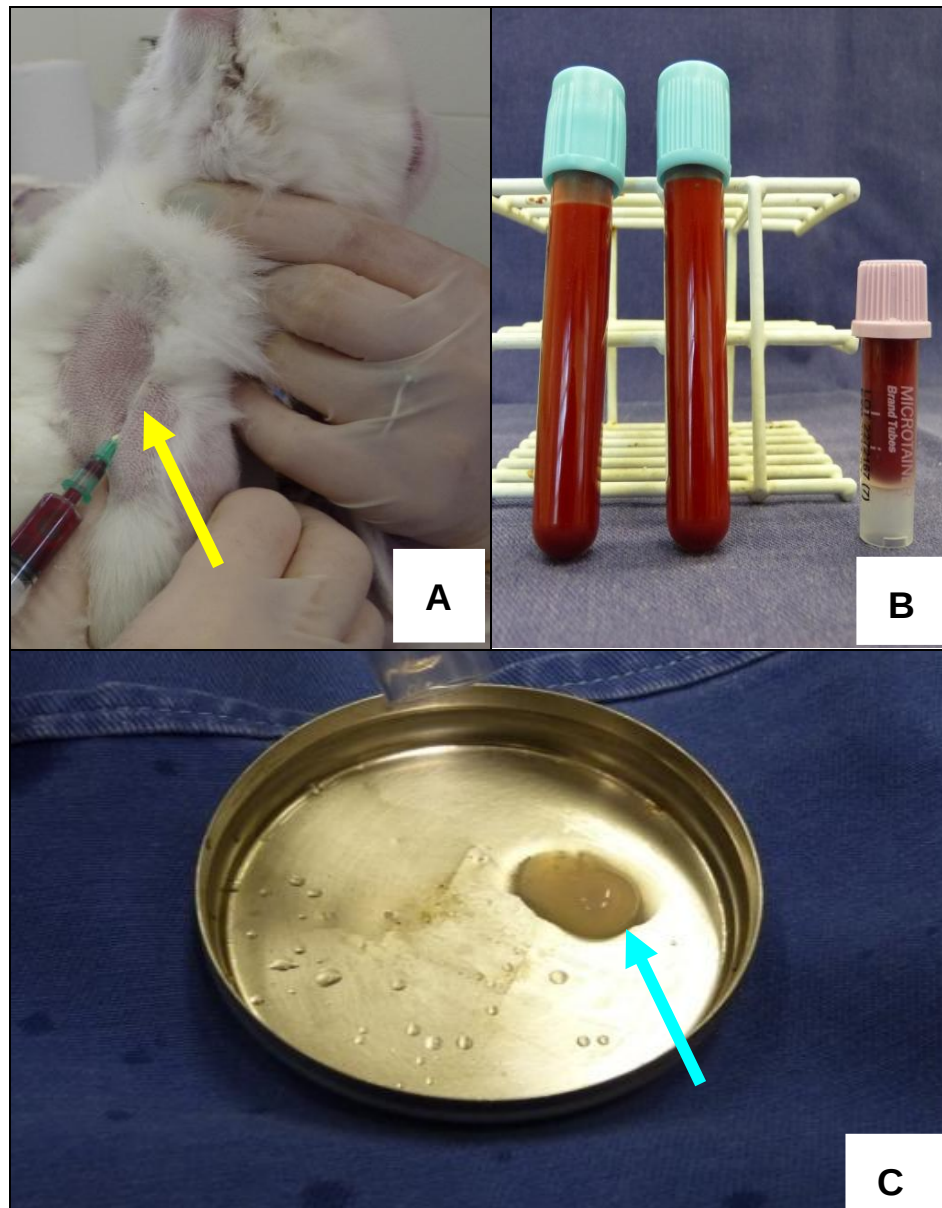
VANAT, N.; MEDEIROS, T.N.S.;BALARIN, M.R.S.; PEREIRA, P.M.; DE BIASI, F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 313-322, 2012.

VENDRAMIN, F.S; FRANCO, D; NOGUEIRA, C.M; PEREIRA, M.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, 2006.

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

VENDRUSCOLO, C.P; CARVALHO, A.M; MORAES, L.F; MAIA, L; QUEIROZ, D.L; WATANABE, M.J; YAMADA, A.L; ALVES, A.L. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.2, p.106-110, 2012.

ANEXO I



Imagens fotográficas das etapas de obtenção do PRP em coelhos submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Posicionamento do animal para punção da veia jugular (seta). B) Amostras sanguíneas para preparação do PRP (tubo de tampa azul) e contagem de plaquetas (tubo de tampa roxa). C) Gel de PRP (seta) pronto para ser utilizado.

ANEXO II

AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA			
Nº COELHO	PESO	SEXO	DATA
1ª avaliação - D3			
Edema			
Ausente	Discreto		
Moderado	Intenso		
Rubor			
Ausente	Presente		
Integridade da pele			
Rósea	Hemorragia discreta	Hemorragia intensa	
Necrose			
Ausente	Presente		
Exsudato			
Ausente	Discreto	Moderado	Intenso
2ª avaliação - D7			
Edema			
Ausente	Discreto		
Moderado	Intenso		
Rubor			
Ausente	Presente		
Integridade da pele			
Rósea	Hemorragia discreta	Hemorragia intensa	
Necrose			
Ausente	Presente		
Exsudato			
Ausente	Discreto	Moderado	Intenso
3ª avaliação - D14			
Edema			
Ausente	Discreto		
Moderado	Intenso		
Rubor			
Ausente	Presente		
Integridade da pele			
Rósea	Hemorragia discreta	Hemorragia intensa	
Necrose			
Ausente	Presente		
Exsudato			
Ausente	Discreto	Moderado	Intenso

LEGENDA	
Necrose	
Ausente	0
Presente	1
Edema	
Ausente	0
Discreto	1
Moderado	2
Intenso	3
Rubor	
Ausente	1
Presente	2
Exsudato	
Ausente	0
Discreto	1
Moderado	2
Intenso	3
Integridade da pele	
Rósea	1
Hemorragia discreta	2
Hemorragia intensa	3

Ficha individual das avaliações macroscópicas do 3º, 7º e 14º dia dos animais submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

ANEXO III

AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS				
Porção:	nº			
Achados HE	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
proliferação vascular	0	1	2	3
células mononucleares	0	1	2	3
células polimorfonucleados	0	1	2	3
proliferação fibroblásticas	0	1	2	3
colagenização	0	1	2	3
reepitelização	0	1	2	3
hemorragia	0	1	2	3

Ficha individual para avaliações microscópicas das variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico.

ANEXO IV

Critérios para avaliar a intensidade dos achados histológicos dos animais submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Proliferação Vascular – foi considerada ausente, quando não se evidenciou vasos no corte histológico; discreta, quando foram visibilizados poucos vasos esparsamente situados, de forma isolada no contexto; moderada, quando os vasos apareceram com maior frequência e dispersos no campo óptico e acentuada, quando foi possível evidenciar com grande frequência a presença de vasos, dispostos em todo o contexto.

Células mononucleares – foram classificadas em ausente, quando estas células não foram visibilizadas no campo óptico; discreta, quando foram evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado; moderada quando apareceram com maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visibilizar áreas livres de infiltrado; e acentuada, quando as células foram evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.

Células polimorfonucleares – foram classificadas em ausentes, quando não foram visibilizadas no campo óptico; discretas, quando foram visibilizadas esparsamente, de forma isolada, com muitas áreas livres de infiltrados; moderada, quando já foram visibilizadas formando agregados, porém com áreas adjacentes livres de infiltrados; acentuada, quando estas células apareceram com grande frequência, formando agregados densos, sem áreas livres de infiltrados.

Proliferação fibroblástica – foram classificadas em ausente, quando não se evidenciou proliferação de fibroblastos; discreta, quando houve esparsos fibroblastos proliferados em meio ao tecido conjuntivo frouxo; moderada, quando houve moderada quantidade de fibroblastos proliferados, constituindo pequenos feixes celulares multi-direcionalmente; e intensa, quando houve grande quantidade de fibroblastos proliferados constituindo agregados compactos de células arranjadas multi-direcionalmente.

Colagenização – classificou-se como ausente, quando não foi possível a visibilização do depósito de fibras colágenas; discreta, quando a deposição de fibras colágenas foram em pequena quantidade, caracterizadas por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados; moderada quando a deposição de colágeno formou feixes de fibras eosinofílicas, espessas, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados; e intensa, quando houve grande deposição de fibras colágenas, constituindo feixes de fibras eosinofílicas espessas, compactamente arranjadas em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.

Reepitelização – classificou-se como ausente, quando não houve epitélio visibilizado no campo óptico; discreta quando o epitélio começou a recobrir a área da ferida; moderada, quando apareceu de forma parcial sobre a área acometida; acentuada, quando visibilizou-se de forma total ou completa sobre o tecido conjuntivo.

Hemorragia – foi considerada ausente, quando não se evidenciou hemácias fora dos vasos sanguíneos; discreta, quando foram visibilizadas poucas hemácias ao redor de até dois vasos sanguíneos; moderada, quando foram observadas hemácias em maior quantidade ao redor de pelo menos dois vasos sanguíneos; acentuada, quando era observada grande quantidade de hemácias ao redor de diversos vasos sanguíneos.

Fonte: Garros e t al., 2006.

CAPÍTULO 3 – Método de obtenção do plasma rico em plaquetas em coelhos (*Oryctogalus cuniculus*)

RESUMO - O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto de fácil obtenção e de baixo custo, destacando-se pelos seus fatores de crescimento na reparação tecidual. O presente trabalho teve como objetivo estudar o método de centrifugação dupla na obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), a fim de avaliar, a eficácia do aumento da concentração de plaquetas no produto final, o preparo do gel de PRP e otimizar o tempo de preparo da amostra final. Quinze coelhos, da raça Nova Zelândia branco, fêmeas, foram submetidas à colheita de sangue para o preparo do PRP. O material foi submetido à contagem de plaquetas, e em seguida a centrifugação dupla, após ocorreu à separação das partes do plasma: a superior, consistindo o plasma pobre em plaquetas (PPP) e a parte inferior as hemácias, e um botão plaquetário na zona intermediária. O PPP foi descartado, de modo que permanecesse apenas 1mL de PPP e o botão plaquetário. Esse material foi levemente agitado promovendo a resuspensão das plaquetas, resultando na produção do PRP. Para obtenção do gel de PRP ativou-se as plaquetas adicionando 0,3 mL de gluconato de cálcio, formando gel de PRP, próximo ao momento de sua utilização terapêutica. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (Teste t emparelhado, sendo $p < 0,05$ e analisados descritivamente por meio de gráficos e tabelas). A contagem de plaquetas obtida na amostra após a preparação do PRP foi três vezes maior quando comparado com a amostra de sangue total, indicando que concentração de plaquetas após a centrifugação dupla foi elevada. O tempo de preparo do plasma rico em plaquetas neste estudo foi em média de 40 minutos. Conclui-se que o PRP foi obtido com sucesso pelo protocolo de dupla centrifugação, sendo capaz de aumentar a concentração plaquetária na amostra de PRP quando comparado com o sangue total, permitindo desta forma o emprego do PRP em procedimentos cirúrgicos.

Palavras – chave: coelhos, concentração de plaquetas, PRP

ABSTRACT - The platelet rich plasma (PRP) is a product easy to obtain and inexpensive, especially for their growth factors in tissue repair. The present study aimed to study the method of double centrifugation to obtain the platelet rich plasma (PRP) in order to evaluate the effectiveness of increasing the platelet concentration in the final product, the preparation of PRP gel and optimize time preparation of the final sample. Fifteen white rabbits white, female New Zealand, underwent blood sampling for the preparation of PRP. The material was subjected to platelets, and then double centrifugation, separation occurred after the plasma parts: the top, consisting of the platelet poor plasma (PPP) and the bottom of a platelet button. The PPP was discarded, 1 ml of which remain only PPP and platelet button. This material was gently agitated to promote resuspension of the platelets, resulting in production of PRP. To obtain the PRP gel was activated platelets with 0,3 mL of calcium gluconate, forming PRR gel, near the time of their therapeutic use. The data were subjected to statistical analysis (Test t paired, with $p < 0.05$ and descriptively analyzed through graphs and charts). The platelet count in the sample obtained after the PRP preparation was three times higher when compared to the whole blood sample, indicating that the platelet concentration after the double centrifugation was high. The time of preparation of platelet rich plasma in this study averaged 40 minutes. It follows that the PRP was successfully obtained by double centrifugation protocol being able to increase platelet concentration in the PRP sample as compared to whole blood, thereby permitting the use of PRP in surgical procedures.

Key – words: rabbits, platelet concentration, PRP

3.1 Introdução

O plasma rico em plaquetas (PRP) e o concentrado de plaquetas (CP) são produtos de fácil obtenção e de baixo custo, e se destacam por possuírem fatores de crescimento de reparação tecidual importantes. Um exemplo dos fatores de crescimento são os grânulos alfa das plaquetas ativadas, os quais estimulam a quimiotaxia, fibroplastia e angiogênese (MAIA E SOUZA, 2009).

Entretanto, outros agentes, como os fatores de crescimento mitogênicos, também são liberados pelas plaquetas, estes se relacionam ao aumento da população de células cicatriciais por mitogênese. Os fatores de crescimento transformador beta (TGF β), fator de crescimento endotelial (EGF), e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) que agem sinergicamente na melhoria do acesso das células inflamatórias para a área da lesão, também são fatores liberados pelas plaquetas, que atuam principalmente na angiogênese, fibroplasia e regeneração da pele (WERNER E GROSE, 2003).

A obtenção dos componentes ricos em plaquetas é feita por meio da centrifugação do sangue total, com forças gravitacionais e tempos específicos. Este componente pode ser obtido por uma (MACEDO, 2004; MESSORA et al., 2009) ou duas centrifugações (VENDRAMIN et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; CARMONA et al., 2009). De acordo com Maia e Souza (2009) a ativação plaquetária é realizada próximo ao momento da aplicação terapêutica, podendo utilizar para esta finalidade, diversas substâncias como trombina recombinante humana, trombina autóloga ou extra purificada, gluconato de cálcio e cloreto de cálcio.

O gel de plasma rico em plaquetas (PRP) é descrito como a mais recente linha de colas teciduais com uma vantagem adicional em relação à cola de fibrina, pois possui fatores de crescimento e citocinas, proporcionando grande benefício na cicatrização, como menor tempo de reepitelização, redução de exsudato da ferida e necrose (BHANOT, 2002; MARX, 2004; VENDRAMIN et al., 2010).

A busca pela melhoria do plasma rico em plaquetas é muito importante e inúmeros estudos estão sendo desenvolvidos a fim de realizar novas descobertas

sobre esse subproduto do sangue (NUNES FILHO et al., 2007; VENDRAMIN et al., 2010).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o método de dupla centrifugação na obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), para avaliar a eficácia do aumento da concentração de plaquetas no produto final e o método de preparo do gel de PRP, além de otimizar o tempo de preparo da amostra final. Pesquisas como estas são importantes para aprimorar a elaboração do PRP para que este possa ser empregado em cirurgias a fim de melhorar a cicatrização.

3.2 Material e Método

O procedimento de preparação do plasma rico em plaquetas foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

3.2.1 Seleção dos pacientes

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Jaboticabal³⁵.

O modelo experimental utilizado para a realização da coleta das amostras de sangue foi o coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Foram utilizados 15 coelhos da raça *Nova Zelândia branco*, com idade média de 170 dias, fêmeas, com peso médio de 3,45 kg, provenientes de produtor especializado na criação da espécie. Os coelhos foram mantidos no biotério do Curso de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da UNESP, Câmpus de Jaboticabal em gaiolas individuais com dimensões de 80 cm x 50 cm x 35 cm, obedecendo-se os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Foi

³⁵ Protocolo número: 028406/12

fornecido durante todo o experimento aos animais ração comercial³⁶ própria para a espécie e água *ad libitum*.

3.2.2 Obtenção do plasma rico em plaquetas

Após a sedação dos coelhos com Cloridrato de Clorpromazina³⁷ na dose de 0,5 mg/kg, e Morfina³⁸ na dose de 0,5mg/kg na mesma seringa, por via intramuscular (IM), realizou-se a tricotomia da região cervical para acesso das veias jugulares, e procedeu-se antissepsia com clorexidine e solução de álcool a 90%. Os animais foram posicionados em decúbito esternal com o pescoço em extensão dorsal máxima para permitir a visualização adequada das veias jugulares.

Procedeu-se venopunção da veia jugular e coleta de 8 mL de sangue (Figura 3.1A) acondicionada em 3 tubos estéreis, dois com capacidade de 3,6 mL contendo citrato de sódio³⁹ (anticoagulante) destinados à preparação do PRP, e um terceiro tubo com capacidade de 1mL contendo EDTA⁴⁰ (anticoagulante) foi preenchido com 0,8ml de sangue o qual foi destinado à contagem de plaquetas (Figura 3.1B). Após determinar a contagem plaquetária dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie, dava-se início a preparação do PRP.

O frasco com citrato de sódio foi empregado na produção do plasma rico em plaquetas (PRP) pelo protocolo de dupla centrifugação em centrífuga laboratorial comum⁴¹ (Figura 3.1C) conforme descrito por Morato (2013). Os tubos foram centrifugados com tampa fechada, a 1600 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, resultando na separação de hemácias e plasma contendo leucócitos e plaquetas.

Em capela de fluxo laminar⁴², os tubos eram destampados para que o plasma fosse pipetado e transferido para outro tubo estéril (Figura 3.1D). O plasma era

³⁶ Nature multivida coelho - Socil - Sgh Ind. e Com, Ltda – Descalvado - São Paulo - Brasil.

³⁷ Clorpromazina® - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Itapira - São Paulo - Brasil.

³⁸ Dimorf – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Itapira - São Paulo - Brasil.

³⁹ Tubo BD vacutaneir® citrato de sódio – BD – São Paulo – São Paulo – Brasil.

⁴⁰ Tubo pediátrico BD vacutaneir® EDTA – BD – São Paulo – São Paulo – Brasil.

⁴¹ Modelo 206 I centrifuge/Fanem® - SP.

⁴² Vecoflow LTDA – Modelo bio 12 – Campinas – São Paulo – Brasil.

novamente centrifugado à 2000 rpm por 10 minutos (Figura 3.1E), resultando em duas partes de plasma: a superior, consistindo o plasma pobre em plaquetas (PPP) e a parte inferior, um botão plaquetário. O PPP foi descartado de modo que permanecesse apenas 1mL de PPP e botão plaquetário (Figura 3.1F). Esse material foi levemente agitado para promover a ressuspensão das plaquetas, resultando assim na produção do plasma rico em plaquetas (PRP).

Após o processo de enriquecimento do plasma a contagem da concentração de plaquetas foi realizada em máquina automática⁴³, a partir de uma alíquota de 80 µL da amostra do PRP. Após a contagem das plaquetas na amostra, o PRP foi ativado por meio da adição de 0,3 ml de gluconato de cálcio⁴⁴, próximo ao momento de sua utilização terapêutica, adquirindo assim, propriedades semelhantes a um gel, estando dessa forma, pronto para ser utilizado (Figura 3.1G).

⁴³ Poch – 100iV Diff- médica comércio representações e importações LTDA – Recife – Pernambuco – Brasil.

⁴⁴ Gluconato de cálcio 100mg/ml/ Hipolabor – Sabará – Minas Gerais - Brasil.

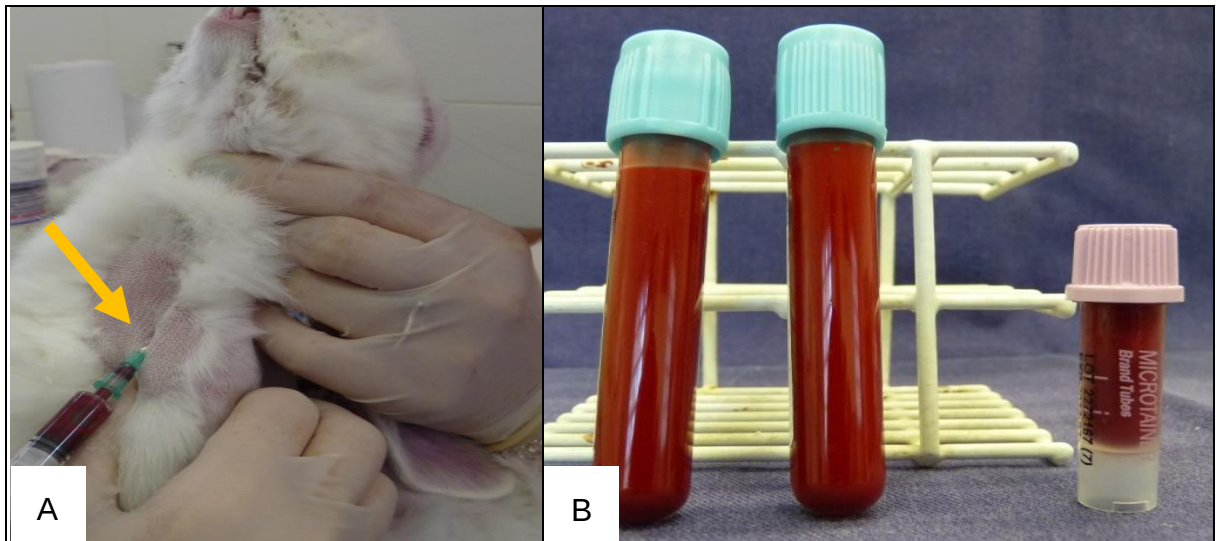


Figura 3.1 Imagens fotográficas das etapas de obtenção do PRP em coelhos no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Posicionamento do animal para punção da veia jugular. B) Amostras sanguíneas para preparação do PRP (tubo de tampa azul) e contagem de plaquetas (tubo de tampa roxa). C) Centrífuga utilizada para preparação do PRP (seta). D) Amostras sanguíneas após primeira centrifugação (seta). E) Amostras sanguíneas após segunda centrifugação, indicando o volume total de plasma (seta). F) Plasma após segunda centrifugação e descarte do sobrenadante . G) Gel PRP após adição de 0,3 ml de gluconato de cálcio com ativação das plaquetas.

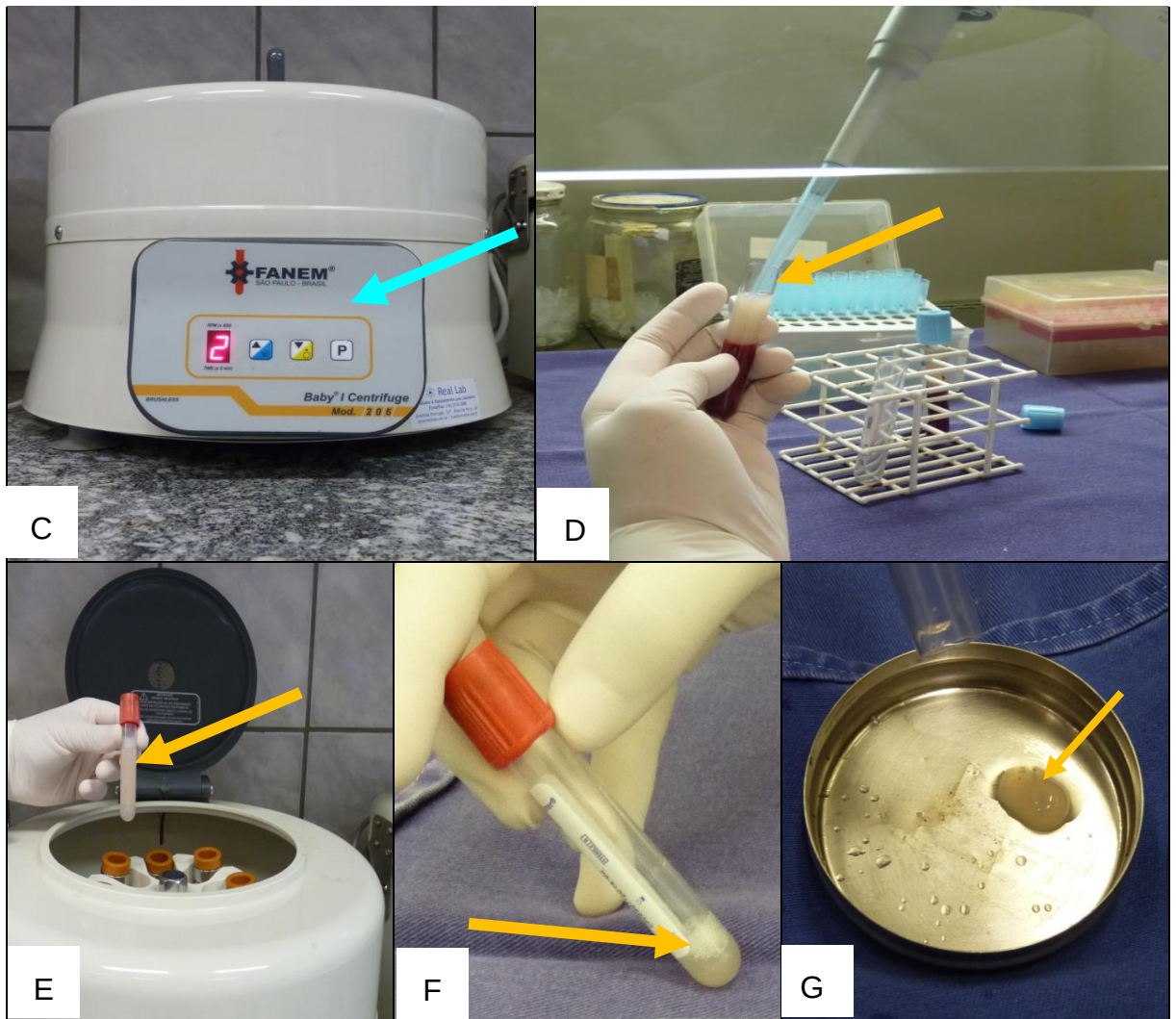


Figura 3.1 Imagens fotográficas das etapas de obtenção do PRP em coelhos no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013. A) Posicionamento do animal para punção da veia jugular (seta). B) Amostras sanguíneas para preparação do PRP (tubo de tampa azul) e contagem de plaquetas (tubo de tampa roxa). C) Centrífuga utilizada para preparação do PRP (seta). D) Amostras sanguíneas após primeira centrifugação (seta). E) Amostras sanguíneas após segunda centrifugação, indicando o volume total de plasma (seta). F) Plasma após segunda centrifugação e descarte do sobrenadante. G) Gel PRP (seta) após adição de 0,3 ml de gluconato de cálcio com ativação das plaquetas.

3.2.3 Análise estatística

Os dados de PRP (concentração plaquetária) foram analisados pelo teste t emparelhado com grau de significância de 5%, e também foram analisados descritivamente por meio de uma tabela representando a contagem plaquetária dos coelhos antes e após o enriquecimento do plasma rico em plaquetas, e por um gráfico diferenciando as médias dos valores da contagem plaquetária pré e pós enriquecimento do plasma rico em plaquetas (PRP).

3.3 Resultados e Discussão

Nas amostras de sangue dos coelhos a contagem inicial de plaquetas estava dentro dos padrões fisiológicos para a espécie, variando de 290.000 a 678.000 plaquetas/ μL . O volume obtido de PRP a partir de 7,2 mL de sangue foi 0,7 mL, a contagem média de plaquetas após centrifugação foi de 1.176.933 plaquetas / μL . Os resultados obtidos quanto à contagem plaquetária dos coelhos antes e após o enriquecimento do plasma rico em plaquetas (PRP) são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Resultados da contagem plaquetária das amostras sanguíneas de coelhos utilizadas para o preparo do PRP e quantidade de plaquetas obtidas após o enriquecimento realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

Coelho	Contagem de plaquetas da amostra $10^3\text{plq}/\mu\text{L}$	Contagem obtida após o enriquecimento ($\times 10^3\text{plq}/\mu\text{L}$)	Diferença entre os enriquecimentos
1	470	1.172	702
2	352	4.420	4.068
3	347	1.238	891
4	304	1.123	819
5	502	1.810	1.308
6	339	640	301
7	403	1.380	977
8	216	640	424
9	318	523	205
10	352	605	253
11	440	1.429	989
12	287	471	184
13	396	644	248
14	434	754	320
15	417	805	388
Média	371,8	1.176, 933	805,13

Avaliando o protocolo de centrifugação observa-se que a dupla centrifugação conforme preconizado por Camargo et al. (2002), e realizado neste ensaio foi adequado, sendo que a concentração de plaquetas após centrifugação dupla aumentou, embora em algumas amostras a concentração de plaquetas não tenha aumentado conforme o esperado acima de 1.000.000 plaquetas/ μ L, ainda assim foi possível a obtenção de bons resultados.

Entretanto, alguns autores relatam que a contagem deve apresentar uma concentração de plaquetas superior a 1.000.000 plaquetas/ μ L (DEL CARLO et al., 2009), outros autores obtiverem efeitos terapêuticos desejados com concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L (CARMONA et al., 2009). Os resultados encontrados nesta pesquisa quanto à contagem plaquetária corroboram com a literatura (CARMONA et al., 2009; DEL CARLO et al., 2009), sendo que na presente pesquisa obteve-se contagem plaquetária que variaram entre 470.000 e 4.420.000/ μ L no PRP.

Os resultados encontrados quanto ao volume médio de 0,7 mL do PRP obtido a partir de 7,2 mL de sangue total, foram semelhantes ao encontrados por Morato (2013), em seu estudo a partir de 8 mL de sangue total, obteve uma média de 0,8 mL de PRP.

Quanto ao valor inicial das amostras de sangue pode-se observar que 87% apresentavam os valores dentro dos padrões fisiológicos para a espécie, entretanto 13% estavam abaixo no limite mínimo, indicando que os animais estavam com algum distúrbio sistêmico. Segundo Freitas (2009) coelhos infectados com o protozoário *Eimeria stiedae* apresentam desordens sistêmicas principalmente hematológicas (trombocitopenia, anemia e leucocitose) e bioquímicas (hiperproteinemia e hiperalbuminemia) pela tentativa de suprir as necessidades decorrentes do parasitismo. Sendo assim, os animais que estavam com as concentrações plaquetárias abaixo do limite mínimo para a espécie, poderiam estar apresentando algum distúrbio sistêmico conforme descrito na literatura (FREITAS, 2009).

O protocolo da dupla centrifugação foi capaz de promover uma média de concentração plaquetária 3 vezes maior em relação ao valor inicial da amostra (desvio padrão = 980.546 plaquetas/ μ L). Na Figura 3.2 estão apresentadas as médias dos valores de contagem plaquetária pré e pós enriquecimento do plasma rico em plaquetas (PRP). Sendo assim, a amostra final de PRP quando comparada com a inicial foi significativamente maior no grupo PRP ($p=0,006$).

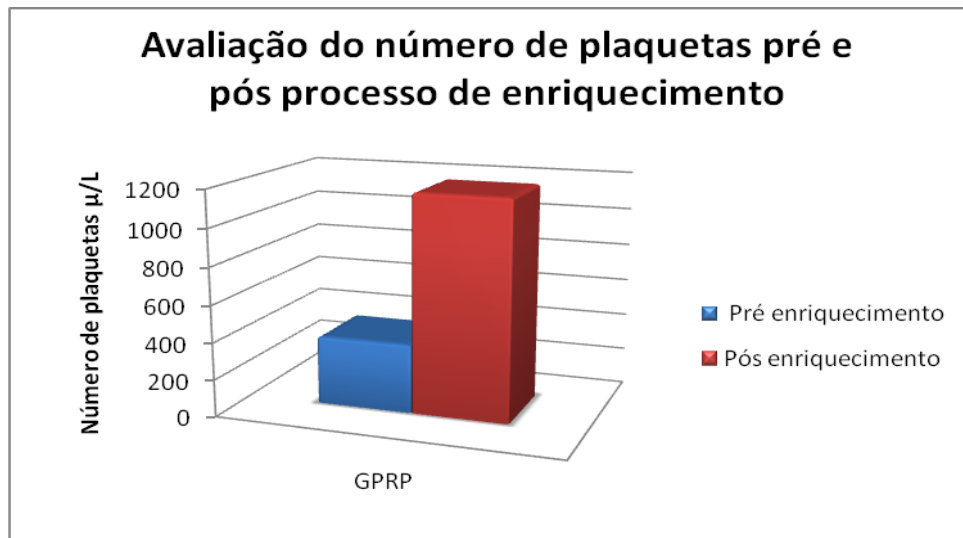


Figura 3.2 Resultado da centrifugação para obtenção do PRP em coelhos submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2013, capaz de promover uma média de concentração plaquetária 3 vezes maior em relação ao valor inicial de sangue coletada nos animais do GPRP ($p=0,006$).

Quanto a contagem de plaquetas obtida antes do enriquecimento do PRP foi menor quando comparado a obtida após o processo de enriquecimento do produto. No entanto, os dados obtidos nesta pesquisa são semelhantes aos resultados encontrados por Silva et al. (2011), em seu trabalho a contagem de plaquetas na amostra final, após a obtenção do PRP, foi significativamente maior que a contagem de plaquetas da amostra de sangue inicial.

O plasma rico em plaquetas é um produto de fácil obtenção e baixo custo, entretanto, quando começou ser produzido, sua obtenção era mais complexa e de alto custo, devido aos métodos automatizados que necessitavam de equipamentos e “kits” específicos, de volumes de sangue maiores, porém, dessa forma, eram obtidas altas concentrações plaquetárias e maiores volumes de PRP (MAIA E SOUZA, 2009). Após a realização de inúmeras pesquisas para adequar o melhor método de coleta associado a custos reduzidos, pesquisadores como Lemos et al. (2002) Macedo (2004) e Barbosa et al. (2008) desenvolveram protocolos que usassem as centrífugas laboratoriais na produção do plasma rico em plaquetas. O presente ensaio obteve o plasma rico em plaquetas a partir de métodos de fácil execução e de baixos custos, em virtude de utilizar-se o produto por profissionais de diversas modalidades clínicas e cirúrgicas.

Embora ainda não exista um protocolo de centrifugação padronizado, alguns estudos indicam a centrifugação única, enquanto outros indicam a dupla centrifugação (CAMARGO et al., 2002; JÚNIOR, 2004; MACEDO, 2004). Como não existe consenso entre a centrifugação única ou dupla, e também não existe uma velocidade de centrifugação e tempo de obtenção do produto pré estabelecido, padronizou-se neste ensaio 2 ciclos de centrifugação para a obtenção do PRP que foram semelhantes ao descrito por Morato (2013), estudo este que para obtenção do PRP utilizou a centrifugação. Sendo assim, utilizando a dupla centrifugação foi possível obter a concentração de plaquetas, no PRP final, variando entre 470.000 e 4.420.000 plaquetas/ μ L.

O sangue obtido para a preparação do plasma rico em plaquetas foi acondicionado em tubos estéreis contendo citrato de sódio (anticoagulante). Entretanto alguns autores descrevem a utilização de outros anticoagulantes como solução de citrato de dextrose (LU et al., 2008) e a heparina (KASTEN et al., 2008) para a confecção do PRP. Porém, o presente ensaio seguiu protocolo semelhante ao de Barbosa et al. (2008) e Vanat et al. (2012) que utilizaram na obtenção do PRP tubos estéreis contendo citrato de sódio e obtiveram bons resultados livre de contaminação. A escolha do citrato de sódio, nesta ensaio foi pela facilidade de

obtenção, já disponível de forma estéril no frasco, e por diminuir os riscos de contaminação no momento da colheita.

Entretanto, White e colaboradores (2000) descrevem que a utilização de outros anticoagulantes como EDTA podem causar danos na parte estrutural e funcional das plaquetas, inclusive provocar lesões aos tecidos tratados. Sendo assim, a escolha do citrato de sódio neste ensaio foi a melhor opção, em virtude de não causar danos aos tecidos.

Após a segunda centrifugação, o concentrado de plaquetas foi avaliado em máquina automática para contagem das plaquetas, e em seguida obteve-se o gel de PRP através da adição de 0,3mL gluconato de cálcio. Segundo Efeoglu et al. (2004) a obtenção do gel ocorre pela administração de um ativador plaquetário como trombina ou gluconato de cálcio, estes ativam o sistema de coagulação, resultando na formação do gel de PRP, facilitando sua aplicação em diversas cirurgias. Dessa forma, o ativador plaquetário utilizado no presente ensaio seguiu os mesmos critérios preconizado pela literatura (EFEUGLU et al., 2004; MORATO, 2013).

O volume de 0,3mL de gluconato de cálcio, utilizado nesta pesquisa, responsável na ativação plaquetária do PRP, foi suficiente para coagular a amostra, e o tempo de coagulação variou de 8 à 20 minutos, com média de 17,6 minutos. O tempo de preparo do plasma rico em plaquetas neste estudo, desde a coleta até a obtenção do gel foi reduzido, sendo em média de 40 minutos. Em virtude da maior aplicabilidade do PRP ser em procedimentos cirúrgicos o tempo torna-se um fator importante na sua obtenção. Sendo assim, quanto a avaliação do tempo de obtenção do PRP, a presente pesquisa apresentou resultados semelhantes ao descrito por Garcez et al. (2013) e Morato (2013) que obtiveram o tempo de preparo do PRP variando de 30 a 50 minutos.

3.4 Conclusões

Os resultados desse estudo indicaram que a preparação do gel PRP através do método de dupla centrifugação, é reprodutível e de fácil aplicação, podendo ser confeccionado em clínicas veterinárias e hospitais, desde que o local possua equipamentos laboratoriais necessários para obtenção do produto.

O método de dupla centrifugação é capaz de aumentar a concentração plaquetária na amostra do PRP quando comparado com o sangue total. Além disto, o tempo de preparo também é adequado, permitindo a obtenção do PRP em apenas 40 minutos.

3.5 Referências⁴⁵

BARBOSA, A.L.T.; DEL CARLO, R.J.; GOMES, H.C.; OLIVEIRA, A.C.; MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para preparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p. 1335-1340, 2008.

BHANOT S, ALEX JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. **Facial Plastic Surgery**, v.18, n.1, p.27-33, 2002

CAMARGO, P.M.; LEKOVIC, V.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; MADZAREVIC, M.; KENNEY, E.B. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **Journal Periodontal Research**, v.37, p. 300-306, 2002.

CARMONA, J.U; LÓPEZ, C; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos de plaquetas obtenidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías em caballos. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.41, p.175-176, 2009.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; SILVA.; ARGOLO, N.; SERAKIDES, R. Aspectos microscópicos da reparação mediada por plasma rico em plaquetas e autoenxerto esponjoso em falhas ósseas experimentais no crânio de coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.152-160, 2009.

EFEUGLU, C.; AKCAY, Y.D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.1, p.1403-7, 2004.

⁴⁵ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

FREITAS, F.L.C. **Avaliação fisiopatológica de coelhos (*oryctolagus Cuniculus*) infectados experimentalmente com oocistos esporulados de eimeria stiedae (apicomplexa: *eimeriidae*).** 2009. 82f. . Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2009.

GARCEZ, T.N.A.; ROSA PAZ, A.H.; MAGRISSE, A.B.; MELLO, H.F.; GONÇALVES, F.C.; MEYER, F.S.; CONTESINI, E.A.; CIRNE-LIMA, E.O. Comparação entre três protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) utilizando o coelho como modelo experimental. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p. 1134. 2013.

JUNIOR, F. Análise comparativa do índice de sucesso dos implantes osteointegrados com e sem a utilização de PRP no protocolo de fixação. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.25, p. 9-21, 2004.

KASTEN, P.; VOGEL, J.; GEIGER, F.; NIEMEYER, P.; LUGINBÜHL, R.; SZALAV, K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 3983-3992, 2008.

LEMOES, J.J.; JUNIOR ROSSI, R.; PÍSPICO, R. (2002). **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado.** Disponível em: [HTTP://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225](http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225). Acesso em 21.09.12.

LU, H. H.; VO, J. M.; CHIN, H. S.; LIN, J.; COZIN, M.; TSAY, R.; EISIG, S.; LANDESBURG, R. Controlled delivery of platelet – rich plasma – derived growth factors for bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 86, n. 4, p. 1128-1136, 2008.

MACEDO, A.P. **Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção.** 2004. 63f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

MAIA, L; SOUZA, M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1267-1274, 2009.

MARX RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.4, p.489-96, 2004.

MESSORA, M.E; NAGATA, M.J.H; MELO, L.G.M; FURLANETO, F.A.C; DELIBERADOR, T.M; GARCIA, V.G; BOSCO, A.F. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009.

MORATO, G.O. **Osso esponjoso liofilizado de cão utilizado como enxerto puro e associado a plasma rico em plaquetas ou medula óssea em falhas ósseas induzidas em coelhos – estudo experimental**. 2013. 80f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2013.

NUNES FILHO, D.P; LUPPINO, F; YAEDÚ, R.Y.F; CARVALHO, P.S.P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implate News**, v.4, n.3, p.263-262, 2007.

SILVA, R.F., REZENDE, C.M.F., PAES LEME, F.O., CARMONA, J.U. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 43 p.95-98, 2011.

WERNER, S; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, Houston, v.83, n.3, p.835-870, 2003.

WHITE, G.; ESCOLAR, G. EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. **Platelets**, v.11, p.56-61, 2000.

VANAT, N.; MEDEIROS, T.N.S.;BALARIN, M.R.S.; PEREIRA, P.M.; DE BIASI, F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 313-322, 2012.

VENDRAMIN, F.S; FRANCO, D; NOGUEIRA, C.M; PEREIRA, M.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, 2006.

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