

Emprego de plasma rico em plaquetas associado à esponja cirúrgica em enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)*

Josiane Morais Pazzini¹⁺, Eduardo Luis Serafim², Ricardo Ramirez Andrez Uscategui¹, Vivian Tavares de Almeida¹, Carlos Alfredo Calpaa Oliva³, Fátima Gärtner⁴, Maria de Fátima Faria de Carvalho⁵, Nazilton De Paula Reis¹, Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira³, Paola Castro Moraes⁶, João Ademir de Oliveira⁷ e Andriago Barboza De Nardi⁶

ABSTRACT. Pazzini J.M., Serafim E.L., Uscategui R.R.A., de Almeida V.T., Oliva C.A.C., Gartner F., de Carvalho M.F.F., Reis N. de P., Ferreira M.G.P.A., Moraes P.C., de Oliveira J.A. & De Nardi A.B. [Rich plasma platelets employed with surgical sponge in skin grafts in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).] Emprego de plasma rico em plaquetas associado à esponja cirúrgica em enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(4):397-405, 2016. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, Via de Acesso Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: josipazzini@hotmail.com

This work had the purpose to evaluate the effectiveness of PRP gel use associated with surgical sponges improve the integration of skin graft to receptor site. Was conducted a study of 16 rabbits, New Zealand white, female, 60 days old. They were divided into two groups with eight animals each, all of which was undergoing reconstructive surgery technique for making mesh graft. The groups were constituted in Gprpme received PRP gel and Gcme who received 0.9% saline solution combining both surgical sponge as a way of curative. The blood samples the Gprpme group that was done PRP, the mean platelet count after centrifugation was 1,288,750 platelets/uL. The results obtained in the PRP final sample when compared to the inicial were significantly greater. Thus, the double centrifugation protocol for obtaining PRP which was performed in this trial was appropriate, because the platelet concentration after double centrifugation increased three times as compared with the initial count of the blood sample, and it was possible to achieve good therapeutic results. In the macroscopic evaluation of the 3rd day, exudate showed significant differences in Gprpme compared to Gcme. In the evaluations of the 7th and the 14th day edema, flushing, color, exudate and

*Recebido em 16 de janeiro de 2016.

Aceito para publicação em 20 de abril de 2016.

Pesquisa de doutorado com apoio da Capes e do Programa de Doutorado Sanduíche no exterior (PDSE).

¹ Médica-veterinária, MSc. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900. E-mails: ramirezuscategui@hotmail.com; vitalmeida21@hotmail.com; nazilton@hotmail.com; ⁺ Autora para correspondência, E-mail: josipazzini@hotmail.com - bolsita CNPq.

² Médico-veterinário, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, FCAV, Unesp/Jaboticabal, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900. E-mail: eduardoluis.serafim@gmail.com

³ Médico-veterinário, MSc. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, FCAV, Unesp/Jaboticabal, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900. E-mails: calpaa@yahoo.es; mary_pops1@hotmail.com

⁴ Médica-veterinária, PhD, Departamento de Patologia Veterinária, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (UP), Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto, 4050-313, Portugal. E-mail: fgartner@ipatimup.pt

⁵ Técnica de Anatómiopatológica, Departamento de Patologia Veterinária, UP, ICSBAS, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto, 4050-313, Portugal. E-mail: fatimafaria10@yahoo.com.br

⁶ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV, Unesp/Jaboticabal. Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900. E-mails: pcastromoraes@yahoo.com.br; andriogbarboza@yahoo.com.br - bolsita CNPq.

⁷ Estatístico, DSc. Departamento de Estatística, FCAV, Unesp/Jaboticabal, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900. E-mail: jaoliv@fcav.unesp.br

cosmetic appearance were not significant between the groups. Qualitative histological evaluations using the staining HE and Trichromes of Masson, it was observed that the intensity of polymorphonuclear cells, fibroblast proliferation, collagen deposition and epithelialization no significant difference. However, the vascular proliferation was significantly higher in the Gprpme when comparison with the Gcme. Therefore, the use of platelet rich plasma in the form of gel using in meshed skin grafts are able to stimulate angiogenesis in wound, favoring integration of the graft to site receptor, without the presence of granulation tissue. And association of surgical sponge as a pressure dressing promotes healing of the graft, reducing complications such as presence of edema, and graft movement, therefore is feasible and advisable his use.

KEY WORDS. Graft, wounds, neovascularization, PRP, compressive curative, rabbits.

RESUMO. Objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia do uso do gel de PRP associado as esponjas cirúrgicas favorecerem a integração do enxerto em malha ao leito receptor. Foi realizado, um estudo com 16 coelhos, Nova Zelândia branco, fêmeas, com 60 dias de idade, separados em dois grupos, com oito animais, que foram todos submetidos à técnica de cirurgia reconstrutiva para confecção de enxerto em malha. Os grupos foram compreendidos em Gprpme receberam gel de PRP e Gcme que receberam solução fisiológica 0,9% ambos associando esponja cirúrgica como forma de curativo. As amostras de sangue do grupo Gprpme no qual se realizou o PRP, a contagem média de plaquetas após a centrifugação foi de 1.288.750 plaquetas/ μ L, sendo os resultados obtidos na amostra final de PRP quando comparada com a inicial foram significativamente maior. Assim, o protocolo de centrifugação dupla para obtenção do PRP que foi realizado neste ensaio foi adequado, visto que a concentração de plaquetas após centrifugação dupla aumentou três vezes quando comparado com a contagem inicial da amostra de sangue, e foi possível alcançar bons resultados terapêuticos. Nas avaliações macroscópicas do 3º dia, edema, rubor, coloração e aspecto cosmético não foram significativas entre os grupos. Porém, exsudato apresentou diferenças significativas no Gprpme quando comparado com Gcme. Nas avaliações do 7º e do 14º dia edema, rubor, coloração, exsudato e aspecto cosmético não foram significativas entre os grupos. As avaliações histológicas qualitativas utilizando as colorações HE e Tricromio de Masson observou-se que a intensidade de polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, reepitelização e colagenização não houve diferença significativa. Entretanto, a proliferação vascular foi significativamente maior no Gprpme quando comparado com o Gcme. Já presença de células mononucleares e hemorragia foram significativamente maior no Gcme quando comparado com Gprpme. Portanto, a utilização do

plasma rico em plaquetas na forma de gel em enxertos cutâneos em malha é capaz de estimular a angiogênese na ferida favorecendo a integração do enxerto ao leito receptor, sem presença prévia de tecido de granulação. E associação da esponja cirúrgica como curativo compressivo favorece a cicatrização do enxerto por reduzir complicações como seu deslocamento no leito receptor e presença de edema, sendo viável e aconselhável seu emprego.

PALAVRAS-CHAVE. Enxerto, feridas, angiogênese, PRP, curativo compressivo, coelhos.

INTRODUÇÃO

A cirurgia reconstrutiva consiste de uma especialidade das cirurgias de pequenos animais, a qual vem sendo empregada com frequência a fim de reparar defeitos com grande perda de continuidade do tegumento, ou falta de elasticidade cutânea, que comprometam a cicatrização (Pavletic 2010, Castro et al. 2015). As técnicas cirúrgicas reconstrutivas podem ser divididas em duas modalidades: retalhos e enxertos (Fossum 2007). Os retalhos consistem de uma porção de tecido que é removido parcialmente do seu local de origem e transferido para outro (leito receptor) onde irá cobrir o defeito, e é acompanhado pela vascularização local (Hedlund 2005). O enxerto cutâneo é uma das modalidades da cirurgia reconstrutiva que é principalmente empregado em defeitos em extremidades de membros, bem como locais com lesões menores, porém pouco utilizado (Pazzini et al. 2015). Esse modelo consiste de segmento da epiderme e da derme que é completamente removido da região doadora e transferido para o local receptor, sem a presença de pedículo vascular (Headlund 2008).

Os enxertos são classificados conforme sua espessura, podendo ser espessura completa ou parcial. Os de espessura completa consistem da epiderme e derme completa, e os de espessura parcial consistem de epiderme e camadas variáveis da derme (Pazzini et al. 2015). Ademais os enxertos

podem ser do tipo camada, malha ou sementeira, e são obtidos de tecido da parede torácica lateral, membros, e áreas que contenham pele abundante (Fossum 2007).

Em virtude dos enxertos não apresentarem pedículo vascular, é recomendado curativo compressivo, a fim de otimizar o contato do enxerto com o leito da ferida, e permitir adequada angiogênese. Além do mais, possibilitam menor ocorrência de hematoma e seroma, eventos que habitualmente conduzem à perda de vitalidade e, por consequência, à falência do enxerto (Leffel 1994).

Os curativos compressivos mais utilizados são Tie over, os quais consistem em suturar um aglomerado de gazes sobre o enxerto (Pavletic 2010). Todavia, outros materiais podem ser usados como curativos compressivos como gaze, algodão, discos plásticos, e moldes de cera (Vasconez 1994). No entanto, a idéia do uso de esponja ou espuma surgiu em 1929, (Blair & Brown 1929), segundo os autores dessa descoberta, a melhor pressão sobre os enxertos era proveniente do uso da esponja. Ademais, as principais vantagens do seu emprego são custo reduzido, oferecendo adequada proteção do enxerto, técnica de fácil realização, moldável em diferentes formas apresenta pressão uniformemente distribuída, são de retirada fácil e proporcionam redução do desconforto pós-operatório do paciente.

As cirurgias reconstrutivas apresentam muitos benefícios, permitem que o paciente retorne a sua rotina normal com maior rapidez, e com resultados estéticos satisfatórios. No entanto, alguns casos, há complicações, como inadequada vascularização, movimentação do enxerto e infecção, sendo fatores que predispõe a ocorrência de necrose (Amsellem 2011).

Sendo assim, os problemas encontrados relacionados com neovascularização em procedimentos cirúrgicos, são alvo de estudos em diversas áreas médicas, principalmente em ortopedia e odontologia. Para tanto, o plasma rico em plaquetas (PRP) é alvo de vários estudos associados às complicações nessas áreas. Esse produto é resultado do processamento do sangue do paciente em centrífugas que promovem a separação dos seus constituintes e permitem extração do plasma com concentração maior de plaquetas, e é capaz de potencializar o processo de cicatrização tecidual, por meio da liberação de mediadores biológicos e 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, diferenciação celular, quimiotaxia e angiogênese (Floryan et al. 2004, Silva et al. 2011).

Considerando os benefícios do plasma rico em plaquetas e a importância da cirurgia reconstrutiva para corrigir defeitos sem complicações, este trabalho teve o intuito de avaliar a eficácia do emprego do gel de plasma rico em plaquetas (PRP) em enxertos cutâneos de espessura completa do tipo malha em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), associando no pós-operatório esponjas cirúrgicas como curativo compressivo, a fim de avaliar a possibilidade do PRP junto as esponjas cirúrgicas favorecerem a integração do enxerto ao leito receptor sem a presença prévia de tecido de granulação, bem como avaliar a angiogênese local onde o procedimento foi realizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos cirúrgicos deste estudo foram realizados no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), *Campus* de Jaboticabal e, as lâminas destinadas à análise histológicas foram preparadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade do Porto, Portugal.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), *Campus* de Jaboticabal⁸.

O modelo experimental utilizado para realização das cirurgias reconstrutivas foi o coelho (*O. cuniculus*). Foram utilizados 16 coelhos da raça Nova Zelândia Branco, com a aproximadamente 170 dias de idade, fêmeas e peso médio de 3 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 Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foi fornecido durante todo o experimento aos animais ração comercial⁹ própria para a espécie e água *ad libitum*.

Os animais foram separados em dois grupos de 8 animais cada, compreendendo os grupos Gprpme (gel de plasma rico em plaquetas associado com esponja cirúrgica, como forma de curativo no enxerto de malha) e Gcme (solução fisiológica 0,9%⁴ associada com esponjas cirúrgicas no enxerto de malha). Em todos os animais foi realizada a mesma técnica de cirurgia reconstrutiva de enxertia do tipo malha, diferindo apenas a aplicação do plasma rico em plaquetas.

Não foi necessário submeter os animais ao jejum alimentar e hídrico. O protocolo anestésico ao qual os animais foram submetidos consistiu de midazolam¹⁰, na

⁸ Protocolo número:11767/14

⁹ Nature multivida coelho - Socil - Sgh Ind. e Com, Ltda., Descalvado, São Paulo, Brasil.

¹⁰ Midazolam - Medley Indústria Farmacêutica Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil

dose de 0,5 mg/kg pela via intramuscular (IM) e cloridrato de tramadol¹¹, na dose de 5 mg/kg pela mesma via. Após sedação, foram coletadas amostras de sangue dos 16 coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico. As amostras de sangue do Gcme não foram submetidas ao preparo de PRP, apenas coletadas para não haver diferenças entre os grupos quanto ao volume de sangue corpóreo. Na sequência, realizou-se tricotomia da região cervical para acesso das veias jugulares, e procedeu-se antissepsia com clorexidine¹² e solução de álcool a 70%¹³. 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 e coleta de 8ml de sangue, acondicionada em três tubos estéreis, dois com capacidade de 3,6mL contendo citrato de sódio¹⁴ (anticoagulante) destinados à preparação do PRP, e um terceiro tubo com capacidade de 1mL contendo EDTA¹⁵ (anticoagulante) foi preenchido com 0,8ml de sangue o qual foi destinado à contagem de plaquetas. Após determinar em máquina automática¹⁶ 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 comum¹⁷ conforme descrito por Camargo et al. (2002).

Após 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. Após 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 cálcio¹⁸, no momento de sua utilização terapêutica, adquirindo assim, propriedades semelhantes a um gel, estando dessa forma, pronto para ser utilizado.

Em seguida, à coleta do sangue, realizou-se ampla tricotomia da face lateral esquerda do tórax e membro torácico ipsilateral. Após o término da tricotomia realizou-se venopunção da veia auricular dos pacientes com cateter 24¹⁹ para fluidoterapia de manutenção com solução de ringer lactato²⁰, e procedeu-se indução e manutenção anestésica via máscara facial vedada, com Isoflurano²¹ na dose de 3% diluído em 100% oxigênio, para produzir um plano anestésico cirúrgico.

O procedimento cirúrgico de reconstrução empre-

gando enxerto foi realizado em um único momento, substituindo o tecido de granulação pelo plasma rico em plaquetas e pela solução fisiológica 0,9%⁴.

Para a realização da ferida dermoepidérmica e demarcação do segmento de pele a ser retirado em região de cotovelo esquerdo, foi utilizada caneta cirúrgica²² e régua estéril para criar uma lesão de 4 cm de comprimento por 4 cm de largura, no formato de quadrado (Figura 1A). Com o auxílio de lâmina de bisturi n°15²³ foi excisado o fragmento cutâneo de 16 cm², na porção distal do carpo, do membro torácico esquerdo, aproximadamente 3 cm abaixo do olecrano (Figura 1B), sendo semelhante à lesão decorrente de trauma ou ressecção neoplásica extensa. A confecção de fendas no enxerto (Figura 2A) foram realizadas com auxílio de bisturi¹⁷, com aproximadamente 0,2 mm de comprimento, com 0,3mm de distância entre elas (Figura 2B).

Logo após realização da lesão do cotovelo, com o paciente em decúbito lateral, e membro torácico em extensão perpendicular ao tronco, confeccionou-se o enxerto cutâneo de 9cm², na região lateral esquerda do tórax, com incisão cutânea em formato de quadrado (Figura 3A), partindo 4 cm no sentido caudal à espinha da escápula, e 3 cm abaixo do processo espinhoso da coluna vertebral, com limites de profundidade determinados de acordo com as referências anatômicas descrita na literatura (Pazzini et al. 2015). Para tal, foi estimada a localização do subcutâneo imediatamente após a incisão de pele A partir deste ponto, prosseguiu-se dissecação cuidadosa do enxerto, e sua retirada do leito doador (Figura 3B), finalizando essa etapa, realizou-se a remoção de resíduos de gordura e subcutâneo do fragmento (Figura 3C), e confeccionaram-se as fendas. Ato contínuo promoveu-se hemostasia dos vasos locais do leito receptor e iniciou-se a implantação do enxerto. As suturas em padrão simples separado, utilizando náilon 4-0²⁴, foram primeiramente distribuídas nos vértices do quadrado entre o tecido do leito doador com o receptor (Figura 3D), sempre na direção enxerto - pele do leito receptor, a fim de evitar movimentação do enxerto no momento da sutura, e na sequência, procedeu-se a síntese da ferida cirúrgica (Figura 3E).

A ferida do leito doador no tórax foi submetida à dermorrafia em padrão de fechamento em formato de figura geométrica, com náilon 4-0⁷, as suturas iniciaram nos vértices do defeito e convergiram em direção ao centro na ferida cirúrgica (Figura 3F), ao término apresentando a cicatriz cirúrgica dois triângulos invertidos (Figura 3G).

¹¹ Tramal - Medley Indústria Farmacêutica Ltda., Campinas, São Paulo - Brasil

¹² Solução de Digliconato de Clorexidina Loção Aquosa 0,2%. Rioquímica Ind. Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

¹³ Álcool etílico 70%. Rioquímica Ind. Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

¹⁴ Tubo BD vacutaneir® citrato de sódio - BD, São Paulo, São Paulo, Brasil.

¹⁵ Tubo pediátrico BD vacutaneir® EDTA - BD, São Paulo, São Paulo, Brasil.

¹⁶ Poch - 100iV Diff- médica comércio representações e importações Ltda., Recife, Pernambuco, Brasil.

¹⁷ Modelo 206 I centrífuga/Fanem® - SP.

¹⁸ Gluconato de cálcio 100mg/ml/ Hipolabor, Sabará, Minas Gerais, Brasil.

¹⁹ Cateter BD Angiocath 24 - Becton, Dickinson Indústria Cirúrgica Ltda., Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

²⁰ Ringer lactato - JP Indústria Farmacêutica S.A - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

²¹ Isoflurine - Cristália, Itapira, São Paulo Brasil

²² Skins - T Surgical Skin Marker - Batrik Medical Manufacturing Inc., Quebec, Canadá.

²³ Lâmina de bisturi N15 - Solidor, São Paulo, São Paulo, Brasil.

²⁴ Nylon monofilamentar- Point Suture do Brasil Ind. de fios cirúrgicos Ltda., Fortaleza, Ceará, Brasil.

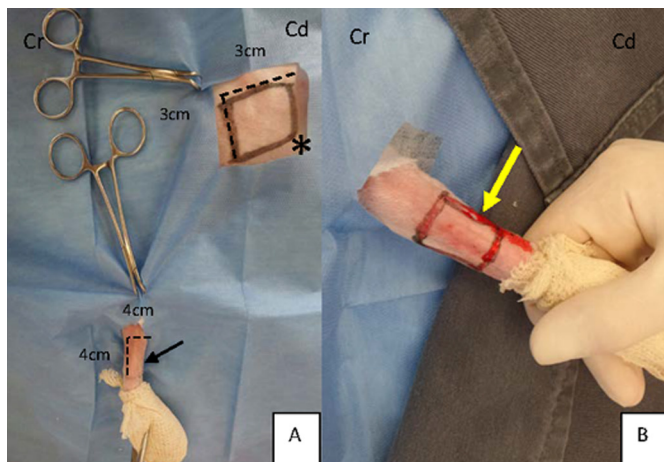


Figura 1. Imagens fotográficas da diêrese do procedimento cirúrgico de reconstrução realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal, 2015. A) Demarcação do segmento de pele a ser retirado no tórax de 9cm², e no membro torácico com 16cm² (seta preta) confeccionado com auxílio de caneta cirúrgica e régua estéril. B) Criação da lesão com no formato de um quadrado, 3 cm abaixo da extremidade do olecrano (seta amarela). Cr. Cranial, Cd. Caudal.

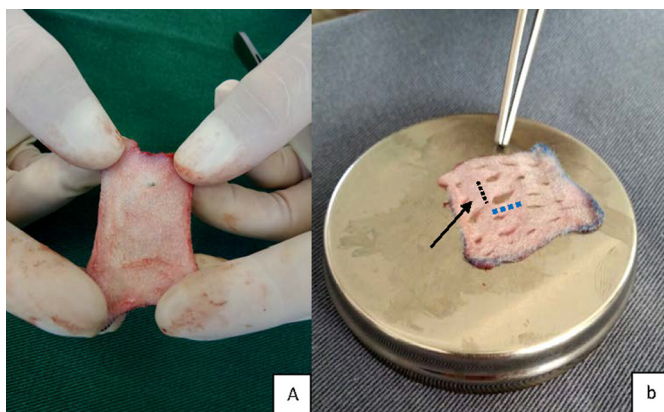


Figura 2. Imagens fotográficas da diêrese do procedimento cirúrgico de reconstrução realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal, 2015. A) Confeção do enxerto. B) Presença das fendas (seta) no enxerto em malha realizadas com auxílio de bisturi¹⁷, com aproximadamente 0,2mm de comprimento (tracejado azul), com 0,3mm de distância entre elas (tracejado preto).

O gel de plasma rico em plaquetas autólogo (0,7mL de PRP) foi colocado no Gprpme antes da síntese da lesão no cotovelo, com auxílio do cabo de bisturi²⁵ e distribuído de maneira homogênea entre o subcutâneo do leito doador e o subcutâneo do leito receptor (Figura 3H), e os animais do Gcme receberam 0,7mL de solução fisiológica². Após aplicação das respectivas soluções procedeu-se a síntese da ferida cirúrgica.

A confecção das esponjas cirúrgicas²⁶ foi realizada a partir das escovas utilizadas para antissepsia, seguindo descrito na literatura (Zanini et al. 2004). Primeiramente destacou-se a esponja da escova com auxílio de bisturi. Ato contínuo, com lâmina de bisturi, reduziu-se espes-

sura da esponja para 1cm. Sua extensão foi projetada para exceder em torno de 0,5 cm a margem do enxerto. Assim, após implantação do enxerto e aplicação das respectivas soluções, realizou-se o emprego da esponja cirúrgica ao término da dermorrafia (Figura 3I), como curativo compressivo.

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

Como protocolo de analgesia os animais receberam Cloridrato de Tramadol²⁷ por via subcutânea na dose de 4 mg/Kg, com intervalos de 12h, durante 7 dias, e receberam antibióticoterapia com Pentabiótico²⁸ por via subcutânea na dose de 0,06ml/Kg, com intervalo de 48h para nova dose, por 5 dias, e antiinflamatório com Meloxicam²⁹ durante 3 dias, sendo por via subcutânea na dose de 0,2 mg/Kg no primeiro dia, e no segundo e terceiro dia 0,1mg/Kg, com intervalos de 24 horas.

Em todos os animais os curativos foram realizados no pós-operatório imediato e trocados no 3^o, 7^o e 15^o dias, juntamente foram realizadas as avaliações macroscópicas, até a data da eutanásia. A limpeza e troca dos curativos eram conduzidas da seguinte maneira, Limpeza da ferida com solução fisiológica (NaCl 0,9%²), Remoção de exsudato quando necessário; avaliação do aspecto da esponja cirúrgica¹⁸ e do enxerto; cobertura com gaze³⁰; fixação da gaze com atadura³¹ e esparadrapo³².

As avaliações macroscópicas da ferida consistiam em avaliar a presença ou ausência de exsudato, coloração, edema, rubor e aspecto cosmético. 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 coloração consistia em graduá-la variando de 0 a 3, onde 0 representava pele esbranquiçada, 1 rósea, 2 avermelhada, e 3 enegrecida. Para avaliação do edema utilizou-se graduação de 0 a 3, sendo 0 ausência de edema, 1 edema discreto, 2 edema moderado e 3 edema intenso. E para avaliação do aspecto cosmético utilizou-se graduação de 0 a 3, sendo 0 excelente, 1 bom, 2 regular e 3 ruim. Os dados foram anotados em ficha própria, individual para cada coelho.

²⁵ Cabo de bisturi n4 – Brasmed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil.

²⁶ Escova seca estéril – Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP.

²⁷ Tramal – Medley Ind. Farmacêutica Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil.

²⁸ Mogipen – Jofadel Indústria Farmacêutica S/A Monte Mor, São Paulo, Brasil.

²⁹ Maxicam – OuroFino Agronegócios, Cravinhos, São Paulo, Brasil.

³⁰ Gaze hidrófila estéril – Herika – América Medical Ltda., Curvelo, Minas Gerais, Brasil.

³¹ Atadura Cremer – Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

³² Esparadrapo – Cremer – Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

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 infusão de cloreto de potássio, obedecendo-se os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Controle 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 o limite de profundidade foi a fáscia muscular. Cada fragmento foi identificado individualmente, fixado em cartolina e colocado em solução de formalina a 10%³³, e após 48 horas a solução foi substituída por álcool a 70%³⁴, em seguida, o material foi encaminhado ao para o Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade do Porto, Portugal, para confecção das lâminas histológicas.

As amostras foram processadas conforme a rotina convencional de processamento histológico, inclusão em blocos de parafina, e realização dos cortes histológicos. Estes foram cortados em micrótomo³⁵, com espessura de 4 µm, na sequência, realizou-se desidratação em diluições crescentes de álcoois³⁶ e diafanização em xilol³⁷, e procedeu-se as colorações específicas.

A análise dos cortes histológicos foi realizada pelo mesmo patologista sem o conhecimento prévio da identificação dos grupos. A avaliação histológica das lâmi-

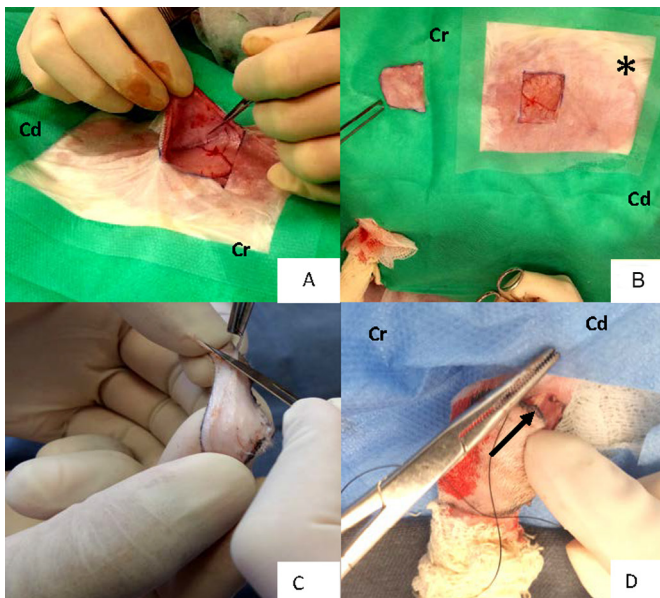


Figura 3. Imagens fotográficas da diérese e síntese do procedimento cirúrgico de reconstrução realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2015. A) Confecção do enxerto cutâneo de 9cm², na região lateral esquerda do tórax, com incisão cutânea em formato de quadrado e divulsão cautelosa. B) Retirada do enxerto do leito doador. C) Remoção de resíduos de gordura e subcutâneo do fragmento com auxílio de bisturi¹⁷. D) Sutura do enxerto no leito receptor em padrão simples separado, com náilon 4-037, direção da sutura sendo enxerto - pele do leito receptor (seta). Cr. Cranial, Cd. Caudal.

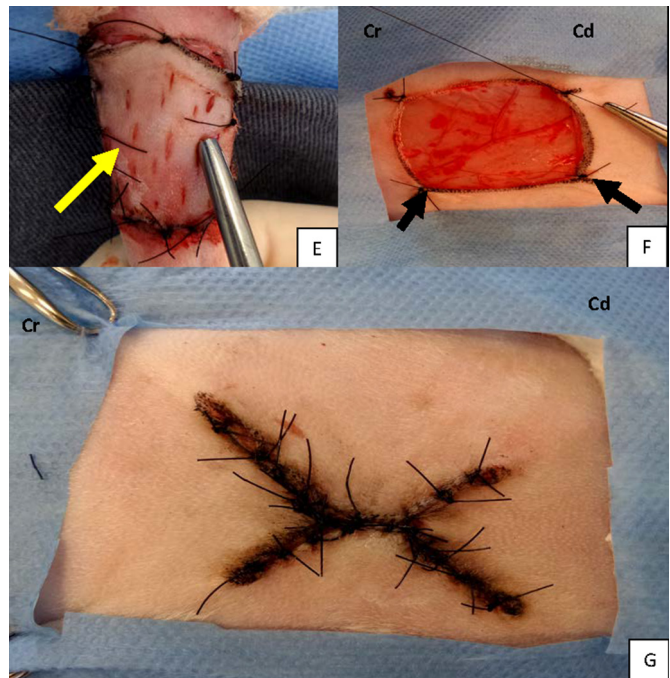


Figura 3. Continuação. Imagens fotográficas da diérese e síntese do procedimento cirúrgico de reconstrução realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2015. E) Síntese do enxerto no leito receptor. F) Fechamento em formato de figura geométrica, com náilon 4-07, suturas iniciam nos vértices do defeito e convergem em direção ao centro na ferida cirúrgica (setas). G) Cicatriz cirúrgica formando dois triângulos invertidos. Cr. Cranial, Cd. Caudal.

nas foi realizada em microscópio óptico³⁸ 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.

Os cortes foram corados pelo método histoquímico para posterior análise em microscopia óptica. Utilizou-se Hematoxilina e Eosina, para avaliação de epiderme, derme, bem como presença de mononucleados, polimorfonucleados, hemorragia, colagenização e reepitelização; e Tricrômico de Masson para proliferação vascular.

Os dados de PRP (concentração plaquetária) foram analisados pelo teste t emparelhado com grau de significância de 5%. A comparação entre os grupos (G_{prpme} e G_{me}) em relação às variáveis categóricas (exsudato, coloração, edema, rubor, aspecto cosmético, proliferação vascular, células mononucleares, células polimor-

³³ Formol a 10% tamponado- Indalabor, Dores do Indaiá, Minas Gerais - Brasil.

³⁴ Alcool 70%- Tupi- Ibaté, São Paulo, Brasil.

³⁵ Micrótomo rotativo RM2036, Leica Biosystems, Carnaxibe, Portugal.

³⁶ Etanol absoluto - Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany.

³⁷ Xilol - Quimidrol - Joinville, Santa Catarina, Brasil.

³⁸ Microscópio Nikon eclipse - E200, Japão.

fonucleares, proliferação de fibroblasto, colagenização, reepitelização e hemorragia) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com posterior utilização do teste de comparação múltipla de Dunn, para os casos em que houve diferença significativa entre as medianas dos grupos. Para todos os testes, valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos. Para as análises foi utilizado o procedimento npar1way do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, EUA) e o programa GraphPad Prism, Version 4.00.

RESULTADOS

Analisando as amostras de sangue dos coelhos do grupo Gprpme no qual se realizou o PRP, a contagem inicial de plaquetas apresentou-se dentro dos padrões fisiológicos para a espécie, variando de 290.000 a 678.000 plaquetas/ μ l. A partir de 7,2 mL de amostra de sangue total, atingiu-se um volume médio de PRP de 0,7ml, e a contagem média de plaquetas após a centrifugação foi de 1.288.750 plaquetas/ μ l.

Os resultados obtidos na amostra final de PRP quando comparada com a inicial foram significativamente maior ($p = 0,001$). Assim, o protocolo de centrifugação dupla para obtenção do PRP que foi realizado neste ensaio foi adequado, visto que a concentração de plaquetas após centrifugação dupla aumentou três vezes quando comparado com a contagem inicial da amostra de sangue, e foi possível alcançar bons resultados terapêuticos.

Nas avaliações macroscópicas do 3º dia, edema, rubor, coloração e aspecto cosmético não foram significativos entre os grupos ($p > 0,05$). Porém, exsudato apresentou diferenças significativas. A

presença de exsudato no Gprpme (Figura 4A) foi significativamente maior quando comparado com Gcme ($p = 0,01$) (Figura 4B).

Nas avaliações do 7º e do 14º dia edema, rubor, coloração, exsudato e aspecto cosmético não foram significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

As avaliações histológicas qualitativas utilizando

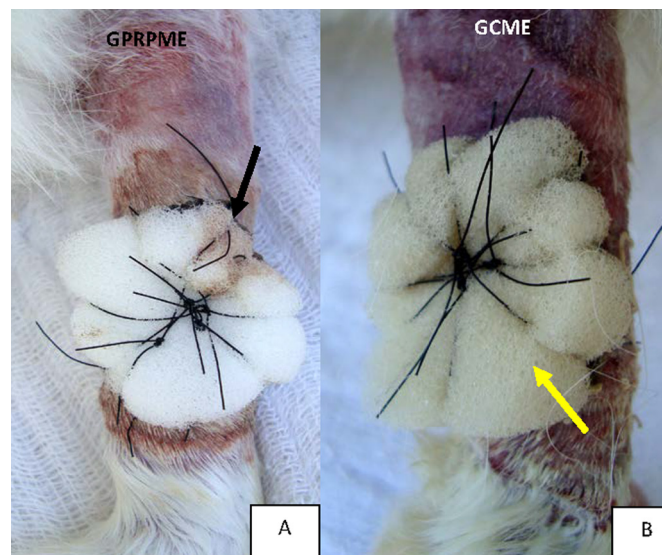


Figura 4. Imagens fotográficas da lesão no membro torácico esquerdo na região do carpo de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) mostrando as variáveis macroscópicas exsudato com 3 dias que foram significativas entre os grupos ($p < 0,05$) submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Campus de Jaboticabal, 2015. A) Presença de exsudato na esponja cirúrgica (seta) no animal do GPRPME. B) Aspecto da esponja cirúrgica sem presença de exsudato (seta) no animal do GCME.

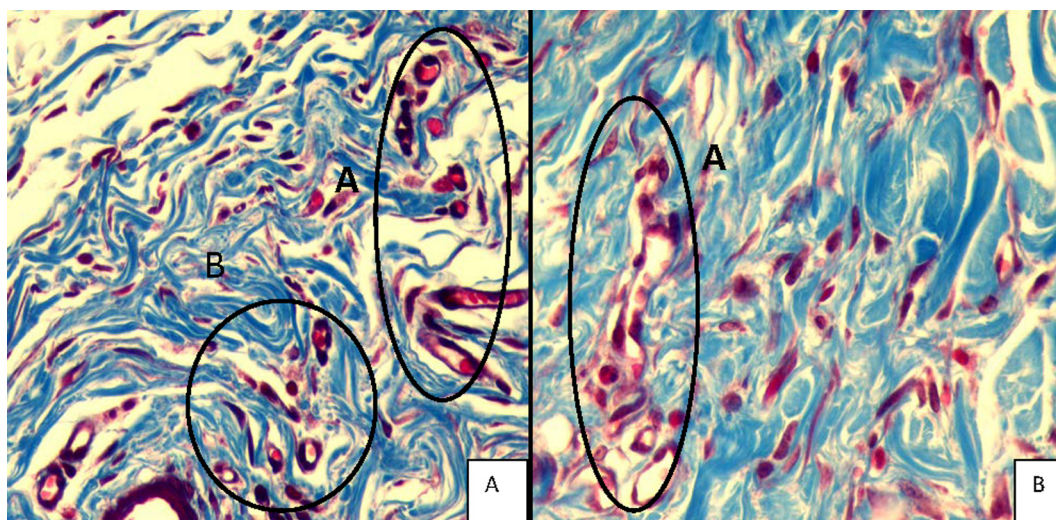


Figura 5. Aspecto histológico da Intensidade de proliferação vascular em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Fotomicrografia óptica da derme de animais do Gprpme e Gcme submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Campus de Jaboticabal, 2015. A) Presença acentuada de neovascularização em A e B no Gprpme, aumento de 400X. B) Presença discreta de neovascularização em A no Gcme. Aumento de 400X. Coloração Tricrômio de Massom.

as colorações HE e Tricômio de Massom, observou-se que a intensidade de polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, reepitelização e colagenização não houve diferença significativa ($p>0,05$). Entretanto, a proliferação vascular foi significativamente maior no Gprpme (Figura 5A) ($p=0,01$) quando comparado com o Gcme (Figura 5B). Já a presença de células mononucleares e hemorragia foram significativamente maior no Gcme ($p=0,01$, $p=0,03$, nesta ordem) quando comparado com Gprpme.

DISCUSSÃO

O plasma rico em plaquetas é um produto obtido do sangue, de fácil obtenção e com custo reduzidos, e é produzido em centrífugas laboratoriais. Esse produto submetido a tempos e rotações específicas, ao final apresenta contagem plaquetária superior a amostra inicial, sendo capaz de proporcionar efeitos terapêuticos em cicatrização de feridas (Camargo et al. 2002). Posto isso, o presente ensaio vai de encontro com a literatura (Camargo et al. 2002), visto que obteve-se o PRP a partir de centrífugas laboratoriais, como método de fácil execução e baixo custo, assim podendo ampliar sua aplicabilidade por profissionais de diversas modalidades clínicas e cirúrgicas.

Durante o processo de obtenção do PRP, o protocolo empregado sendo de única ou dupla centrifugação faz diferença no resultado final do produto (Maia et al. 2009). O protocolo da dupla centrifugação utilizado neste estudo foi capaz de promover concentração plaquetária 3 vezes maior em relação ao valor inicial da amostra (desvio padrão = 329.265 plaquetas/ μ L). Os resultados obtidos na amostra final de PRP quando comparada com a inicial foram significativamente maiores ($p=0,001$), assim, o protocolo de centrifugação foi adequado para obtenção de PRP de boa qualidade, semelhante ao descrito por Vendramin et al. (2010), estudo este que utilizou o gel de PRP em enxerto cutâneos em coelhos, obtido pelo método de dupla centrifugação, com tempos e velocidades semelhantes aos utilizados neste ensaio, e proporcionou a obtenção de bons resultados seguindo esse protocolo.

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa quanto as variáveis macroscópicas, edema, rubor, coloração, e aspecto cosmético que não foram significativos entre os grupos estudados, pode-se atribuir tais resultados ao emprego das esponjas cirúrgicas como modalidade de curativo compressivo. Os resultados obtidos neste ensaio são semelhantes aos de Amâncio et al. (2006), que também utilizaram esponjas cirúrgicas como curativo com-

pressivo em coelhos submetidos ao procedimento de enxertia com estimulação ultrassônica, e não encontraram diferenças significativas quanto à edema, rubor, coloração, bem como aspecto cosmético.

Quanto à presença de exsudato no 3º, que foi significativamente maior no Gprpme quando comparada com o Gcme, os resultados encontrados neste ensaio foram semelhantes ao obtidos por Vendramin et al. (2010), que utilizaram o plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em coelhos e também obtiveram maior presença de exsudato nos animais tratados quando comparados com o controle. Posto isto, este estudo comprovou maior reação inflamatória com o uso do PRP, o que potencializa a cicatrização, que é um fenômeno fundamentalmente inflamatório.

O emprego do gel de plasma rico em plaquetas no subcutâneo do leito receptor da ferida no Gprpme proporcionou bons resultados, quando comparado com a solução fisiológica no Gcme, indicando que a diferença significativa encontrada quanto à proliferação vascular está relacionada com uso do PRP, sugerindo a capacidade deste composto promover angiogênese no local de aplicação, e favorecer a integração do enxerto no leito receptor sem presença de tecido de granulação. Além disso, a associação da esponja cirúrgica como curativo compressivo favoreceu no processo de cicatrização, evitando presença de edema e movimentação do enxerto. Sendo assim, os resultados deste ensaio quanto ao emprego do plasma rico em plaquetas são semelhantes aos resultados de Vendramin et al. (2006), que testaram 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. O resultado do emprego das esponjas cirúrgicas favorecerem a integração do enxerto no leito receptor são condizentes com Salgado et al. (2007), que realizaram cicatrização conduzida em enxertos de pele no tratamento de feridas e também obtiveram resultados satisfatórios empregando esponjas cirúrgicas no pós-operatório das feridas.

Quanto à reação inflamatória da ferida avaliou-se presença das células mononucleares e polimorfonucleares, porém não houve diferenças significativas de células polimorfonucleares entre os grupos experimentais ($p>0,05$). Ademais, a presença de mononucleares ter sido significativamente maior no Gcme ($p=0,01$) quando comparada com o Gprpme indica presença de reação inflamatória, que pode ter sido decorrente do processo de cicatrização da ferida ci-

rúrgica, no entanto, esperava-se que o aumento de células inflamatórias fosse maior no Gprpme devido a reação inflamatória local que é estimulada com emprego do PRP por seus componentes adjuvante na cicatrização, e tal fato não foi observado neste estudo. Os resultados encontrados nessa pesquisa são contrários aos de Vendramin et al. (2010), que utilizaram o PRP em enxertos cutâneos em coelhos e tiveram diferenças significativas entre os grupos tratado e controle quanto a presença de células inflamatórias, associando utilização do produto com aumento da resposta inflamatória, e ainda assim obtiveram bons resultados com o emprego do produto.

Quanto à hemorragia, os achados microscópicos indicaram que a presença de hemorragia foi maior no Gcme quando comparado com o Gprpme, sugere-se que tal resultado ocorreu devido ao enxerto se desprovido de irrigação própria, assim durante o processo de cicatrização ocorre a angiogênese, assim pode-se inferir que devido à formação de novos capilares de pequeno e médio calibre no leito receptor ocorra rompimento de alguns deles e extravasamento de sangue. Os resultados encontrados nesta pesquisa, são contrários ao de Vendramin et al. (2006) e Bauer et al. (2009) que utilizaram PRP em cirurgias reconstrutivas e avaliaram os efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas, e não tiveram presença significativa de hemorragia nos grupos experimentais. E quanto ao uso da esponja cirúrgica que reduz a presença de hemorragia, os resultados encontrados nesta pesquisa são contrários ao obtidos por Zanini et al. (2004), que utilizou esponjas cirúrgicas como curativo compressivo, e não encontrou diferença significativa na presença de hemorragia.

CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo que a utilização do plasma rico em plaquetas na forma de gel em enxertos cutâneos em malha é capaz de estimular a angiogênese na ferida favorecendo a integração do enxerto ao leito receptor, sem presença prévia de tecido de granulação. E associação da esponja cirúrgica como curativo compressivo favorece a cicatrização do enxerto por reduzir complicações como seu deslocamento no leito receptor e presença de edema, sendo viável e aconselhável seu emprego.

Agradecimentos. À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp) pelo apoio estrutural e laboratorial; à Capes pela bolsa de estudos concedida no Brasil

e em Portugal (PDSE); à equipe do laboratório da Universidade do Porto pelo apoio às atividades realizadas.

REFERÊNCIAS

- Amâncio A.C.G., Barbieri C.H., Mazzer N., Garcia S.B. & Thomazini J.A. Estimulação ultra-sônica da integração de enxertos de pele total - Estudo experimental em coelhos. *Acta Ortopédica Brasileira*, 14:5, 2006.
- Amsellem P. Complications of Reconstructive Surgery in Companion Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41:995-1006, 2011.
- Blair V.P. & Brown J.B. Use and uses of large split skin grafts of intermediate thickness. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, 49:82-97, 1929.
- Bauer J.A., Correa J., Lima M.F.L., Lima L.A.P.A. & Pustigliani F.E. Efeitos do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. *Revista de Periodontia*, 19:98-108, 2009.
- 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 of Periodontal Research*, 37:300-306, 2002.
- Castro J.L.C., Huppel R.R., De Nardi A.B. & Pazzini J.M. *Princípios e Técnicas de Cirurgias Reconstrutivas da Pele de Cães e Gatos (Atlas Colorido)*. 1ª ed. Medvep, Curitiba, 2015. 286p.
- Fossum T.W. *Cirurgia de pequenos animais*. 3ª ed. Roca, São Paulo, 2007. 1390p.
- Floryan K.M. & Berghoff W.J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *Aorn Journal*, 80:668-674, 2004.
- 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*, 21:55-65, 2006.
- Headlund C.S. *Cirurgia de pequenos animais*. 3ª ed. Elsevier, São Paulo, 2008. 1390p.
- Headlund C.S. *Cirurgia de pequenos animais*. 2ª ed. Roca, São Paulo, 2005. 1390p.
- Leffell D.J. *Atlas of cutaneous surgery*. W.B Saunders, Philadelphia, 1996. 400p.
- Maia L. & Souza M.V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. *Ciência Rural*, 39:1267-1274, 2009.
- Pavletic M.M. *Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. 3ª ed. Wiley - Blackwell, Ames, 2010. 697p.
- Pazzini J.M. & Moraes P.C. *Princípios e Técnicas de Cirurgias Reconstrutivas da Pele de Cães e Gatos (Atlas Colorido)*. 1ª ed. Medvep, Curitiba, 2015. 286p.
- Salgado M.L., 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*, 53:80-84, 2007.
- Silva R.F., Rezende C.M.F., Paes Lemes F.O. & Carmona J.U. Avaliação do método do tubo para concentrar plaquetas caninas: estudo celular. *Archivos de Medicina Veterinária*, 43:95-98, 2011.
- Vasconez L.O. & Vasconez H.C. *Surgical diagnosis and treatment*. 10ª ed. Appleton & Lange Pubs, Connecticut, 1994. 1392p.
- 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 Cirurgias*, 33:24-28, 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*, 25:4-10, 2010.
- Zanini M., Machado Filho C.A.S. & Timoner F. Uso de esponja cirúrgica para curativo compressivo de enxerto cutâneo. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 79:359-362, 2004.