PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ALINE FABRINI BONFÁ

EFEITO DO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM EQUINOS

(Effect of Platelet-Rich Plasma on the Repair of Skin Grafting in Horses)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2011

ALINE FABRINI BONFÁ

EFEITO DO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM EQUINOS

(Effect of Platelet-Rich Plasma on the Repair of Skin Grafting in Horses)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Área de concentração: Patologia Animal e Comparada, Cirurgia e Clínica, do setor de Ciências Agrárias e Ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Prof. Dra. Antonia Maria Binder do Prado

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2011

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus São José dos Pinhais

ATA nº 0019 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA ALINE FABRINI BONFÁ

Aos treze dias do mês de maio do ano de dois mil e onze, às 14:00 horas, realizou-se no anfiteatro do Mestrado em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada na Rodovia 376 – Km 14 – São José dos Pinhais - PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da Mestranda Aline Fabrini Bonfá, intitulada: **"EFEITO DO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM EQÜINOS"**. A Mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pela Professora Presidente da banca, Dra. Cristina Santos Sotomaior (PUCPR), auxiliada pelos Professores Doutores, Juliany Gomes Quitzan (PUCPR) e Peterson Triches Dornbusch (UFPR). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua argüição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada **APROVADA.**

Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior (Presidente)
Assinatura_____

Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan (PUCPR)
Assinatura_____

Prof. Dr. Peterson Triches Dornbusch (Membro Externo)
Assinatura_____

Proclamado o resultado, a Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

São José dos Pinhais, 13 de maio de 2011.

Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior
Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

Caroline Nocera

Caroline Nocera
Secretária do PPGCA

Dedico este trabalho às minhas amigas Mari, Cassy, Carol e Paty e ao meu namorado, que me ajudaram de verdade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que compartilharam esses dias tão difíceis de experimento comigo e que de alguma forma, fizeram com que este trabalho desse certo.

Agradeço a Prof. Dra. Antonia Maria Binder do Prado que me orientou neste estudo e ao meu co-orientador Prof. Dr. Peterson Triches Dornbush, que esteve comigo me auxiliando desde o início desse projeto.

Agradeço também à Prof. Dra. Andressa Silveira que trouxe a este projeto novas idéias e auxiliou toda a parte prática deste experimento.

Meu agradecimento especial a minha amiga e Prof. Cassiana Garces Ramos, por toda a ajuda no projeto e por ter cedido as instalações da Clínica Santa Fé para a realização do meu projeto.

Agradeço às minhas amigas para toda hora Paty, Carol e principalmente à Mari, pois sem elas nada disso teria sido realizado.

Ao meu namorado, Adson, pelo amor e paciência durante esses dois anos do projeto.

Aos animais desse experimento, pela paciência e cooperação, mesmo nas horas mais difíceis.

A todas as pessoas da minha família pelo carinho, paciência e por toda a força, mesmo a distância, pra que tudo se concretizasse.

"Em termos de evolução, bem maior é o débito da Humanidade para com os animais do que o crédito que lhes temos dispensado para seu bem-estar e progresso."

(Eurípedes Kuhl)

"Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais... os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento."

(Charles Darwin)

RESUMO

O gel de plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma com potencial de melhorar a integração dos enxertos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do uso do gel de plasma rico em plaquetas sobre o tempo de cicatrização de enxertos cutâneos simples da região lateral do pescoço de eqüinos quando comparados à cicatrização do mesmo tipo de enxerto sem o uso do gel. Foram utilizados 8 eqüinos adultos, realizando-se enxertos de 2,5x2,5 cm em cada lado do pescoço, sendo um lado o tratamento, com o uso do gel de PRP e do outro lado o controle, sem uso do gel. Os animais foram avaliados nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após a cirurgia através da avaliação clínica, histológica, morfométrica e cultura dos enxertos. As avaliações clínicas, morfométricas e bacteriológicas dos tecidos enxertados não revelaram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratamento com PRP. A avaliação histológica revelou um aumento da inflamação aguda no momento 7 e de concentração de colágeno no momento 14 no grupo tratamento, decorrente da liberação de fatores de crescimento pelas plaquetas presentes no gel, que foi normalizado nos demais momentos, não resultando em diferenças significativas no processo de cicatrização do enxerto. De acordo com as condições experimentais utilizadas neste estudo, pode-se concluir que não houve diferenças significativas entre o lado tratado com PRP e o lado controle em enxertos cutâneos em eqüinos.

Palavras-chave: enxerto, PRP, eqüinos.

ABSTRACT

The gel of platelet-rich plasma (PRP) is an autologous concentration of platelets in a small volume of plasma with the potential to improve the integration of the grafts. The aim of this study was to evaluate the effects of using gel platelet-rich plasma on the healing time of simple skin grafts from the lateral region of the neck in horses when compared to the healing of the same type of graft without the use of the gel. We used eight adult horses, performing grafts 2,5 x2, 5 cm on each side of the neck, the treatment side with use of PRP gel and a control side, without using gel. The animals were assessed on days 0, 7, 14, 21 and 28 after surgery by clinical, histological, morphometric and culture of the grafts. The clinical, morphological and biological tissue grafts shower no significant differences between the control group and treatment with PRP. Histologic evaluation revealed an increase in acute inflammation at the time 7 and collagen concentration at the time 14 in the treatment group, resulting from the release of growth factors by platelets present in the gel, which was normalized in the remaining moments, resulting in no significant differences in graft healing. Under the experimental conditions used in this study, we can conclude that no significant differences between the side treated with PRP and the control side in skin grafts in horses.

Key-words: graft, PRP, equine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- **A:** Sangue total após a primeira centrifugação, sendo PCV a porção que contém as células vermelhas, PC-A a porção de plasma rico em plaquetas e PC-B o plasma pobre em plaquetas. **B:** Segunda centrifugação para concentração plaquetária, sendo PC-C a porção de plasma rico em plaquetas utilizada para obtenção do gel de PRP e PC-D o plasma pobre em plaquetas..... 26

Figura 2 - Preparo do enxerto durante o procedimento cirúrgico para a retirada das fáscias e tecido subcutâneo..... 27

Figura 3 - Aplicação do gel de plasma rico em plaquetas entre o leito receptor e o tecido enxertado no lado tratamento 28

Figura 4 - Aspecto final do local da cirurgia após o procedimento de enxertia.28

Figura 5 - Enxerto lado direito (tratamento) e esquerdo (controle) nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz de análise para classificação dos enxertos 30
Tabela 2 – Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 31
Tabela 3 – Mediana dos escores clínicos de exsudato, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05% 34
Tabela 4 – Mediana dos escores clínicos de edema, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05% 34
Tabela 5 – Mediana dos escores clínicos de aspecto cosmético, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05% 35
Tabela 6 – Mediana dos escores histológicos de colágeno, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05% 36
Tabela 7 – Mediana dos escores histológicos de inflamação aguda, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05% 36
Tabela 8 – Mediana dos escores histológicos de fibroblasto, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05% 37
Tabela 9 – Mediana dos escores histológicos de granulação, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05% 37

Tabela 10. Número de enxertos que apresentaram contaminação em cada momento, nos diferentes tratamentos, sendo que números entre parênteses representam perdas de enxertos em cada momento. * Perda de enxerto com contaminação bacteriana por *Escherichia coli*. ** Perda de enxertos sem contaminação bacteriana 38

Tabela 11. Mediana das mensurações da área de contração das feridas (em cm^2), nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, $p < 0,05\%$ 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	- Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cm^2	- Centímetro quadrado
Ed.	- Editora
ed.	- Edição
f.	- Folha
FC	- Fatores de Crescimento
g	- Gravidade
HE	- Hematoxilina-eosina
IM	- Intramuscular
IV	- Intravenoso
kg	- Quilograma
L	- Litro
mcg	- Micrograma
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
µL	- Microlitro
n.	- Número
p.	- Página
PC-A	- Porção A
PC-B	- Porção B
PC-C	- Porção C
PC-D	- Porção D
PCV	- Porção de células vermelhas
PRP	- Plasma Rico em Plaquetas
PUCPR	- Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SID	- Uma vez ao dia
UHAF	- Unidade Hospitalar Animais de Fazenda
v.	- Volume
VO	- Via oral

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – ENXERTOS CUTÂNEOS EM EQUINOS---------- 13

1 INTRODUÇÃO 13

1.1 OBJETIVOS 13
1.1.1 Objetivo Geral 13
1.1.2 Objetivos Específicos 14
1.2 JUSTIFICATIVA 14

2 REVISÃO DE LITERATURA 14

2.1 A FERIDA 14
2.2 INDICAÇÕES PARA O USO DE ENXERTOS 15
2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS ENXERTOS 16
2.4 FISIOLOGIA DO ENXERTO 17
2.5 CAUSAS DE FALHA NA ENXERTIA 18
2.6 TÉCNICAS DE ENXERTIA 19
2.7 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS 20
2.8 ARMAZENAMENTO DE ENXERTOS 21
2.9 PLASMA RICO EM PLAQUETAS 22
2.10 USO DO GEL DE PRP EM ENXERTOS 22

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM EQUINOS ---------- 24

3 MATERIAIS E MÉTODO 24

3.1 AMOSTRA 24
3.2 TÉCNICAS DE PESQUISA PARA COLETA E ANÁLISE DOS DADOS 25
3.2.1 Preparo do gel de plasma rico em plaquetas 25
3.2.2 Procedimento Cirúrgico 26
3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS 29
3.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO 29
3.4.1 Avaliação Clínica do Enxerto 29
3.4.2 Análise Histológica 30
3.4.3 Análise Bacteriológica 32
3.4.4 Análise Morfométrica 32
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 33

4 RESULTADOS 33

4.1 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES CLÍNICAS 33
4.2 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS 35
4.3 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES BACTERIOLÓGICAS 37
4.4 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES MORFOMÉTRICAS 38

5 DISCUSSÃO 39

6 CONCLUSÃO 43

REFERÊNCIAS 44

CAPÍTULO 1

ENXERTOS CUTÃNEOS EM EQUINOS

1 INTRODUÇÃO

O enxerto cutâneo é uma técnica terapêutica indicada para o tratamento de feridas lacerantes, geralmente muito extensas e com grande perda de tecido. Essas feridas resultam em lesões com quantidade insuficiente de tecido cutâneo para a cicatrização da mesma, não sendo possível o tratamento por primeira intenção. Feridas onde o tecido de granulação exuberante impede sua contração e em ferimentos onde a cicatrização da ferida pode resultar em uma contratura indesejada para o local também podem ser tratadas por enxerto cutâneo (BRISTOL, 2005).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma e seus fatores de crescimento (FC) liberados, além de proteínas osteocondutoras, também servem de matriz para migração epitelial, formação óssea e de tecido conectivo. Estas propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial de melhorar a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de gordura, bem como estimular a cicatrização de feridas (VENDRAMIN *et al.,* 2006).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do uso do gel de plasma rico em plaquetas na cicatrização de enxertos cutâneos simples da região lateral do pescoço de

eqüinos quando comparados à cicatrização do mesmo tipo de enxerto sem o uso do gel, avaliados em diferentes períodos.

1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar se o gel de plasma rico em plaquetas melhora a incorporação do enxerto de pele.

Comparar a cicatrização de enxertos cutâneos em eqüinos sem o uso do gel de plaquetas com a dos enxertos com o uso do gel, clinicamente e histologicamente.

1.2 JUSTIFICATIVA

O uso do gel de plasma rico em plaquetas associado ao procedimento cirúrgico de enxerto cutâneo em eqüinos representa a possibilidade de uma nova técnica terapêutica para o tratamento de feridas lacerantes, onde não é possível realizar o tratamento do ferimento por primeira intenção.

O uso do gel de plasma rico em plaquetas associado à técnica de enxertos cutâneos visa uma melhor e mais rápida cicatrização da ferida, melhorando a integração do enxerto e levando a um resultado mais estético e funcional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FERIDA

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica,

que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque (CESARETTI, 1998).

Sua classificação constitui importante forma de sistematização, necessária para o processo de avaliação e registro. Assim, as feridas podem ser classificadas, de acordo com o tempo de cicatrização, em agudas e crônicas. As feridas agudas são originadas de cirurgias ou traumas e a reparação ocorre em tempo adequado, sem complicações. As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas em tempo esperado e apresentam complicações (SANTOS, 2000).

As feridas também podem ser classificadas de acordo com as estruturas comprometidas, baseada na descrição anatômica da profundidade da ferida. O sistema de classificação por extensão do dano tissular completa o anterior, podendo ser divididas em feridas superficiais limitada à epiderme; feridas com perda parcial, abrangendo a epiderme e porção superior da derme; e perda total com destruição da epiderme, derme, tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e ossos (BRYANT, 1992; SANTOS, 2000).

Durante séculos, o tratamento de feridas variou com o objetivo de melhores resultados cicatriciais em menor tempo possível (BLANES, 2004). As aplicações mais comuns dos enxertos cutâneos em eqüinos são em ferimentos muito extensos em que não se consegue a cicatrização por outros meios, porém a presença de qualquer ferida aberta que não pode ser suturada é um convite ao uso de enxertos (SCHUMACHER, 2006).

2.2 INDICAÇÕES PARA O USO DE ENXERTOS

O enxerto cutâneo é uma técnica terapêutica indicada para o tratamento de feridas lacerantes, geralmente muito extensas e com grande perda de tecido, resultando em lesões com quantidade insuficiente de tecido cutâneo para a cicatrização da mesma, não sendo possível o tratamento por primeira intenção, bem como em feridas onde o tecido de granulação exuberante impede sua contração e em ferimentos onde a contração da ferida no processo de cicatrização pode resultar em uma contratura indesejada para o local (BRISTOL, 2005).

A rápida cicatrização de uma ferida que recebeu um enxerto faz desta técnica a escolha mais econômica para o manejo de feridas que não podem ser suturadas. Um enxerto cutâneo cicatrizado contém porções da epiderme, da derme e alguns anexos, incluindo folículos pilosos, sendo preferida por apresentar melhores resultados (SCHUMACHER, 2006). Bristol (2005) afirma que o uso de enxertos cutâneos pode modificar completamente o resultado final da cicatrização destes ferimentos, levando a um resultado mais cosmético e funcional.

2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS ENXERTOS

Existem dois tipos básicos de enxertos, sendo eles o enxerto com pedículo e o enxerto livre (ROSS, 1968; BOYD; HANSELKA, 1971). O enxerto com pedículo permanece conectado ao doador por um pedículo vascular que sustenta o enxerto, mantendo a sua viabilidade. O enxerto livre é uma parte de tecido que foi completamente separado de seu suplemento sanguíneo local e será transferido para uma ferida em outro local, necessitando estabelecer novas conexões vasculares para se manter viável (SCHUMACHER, 2006).

Os enxertos livres podem ser classificados em autólogos, onde os enxertos são transferidos de um local a outro em um mesmo paciente; homólogos ou enxertos entre pacientes da mesma espécie; e heterólogos que são os enxertos entre diferentes espécies. Os enxertos homólogos e heterólogos podem gerar uma resposta imune contra o enxerto, levando a uma eventual rejeição (MAY, 1991). Os enxertos autólogos são os mais comuns e mais aplicados em equinos por serem mais práticos e não gerar uma resposta imune (BRISTOL, 2005; SHUMACHER, 2006).

Os enxertos ainda podem ser classificados em enxertos de espessura completa, ou seja, compostos pela epiderme e toda a derme ou enxertos de espessura parcial, compostos pela epiderme e somente uma porção da derme. A porcentagem de derme contida no enxerto pode influenciar em sua aceitação, durabilidade e na estética do local receptor (SHUMACHER, 2006).

2.4 FISIOLOGIA DO ENXERTO

Bristol (2005) afirma que o primeiro processo crítico para o sucesso da pega do enxerto é a aderência ao leito da ferida. De acordo com Schumacher (2006), o leito receptor para o enxerto deve ser vascular e livre de infecções e tecido desvitalizado. Alguns pré-requisitos para o sucesso de enxertos de pele são leito receptor com vascularização adequada, aproximação acurada e imobilização adequada (McGLENNON; WHITE, 1989).

Segundo Swain (1980), imediatamente após a enxertia, o retalho aparece pálido, devido à deficiência de elementos hemáticos. Durante os três dias subseqüentes, aparece azulado e só no sétimo dia retorna a coloração rosada, decorrente do restabelecimento circulatório. Para o autor, a formação das anastomoses vasculares pode acontecer já nas primeiras 24 horas após a cirurgia, porém, é mais comum que ocorra 48 horas após a enxertia.

A sobrevivência do enxerto ocorre através de três processos. O processo precoce é não vascular, o qual garante nutrição através da absorção de exsudato do leito receptor. Nessa fase, chamada de fase de aderência, forma-se uma camada de fibrina e não existe circulação. O enxerto torna-se edemaciado, com aparência azulada (McGLENNON; WHITE, 1989). Durante esta fase, torna-se fácil a ruptura desta camada de fibrina responsável pela aderência do tecido através da mobilidade excessiva ou pela destruição enzimática bacteriana, levando a uma perda do enxerto (BRISTOL, 2005). Os dois outros processos são a conexão direta dos vasos do leito com os do enxerto (inosculação) e a penetração de vasos do leito diretamente na derme do enxerto (BRAUER; CONVERSE, 1964).

A fase de revascularização ocorre após aproximadamente 48 horas da realização do procedimento cirúrgico. Nesta fase, novos capilares gerados no leito receptor atravessam a camada de fibrina formada na fase de aderência, fazendo uma anastomose com o enxerto e, simultaneamente, novos canais vascular são criados dentro da derme, num processo de neovascularização (SCHUMACHER, 2006).

Após a enxertia, a elastina e o colágeno do enxerto são progressivamente substituídos por outros elementos. O enxerto é gradualmente reinervado através da penetração de nervos regionais pela base e pelas

margens do enxerto, constituindo a fase de organização do enxerto (BRISTOL, 2005).

2.5 CAUSAS DE FALHA NA ENXERTIA

Os eqüinos são certamente uma das espécies domésticas mais propensas a desenvolver feridas cutâneas de origem traumática, principalmente devido a condições inadequadas de manejo e instalações. Grande número dessas feridas se apresenta, ao cirurgião, já contaminadas por bactérias (SOUZA, 1989).

Reações que levam a uma falha no processo de enxertia incluem o acúmulo de fluído sob o enxerto, movimentação excessiva e infecção. Enxertos aplicados em cavalos falham, mais freqüentemente, por causas infecciosas (BOOTH, 1991; BRISTOL, 2005).

Um preparo deficiente do local receptor é um convite para uma falha na enxertia. Um local receptor com uma pobre perfusão, como exemplos, osso exposto, tecido de granulação maduro ou gordura, não irá fornecer suporte para um enxerto (BRISTOL, 2005).

O enxerto deve estar em contato com a ferida para prevenir a formação de fluído que se acumulará entre o enxerto e a ferida. Um hematoma, seroma ou exsudato entre o abaixo do enxerto não permite a adesão da fibrina entre o enxerto e a ferida, formando assim uma barreira à formação de novos vasos (ROTHSTEIN, 1983).

A causa mais comum de falha é a infecção bacteriana que pode resultar em uma destruição do tecido enxertado, através deslocamento do tecido enxertado do local receptor pelo acúmulo excessivo de exsudato e pela destruição enzimática da fibrina que inicialmente mantém o enxerto no local adequado (BRISTOL, 2005). O tecido de granulação sempre contém uma camada de bactérias em sua superfície, porém contém também abundantes vasos sanguíneos e células fagocitárias que atuam como uma barreira para a invasão bacteriana (ROTHSTEIN, 1983). A ferida torna-se infectada quando a concentração de bactérias no tecido excede a habilidade das defesas humorais e celulares de destruir essas bactérias. Para a maior parte das bactérias essa

concentração é em torno de 10^5 organismos por grama de tecidos. A sobrevivência do tecido enxertado está melhor correlacionada com a concentração de bactérias no local receptor do que com qualquer outro fator (ROBSON; KRIZEK, 1967;1973). *Pseudomonas spp* e *Streptococcus spp* β-hemolíticos são particularmente proeminentes em feridas infectadas de eqüinos (BRISTOL, 2005). *Streptococcus* β-hemolítico produz enzimas proteolíticas, que destroem o leito receptor e o tecido enxertado, desestabilizando a rede de fibrinas entre o enxerto e o leito e digerindo esta fibrina. *Pseudomonas* atua atacando a fibrina através da produção de elastase, que degrada a elastina da derme do tecido enxertado (TEH, 1979).

Outra falha comum no processo de enxertia é a mobilidade excessiva. O enxerto deve ser mantido imobilizado para que possa se tornar vascularizado. A presença de forças entre o enxerto e o leito receptor pode resultar no deslocamento do tecido enxertado, desalojando a fibrina, prejudicando a embebição plasmática, a inosculação e o crescimento capilar. Essas forças aparecem quando o leito receptor é localizado em uma área de grande mobilidade, como uma articulação, ou quando a área enxertada é inadequadamente imobilizada (SCHUMACHER, 2006).

2.6 TÉCNICAS DE ENXERTIA

A preparação do leito receptor é a contribuição mais importante para a sobrevivência de um enxerto cutâneo livre (WILSON, 1990). De acordo com Schumacher (2006), pode ocorrer a perda do enxerto se a ferida apresentar um suporte vascular inadequado para suportar um enxerto livre, se parecer infectada ou apresentar uma elevada vulnerabilidade para o desenvolvimento de uma infecção.

O local doador de pele irá depender da técnica de enxertia escolhida e do modo em que o enxerto será coletado, com o cavalo anestesiado ou em estação, sendo realizada a assepsia cirúrgica do local (SCHUMACHER, 2006). Os enxertos de espessura completa geralmente são retirados da região peitoral cranial, onde a pele é relativamente móvel (STASHAK, 1984). O enxerto é removido e o local doador é suturado, com o cavalo anestesiado ou em

estação, com sedação e anestesia local (SCHUMACHER, 2006). O tecido subcutâneo deve ser removido para a exposição da derme e de sua vascularização, uma vez que este funciona como uma barreira para a embebição plasmática, impedindo o crescimento de novos vasos. A fáscia e a gordura também devem ser retiradas através de uma dissecação cuidadosa para não provocar injúria aos vasos da derme (BOYD; HANSELKA, 1971; ROSS, 1968). Os enxertos de espessura parcial geralmente são de tamanhos menores, podendo ser obtidos da porção ventral do abdômen ou da porção ventral do tórax (BRISTOL, 2005).

Segundo Bristol (2005), o enxerto pode ser colocado diretamente sobre o leito receptor e suturado no local. De acordo com Schumacher (2006), a sutura do tecido enxertado deve ser realizada juntamente à margem da ferida, podendo ser realizada com o cavalo em estação, com uma prévia dessensibilização do local através de uma anestesia infiltrativa local. A aplicação de enxerto com o animal em estação reduz o tempo de anestesia geral e elimina a possibilidade de danos ao enxerto que podem ocorrer no período pós-anestésico. A sutura pode ser removida após seis a sete dias, quando a aceitação do enxerto é assegurada.

Em eqüinos, os locais receptores são freqüentemente maiores do que os enxertos obtidos, sendo utilizadas algumas técnicas expansoras para aumentar o tamanho dos enxertos. Equipamentos expansores são provavelmente o melhor método para cobrir grandes defeitos (BRISTOL, 2005). O enxerto é fenestrado manualmente ou mecanicamente, através de expansores, para a obtenção de um enxerto em malha. Booth (1991) afirma que essas fenestrações são importantes para reduzir o edema local e prevenir o acúmulo de exsudato seroso ou sanguinolento.

2.7 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

A ferida enxertada deve ser recoberta com uma bandagem estéril e não aderente, como uma bandagem não aderente de algodão ou bandagem de rayon. A bandagem deve ser realizada de modo a impedir o máximo possível a mobilidade no local para facilitar a pega do enxerto. A bandagem não deve ser

trocada nos primeiros 4 a 5 dias após o procedimento cirúrgico, a menos que exista sinais de infecção (SCHUMACHER, 2006). A perda completa do enxerto cutâneo, por infecção ou movimentação, após o quinto dia do procedimento inicial é incomum (BOOTH, 1991).

Infecções por *Streptococcus* ou *Pseudomonas* podem destruir rapidamente um enxerto aplicado recentemente; portanto, o reconhecimento precoce de uma infecção e a aplicação apropriada de uma droga antimicrobiana se torna necessária para a sobrevivência do enxerto (SCHUMACHER, 2006).

A ferida enxertada, principalmente nos membros, deve ser protegida por uma bandagem até que a epitelização esteja completa. Medicações analgésicas devem ser administradas antes da coleta do tecido cutâneo do local doador e deve ser mantida por alguns dias no período pós-operatório (SCHUMACHER, 2006).

2.8 ARMAZENAMENTO DE ENXERTOS

Enxertos autólogos ou homólogos podem ser aplicados com sucesso em feridas após armazenagem por várias semanas em temperatura de refrigeração, envoltos em gazes embebidas com solução salina fisiológica ou solução de Ringer (ROTHSTEIN, 1983).

Resultados excelentes foram descritos em eqüinos que receberam tecidos de enxertos cutâneos armazenados a 4º C por mais de três meses em meio de McCoy 5ª com soro eqüino a 10% e sulfato de gentamicina (80 mg/ L) (SCHUMACHER, *et al*., 1987). Ferimentos de alguns cavalos também foram enxertados com sucesso usando tecido cutâneo armazenado por mais de doze meses (SCHUMACHER, 2006).

Um enxerto armazenado pode ser útil para recobrir um defeito criado em todo ou uma parte do enxerto inicial e, por essa razão, coletar mais tecido do que o necessário para recobrir a ferida é sempre prudente, especialmente quando o enxerto tem uma chance maior do que a usual de falhar. Um enxerto armazenado que não será usado para a enxertia autóloga pode ser utilizado

como um curativo biológico para uma ferida em outro cavalo, quando as circunstancias permitirem (SCHUMACHER, 2006).

2.9 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma, com a conseqüente presença de fatores de crescimento (FC) liberados por estas plaquetas, além de proteínas osteocondutoras, que também servem de matriz para migração epitelial e formação óssea e de tecido conectivo (VENDRAMIN *et al.,* 2006).

O PRP é um hemocomponente autógeno usado para liberar fatores de crescimento em altas concentrações no local onde se pretende reparar um defeito ou uma lesão tecidual, levando à aceleração do processo cicatricial. Os fatores de crescimento estimulam principalmente a reepitelização, a angiogênese, a mitose celular, a síntese de colágeno, a quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos e fibroblastos e a produção de linfócitos com a produção de interleucina (ALMEIDA *et al.,* 2008). O coágulo sanguíneo normal contém cerca de 95% de hemácias, 5% de plaquetas e menos de 1% de células brancas. No PRP, o quociente entre hemácias e plaquetas se inverte, estas últimas ocupando 95% do volume total (WILSON; BARBIERI; MAZZER, 2006).

Estas propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial de melhorar a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de gordura, bem como estimular a cicatrização de feridas (VENDRAMIN *et al.,* 2006).

2.10 USO DO GEL DE PRP EM ENXERTOS

O PRP representa uma nova biotecnologia, devido ao crescimento tecidual interessar à engenharia de tecidos e à terapia celular, atuando na cicatrização e capacitando as células às mitoses e angiogênese (MARX, 2001; VILLELA, 2007).

A utilização das técnicas de enxertos cutâneos pode ser considerada uma parte importante no tratamento veterinário de feridas complicadas em eqüinos, principalmente as localizadas nos membros destes animais (BRISTOL, 2005). O uso das técnicas de enxertos cutâneos requer uma pequena experiência e somente um material cirúrgico básico (SCHUMACHER, 2006). Percebendo a importância da enxertia para aquelas feridas nas quais a cicatrização por primeira intenção esteja prejudicada e ainda a dificuldade para que se obtenha um percentual de pega neste procedimento, é importante que se pesquisem novos métodos de modo a melhorar os índices de sucesso nas enxertias (PAIM, *et al*., 2002).

CAPÍTULO 2

EFEITO DO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM EQUINOS

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 AMOSTRA

O experimento envolveu a população de eqüinos pertencentes à Unidade Hospitalar para Animais de Fazenda (UHAF) da PUCPR.

Foram utilizados neste projeto oito eqüinos saudáveis, do sexo feminino, com idades entre 3 e 15 anos, com peso médio de 350 kg. Estes animais foram previamente desverminados com Ivermectina (200 mcg/kg), examinados clinicamente e submetidos a exames laboratoriais para constatar sua higidez orgânica, uma semana antes da realização do procedimento cirúrgico.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, n° 514/2010 em reunião realizada no dia 27 de Maio de 2010. O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), utilizando medidas para minimizar o desconforto dos animais.

Durante o experimento os animais foram mantidos em baias individuais localizadas na Clínica Santa Fé, no Jockey Clube do Paraná, com água, feno e ração próprias para cavalos. Ao término do experimento os animais retornaram à Unidade Hospitalar para Animais de Fazenda (UHAF) da PUCPR.

3.2 TÉCNICAS DE PESQUISA PARA COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

3.2.1 Preparo do gel de plasma rico em plaquetas

O gel de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) foi obtido pelo protocolo de dupla centrifugação em tubos descrito por Arguëles *et al*. (2006).

Antes de submeter o animal ao procedimento cirúrgico foi realizada a coleta de 80 mL de sangue total, por meio de punção venosa jugular.

Coletou-se sangue em 16 tubos vacutainer com anticoagulante citrato de sódio 3,2%, cada um com 5 mL, sendo encaminhado ao laboratório para o preparo de gel de PRP em capela de fluxo laminar e com material estéril, visando reduzir as chances de contaminação. Os frascos foram submetidos à primeira centrifugação à 120*g* durante 5 minutos, promovendo a separação das células vermelhas que, por terem um peso específico maior, depositam-se na parte inferior do tubo. Na parte superior fica o plasma com as plaquetas e, entre estas duas camadas, existe uma outra fina e esbranquiçada, denominada de zona de névoa, que contém as células brancas, principalmente leucócitos, e as plaquetas maiores.

Com o auxílio de um cateter espinhal 18 G acoplado à uma seringa de 20 mL foram coletadas a porção superior do plasma de cada um dos tubos, totalizando 20 mL, que foram colocados em outros dois tubos vacutainer de 10 mL, sem anti-coagulante. Esses tubos foram submetidos à nova centrifugação à 240*g* durante 5 minutos. Retirou-se 25 % da porção inferior do plasma, ou seja, 2,5 mL da porção inferior de cada tubo, levando-as à um novo tubo vacutainer sem anti-coagulante, totalizando 5 mL e obtendo-se assim o PRP.

O gel de PRP é obtido por meio da adição de 250 µL de uma solução de cloreto de cálcio a 10% aos 5 mL de PRP, ativando assim o sistema de coagulação que resultará na gelação do PRP. Esse tubo deverá ser deixado em temperatura ambiente durante duas horas para estimular a degranulação das plaquetas antes do uso.

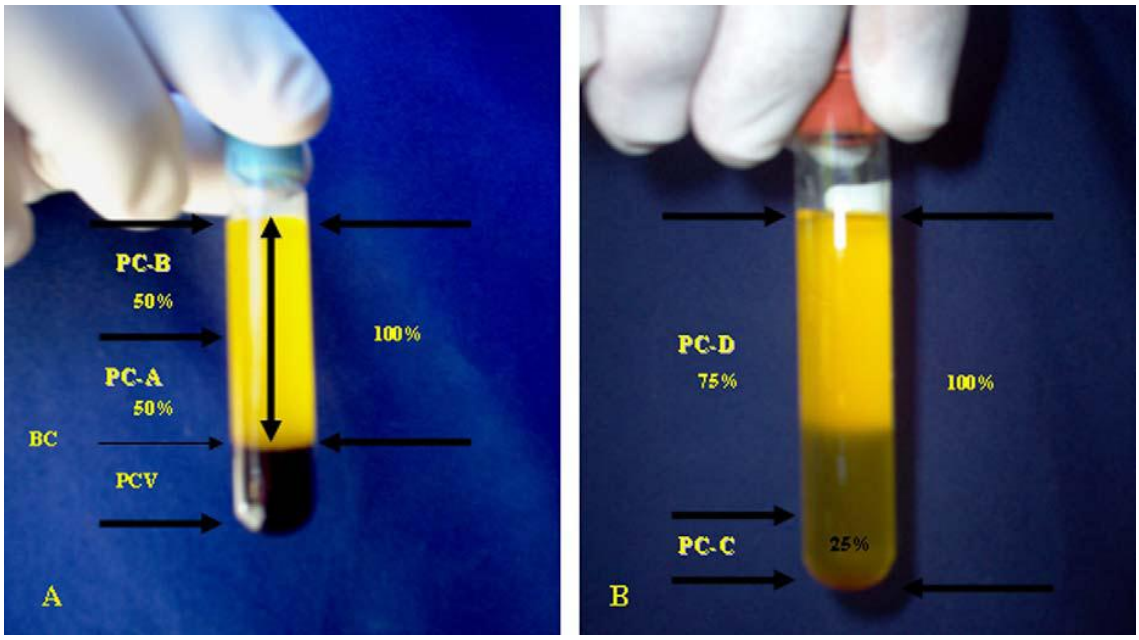

Figura 1. **A:** Sangue total após a primeira centrifugação, sendo PCV a porção que contém as células vermelhas, PC-A a porção de plasma rico em plaquetas e PC-B o plasma pobre em plaquetas. **B:** Segunda centrifugação para concentração plaquetária, sendo PC-C a porção de plasma rico em plaquetas utilizada para obtenção do gel de PRP e PC-D o plasma pobre em plaquetas.

3.2.2 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram sedados com Acepromazina 1% 0,05 mg/kg/IM e após 15 minutos utilizou-se a Xilazina a 10% na dose de 1 mg/kg/IV e Butorfanol na dose de 0,02 mg/kg/IV para serem então submetidos à técnica de enxerto de pele com o paciente em estação.

Para a produção de feridas experimentais foram realizadas as tricotomias de quadrados de aproximadamente 20 cm^2, bilateral, na região lateral do pescoço, logo abaixo da crina. Realizou-se a antissepsia da pele com uma solução de álcool iodado e solução de PVPI degermante. Foram demarcados dois quadriláteros de cada lado do animal, sendo um mais cranial e proximal de 2,5 cm^2, sendo este o local receptor de pele e um mais caudal e distal, na região média do pescoço, com 3,5 cm^2, sendo o local doador de pele.

Realizou-se a dessensibilização dos locais demarcados com anestesia infiltrativa local com 10 mL de Lidocaína 2%, sem vasoconstritor, ao redor das áreas com os quadriláteros demarcados, sem infiltrar o local dos enxertos. Utilizando-se uma lâmina de bisturi nº 24 estéril, a pele dos locais demarcados com os quadriláteros craniais foi excisada, obtendo-se as feridas cutâneas experimentais.

Logo após, realizou-se a excisão da pele dos locais demarcados como doadores de pele. Os tecidos cutâneos retirados desses quadriláteros caudais foram dissecados para a retirada das fáscias e tecido subcutâneo.

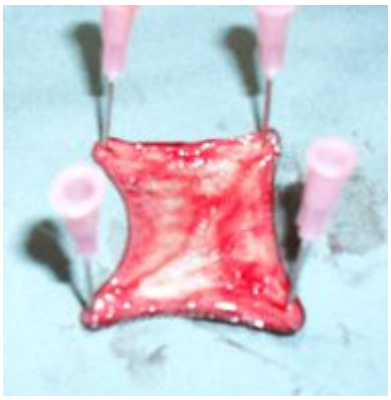

Figura 2. Preparo do enxerto durante o procedimento cirúrgico para a retirada das fáscias e tecido subcutâneo

Após o preparo, os tecidos doadores foram fixados nas feridas experimentais, bilateralmente, através de uma sutura com fio de Nylon nº 0 das bordas do tecido doador com o tecido receptor utilizando-se pontos isolados simples.

O gel de plaquetas foi utilizado entre o leito receptor e o tecido enxertado antes da sutura da porção superior do mesmo, somente de um dos lados do animal, utilizando-se o volume de 5 mL, onde o excesso era retirado com uma leve compressão do enxerto. No outro lado o gel de PRP não foi utilizado, sendo este o lado controle.

Figura 3. Aplicação do gel de plasma rico em plaquetas entre o leito receptor e o tecido enxertado no lado tratamento.

Figura 4. Aspecto final do local da cirurgia após o procedimento de enxertia.

Nos primeiros quinze dias foi realizada a limpeza dos locais de cirurgia duas vezes ao dia e utilizou-se Nebacetin ® (sulfato de Neomicina e Bacitracina) tópico sobre os tecidos enxertados em ambos os lados, para evitar contaminação pós-operatória dos enxertos. As feridas doadoras de pele também foram tratadas até sua completa cicatrização por segunda intenção.

Para o pós-operatório destes animais foi realizada a analgesia com o uso de Flunixin Meglumine (1,1 mg/ kg/ IV/ SID), por um período de cinco dias e

antibioticoterapia com uso de Sulfadiazina e Trimetoprim em pasta (30g/VO/SID), durante de cinco dias.

3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para o preparo do gel de plasma rico em plaquetas foram realizadas análises laboratoriais da amostra sanguínea inicial e do gel de PRP preparado, realizando-se a contagem das plaquetas, para garantir uma concentração plaquetária com uma média de quatro a seis vezes superior ao da amostra sanguínea inicial, garantindo a qualidade do gel de PRP utilizado nas regiões enxertadas.

Foram realizadas avaliações clínicas dos enxertos, utilizando-se uma matriz de análise (Tabela 1), bem como avaliações histológicas e bacteriológicas no dia da cirurgia (dia 0), sendo repetidos nos momentos 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório, para serem comparados entre si.

3.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

3.4.1 Avaliação Clínica do Enxerto

A avaliação clínica do enxerto foi realizada pelo mesmo observador, que não sabia a diferença entre os tratamentos, nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 conforme Hermeto (2010) com tabela adaptada de Paim *et al;* (*2002*), na qual foram avaliados aspectos como exsudação, coloração, edema e aspecto cosmético do enxerto.

Tabela 1. Matriz de análise para classificação clínica dos enxertos.

ANÁLISE CLÍNICA DO ENXERTO CUTANEO		
Nome / n° do animal		Data do enxerto:
Data:		Data da biopsia:
Análises	**Direito**	**Esquerdo**
Exsudato		
Sem exsudato (0)		
Com exsudato (1)		
Pouco exsudato (2)		
Muito exsudato (3)		
Coloração		
Branca (0)		
Rosada (1)		
Roxa (2)		
Preta (3)		
Edema		
Sem edema (0)		
Leve edema (1)		
Muito edema (2)		
Aspecto Cosmético		
Excelente (1)		
Bom (2)		
Regular (3)		
Ruim (4)		

3.4.2 Análise Histológica

A coleta do tecido enxertado e do leito receptor foi realizada através de um punch de biópsia de 5 mm de diâmetro, realizada nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após o procedimento cirúrgico, com uso de anestesia local, somente ao redor dos enxertos.

Após a biópsia, o tecido foi fixado em formol tamponado por pelo menos 24 horas e encaminhado para o Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para análise. Após esse tempo, o fragmento foi embebido em parafina e preparado em cortes transversais de 4 x 6 µm, e as lâminas foram coradas pelas técnicas de Hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Mallory.

As lâminas obtidas após as colorações foram avaliadas por um mesmo observador, sem que soubesse qual era o lado do controle e o lado do tratamento.

Para a avaliação histológica foi utilizados os critérios descritos na tabela 2, em que foram avaliados: autólise, fibroblasto, colágeno, inflamação aguda, integração-aderência microscópica e tecido de granulação, conforme Hermeto (2010).

Tabela 2. Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 nos enxertos cutâneos em equinos.

Achados HE	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
Fibroblasto	0	1	2	3
Colágeno	0	1	2	3
Inflamação aguda	0	1	2	3
Integração-aderência microscópica	ausente	presente	--	--
Tecido de granulação	ausente	presente	--	--

HE: hematoxilina-eosina e Tricrômio de Mallory.

A atribuição de índices aos achados histológicos foi realizada de acordo com Hermeto (2010), baseada em critérios apresentados por Chandra *et al*. (2007) e DeRossi *et al.* (2009).

Fibroblastos: ausentes, discreta proliferação, moderada proliferação ou acentuada proliferação.

Colágeno: ausente, discreto (deposição de fibras colágenas em pouca quantidade), moderada ou acentuada (fibras colágenas espessas formando feixes de fibrose).

Inflamação aguda: ausente (sem infiltrado inflamatório na lâmina), discreto (presença de neutrófilos e/ou eosinófilos esparsos, com áreas sem infiltrado inflamatório), moderado (com neutrófilo e/ou eosinófilos e com poucas áreas sem infiltrado inflamatório) e acentuado (células inflamatórias em grande quantidade formando agregados inflamatórios).

Integração-aderência microscópica: presença ou ausência de aderência entre leito receptor e enxerto.

Tecido de granulação: ausência ou presença de tecido de granulação com proliferação de capilares e fibroblastos jovens.

3.4.3 Análise Bacteriológica

Para a análise bacteriológica foi empregada a técnica de remoção de uma amostra de microrganismos existentes no enxerto através do uso de swab estéril depois de realizada a anti-sepsia da pele e a biopsia do tecido enxertado. O material foi enviado em frasco estéril ao Laboratório de Microbiologia da PUCPR para posterior cultura em meios de Ágar McConkey e Águar Sangue de Carneiro, nos dias 0, 7, 14, 21 e 28.

3.4.4 Análise Morfométrica

Para a análise morfométrica, foram realizadas avaliações macroscópicas através de fotografias do local com mensuração dos enxertos, de ambos os lados. Calculou-se a área dos enxertos nos momentos 0, 7, 14, 21 e 28, através do software Metron Epoonatech 3.0, para avaliação da contração do enxerto durante o processo cicatricial.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram comparados estatisticamente, através do teste Kruskal-wallis, entre os lados (tratamento e controle) e entre os momentos dentro de cada tratamento, utilizando-se ANOVA One Way para dados não paramétricos, com pós teste de Dunns, para os diferentes momentos da coleta de dados, com $p < 0,05\%$ de significância, utilizando-se o software Graphpad prism, versão 5.0.

4 RESULTADOS

O gel de PRP obtido apresentou a concentração plaquetária esperada, sendo 4 a 6 vezes superior a concentração inicial de plaquetas.

O procedimento cirúrgico ocorreu sem complicações em todos os animais. Durante os 28 dias de pós-operatório, todos os eqüinos permaneceram em boa saúde, sem nenhuma complicação de ordem geral, porém alguns animais apresentaram perda de enxerto em ambos os lados em diferentes momentos. No lado controle ocorreram três perdas de enxertos, sendo uma aos 14 dias, uma aos 21 dias e uma aos 28 dias. No lado dos enxertos tratados com PRP ocorreram duas perdas, sendo uma aos 14 dias e uma aos 28 dias.

Um dos enxertos do lado tratamento com PRP e um do lado controle apresentaram descolamento da epiderme, com posterior nascimento de novos pêlos no local, indicando a presença da derme do tecido enxertado no local, nos momentos 21 e 28 respectivamente.

4.1 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES CLÍNICAS

A análise das avaliações clínicas pelo teste de Kruskal-Wallis revelou que não houve diferenças significativas nos parâmetros exsudato, coloração,

edema e aspecto cosmético entre o lado controle e lado tratamento com PRP em nenhum dos momentos avaliados neste estudo.

A análise estatística demonstrou diferenças significativas entre os momentos dentro de cada tratamento nos parâmetros exsudato (tabela 3), edema (tabela 4) e aspecto cosmético (tabela 5). Não houve diferença significativa no parâmetro coloração em nenhum dos momentos dentro de cada tratamento.

Tabela 3. Mediana dos escores clínicos de exsudato, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, $p < 0,05\%$.

EXSUDATO					
Tratamento/Dias	**0**	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	0^{Aa}	0^{Aa}	2^{Aa}	2^{Aa}	1^{Aa}
Controle	0^{Aa}	0^{Aab}	2^{Ab}	$1,5^{Ab}$	$0,5^{Aab}$

Tabela 4. Mediana dos escores clínicos de edema, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, $p < 0,05\%$.

EDEMA					
Tratamento/Dias	**0**	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	0^{Aa}	1^{Aab}	2^{Ab}	1^{Aab}	1^{Aab}
Controle	0^{Aa}	1^{Ab}	1^{Ab}	$0,5^{Aab}$	1^{Aab}

Tabela 5. Mediana dos escores clínicos de aspecto cosmético, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05%.

ASPECTO COSMÉTICO					
Tratamento/Dias	**0**	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	1,5 ^{Aa}	2 ^{Aa}	2 ^{Aa}	3 ^{Aa}	3 ^{Aa}
Controle	1 ^{Aa}	2 ^{Aab}	2 ^{Aab}	3 ^{Ab}	2,5 ^{Aab}

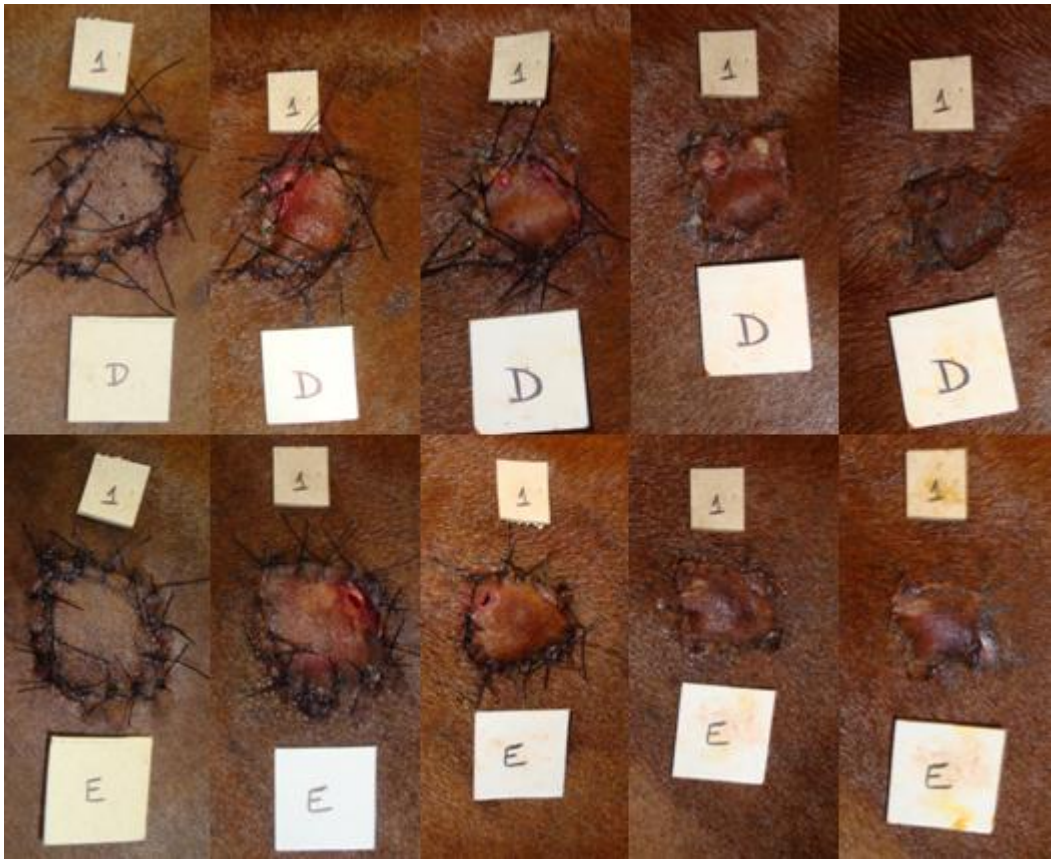

Figura 5 – Enxerto lado direito (tratamento) e esquerdo (controle) nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Observam-se os sinais das biópsias prévias nos enxertos.

4.2 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS

A análise das avaliações histológicas revelou diferenças significativas entre os lados controle e tratamento com PRP nos parâmetros colágeno (tabela

6) e inflamação aguda (tabela 7). Não houve diferenças significativas nos parâmetros fibroblastos, granulação e integração-aderência entre os lados em todos os momentos avaliados neste estudo.

Entre os momentos dentro de cada tratamento observou-se diferenças significativas nos parâmetros inflamação aguda (tabela 7), fibroblasto (tabela 8) e granulação (tabela 9). Não houve diferença significativa nos parâmetros colágeno e integração-aderência em nenhum dos momentos dentro de cada tratamento.

Tabela 6. Mediana dos escores histológicos de colágeno, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, $p < 0,05\%$.

COLÁGENO				
Tratamento/Dias	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	2^{Aa}	2^{Aa}	$1,5^{Aa}$	$1,5^{Aa}$
Controle	$1,5^{Aa}$	1^{Ba}	2^{Aa}	$1,5^{Aa}$

Tabela 7. Mediana dos escores histológicos de inflamação aguda, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, $p < 0,05\%$.

INFLAMAÇÃO AGUDA				
Tratamento/Dias	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	3^{Aa}	3^{Aab}	3^{Aab}	0^{Ab}
Controle	2^{Ba}	3^{Aa}	2^{Aa}	$2,5^{Aa}$

Tabela 8. Mediana dos escores histológicos de fibroblasto, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05%.

FIBROBLASTO				
Tratamento/Dias	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	1 ^{Aa}	2 ^{Aab}	2 ^{Aab}	3 ^{Ab}
Controle	1 ^{Aa}	2 ^{Aab}	2 ^{Aab}	3 ^{Ab}

Tabela 9. Mediana dos escores histológicos de granulação, nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, p < 0,05%.

GRANULAÇÃO				
Tratamento/Dias	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	1 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	2 ^{Aa}	3 ^{Aa}
Controle	1 ^{Aa}	2 ^{Ab}	2 ^{Aab}	3 ^{Ab}

4.3 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES BACTERIOLÓGICAS

Durante o experimento foram realizadas culturas dos enxertos de ambos os tratamentos, após o procedimento cirúrgico e nos momentos 7, 14, 21 e 28, após as biópsias.

No momento 0 (pós cirúrgico) não houve crescimento bacteriano em nenhum dos lados. Um dos animais apresentou perda de enxertos, tanto no lado controle quanto no lado tratamento com PRP, após décimo quarto dia, porém sem contaminação bacteriana dos enxertos.

No lado tratamento com PRP um dos animais apresentou crescimento de *Escherichia coli* no tecido enxertado nos momentos 14 e 21, porém não ocorreu perda do enxerto e não houve crescimento bacteriano no momento 28. Outros três animais apresentaram crescimento bacteriano de *Escherichia coli* no mesmo lado, apenas no dia 28, porém sem perda dos enxertos.

No lado controle um dos animais apresentou crescimento de *Escherichia coli* no tecido enxertado nos dias 14 e 21, com perda do enxerto após esse momento. Ainda no lado controle um animal apresentou crescimento bacteriano de *Escherichia coli* apenas no dia 28, porém sem perda do enxerto.

Somente um dos eqüinos deste experimentou apresentou crescimento de outros tipos de bactérias, sendo *Bacilo sp* no décimo quarto dia e *Staphylococcus intermédius* nos dias 21 e 28, do lado do enxerto tratado com PRP e crescimento de *Cândida sp* no dia 21 e *Staphylococcus intermédius* no dia 28 do lado controle, porém não houve perda de enxerto em nenhum dos lados, como pode ser observado na tabela 10.

Tabela 10. Número de enxertos que apresentaram contaminação em cada momento, nos diferentes tratamentos, sendo que números entre parênteses representam perdas de enxertos em cada momento. * Perda de enxerto com contaminação bacteriana por *Escherichia coli*. ** Perda de enxertos sem contaminação bacteriana.

CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DE ENXERTOS					
Dias	**0**	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	0	1	3 (1**)	2	4 (1**)
Controle	0	1	2 (1**)	2 (1*)	2 (1**)

4.4 ANÁLISE DAS AVALIAÇÕES MORFOMÉTRICAS

Os valores obtidos da mensuração da área dos enxertos para avaliação morfométrica da contração dos enxertos durante o processo de cicatrização

foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, que não revelou diferenças significativas entre os lados controle e tratamento com gel de plasma.

A análise estatística desses dados pelo teste ANOVA One Way também não demonstrou diferenças significativas entre os momentos dentro de cada tratamento durante o experimento, conforme tabela 11.

Tabela 11. Mediana das mensurações da área de contração das feridas (em cm^2), nos enxertos tratados com PRP e nos enxertos controle, sendo que letras maiúsculas representam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas representam a diferença entre os momentos, $p < 0,05\%$.

CONTRAÇÃO DAS FERIDAS					
Tratamento/Dias	**0**	**7**	**14**	**21**	**28**
PRP	$6,25^{Aa}$	$6,23^{Aa}$	$6,22^{Aa}$	$6,20^{Aa}$	$6,17^{Aa}$
Controle	$6,26^{Aa}$	$6,24^{Aa}$	$6,21^{Aa}$	$6,20^{Aa}$	$6,18^{Aa}$

5 DISCUSSÃO

Neste estudo utilizou-se uma técnica para a produção de PRP simples e de baixo custo, para viabilizar a sua utilização na medicina veterinária de rotina, sendo a mesma técnica desenvolvida por Argüelles *et al*. (2006). De forma semelhante ao descrito pelo autor, foram obtidas concentrações plaquetárias médias de quatro a seis vezes superior a da amostra sanguínea inicial, considerado o ideal para a produção do gel de PRP terapêutico.

Estudos realizados em feridas cutâneas agudas em seres humanos tratadas com PRP demostraram um aumento estatisticamente significativo quando comparados à cicatrização de feridas sem o uso do gel, acelerando clínica e histologicamente a cicatrização dos tecidos tratados com PRP (HOM *et al*., 2007). A utilização do PRP mostrou-se efetiva também em procedimentos de ritidoplastias em seres humanos, em que a análise

qualitativa de casos clínicos evidenciou uma melhor integração da enxertia adiposa nos preenchimentos faciais com o uso do PRP (ALMEIDA *et al*., 2008).

Neste estudo, a adição do gel de PRP aos enxertos cutâneos para acelerar sua incorporação e cicatrização não pode ser demonstrada, pois não houve diferenças significativas entre o lado controle e o lado tratamento com PRP. O mesmo resultado foi descrito por Monteiro *et al.* (2009), que avaliou o tempo de cicatrização de feridas cirúrgicas com o uso do gel de PRP em eqüinos e por DeRossi *et al*. (2009), que avaliou cicatrização de feridas distais em membros de eqüinos com uso de PRP. Em ambos os casos, não houve diferenças significativas no processo de cicatrização com o uso do gel de plasma rico em plaquetas. Segundo DeRossi *et al.* (2009), não foi comprovada a hipótese de que a adição de PRP para o aumento da presença de mediadores inflamatórios no local melhora a qualidade da reparação e acelera a cicatrização de feridas em membros de eqüinos. Resultado semelhante também foi descrito por Hermeto (2010), que realizou um estudo comparativo entre a cola de fibrina e o plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em cães, concluindo que o grupo cola de fibrina foi superior ao grupo plasma rico em plaquetas e que o grupo plasma rico em plaquetas quando comparado com o grupo controle apresentou resultados inferiores na cicatrização de enxertos cutâneos de espessura completa em cães.

O índice de falhas na enxertia foi de 37,5% no lado controle e de 25% no lado tratado com o gel, sendo esses índices semelhantes ao encontrados em literatura, como no caso de enxertos de membros em eqüinos, que foi aproximadamente 30% em estudo realizado em feridas distais, o que pode ocorrer devido à mobilidade excessiva ou ainda por contaminação bacteriana (FRENCH; FRETZ; 1990), uma vez que as bactérias também inibem a cicatrização através do prolongamento da fase inflamatória. Índices semelhantes também são encontrados em cães, Pavletic (1996) e Hermeto (2010) relatam que mesmo com todos os cuidados pós-operatórios o sucesso da enxertia foi de 50 a 60%.

A maioria dos casos de contaminação dos enxertos foi ocasionada por *Escherichia coli*, indicando uma contaminação ambiental dos enxertos, assim como o resultado encontrado por Monteiro *et al*. (2007) que avaliou a contaminação de feridas em diversas espécies, relatando 25% de

contaminação por *E. coli* em feridas. A *E. coli*, por ser uma enterobactéria, sugere que os animais do experimento deitavam-se sobre as feridas cirúrgicas, nas baias em que permaneceram durante o experimento. Segundo Souza e Scarcelli (2000), o isolamento bacteriano era esperado, uma vez que, a *E. coli* faz parte de uma flora normal dos mamíferos, conhecida como microbiota, que se refere aos microorganismos, sejam eles bactérias, fungos ou vírus, que vivem sobre ou no interior dos mesmos. Wilknison e Harvey (1990) relatam que por se tratar de feridas, a colonização por microorganismos se torna ainda mais propícia, pois a lesão na pele facilita a passagem de bactérias transitórias e enterobactérias ao foco da ferida.

De acordo com Pope (1990), o uso de curativos com bandagens compressivas sobre os locais enxertados reduz a mobilidade e o uso de antibiótico tópico reduz a contaminação bacteriana no local. Neste experimento, o local em que foi realizada a enxertia dificultou a colocação de bandagens sobre as áreas dos enxertos, porém eram realizados dois curativos diários para a assepsia do local com o uso de pomada de Bacitracina e Neomicina. Amaral *et al.* (2004) e Hermeto (2010), efetuaram curativos com trocas de bandagens a cada 48 horas com uso de pomada de Neomicina e Bacitracina para reduzir a contaminação pós-operatória de enxertos cutâneos em malha em cães, nos primeiros 15 dias.

Observou-se a contaminação de alguns enxertos, porém nem sempre relacionado à perda dos mesmos. No lado controle ocorreram três contaminações de enxertos, com duas perdas. Já no lado tratamento com PRP ocorreram cinco casos de contaminação de enxertos, com apenas uma perda. Segundo Livingston *et al*. (1990) a utilização da associação de Neomicina com Bacitracina reduziu significativamente o número de infecções levando a uma menor perda de enxertos de pele em casos de queimaduras em humanos, pois a associação de Bacitracina com Neomicina atinge os critérios de uma antibioticoterapia tópica ideal, uma vez que apresenta atividade bactericida com amplo espectro de ação e essas substâncias são raramente utilizadas por outras vias de administração, reduzindo a probabilidade de resistência bacteriana.

As biópsias para análise histológica foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias, observando-se posterior necrose ao redor dos locais da biópsia, o que

pode ter interferido nos índices de falhas na enxertia. Outros estudos devem ser realizados, com número reduzido de biópsias, para avaliar o grau de interferência que esse procedimento pode provocar nos índices de sucesso no processo de enxertia, como nos estudos realizados em coelhos por Chandra *et al*. (2007) em feridas cirúrgicas, em que as biópsias foram realizadas apenas nos momentos 7, 14 e 21, ou ainda como no experimento realizado em enxertos cutâneos em cães por Hermeto (2010), em que foram realizadas biópsias aos 3 dias em metade dos animais e aos 7 e 14 dias nos animais restantes. Nos estudos realizados em cicatrização de feridas em eqüinos por DeRossi (2009) as biópsias também foram realizadas em menos momentos, sendo realizadas em três eqüinos nos dias 5 e 30 e nos outros três animais nos dias 15 e 45, reduzindo assim o número de biópsias em cada animal do experimento, diminuindo a injúria ao local que está sendo avaliado.

A inflamação aguda do lado tratamento com PRP apresentou-se superior na avaliação histológica do sétimo dia, quando comparada ao grupo controle, fato que pode ser explicado pela intensa liberação de fatores de crescimento no local devido à degranulação das plaquetas presentes no gel. Os mesmos resultados foram observados por Henderson *et al.* (2003) e Chandra *et al*. (2007) que concluíram que o PRP induziu uma resposta inflamatória intensa e mais recente. Segundo Marx (2001), a liberação dos fatores de crescimento pode chegar até dez dias após a degranulação das plaquetas. O que explicaria porque não ocorreu diferença significativa de índices de inflamação aguda entre lado controle e tratamento nos demais momentos do experimento.

O parâmetro colágeno do lado PRP também se apresentou superior ao controle apenas no momento 14, de acordo com DeRossi (2009), os fatores de crescimento do PRP ativam os fibroblastos para a formação de pré-colágeno, induzindo e aumentando a deposição de colágeno na ferida. O mesmo resultado não pode ser observado por Hermeto (2010), pois não houve diferença significativa de presença de colágeno entre os grupos PRP e controle

Assim como Scartezini (2008) observou-se que os benefícios dos fatores de crescimento presentes no PRP relatados em literatura pareciam trazer uma grande evolução na melhora da cicatrização de tecidos moles, o que não foi observado em estudos *in vivo* pelo autor. Hermeto (2010) relata que os

resultados encontrados em enxertos de espessura completa em cães com uso de PRP não foram os esperados, resultando em uma cicatrização mais lenta quando comparado ao grupo controle. DeRossi (2009) relata resultados semelhantes aos desse experimento onde a cicatrização de feridas cutâneas em equinos não demonstrou diferença quando comparado ao grupo controle.

6 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas neste estudo, pode-se concluir que não houve diferenças significativas entre o lado tratado com gel de plasma rico em plaquetas e o lado controle, sob o ponto de vista clínico e histológico, nos enxertos cutâneos livres localizados na região lateral do pescoço de eqüinos.

REFERÊNCIAS

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

AMARAL, M. S. P; RAHAL, S.C; DAL-PAI, V; BARRAVIERA, S. R. C. S; LIMA, A. F.M; CROCCI, A. J. Fixação de enxerto cutâneo em malha de espessura total com sutura ou cola de fibrina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 56, n.3, p.312-319, 2004.

ARGÜELES, D; CARMONA, J. U; PASTOR, J; IBORRA, A; VIÑALS, L; MARTÍNEZ, P; BACH,E; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. **Research in Veterinary Science,** v.81, p. 237-245, 2006.

BLANES, L. Tratamento de feridas. In: Baptista-Silva, J. C., C, (Ed.). **Cirurgia vascular:** guia ilustrado. São Paulo: 2004. Disponível em: <http://www.bapbaptista.com>. Acesso em: 25 mar. 2009.

BOOTH, L. Equine wound reconstruction using free skin grafting. **California Veterinary,** v.45, n.13, 1991.

BOYD, C. L; HANSELKA D. V. A Skin punch technique for equine skin grafting. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.158, n.82, 1971.

BRAUER, R.O; CONVERSE, J.M. Transplantation of skin. In: CONVERSE, J.M. (Editor). **Reconstructive plastic surgery.** Philadelphia : Saunders. v.1, Cap.2, p. 21-80, 1964.

BRISTOL, D. V. Skin grafts and skin flaps in the horse. **Veterinary Clinic Equine**. North Carolina: Elsevier Saunders, v.21, p. 125-144, 2005.

BRYANT, R. A. **Acute and chronic wounds:** nursing management. 2 ed. St Louis: Mosby; p.105-163, 1992.

CESARETTI, I.U.R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Pelle Sana**, v.2, p.10- 12, 1998.

CHANDRA, R. K; HANDORF, C; WEST, M; KRUGER E. A; JACKSON S. Histologic effects of autologous platelet gel in skin flap healing. **Archives of Facial Plastic Surgery,** v. 9, n. 4, p. 260-263, 2007.

DEROSSI, R; COELHO, A. C. A. O; MELLO, G. S; FRAZÍLIO, F. O; LEAL, C. R. B; FACO, G. G; BRUM, K. B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.4, p. 276-281, 2009.

FRENCH, D. A; FRETZ, P. B. Treatment of equine leg wounds using skin grafts: Thirty-five cases, 1975-1988. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 761-765, 1990.

HENDERSON, J. L; CUPP, C. L; ROSS, E. V; SHICK, P. C; KEEFE, M. A; WESTER, D. C; HANNON, T; McCONNELL, D. The effects of the autologous platelet gel on wound healing. **Ear, Nouse e Throat Journal,** v.82, n.8, p.598-602, 2003.

HERMETO, L. C. **Estudo comparativo entre a cola de fibrina e o plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em cães.** Dissertação (Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 111f, 2010.

HOM, D. B; LINZIE, B. M; HUANG, T. C. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v. 9, p. 174 - 183, 2007.

KRIZEK, T. J., ROBESON M. C., KHO E**.** Bacterial growth and skin graft survival. **Surgery Forum**, v.18, p.518, 1967.

LIVINGSTON, D. H; CRIER, H.G; MILLER, F. B; MALANGONI, M. A; POLK. H. C. Jr; WEINER, L.J. A Randomized Prospective Study of Topical Antimicrobial Agents on Skin Grafts After Thermal Injury. **Plastic Reconstructive Surgery,** v. 86, n.6, p. 1059-1064, 1990.

MARX, R. E. Platelet rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Journal of Oral Implantology**, v.10, n. 4, p. 225 – 228, 2001.

MAY, S. The effects of biological wound dressings on the healing process. **Clinical Materials**, v.8, n. 3-4, p. 243-249, 1991.

McGLENNON, N., WHITE, R. Free skin grafting in small animals. **Practice, London**, v.11, n.2, p.43-49, 1989.

MONTEIRO, S. O; LEPAGE, O. M; THEORET, C. L. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 2, p. 277 – 282, 2009.

PAIM, C. B. V., RAISER, A. G., CARDOSO, E., BECK, C. Enxerto autólogo de pele, em malha, com espessura completa, na reparação de feridas carpometacarpianas de cães. Resposta à irradiação laser AsGa. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 451-457, 2002.

PAVLETIC, M. M. Técnicas de enxertadura cutânea. **In: BOJRAB. Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais.** Ed. Roca, São Paulo, p. 443 – 445, 1996.

POPE, E.R. Mesh skin grafting. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice,** v.20, p. 177-187,1990.

ROBSON M., KRIZEK T. J. Predicting skin graft survival. **Journal of Trauma**, v. 13, n. 3, 213-217, 1973.

ROSS, G. E. Clinical canine skin grafting. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p. 153-175, 1968.

ROTHSTEIN, A. S. Skin grafting techniques, **Journal of the American Podiatry Association,** v. 73, p. 79, 1983.

SANTOS, V.L.C.G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: DUARTE, Y .A. O; DIOGO M. J. D. **Atendimento domiciliar:** um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu; p.265-306, 2000.
SCHUMACHER, J. Skin grafting**.** In: AUER, J. A; STICK, J. A. **Equine Surgery,** 3. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 269-287, 2006.

SCARTEZINI, G. R. **Reparo em osso irradiado utilizando enxerto ósseo autógeno associado ao plasma rico em plaquetas. Análise**

histomorfométrica em coelhos. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 76f., 2008.

SCHUMACHER, J., CHAMBERS, M., HANSELKA, D., MORTON, L. D. Preservation of skin by refrigeration for autogenous grafting in the horse. **Veterinary Surgery,** v. 16, p. 358, 1987.

SOUZA, A. E. **O efeito de diferentes agentes sobre a cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção no cavalo: estudo Bacteriológico, histológico, histoquímico e morfométrico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 63f ,1989.

SOUZA, C.A.I., SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.67, n.2, p.275-281, 2000.

STASHAK, T. S. Skin grafting in horses. **Veterinary Clinics of North America**, v. 6, p.215, 1984.

SWAIN, S. F. **Surgery of traumatized skin:** Management and reconstruction in the dog and cat. London : Saunders, p. 585, 1980.

TEH, B. Why do skin grafts fail? **Plastic and Reconstructive Surgery**, n. 63, p. 323, 1979.

VILLELA, D. L. **Terapia tópica de úlceras crônicas de pernas com plasma rico em plaquetas – PRP:** revisão sistemática da Literatura. 2007, 154 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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, p. 24-28, 2006.

WILKNISON, T.G., HARVEY, R.G. **Atlas de dermatologia dos pequenos animais - guia para diagnóstico***.* 2. ed. São Paulo: Manole, p. 304, 1990.

WILSON, D. G. Applications of skin grafting in large animals. **Problems in Veterinary Medicine,** v. 2, p. 442, 1990.

WILSON, E. M. K; BARBIERI, C. H; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasilera**, v.14, n.4, p. 208-212, 2006.