

GRAZIELLE ANAHY DE SOUSA ALEIXO CAVALCANTI

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS: OBTENÇÃO, MOMENTO DE
PRODUÇÃO E USO NA INTEGRAÇÃO DE FLAPES CUTÂNEOS DE
AVANÇO EM CÃES**

RECIFE

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

GRAZIELLE ANAHY DE SOUSA ALEIXO CAVALCANTI

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS: OBTENÇÃO, MOMENTO DE
PRODUÇÃO E USO NA INTEGRAÇÃO DE FLAPES CUTÂNEOS DE
AVANÇO EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Veterinária.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Cristina de O. Cardoso Coelho

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Miriam Nogueira Teixeira

Co-Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Aleixo da Silva

RECIFE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS: OBTENÇÃO, MOMENTO DE
PRODUÇÃO E USO NA INTEGRAÇÃO DE FLAPES CUTÂNEOS DE
AVANÇO EM CÃES**

Tese de Doutorado elaborada por
GRAZIELLE ANAHY DE SOUSA ALEIXO CAVALCANTI

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. MARIA CRISTINA DE OLIVEIRA CARDOSO COELHO
Orientadora/Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. MIRIAM NOGUEIRA TEIXEIRA
Co-Orientadora/Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. EDUARDO ALBERTO TUDURY
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. MARCELO CAMPOS RODRIGUES
Departamento de Biofísica e Fisiologia do CCS/UFPI

Profa. Dra. FLÁVIA FERREIRA DE MENEZES
Departamento de Medicina Veterinária da UAG/UFRPE

Dedico
A Humberto e Luana,
meus alicerces.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

À minha orientadora Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho;

Aos meus co-orientadores Miriam Nogueira Teixeira e José Antônio Aleixo da Silva;

Ao meu esposo Humberto Barros Cavalcanti e minha filha Luana Aleixo Cavalcanti;

Aos meus pais José Antônio Aleixo da Silva e Maria Lucia de Sousa Aleixo e irmãos Giuseppe Sahib de Sousa Aleixo e Yuri Baidhy de Sousa Aleixo;

Aos professores Ana Paula Monteiro Tenório, Andréa Paiva Botelho de Moura, Eduardo Alberto Tudury, Edvaldo Lopes de Almeida, Jean Carlos Ramos da Silva, Joaquim Evêncio Neto, Lilian Sabrina de Andrade Silvestre, Márcia de Figueiredo e Roseana Diniz de Moura;

Aos funcionários Acácio Teófilo, Cleide de Lima, Cleodécio Ribeiro, Edna Cherias, Guiomar Batista, Ilma Braga, Joana D'arc, José Benedito de Lima, Josiete Joaquina, Maria Joaquina, Sérgio Alves e Vera Cavalcanti;

Aos médicos veterinários Amaro Fábio de Albuquerque, Ana Karina Rodrigues, Ana Luiza Guimarães, Angélica Neves dos Santos, Bruno Alencar Esmeraldo, Bruno Martins Araújo, Cícero Petrônio Lima, Érica Paes Barreto, Ernani Mero Campos, Flávia Correa Maia, Lígia Estevão, Maria Albeline Lacerda, Marília Bonelli, Nair de Lira, Sabrina Maria Gurjão, Sildivane Valcácia Silva, Telga Lucena de Almeida, Thiago Zacarias e Vandilson Rodrigues;

Aos estudantes de graduação Emanuela Polimeni de Mesquita, Filipe Feitosa de Oliveira, Giselle Martinho Moraes, Lorena Mariane Zubieta, Maria Edna de Barros, Simone Gutzman Vaz e Yslane Carla de França;

Às empresas Centagro (Ismael de Barros Marinho), Impulso distribuidora (Vital Tavares), Ourofino (Ketteny de Souza), Total Alimentos (Ortiz Caires) e Vetbrands (Thaisa Brito);

Aos pacientes e seus tutores;

A Bibliotecária Ana Katarina;

Ao CNPq.

Agradeço a todos pela compreensão, apoio incondicional e colaboração durante a execução do experimento.

A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante.

Paulo Freire

RESUMO

Atualmente tem se dado muita ênfase ao uso do plasma rico em plaquetas (PRP) em diversas áreas da Medicina, inclusive em cirurgia reconstrutiva, pois ao ser aplicado sobre um tecido em reparação ele é capaz de estimular muitos processos celulares importantes, como a proliferação, diferenciação, quimiotaxia e angiogênese. Com este trabalho, objetivou-se avaliar a ação do PRP na integração de flapes cutâneos de avanço em animais da espécie canina. Na primeira etapa do experimento foram coletados amostras de sangue de 20 cães para comparar dois protocolos de obtenção do PRP. No primeiro (A), a amostra de sangue foi submetida a uma única centrifugação a 1200 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos enquanto que no segundo (B), a amostra foi processada através de duas centrifugações, sendo a primeira a 1200 rpm durante 10 minutos e a segunda em 1600 rpm durante 10 minutos. Os resultados demonstraram que o protocolo B foi capaz de incrementar a concentração plaquetária em 449,02% com relação ao sangue total, sendo este superior ao protocolo A (190,22%). Posteriormente se testou o protocolo B em outros 20 animais e foi constatado que o método em questão era reprodutível e eficiente. Na etapa seguinte, amostras de sangue de mais 20 cães foram utilizadas para produção do PRP em dois momentos distintos, sendo o primeiro (M_0) correspondente ao período pré-operatório antes da anestesia e fluidoterapia, e o segundo (M_1) durante o trans-operatório após a obtenção do plano anestésico. A coleta em M_0 resultou em uma plaquetometria 28,58% mais alta do que em M_1 , culminando conseqüentemente, com a produção de um PRP mais concentrado. Definido o protocolo (B) e o momento ideal para a coleta da amostra de sangue (M_0), seguiu-se para a etapa final do experimento, no qual foram criados dois flapes de avanço na região ventral do abdomen de oito cadelas. Entre um flape e o leito receptor, aplicou-se o gel de PRP ativado com tromboplastina, enquanto que no outro flap não foi aplicado nenhum produto (controle). Estes foram clinicamente avaliados 24 horas após a cirurgia (D_1) e a cada dois dias (D_3 , D_5 e D_7) até o sétimo dia de pós-operatório. Além disso, com dez dias ambos os flapes foram removidos para realização do exame histopatológico e morfometria dos vasos sanguíneos. Os achados demonstraram não haver diferença significativa entre o flape tratado e controle, concluindo-se que o gel de plaquetas ativado com tromboplastina não favoreceu a integração de flapes cutâneos de avanço em animais da espécie canina.

Palavras-chaves: Cão, trauma cutâneo, flape, concentrado de plaquetas, fatores de crescimento.

ABSTRACT

A lot of emphasis has been given to the use of platelet rich plasma (PRP) in various areas of medicine, including reconstructive surgery, because when it is applied on a tissue in repair its capable of stimulating many important cellular processes, such as proliferation, differentiation, chemotaxis and angiogenesis. The aim of this paper was to evaluate the PRP effects over integration of advance skin flaps in dogs. In the first stage of the research, blood samples were collected from 20 dogs to compare two protocols used to obtain PRP. In the first protocol (A), blood sample was submitted to a single spin at 1200 revolutions per minute (rpm) for 10 minutes while in the second protocol (B), the sample was processed through two centrifugations, the first at 1200 rpm for 10 minutes and the second at 1600 rpm for 10 minutes. The results showed that protocol B was able to increase platelet count in 449,02% compared to whole blood, being higher than protocol A (190,22%). In the sequence, protocol B was applied in other 20 animals to evaluate its efficiency and it was found that the method was reproducible. After that, blood samples from 20 dogs were collected for production of PRP at two different moments: M_0 , corresponding to preoperative time, before anesthesia and fluid therapy, and M_1 , during trans-surgical period, after anesthesia. Platelets counts of blood collected in M_0 were 28,58% higher than in M_1 , leading consequently, to the production of a more concentrated PRP. After defining the best protocol (B) and the ideal moment to collect the blood sample (M_0) began the final stage of the experiment, in which two advance flaps were created in the ventral abdomen of eight dogs. Between one flap and recipient bed, PRP gel activated with thromboplastin was applied, whereas under the other flap was not applied any product (control). The flaps were clinically evaluated 24 hours after surgery (D_1) and at every two days (D_3 , D_5 and D_7) until the seventh day after surgery. With ten days, both flaps were removed for histopathological examination and morphometry of blood vessels where it was demonstrated no significant difference between treated and control flap. Based on the results, it is concluded that platelet gel activated with thromboplastin did not enhance integration of advance skin flaps in dogs.

Keywords: Dog, cutaneous trauma, flap, platelet concentrate, growth factors.

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
Figura 01: Estrutura do tegumento: 1. Epiderme; 2. Derme; 3. Hipoderme; 4. Glândula sebácea; 5. Músculo eretor do pêlo; 6. Glândula sudorípara; 7. Folículo piloso; 8. Redes arteriais.....	20
Figura 02: Plexos vasculares do tegumento do cão e gato.....	22
Figura 03: A: Ferida na face medial da coxa de uma cadela. B: Deslocamento de uma porção da pele da região abdominal ventral para cobrir o defeito.....	23
Figura 04: A: Flape randomizado. B: Flape de padrão axial.....	24
Figura 05: Flape de avanço na região frontal de um cão.....	25
Figura 06: Fotomicrografia eletrônica de plaquetas de um cão apresentando pseudópodos (setas).....	28
Figura 07: Estrutura da plaqueta na sua forma inativada.....	28
Figura 08: Separação das hemácias, zona de névoa (buffy coat) e plasma após a centrifugação do sangue total.....	33
Figura 09: Gel de PRP formado após a adição de um fator ativador.....	34
3 ARTIGOS.....	45
ARTIGO I-PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE CÃES: AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS PROTOCOLOS PARA A SUA OBTENÇÃO.....	46
Figura 01: Plasma, zona de névoa e hemácias separadas após a primeira centrifugação.....	53
Figura 02: Fluxograma demonstrando as etapas para obtenção do PRP através dos protocolos A e B.....	57
Figura 03: Aumento em porcentagem da plaquetometria no protocolo A (1200 rpm/10 min.) e B (1200 rpm/10 min. e 1600 rpm/10 min.) com relação ao sangue total.....	62
Figura 04: Contagem de plaquetas em cada paciente no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP) obtido através do protocolo A (1200 rpm/10 min.) e B (1200 rpm/10 min. e 1600 rpm/10 min.).....	63
Figura 05: Gel de plaquetas (seta vermelha) formado após a adição do agonista tromboplastina.....	65
ARTIGO II-PRODUÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO PERÍODO PRÉ OU TRANS-OPERATÓRIO: MOMENTO IDEAL PARA SUA OBTENÇÃO.....	72
Figura 01: Coleta de sangue na veia jugular com a paciente anestesiada.....	79
Figura 02: Plaquetometria alcançada no sangue total nos momentos M_0 e M_1	82
Figura 03: Contagem plaquetária do PRP em M_0 e M_1	83
Figura 04: Média da concentração plaquetária alcançada após a produção do PRP com relação ao sangue total em M_0 e M_1 e a redução observada na plaquetometria entre os referidos momentos.....	83

ARTIGO III- AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ATIVADO COM TROMBOPLASTINA NA INTEGRAÇÃO DE FLAPES CUTÂNEOS EM CÃES.....	94
Figura 01: Tubos colhidos para realização do hemograma e plaquetometria no sangue total (primeiro frasco à esquerda) e produção e contagem plaquetária no PRP (demais frascos).....	102
Figura 02: Incisões de pele (setas brancas) delimitando a área do flape cranial.....	104
Figura 03: Remoção de 1 cm da extremidade distal do retalho (seta branca).....	104
Figura 04: Momento da colocação do PRP sob o flape tratado.....	105
Figura 05: Uso do “swab” para a coleta de uma amostra do PRP para realização de cultura bacteriana.	112
Figura 06: Área de necrose (setas) na extremidade distal de um flape cutâneo identificada no exame histopatológico (Coloração HE e aumento de 160X).....	115
Figura 07: Área da derme profunda com células gigantes multinucleadas (setas amarelas) em um flape tratado com PRP, visualizada no aumento de 250X (Coloração HE).....	118

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	<i>Página</i>
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
Quadro 01: Fator de crescimento (FC), isoforma, locais onde são produzidos e principais funções.....	30
Tabela 01: Alguns protocolos citados na literatura para produção do PRP em centrífuga laboratorial.....	32
3 ARTIGOS.....	45
ARTIGO I-PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE CÃES: AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS PROTOCOLOS PARA A SUA OBTENÇÃO.....	46
Tabela 01: Comparação entre o emprego de centrífuga comum e aparelho automático com relação a quantidade de sangue necessário e contagem de plaquetas após a produção do PRP..	51
Tabela 02: Alguns protocolos descritos na literatura para a obtenção do PRP.....	52
Tabela 03: Resultados do teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades.....	64
Tabela 04: Estatísticas para as relações entre a contagem de plaquetas pelo protocolo B nos 20 animais da primeira etapa do experimento (EI) e nos 20 animais da segunda etapa (EII) visando avaliar a reprodutibilidade do método.....	64
ARTIGO II-PRODUÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO PERÍODO PRÉ OU TRANS-OPERATÓRIO: MOMENTO IDEAL PARA SUA OBTENÇÃO.....	72
Quadro 01: Fármacos que podem resultar em trombocitopenia e/ou trombocitopatia.....	77
Tabela 01: Contagem plaquetária de cada animal no sangue total e PRP em M ₀ e M ₁	81
Tabela 02: Resultados para os tratamentos analisados no teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades.....	82
ARTIGO III-AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ATIVADO COM TROMBOPLASTINA NA INTEGRAÇÃO DE FLAPES CUTÂNEOS EM CÃES.....	94
Tabela 01: Classificação do flape de acordo com o IET%.....	108
Quadro 01: Momento da contaminação do PRP e bactéria isolada.....	112
Tabela 02: Cálculo do IET para cada dia de avaliação no grupo controle.....	116
Tabela 03: Cálculo do IET para cada dia de avaliação no grupo tratado.....	116
Tabela 04: Áreas de necrose dos flapes controle e tratado calculadas pelo programa Imagelab 2000®.....	117
Tabela 05: Média de vasos identificados por mm ² no flape tratado e controle.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

1^a - Primeira

2^a - Segunda

% - Porcentagem

2/3 - Dois terços

1/4 - Um quarto

°C - Graus Celsius

> - Maior que

< - Menor que

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μm - Micrometro

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

cm - Centímetro

D₁ - Dia um

D₃ - Dia três

D₅ - Dia cinco

D₇ - Dia sete

D₁₀ - Dia dez

DMV- Departamento de Medicina Veterinária

EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético

EGF - Fator de crescimento epidermal ou epitelial

EI - Primeira etapa do experimento

EII - Segunda etapa do experimento

ex. - Exemplo

FCs - Fatores de crescimento

FGF - Fator de crescimento fibroblástico

FC - Flape controle

FT - Flape tratado

g - Gravidade

HE - Hematoxilina-eosina

IET - Índice de Eficiência do Tratamento
IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina
IM - Intramuscular
IV - Intravenosa
kg - Kilograma
 M_0 - Momento pré-cirúrgico
 M_1 - Momento trans-cirúrgico
min - Minuto
mg - Miligrama
mL - Mililitro
mm - Milímetro
 mm^2 - Milímetro quadrado
MPA - Medicação pré-anestésica
n - Número
OSH - Ovariosalpingohisterectomia
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
PPP - Plasma pobre em plaquetas
PRP - Plasma rico em plaquetas
rpm - Rotações por minuto
SC - Subcutânea
 $\text{TGF}\beta$ - Fator de crescimento de transformação β
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial
VO - Via oral
X - Vezes

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 PELE.....	20
2.2 CIRURGIA RECONSTRUTIVA.....	22
2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).....	26
3 ARTIGOS.....	45
ARTIGO I-PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE CÃES: AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS PROTOCOLOS PARA A SUA OBTENÇÃO.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	47
INTRODUÇÃO.....	48
REVISÃO DE LITERATURA.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	66
ARTIGO II-PRODUÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO PERÍODO PRÉ OU TRANS-OPERATÓRIO: MOMENTO IDEAL PARA SUA OBTENÇÃO.....	72
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	73
INTRODUÇÃO.....	74
REVISÃO DE LITERATURA.....	75
MATERIAL E MÉTODOS.....	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	87
ARTIGO III-AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ATIVADO COM TROMBOPLASTINA NA INTEGRAÇÃO DE FLAPES CUTÂNEOS EM CÃES.....	94
RESUMO.....	95
ABSTRACT.....	96
INTRODUÇÃO.....	96
REVISÃO DE LITERATURA.....	97
MATERIAL E MÉTODOS.....	101
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
CONCLUSÃO.....	120

REFERÊNCIAS.....	120
4 APÊNDICE.....	128
APÊNDICE A: Ficha de avaliação clínica dos flapes.....	129
5 ANEXO.....	130
ANEXO A: Licença concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para o uso de animais no experimento.....	131

1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão extremamente importante para os animais, pois exerce as funções de termorregulação, reservatório de água, sensorial, secreção glandular e, principalmente, barreira protetora contra o meio ambiente. Seu grave traumatismo e os possíveis tratamentos são assuntos de interesse para a Medicina, pois a perda de integridade de grandes porções da pele poderá resultar em incapacidade ou até mesmo em morte.

Na clínica de pequenos animais é observado um elevado número de pacientes que são encaminhados para atendimento por apresentarem lesões de pele, principalmente, em decorrência de atropelamentos, quedas, mordeduras e queimaduras. A necessidade de reconstruir determinadas regiões do corpo visando à cura do paciente tem se tornado um grande estímulo para a pesquisa de novos métodos que possam de alguma forma contribuir e tornar mais adequado o processo de recuperação, minimizar o sofrimento do animal, reduzir o custo do tratamento e conseqüentemente, permitir que o paciente retorne a sua rotina com maior rapidez, proporcionando bem-estar e resultados estéticos satisfatórios.

Diante da necessidade de promover o fechamento das feridas dermatológicas, torna-se importante conhecer as técnicas reconstrutivas disponíveis, para que seja feita a escolha daquela que apresente melhor aplicabilidade para cada situação. Podem ser citados como opção ao cirurgião veterinário o uso de suturas, incisões de relaxamento, expansores de pele, flapes ou enxertos. Dentre elas, destaca-se o flape cutâneo, pelo fato do paciente ser o seu próprio doador e a vascularização da pele transferida para o leito receptor ser mantida através da sua base, o que facilita a integração desse ao local.

Apesar de apresentar grande utilidade, tem se observado que quanto maior for o comprimento do flap, mas difícil será a possibilidade dos vasos provenientes da sua base irrigarem a sua porção distal e em algumas situações, essa região desenvolve um processo de isquemia e posterior, necrose. Em conseqüência disso, muitos pesquisadores tem estudado maneiras de potencializar a sua vascularização, especialmente na porção distal, através da administração ou aplicação tópica de produtos.

Atualmente, tem-se dado muita ênfase ao uso de plasma rico em plaquetas (PRP) em diversas áreas médicas, principalmente, em odontologia e ortopedia.

O produto é resultado do processamento do sangue do paciente em centrífugas para promover a separação dos seus constituintes e permitir a extração de um plasma com uma concentração aumentada de plaquetas.

Estudos desenvolvidos nas mais diversas áreas e, em todo o mundo, tem sugerido que o produto potencializa o processo de cicatrização tecidual, por meio da liberação de mediadores biológicos denominados fatores de crescimento no local da sua aplicação. Acredita-se que

eles sejam capazes de estimular vários processos envolvidos na recuperação tecidual entre eles a mitose e diferenciação celular, quimiotaxia, além da angiogênese.

Baseado nas informações descritas, este experimento teve com objetivo principal avaliar o emprego do gel produzido a partir do PRP em flapes randomizados de avanço em animais da espécie canina, com relação a possibilidade do mesmo favorecer a integração do retalho ao leito receptor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PELE

A pele, o maior órgão do corpo (KIERSZENBAUM, 2004; PAVLETIC, 2007a), é composta por duas camadas histologicamente distintas, uma porção epitelial, conhecida como epiderme, que fica localizada mais superficialmente, e a derme, uma porção conjuntiva, localizada abaixo dela (RAMALHO et al., 1997; AMÂNCIO, 2003; PAVLETIC, 2007a) (Figura 01).

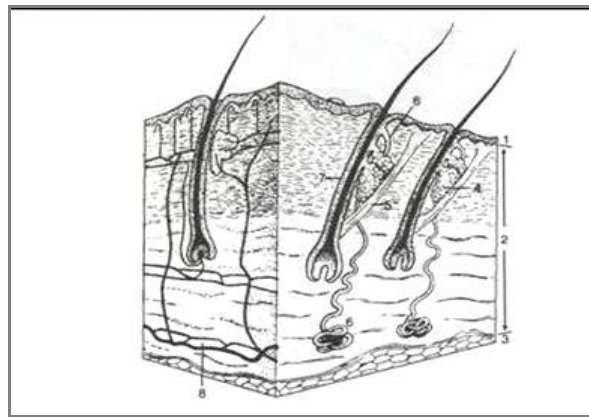


Figura 01: Estrutura do tegumento: 1. Epiderme; 2. Derme; 3. Hipoderme; 4. Glândula sebácea; 5. Músculo eretor do pêlo; 6. Glândula sudorípara; 7. Folículo piloso; 8. Redes arteriais.
Fonte: Dyce et al., 1997.

A epiderme é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado (BANKS, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004a; KIERSZENBAUM, 2004), formada pelas camadas (da superfície para o interior) córnea, lúcida, granulosa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999), espinhosa (ou parabasal) e basal (ou germinativa) (BANKS, 1991). O número total de camadas e espessura relativa das mesmas varia de acordo com a região do corpo (BANKS, 1991). Não existem vasos sanguíneos ou linfáticos na camada epidérmica, sendo sua nutrição realizada por difusão a partir da derme subjacente (DYCE et al., 1997).

A derme (ou cório) é o tecido sobre o qual se apóia a epiderme, sendo considerada a camada mais grossa da pele, pois representa mais de 90% da sua espessura total (DOCKHORN et al., 1992). Apresenta uma camada superficial conhecida como papilar, e outra profunda, chamada reticular (BANKS, 1991; DOCKHORN et al., 1992; RAMALHO et al., 1997).

A região dérmica apresenta numerosos vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (BANKS, 1991; HEDLUND, 2002; PAVLETIC, 2007a) e nela também são encontradas outras estruturas derivadas da epiderme, como os folículos pilosos, glândulas e unhas (DYCE et al., 1997).

O limite entre a epiderme e a derme não é regular, apresentando saliências e reentrâncias, que imbricam e se ajustam entre si, aumentando a coesão entre elas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). As projeções da derme que se estendem para o interior da epiderme, aumentando a superfície de contato entre as camadas recebem o nome de papilas dérmicas (BANKS, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004a).

Anteriormente, acreditava-se que a vascularização cutânea era um emaranhado de anastomoses vasculares, sem nenhuma organização ou estratificação. Posteriormente, chegou-se a conclusão de que a mesma apresenta uma estrutura organizada, e que seus vasos não estão dispostos aleatoriamente (BRAVERMAN, 2000).

As estruturas que compõem a microcirculação cutânea são as pequenas artérias terminais (originárias da artéria aorta) que vão se ramificando, progressivamente, até dar origem as arteríolas e metarteríolas, que por sua vez, originam os capilares. Os capilares arteriais desembocam no sistema vascular venoso, formado pelas pré-vênulas, vênulas e pequenas veias (HALFOUN et al., 2003).

As artérias que irrigam a pele do cão são classificadas em duas categorias: artérias cutâneas mistas e artérias cutâneas simples. As mistas se estendem através da massa muscular e fornecem um número significativo de ramos no músculo, antes de penetrar e irrigar a pele, enquanto que as simples emitem poucos ramos para os músculos os quais atravessam, para irrigar a pele (BANKS, 1991; PAVLETIC, 1998).

A vascularização da pele está disposta em três plexos venosos, que se localizam em diferentes planos, mas estão conectados entre si (PAVLETIC, 1998). Eles são conhecidos como plexo superficial (ou subpapilar), plexo intermediário (ou cutâneo) e plexo profundo (subdérmico ou subcutâneo) (BANKS, 1991; PAVLETIC, 2007a) (Figura 02).

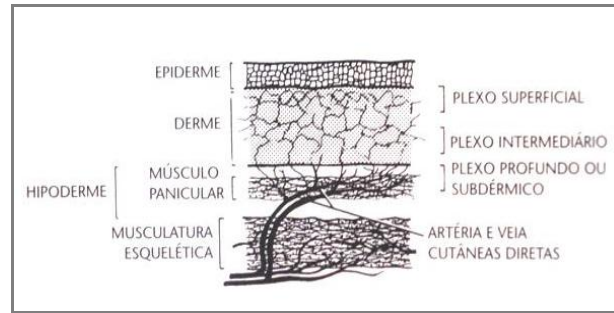


Figura 02: Plexos vasculares do tegumento do cão e gato.
Fonte: Pavletic, 2007a.

Na tela subcutânea está localizado o plexo subdérmico, sendo ele a principal rede vascular para a pele sobrejacente e responsável pela irrigação do bulbo, folículo piloso, glândulas tubulares, parte mais profunda dos ductos e o músculo eretor dos pêlos (PAVLETIC, 1998; HEDLUND, 2002).

Do plexo profundo partem ramificações que ascendem e penetram na derme para dar origem ao plexo cutâneo (BANKS, 1991). O mesmo é responsável pela vascularização das glândulas sebáceas e pelo fortalecimento da rede capilar que circunda os folículos pilosos, os ductos glandulares tubulares e o músculo eretor dos pêlos (HEDLUND, 2002).

Algumas ramificações do plexo intermediário ascendem e se dirigem às papilas dérmicas, onde dão origem ao plexo subpapilar, que fica localizado entre as camadas papilar e reticular da derme (DYCE et al., 1997; PAVLETIC, 1998). As alças capilares desse plexo se projetam através das papilas dérmicas para dentro da epiderme, onde irão irrigar o tecido, já que esse é avascular (PAVLETIC, 1998; HEDLUND, 2002). A maior parte da vascularização da pele se encontra localizada na camada papilar, entre 1 a 2 mm abaixo da superfície da epiderme (BRAVERMAN, 2000).

2. 2 CIRURGIA RECONSTRUTIVA

A pele apresenta diversas funções, entre as quais estão proteger contra traumatismos, agentes químicos, radiação e invasão de microrganismos; colaborar com a termorregulação; impedir a perda de água por evaporação; servir de reservatório para eletrólitos, água, lipídios, carboidratos e proteínas, além de atuar na excreção de várias substâncias (HEDLUND, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004a; KIERSZENBAUM, 2004; PAVLETIC, 2007a). Devido as suas muitas terminações

nervosas, permite que o animal responda a vários estímulos externos, tais como tato, pressão, vibração, calor, frio e dor (DYCE et al., 1997; PAVLETIC, 1998).

A sua principal função é servir como barreira protetora contra o meio ambiente e por esse motivo, a perda da integridade de grandes porções da mesma poderá resultar em incapacidade ou até mesmo em óbito (PAIVA, 2003).

Dentro do arsenal terapêutico utilizado por cirurgiões visando restaurar os tecidos danificados estão disponíveis diversas técnicas, como a utilização de incisões de relaxamento, suturas de tensão, expansores de pele (TROUT, 2007), flapes e enxertos (HEDLUND, 2005).

O flape cutâneo é uma técnica bastante empregada (ACEVEDO-BOGADO et al., 2002; PAVLETIC, 2007b) para promover o fechamento de feridas que não podem ser restauradas pelo uso de sutura primária (MATERA et al., 1998), sendo uma alternativa terapêutica útil para reconstruir lesões resultantes de traumatismos, remoção de tumores, infecções ou isquemias (ALMEIDA et al., 2004).

Quando a perda de pele é substancial ao ponto de dificultar a aproximação direta das bordas, a cicatrização se torna mais lenta e as cicatrizes mais extensas (COELHO et al., 1999) e muitas vezes o flape cutâneo é a única opção para restaurar a área cirurgicamente (BIONDO-SIMÕES et al., 2000).

O flape (ou retalho) corresponde a uma porção de tecido que é removido parcialmente do seu local de origem e transferido para outro (leito receptor) onde irá cobrir um defeito (HEDLUND, 2005) (Figura 03).

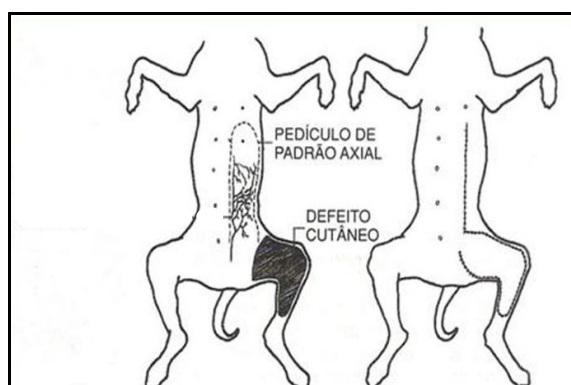


Figura 03: A: Ferida na face medial da coxa de uma cadela. B: Deslocamento de uma porção da pele da região abdominal ventral para cobrir o defeito.
Fonte: Hedlund, 2005.

Apresenta a vantagem de permitir a cobertura imediata da região o que diminui o tempo de cicatrização do tecido (SAKUMA et al., 2003; HEDLUND, 2005), proporcionando ao paciente resultados estéticos e funcionais (BIONDO-SIMÕES et al., 2000).

A sua irrigação é mantida pelo vaso proveniente da sua base (ou pedículo), (OLOUMI, 2004). Por apresentarem vascularização própria, diferentemente dos enxertos, os flapes sobrevivem melhor e são capazes inclusive de melhorar a circulação em regiões isquêmicas (PAVLETIC, 2007b).

São classificados de diversas maneiras, podendo um único retalho se enquadrar em diferentes categorias. De modo geral, sua classificação é baseada na sua localização, vascularização e de acordo com os tecidos que o constituem (SAKUMA et al., 2003; HEDLUND, 2005).

O retalho que incorpora uma artéria e veia cutânea direta é considerado de padrão axial (enxerto pediculado arterial). Quando o flape é irrigado por ramos terminais da artéria cutânea direta através do plexo subdérmico ele é denominado de flape de plexo subdérmico (ou randozimado) (Figura 04), sendo esse o tipo mais frequentemente utilizado em cães e gatos (CAMPOS et al., 2001; PAVLETIC, 2007b).

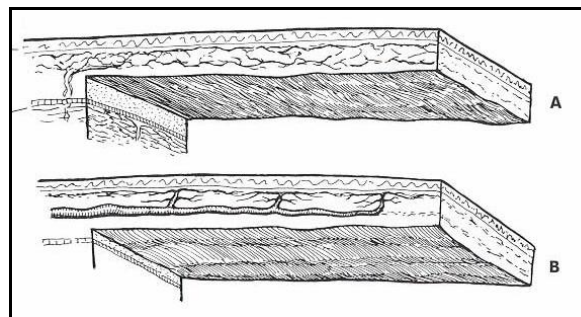


Figura 04: A: Flape randomizado. B: Flape de padrão axial.

Fonte: Katzenmeyer e Calhoun, 2000.

Com relação aos tecidos que são incorporados a ele, o flape simples é aquele formado apenas pela pele e tela subcutânea (KAMAKURA et al., 1986), enquanto que o composto é aqueles em que outro tecido além da pele está envolvido (HEDLUND, 2005), tais como músculo, gordura, osso ou cartilagem (PAVLETIC, 2007b).

Flapes usados para cobrir defeitos próximos a área doadora são denominados de retalhos locais, enquanto que aqueles usados em regiões afastadas recebem o nome de retalhos distantes (HEDLUND, 2005; PAVLETIC, 2007b).

Outra categorização se refere a sua forma ou característica (PAVLETIC, 2007b), podendo o mesmo ser de avanço (de pedículo único, bipediculado, H plastia e V-Y), transposição, interpolação, bolsa, dobradiça ou rotacional (HEDLUND, 2005). Entre esses, o de avanço (Figura 05) é um dos mais utilizados na Medicina Veterinária (SAKUMA et al., 2003; PAVLETIC, 2007b).



Figura 05: Flape de avanço na região frontal de um cão.
Fonte: Aleixo, 2008.

Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento de necrose em um flape, como a infecção, compressão, tensão e técnica inadequada durante a sua execução sendo, entretanto, a irrigação do tecido o mais importante, uma vez que os vasos são responsáveis pela nutrição local (CAMPOS et al., 2001). Outras complicações que podem comprometer a viabilidade do tecido são a deiscência, seroma (HEDLUND, 2005), edema (ACEVEDO-BOGADO et al., 2002) e hematoma (PAVLETIC, 2007b).

Com relação a vascularização do flape, a proporção entre o seu comprimento e largura é um fator que tem papel fundamental na determinação da sua viabilidade (ALMEIDA et al., 2004), pois quando o flape é muito longo, ocorre um prejuízo no alcance do sangue até o seu terço distal (ACEVEDO-BOGADO et al., 2002). Em pesquisa executada por Sakuma et al. (2003) as áreas de necrose desenvolvidas em 24% dos animais se localizavam sempre na margem distal do flape.

Vários artigos, citando como exemplos os trabalhos executados por Biondo-Simões et al., 2000, Acevedo-Bogado et al., 2002, Almeida et al., 2004, Esteves Junior et al., 2005 e Estevão et al., 2009, tem relatado o uso de substâncias visando aumentar a viabilidade de retalhos cutâneos.

2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O sangue é um fluido tissular que circula através dos vasos sanguíneos carregando elementos essenciais para as células e recebendo os produtos do metabolismo para transportá-los até os órgãos de excreção (JAIN, 1993a). É composto por três classes de células sanguíneas, as hemácias, leucócitos e plaquetas, que se encontram dissolvidas em um meio líquido conhecido por plasma (REECE e SWENSON, 2006).

Na realidade, as plaquetas são consideradas células incompletas, pois são produzidas na medula óssea a partir da fragmentação do citoplasma de células denominadas megacariócito (GENTRY, 2006; SANTOS, 2007), podendo cada uma dar origem a até 4.000 plaquetas (HOFFBRAND et al., 2004).

As plaquetas apresentam formato discóide (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002; REBAR et al., 2003; SANTOS, 2005), são anucleadas (BOLTA, 2007) e em cães saudáveis tem entre 2 a 4 μm de diâmetro, o que corresponde a aproximadamente $\frac{1}{4}$ do tamanho de uma hemácia (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004b ; WALKER, 2009).

O valor de referência para as plaquetas no sangue total de animais da espécie canina varia entre 200.000/ μL e 500.000/ μL (JAIN, 1993b; SANTOS, 2005; WALKER, 2009). Alguns autores sugerem que o valor máximo para a plaquetometria é de 400.000/ μL (KERR, 2003; GENTRY, 2006) enquanto outros indicam até 600.000/ μL (REBAR et al., 2003).

Após serem sintetizadas, as plaquetas chegam a circulação sanguínea em três a cinco dias (SANTOS, 2005), possuindo meia-vida de, aproximadamente, sete a dez dias (HOFFBRAND et al., 2004). Durante esse tempo as plaquetas ficam circulando na corrente sanguínea na sua forma inativada (BOLTA, 2007).

Em torno de um terço das plaquetas produzidas na medula óssea, são armazenadas no baço (KERR, 2003; HOFFBRAND et al., 2004; SANTOS, 2005), entretanto, ocorrem trocas constantes e dinâmicas entre as que circulam no sangue com aquelas que se encontram nesse órgão (KERR, 2003).

Entende-se por Plasma Rico em Plaquetas (PRP), um produto obtido através da centrifugação de sangue autógeno, que resulta em uma maior concentração de plaquetas em um menor volume de plasma (VENDRAMIN et al., 2006; PAGLIOSA e ALVES, 2007). Segundo Whitlow et al. (2008), é possível concentrar em três a cinco vezes a quantidade de plaquetas em comparação com a sua quantidade no sangue basal.

O PRP também recebe outras denominações tais como plasma enriquecido com plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, concentrado de plaquetas ou plasma autógeno de plaquetas (WHITMAN et al., 1997; ANITUA, 1999; FERES JUNIOR et al., 2004).

O uso desse produto para auxiliar na cicatrização de tecidos tem sido objeto de estudo e de grande interesse nas duas últimas décadas (ROUKIS et al., 2006), tendo sido bastante reportado na literatura médica (FLORYAN e BERGHOFF, 2004). Pelo fato de ser produzido com o sangue do próprio paciente, são eliminadas as chances de transmissão de doenças ou mesmo do desenvolvimento de reações imunogênicas ao material, que podem acontecer quando são utilizados produtos alogênicos ou xenogênicos (LEMOES et al., 2002; ROSSI JUNIOR e SOUZA FILHO, 2004).

Inicialmente, foi desenvolvido com o objetivo de reduzir as hemorragias durante procedimentos cirúrgicos (NUNES FILHO et al., 2007), entretanto, seu uso começou a se tornar popular na odontologia humana, mais especificamente em cirurgias orais e maxilo-faciais, a partir de 1998 com a publicação de artigos relatando que a associação do PRP a enxertos de osso autógeno potencializava o processo de reparação óssea (ALBUQUERQUE et al., 2008). A partir de então, o produto passou a ser usado com sucesso em cirurgia ortopédica, cardíaca, plástica (WHITLOW et al., 2008), geral, vascular, neurológica, obstétrica, ginecológica e oftálmica (FLORYAN e BERGHOFF, 2004).

O principal intuito de obter uma maior quantidade de plaquetas é devido a existência de pelo menos 60 substâncias biologicamente ativas em seu interior, que participam dos mecanismos de reparação tecidual por promoverem a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, modulação imunológica, remodelação e apresentarem atividade antimicrobiana (BOLTA, 2007). Entretanto, para que isso aconteça, as plaquetas precisam ser ativadas por um agonista (JAIN, 1993c).

Após a ativação das plaquetas, elas mudam de formato e passam a apresentar projeções (REECE e SWENSON, 2006) membranosas longas partindo da sua superfície conhecidas como pseudópodos (JAIN, 1993b; HOFFBRAND et al., 2004) (Figura 06) e

os grânulos localizados no seu interior são rompidos levando a liberação do seu conteúdo (REECE e SWENSON, 2006).

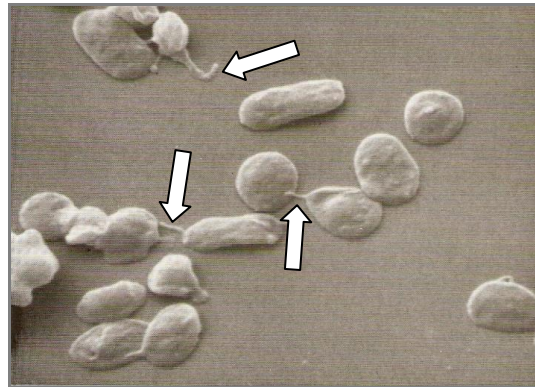


Figura 06: Fotomicrografia eletrônica de plaquetas de um cão apresentando pseudópodos (setas).

Fonte: Jain, 1993b.

As plaquetas apresentam três tipos de compartimento de armazenamento no seu interior (Figura 07), os grânulos α , densos e lisossomais, entretanto a maioria das substâncias se encontram armazenadas nos grânulos α (BOLTA, 2007).

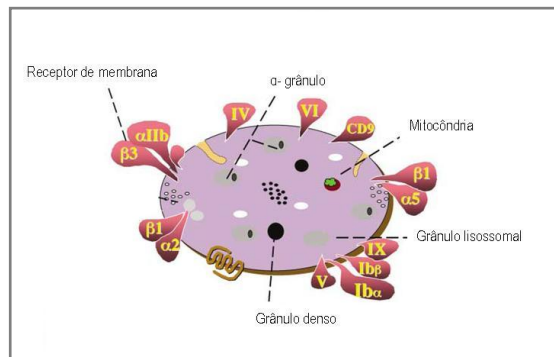


Figura 07: Estrutura da plaqueta na sua forma inativada.

Fonte: Anitua et al., 2004.

Os mediadores biológicos secretados pelos grânulos plaquetários após a ativação das plaquetas são a trombina, tromboxano A_2 , adenosina difosfato (GREEN e KLINK, 1998), tromboplastina, fatores de coagulação, cálcio, serotonina, histamina (DARK et al., 2005), fator de Von Willebrand, fibrinogênio (WHITLOW et al., 2008) e catecolaminas (LOPEZ et al., 2007), sendo entre eles, os fatores de crescimento (FCs) os mais importantes (BOLTA, 2007).

Os FCs são estruturas polipeptídicas (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002; PAGLIOSA e ALVES, 2007) armazenadas nos α -grânulos (ADLER e KENT, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004b; ROUKIS et al., 2006; JAMESON, 2007) capazes de estimular diferentes processos celulares, tais como mitogênese, síntese de matriz (BARBOSA et al., 2008) quimiotaxia, diferenciação, metabolismo (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002) e angiogênese (GREEN e KLINK, 1998; FLORYAN e BERGHOFF, 2004; BARROSO et al., 2007; MAIA e SOUZA, 2009) e por isso são considerados mediadores biológicos naturais (FERES JUNIOR et al., 2004).

Apesar de serem produzidos por diversas células e tecidos tais como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais (SANTOS, 2007) osteoblastos, leucócitos (MOREIRA et al., 2008), glândulas salivares, glândulas lacrimais entre outros, as pesquisas tem se concentrado nas plaquetas porque elas são relativamente fáceis de obter, além de transportarem outras substâncias que são úteis para o processo de regeneração e reparação tecidual (QUINTANA, 2008).

Os FCs tem ação parácrina, porque quando são liberados atuam sobre outras células próximas a elas (MARX et al., 1998). Eles se ligam a superfície externa das células sobre as quais irão atuar (ex. mesenquimais, endoteliais, epidermais, osteoblastos, fibroblastos) pela interação com receptores específicos induzindo a ativação de substâncias localizadas no citoplasma dessas células, que atingem o núcleo para induzir a expressão de genes específicos, que vão desencadear a ação final (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002; MARX, 2004).

Os envolvidos na recuperação tecidual e que comprovadamente são produzidos por plaquetas são o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF β), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento epitelial (EGF) (FÜRST et al., 2003; MARX, 2004; ROUKIS et al., 2006), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) (BOLTA, 2007; MOREIRA et al., 2008).

A ação dos diferentes FCs são bem similares (Quadro 01), mas o conhecimento sobre as moléculas e mecanismos específicos sobre os quais cada um atua ainda são bem limitados (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002), entretanto, sabe-se que nenhum deles por si só é capaz de restaurar uma lesão isoladamente (DARK et al., 2005). Na realidade eles atuam em sinergismo no local da lesão (BOLTA, 2007).

Quadro 01: Fator de crescimento (FC), isoforma, locais onde são produzidos e principais funções.

FC	Isoforma	Células produtoras	Principais funções
Transformador beta (TGFβ)	β1 e β2	Plaquetas, macrófagos, linfócitos, neutrófilos, osteoblastos, matriz óssea	Quimiotaxia, diferenciação celular, angiogênese
Derivado da plaqueta (PDGF)	αα, αβ e ββ	Plaquetas (maior parte), macrófagos, osteoblastos, condrócitos, fibroblastos e células endoteliais	Angiogênese, quimiotaxia, mitogênese, formação de colágeno
Fibroblástico (FGF)	Tipo I e II	Plaquetas, fibroblastos (maior parte), macrófagos, osteoblastos e células endoteliais	Diferenciação de osteoblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese, mitogênese e quimiotaxia
Similar a insulina (IGF)	Tipo I e II	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos, células mesenquimais e matriz óssea	Mitogênese e diferenciação de células mesenquimais
Vascular endotelial (VEGF)	4 isoformas	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos e células musculares lisas	Quimiotaxia e proliferação de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular
Epitelial ou epidermal (EGF)	1 isoforma	Plaquetas, fibroblastos, células endoteliais	Mitogênese, atividade migratória e diferenciação de células epiteliais, fibroblastos, células renais e da glia

Fonte: Martínez-González et al., 2002.

Entre todos, os PDGF e TGFβ são os mais abundantemente encontrados nos grânulos α-plaquetários (CAMARGO et al., 2002). O PDGF foi um dos primeiros a ser descrito na literatura (SANTOS, 2007) e as atividades específicas mais importantes do mesmo são a mitogênese, angiogênese e ativação dos macrófagos (MARX et al., 1998). O TGFβ exerce efeito mitogênico sobre os fibroblastos (levando a deposição de colágeno), células do tecido muscular liso e osteoblastos, além de estimular a angiogênese e produção de matriz extra-celular (EPPLEY et al., 2004).

Atualmente, o PRP é considerado um produto de fácil obtenção e baixo custo (MAIA e SOUZA, 2009), entretanto no início sua produção era mais complexa e tinha custo bastante elevado.

Nas primeiras tentativas, eram utilizados grandes equipamentos de autotransfusão que separavam o plasma das hemácias, porém era preciso colher amostras de sangue volumosas (aproximadamente 450 mL) (GREEN e KLINK, 1998; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002; KEVY e JACOBSON, 2004; JAMESON,

2007) além de um profissional experiente para realizar tal procedimento e manusear a máquina (VENDRAMIN et al., 2006). Como o sangue era coletado de um cateter venoso profundo posicionado no paciente durante a cirurgia, o procedimento só podia ser realizado dentro de ambiente cirúrgico e com o paciente anestesiado, o que resultava em maior risco de morbidade (KEVY e JACOBSON, 2004; DE ROSSI et al., 2009).

Com o passar dos anos foram sendo criados equipamentos automáticos mais compactos e simples (JAMESON, 2007), como o AG Curasan[®], 3i PCCS[®], Sequire[®], SmartPreP[®] (KEVY e JACOBSON, 2004) Magellan[®], AutoloGel System[®], Autologous Growth Factor[®], Gravitational Platelet Separation II System[®], Symphony II Platelet Concentrate System[®], Accelerate Platelet-Rich Plasma Gel[®] (ROUKIS et al., 2006). Apesar de exigirem menores amostras de sangue (KEVY e JACOBSON, 2004), apresentam custo bastante elevado, tornando o seu emprego inviável do ponto de vista financeiro (LEMOS et al., 2002).

Visando facilitar e reduzir ainda mais as despesas na produção do PRP, outros protocolos usando centrífugas laboratoriais foram criados e testados por diversos pesquisadores como Lemos et al. (2002), Macedo (2004), Rossi Junior e Souza Filho (2004), Ferraz et al. (2007) e Barbosa et al. (2008).

Com relação ao processo de centrifugação, etapa essencial para a fabricação do PRP (PAGLIOSA e ALVES, 2007), a mesma pode ser realizada em um único momento ou em duas etapas, dependendo do protocolo empregado (CAMARGO et al., 2002; PAGLIOSA e ALVES, 2007).

Alguns autores sugerem o protocolo de centrifugação única, enquanto outros indicam o de dupla centrifugação (MACEDO, 2004). (Tabela 01).

Tabela 01: Alguns protocolos citados na literatura para produção do PRP em centrífuga laboratorial.

<i>Referência</i>	<i>Protocolo</i>	<i>Material utilizado</i>	<i>Volume de sangue</i>
Feres Junior et al., 2004	Centrifugação única: 1400 rpm/10 minutos	4 frascos de 5 mL Centrífuga Fanem	20 mL
Macedo, 2004	Centrifugação única: 1200 rpm/10 minutos	3 tubos de 5 mL Centrífuga Fanem baby	15 mL
Ossa e Orrego, 2004	1ª centrifugação: 1200 rpm/20 minutos 2ª centrifugação: 2000 rpm/15 minutos	Tubos de 5 mL Centrífuga	20 a 50 mL
Vendramin et al., 2006	1ª centrifugação: 300 g/10 minutos 2ª centrifugação: 640 g/10 minutos	2 tubos de 10 mL Centrífuga Jouan	20 mL
Barroso et al., 2007	1ª centrifugação: 200 g/10 minutos 2ª centrifugação: 700g/15 minutos	10 frascos de 5 mL Centrífuga	50 mL
Ferraz et al., 2007	1ª centrifugação: 800 rpm/10 minutos 2ª centrifugação: 1600 rpm/10 minutos	4 frascos de 10 mL Centrífuga	40 mL
Gurgel et al., 2007	1ª centrifugação: 1200 rpm/10 minutos 2ª centrifugação: 1200 rpm/15 minutos	3 tubos de 5 mL Centrífuga	15 mL
Suaid et al., 2007	1ª centrifugação: 200 g/10 minutos 2ª centrifugação: 200 g/15 minutos	Tubos de 4,5 mL Centrífuga	40 mL
Barbosa et al., 2008	1ª centrifugação: 1300 rpm/8 minutos 2ª centrifugação: 1300 rpm/8 minutos	4 tubos de 4,5 mL Centrífuga	18 mL
Quintana, 2008	Centrifugação única: 450g/8 minutos	Tubos Centrífuga	20 mL
Messori et al., 2009	Centrifugação única: 160 g/6 minutos	Tubos Centrífuga Beckman	10 mL
Silva et al., 2009	1ª centrifugação: 1300 rpm/12 minutos 2ª centrifugação: 1300 rpm/8 minutos	2 tubos de 4,5 mL Centrífuga	9 mL

Levando em consideração a variação das densidades, após a centrifugação de uma amostra de sangue, as hemácias, que tem maior peso, tendem a se depositar no fundo do tubo, enquanto que os leucócitos se localizam em uma zona intermediária e o plasma fica no alto (REECE e SWENSON, 2006; ROUKIS et al., 2006). Acima dos leucócitos estão as plaquetas, formando uma delgada camada que é invisível a olho nu

(JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004b). A junção das plaquetas e leucócitos correspondem a uma camada esbranquiçada chamada de zona de névoa (JAIN, 1993a) (Figura 08).

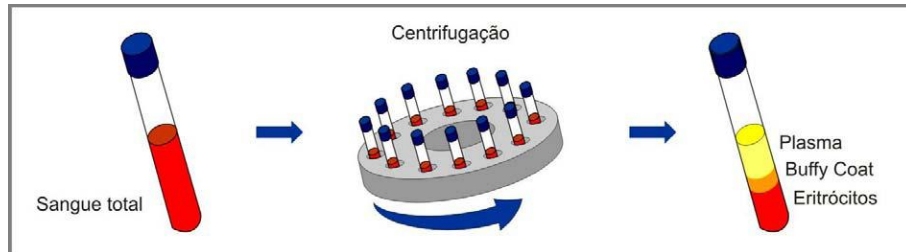


Figura 08: Separação das hemácias, zona de névoa (buffy coat) e plasma após a centrifugação do sangue total.
Fonte: Macedo, 2004.

Em protocolos de centrifugação dupla, após o descarte das hemácias o plasma retorna para a centrífuga (JAMESON, 2007) levando a precipitação das plaquetas e das poucas hemácias (que por ventura possam estar presentes) no fundo do tubo (VENDRAMIN et al., 2006). Posteriormente, 80% da parte superior do plasma, correspondente ao plasma pobre em plaquetas (PPP) é eliminado (MACEDO, 2004) e o botão plaquetário localizado no fundo do frasco é resuspendido no restante do plasma (BARROSO et al., 2007), dando origem ao PRP.

O processo de centrifugação deve ser executado com muita precisão para separar as plaquetas das células vermelhas e obter um plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras (MARX, 2004), pois a sua fragmentação e liberação precoce dos FCs na solução reduz a função e eficácia do PRP (ADLER e KENT, 2002).

Quando a coleta de sangue transcorre sem problemas e a metodologia empregada é adequada, as plaquetas intactas e viáveis ficam prontas para liberar os FCs após sua ativação (JAMESON, 2007), que deve ser realizada antes de aplicar o PRP ao local desejado (CAMARGO et al., 2002; PAGLIOSA e ALVES, 2007).

São indicados para ativar o PRP a trombina bovina (CAMARGO et al., 2002; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002; ROUKIS et al., 2006; PAGLIOSA e ALVES, 2007), tromboplastina ou a trombina autógena (FERREIRA, 2004; ROSSI JUNIOR e SOUZA FILHO, 2004; BARBOSA et al., 2008). Já foi citado também o uso de outras substâncias, tais como o batroxobin (produto isolado do veneno de cobras) (BOLTA, 2007).

A ativação deve ser realizada apenas na hora da aplicação do produto, pois após esse processo a liberação dos FCs ocorre imediatamente. Em 10 minutos e na primeira hora, 70% e 100% deles já foram liberados, respectivamente (MARX, 2001).

A partir desse momento, o produto adquire uma consistência gelatinosa (ALBUQUERQUE et al., 2008), que facilita a sua aplicação no local desejado (EFEOGLU et al., 2004; VENDRAMIN et al., 2006) (Figura 09). A mistura pode ser aplicada diretamente sobre a lesão ou incisão cirúrgica ou previamente misturado com enxertos ósseos e só então aplicado ao leito receptor (JAMESON, 2007).



Figura 09: Gel de PRP formado após a adição de um fator ativador.
Fonte: Aleixo, 2009.

Após sua produção, o PRP deve apresentar uma concentração em torno de 1.000.000 de plaquetas/ μ L (LEMOS et al., 2002; MARX, 2004; SUAID et al., 2007; BARBOSA et al., 2008). A contagem plaquetária pode ser determinada pelo método direto ou indireto (COLES, 1984; SANTOS, 2005). Na contagem indireta é feita uma estimativa da quantidade de plaquetas baseada na quantificação de outras células (ex. hemácias) contadas no esfregaço sanguíneo (WALKER, 2009). O método de contagem direta pode ser efetuado no hemocítmetro (câmara de Neubauer) usando diluentes específicos (ex. Rees-Ecker, Oxalato de amônia) ou em aparelho contador de células eletrônico (COLES, 1984).

As aplicações clínicas do PRP são diversas e muitos dos benefícios citados com relação ao seu uso são aplicáveis para as cirurgias de pele (ADLER e KENT, 2002), tendo sido relatado o seu emprego em operações plásticas e procedimentos reconstrutivos em seres humanos (JAMESON, 2007).

Usando o PRP em flapes cutâneos, Man et al. (2001), citaram que o mesmo foi capaz de auxiliar no processo de hemostasia e estimular a formação de novos vasos sanguíneos, o que por sua vez, reduziu as complicações pós-operatórios (ex. hematoma, seroma e isquemia), potencializou a cicatrização e diminuiu o tempo de recuperação cirúrgica. Sánchez et al. (2003), também atribuiu ao produto o poder de acelerar a cicatrização de flapes através da mais rápida revascularização e reepitelização.

Em trabalho realizado por Clevens (2002), no qual o gel de plaquetas foi aplicado em pacientes humanos submetidos a cirurgias plásticas e reconstrutivas, o autor citou que o tempo de recuperação pós-operatório foi reduzido em 25 a 40%.

Entretanto, enquanto alguns autores como Adler e Kent (2002) citam que no futuro o uso do PRP irá revolucionar a cirurgia pela capacidade de potencializar a cicatrização dos tecidos, outros como Roukis et al. (2006), tem relatado que os resultados em pesquisas realizadas não são totalmente conclusivos. A literatura por sua vez, também tem demonstrado resultados controversos que põem em dúvida os benefícios do seu uso (FRÉCHETTE et al., 2005; QUINTANA, 2008).

Garcia (2005) cita que após a euforia inicial da utilização do PRP, a posterior obtenção de resultados contraditórios com o uso do produto indica que mais pesquisas experimentais precisam ser efetuadas. Mais especificamente com relação a Medicina Veterinária, Maia e Souza (2009), relatam que poucos são os experimentos relacionados ao emprego do PRP, o que justifica o desenvolvimento de mais experimentos com animais.

REFERÊNCIAS

1. ACEVEDO-BOGADO, C. E.; BINS-ELY, J.; D'ACAMPORA, A. J.; NEVES, R. E. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratas. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, supl. 1, p. 14-16, 2002.
2. ADLER, S. C.; KENT, K. J. Enhancing wound healing with growth factors. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 10, p. 129-146, 2002.
3. ALBUQUERQUE, D. P.; OLIVEIRA, T. M. F.; MARANHÃO FILHO, A. W. A.; MILHOMENS FILHO, J. A.; GUSMÃO, E. S. Aplicação clínico-cirúrgica do plasma rico em plaquetas – estudo revisional. **Odontologia Clín.-Científ.**, v. 7, n. 2, p. 119-122, 2008.

4. ALMEIDA, K. G.; FAGUNDES, D. J.; MANNA, M. C. B.; MONTERO, E. F. S. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 6, 2004.
5. AMÂNCIO, A. C. G. **Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de enxertos de pele total em coelhos**. 2003. 68 f. Tese (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
6. ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, p. 529–535, 1999.
7. ANITUA E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb. Haemost.**, v. 91, p. 4-15, 2004.
8. BANKS, W. J. Sistema tegumentar. In:_____. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1991. Cap. 20, p. 391–424.
9. BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335–1340, 2008.
10. BARROSO, C. S. T.; BENITO, J. C.; PUIG, A. G. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. **Ver. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.**, v. 29, n. 4, p. 240-248, 2007.
11. BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; GRECA, F. H.; PAULA, J. B.; CHIN, E. W. K.; SANTOS, E. A. A.; STALHSCHMIDT, F. L. Influência do buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos - estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, supl. 3, p. 34-40, 2000.
12. BRAVERMAN, I. M. The cutaneous microcirculation. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 3–9, 2000.
13. BOLTA, P. R. Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatoven APA**, v. 16, n. 4, p. 156-165, 2007.
14. 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. **J. Periodontol Res.**, v. 37, p. 300-306, 2002.

15. CAMPOS, H.; FERREIRA, L. M.; SANTOS, W. L. C.; ARAÚJO, M. C. M. Efeitos da nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n. 4, 2001.
16. CLEVENS, R. A. Autologous Platelet rich plasma in facial plastic surgery. In: 8th International Symposium of Facial Plastic Surgery, New York, 2002. **Proceedings from the 8th International Symposium of Facial Plastic Surgery**, New York, 2002.
17. COELHO, M. C. O. ; REZENDE, C. M. F. ; TENÓRIO, A. P. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.
18. COLES, E. H. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: _____. **Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. Cap. 5, p. 144-163.
19. DARK, A. J.; DOWLING, B. A.; SMITH, C. L. Topical treatments in equine wound management. **Vet. Clin. Equine**, v. 21, p. 77-89, 2005.
20. DE ROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S.; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, 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.
21. DOCKHORN, L. F; ZANINI, S. A.; MÉLEGA, J. M. Enxertos de pele. In: MÉLEGA, J. M.; ZANINI, S. A.; PSILLAKIS, J. M. **Cirurgia Plástica: Reparadora e Estética**. 2. ed. São Paulo: Medsi, 1992. Cap. 5, p. 35-42.
22. DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O tegumento comum. In: _____. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap. 10, p. 277-291.
23. EFEOGLU, C.; AKCAY Y, D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, 2004.
24. EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. B. S. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.114, n. 6, p. 1502-1508, 2004.
25. ESTEVÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; EVÊNCIO, L. B.; GUIMARÃES, E. C.; CÂMARA, C. A. G.; EVÊNCIO-NETO, J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 406-412, 2009.

26. ESTEVES JUNIOR, I.; MASSON, I. B.; FERREIRA, L. M.; LIEBANO, R. E.; BALDAN, C.; GOMES, A. C. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 164-166, 2005.
27. FERRAZ, V. C. M.; FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet-rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.
28. FERES JUNIOR, F.; PASSANEZI, E.; GREGHI, S. L. A.; PASSANEZI, A. Análise comparativa do índice de sucesso dos implantes osteointegrados com e sem a utilização de prp, no protocolo de fixação. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, p. 9-21, 2004.
29. FERREIRA, C. F. **Avaliação incipiente da influência do plasma rico em plaquetas na proliferação de osteoblastos humanos: estudo “in vitro”**. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
30. FLORYAN, K. M.; BERGHOFF, W. J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. **AORN Journal**, v. 80, n. 4, p. 668-674, 2004.
31. FRÉCHETTE, J. P.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet-rich plasma: growth factor content and roles in wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 84, p. 434-439, 2005.
32. FÜRST, G.; GRUBER, R.; TANGL, S.; ZECHNER, W.; HAAS, R.; MAILATH, G.; SANROMAN, F.; WATZEK, G. Sinus grafting with autogenous platelet-rich-plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, p. 500–508, 2003.
33. GARCIA, R. V. **Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica**. 2005. 93f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2005.
34. GENTRY, P. A. Coagulação sanguínea e hemostasia. In: REECE, W. O. **Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 4, p. 49-64.

35. GREEN, D.; KLINK, B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 101, n. 4, p. 1161-1162, 1998.
36. GURGEL, B. C. V.; GONÇALVES, P. F.; PIMENTEL, S. P.; AMBROSANO, G. M. B.; NOCITI JR., F. H.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z. Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 649, n. 654, p. 649-654, 2007.
37. HALFOUN, V. L. R. C.; FERNANDES, T. J.; PIRES, M. L. E.; BRAUN, E.; CARDOZO, M. G. T.; BAHBOUT, G. C. Estudos morfológicos e funcionais da microcirculação da pele no Diabetes Mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 3, p. 271-279, 2003.
38. HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 13, p. 101-162.
39. HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. Cap.18, p. 135-230.
40. HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: _____. **Fundamentos em Hematologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 18, p. 244-257.
41. JAIN, N. C. Examination of the blood and bone marrow. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 1, p. 1- 18 (a).
42. JAIN, N. C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 2, p. 19-53 (b).
43. JAIN, N. C. The platelets. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 6, p. 105-132 (c).
44. JAMESON, C. A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. **Labmedicine**, v. 38, n. 1, p. 39- 42, 2007.
45. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: _____. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 18, p. 303-314.
46. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: _____. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 18, p. 359-370 (a).
47. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Células do sangue. In: _____. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 12, p. 223-237 (b).

48. KAMAKURA, L.; SPINA, V.; MODOLIN, M. Retalhos de pele. In: GOFFI, F. S. **Técnica Cirúrgica: Bases Anatômicas, Fisiopatológicas e Técnica da Cirurgia**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1986. Cap. 35, p. 383-392.
49. KATZENMEYER, K.; CALHOUN K. (2000). **Local Skin Flaps**. Disponível em: <http://www2.utmb.edu/otoref/Grnds/Flaps-local-0006/Flaps-local-0006.pdf>. Acesso em: 15.10.09.
50. KERR, M. G. Plaquetas (trombócitos) e fatores de coagulação. In: _____. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 2, p. 45-59.
51. KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **The Journal of the American Society of Extra-Corporeal Technology**, v. 36, p. 28-35, 2004.
52. KIERSZENBAUM, A. L. Sistema tegumentar. In: _____. **Histologia e Biologia Celular. Uma Introdução à Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 6, p. 157-188.
53. LEMOS, J. J.; JUNIOR ROSSI, R.; PÍSPICO, R. (2002). **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos - Proposta de um protocolo de obtenção simplificado**. Disponível em: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225>. Acesso em: 30.11.08.
54. LÓPEZ, J. L.; CHIMENOS, E.; SANCHEZ, J. M.; CASTAÑEDA, P. Plasma rico en factores de crecimiento y regeneración ósea. **Dentum**, v. 7, n. 3, p. 108-112, 2007.
55. MACEDO, A. P. **Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção**. 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.
56. MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, v. 39, n.4, p. 1267-1274, 2009.
57. MAN D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107, p. 229-237, 2001.
58. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. M.; SÁNCHEZ, J. C.; LAFUENTE, J. C. G.; TRAPERO, J. C.; GÓMEZ, G. C. E.; LESTÓN, J. M. S. Do ambulatory-use

- Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks? **Medicina Oral**, v. 7, n. 5, p. 383-390, 2002.
59. MATERA, J. M.; SAKUMA, C. H.; TATARUNAS, A. C.; VALENTE, N. S.; MICHALANY, N. Aplicação de retalho cutâneo no tratamento cirúrgico do hemangiopericitoma canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 101-105, 1998.
60. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasm: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.
61. MARX, R. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.
62. MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, n. 62, p. 489-496, 2004.
63. MESSORA, M. E.; NAGATA, M. J. H.; MELO, L. G. N.; FURLANETO, F. A. C.; DELIBERADOR, T. M.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) - estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009.
64. MOREIRA, D. C.; SADIGURSKY, M.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, M. G. S. Fatores de crescimento plaquetários. Revisión de literatura. **Revista Venezolana de Investigación Odontológica**, v. 8, n. 1, p.14-25, 2008.
65. NUNES FILHO, D. P.; LUPPINO, F.; YAEDÚ, R. Y. F.; CARVALHO, P. S. P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 3, p. 263-269, 2007.
66. OLOUMI, M. M. Severe wound of stifle region, treated by a thoracic-based body flap in a dog: case report. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 5, n. 2, p. 114-116, 2004.
67. OSSA, S. G.; ORREGO, G. E. O. Plasma rico en plaquetas: una alternativa para acelerar el proceso de cicatrización ósea. **Revista CES Odontología**, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2004.
68. PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1202-1205, 2007.
69. PAIVA, M. G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (Anacardium occidentale L) em cicatrização experimental**. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado

- em Bioquímica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, 2003.
70. PAVLETIC, M. M. Pele e órgãos anexos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**: Vol. I. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 3, p. 323–333.
71. PAVLETIC, M. M. Tegumento. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Vol. I. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 20, p. 250-259 (a).
72. PAVLETIC, M. M. Enxertos pediculados. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Vol. I. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 23, p. 292-321 (b).
73. QUINTANA, V. M. M. **Análisis de la consolidación ósea en fracturas de ángulo mandibular tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento**. 2008. 48 f. Monografia (Residência em cirurgia plástica e reconstrutiva) – Instituto Mexicano del Seguro Social Unidad Médica de Alta Especialidad, Guadalajara, 2008.
74. RAMALHO, R.; MEDINAL, H.; BISCOTTO, R.; CHVEIDLL, M. Enxerto epidermogorduroso e suas aplicações. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 12, n. 2, 1997.
75. REBAR, A. H.; MACWILLIAMS, P. S.; FELDMAN, B. F.; JR METZGER, F. L.; POLLOCK, R. V. H.; ROCHE, J. Plaquetas. In: _____. **Guia de Hematologia para Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 10, p. 131-156.
76. REECE, W. O.; SWENSON, M. J. Composição e funções do sangue. In: REECE, W. O. **Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 3, p. 24-48.
77. ROSSI JUNIOR, R.; SOUZA FILHO, M. A. P. Obtenção de trombina autógena: proposta de um protocolo simplificado e de fácil reprodução clínica. **Revista Paulista de Odontologia**, v. 26, n. 5, p. 4-9, 2004.
78. ROUKIS, T. S.; ZGONIS, T.; TIERNAN, B. Autologous platelet-rich plasma for wound and osseous healing: A review of the literature and commercially available products. **Advances in Therapy**, v. 23, n. 2, p. 218–237, 2006.
79. SAKUMA, C. H.; MATERA, J. M.; VALENTE, N. S. Estudo clínico sobre aplicação do retalho cutâneo pediculado em cirurgia oncológica no cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**, v. 40, supl, 1, p. 32-37, 2003.

80. SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is Platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18, p. 93–103, 2003.
81. SANTOS, A. P. Avaliação da hemostasia e distúrbios da coagulação. In: 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, Porto Alegre, 2005. **Anais do 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, Porto Alegre, 2005**.
82. SANTOS, L. A. U. **Efeito da utilização do plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos**. 2007. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2007.
83. SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTERIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 129-134, 2009.
84. SUAID, F. F.; SANTAMARIA, M. P.; CARVALHO, M. D.; SOUZA, H. W.; SALLUM, E. A.; NOCITTI JUNIOR, F. H. Avaliação clínica da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em retrações gengivais criadas em cães. **Periodontia**, v. 17, n. 01, p. 68-75, 2007.
85. TROUT, N. J. Princípios da cirurgia plástica e reconstrutiva. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. Vol. I. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 22, p. 274-292.
86. 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 Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24–28, 2006.
87. WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3. ed. São Paulo: MedVet, 2009. Cap. 26, p. 390-422.
88. WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A. G.; SIEVERT, A. N.; SISTINO, J. J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v. 23, p. 283-289, 2008.

89. WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, p. 1294-1299, 1997.

3 ARTIGOS

ARTIGO I

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE CÃES:
AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS PROTOCOLOS PARA A SUA
OBTENÇÃO**

*PLATELET-RICH PLASMA IN DOGS:
COMPARATIVE EVALUATION BETWEEN TWO PROTOCOLS TO OBTAIN IT*

RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do sangue usado em procedimentos clínicos ou cirúrgicos com a finalidade de potencializar as diversas etapas do processo de cicatrização tecidual, pela estimulação da angiogênese, mitogênese e diferenciação celular. Muitos estudos tem sido realizados desde a década de 1990 com relação ao uso do PRP, entretanto até o momento ainda não existe um único protocolo estabelecido para a sua produção, ficando portanto, a escolha do mesmo baseada na experiência prática de cada profissional e equipamentos disponíveis. Objetivou-se com este trabalho testar dois protocolos (considerados A e B) para a produção de PRP com o sangue de animais da espécie canina. Foram coletados três frascos de sangue periférico de 20 cães adultos em que um dos frascos foi usado para produção do PRP através do protocolo A (centrifugação única a 1200 rpm/10 min.), outro para fabricação do PRP pelo protocolo B (1ª centrifugação a 1200 rpm/10 min. e a 2ª centrifugação a 1600 rpm/10 min.) e o terceiro para realização da contagem plaquetária no sangue total, que serviu de parâmetro para os valores alcançados no PRP. No protocolo que foi possível alcançar uma maior concentração plaquetária, a avaliação de sua reprodutibilidade foi testada em outros 20 cães. Com os resultados alcançados, constatou-se que o protocolo B obteve uma maior plaquetometria em 100% das amostras e, conclui-se que o mesmo é eficiente para a produção do PRP em animais da espécie canina.

Palavras-chaves: Cão, gel de plaquetas, fatores de crescimento.

ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP) is a blood product used in clinical or surgical procedures to enhance the different stages of tissue healing through stimulation of angiogenesis, mitogenesis and cellular differentiation. Many studies have been conducted since the 90's regarding the use of PRP, however there is still no single protocol established for its

production, therefore, the choice of which one to use is based on the practical experience of each physician and available equipments. The objective of this paper was to analyze two protocols (considered A and B) for production of PRP in dogs. Peripheral blood of 20 adult dogs were collected into three tubes, in which one was processed through protocol A (single centrifugation at 1200 rpm for 10 min.), while another was submitted to protocol B (1st centrifugation at 1200 rpm for 10 min. and 2nd centrifugation at 1600 rpm for 10 min.) and the third was used to perform platelet count in hole blood, which served as a parameter to values obtained in PRP. The protocol in which it was possible to achieve a higher platelet count, was tested in other 20 dogs to evaluate its reproducibility. The results determined that protocol B resulted in a superior platelet count in 100% of the samples, concluding that the referred protocol is effective for PRP production in dogs.

Key-words: Dog, platelet gel, growth factors.

INTRODUÇÃO

As lesões teciduais, são causa bastante frequente de atendimento médico-hospitalar, tanto na Medicina Humana quanto na Veterinária, e muitas são as opções de tratamento disponíveis para esse tipo de afecção.

As terapias incluem a aplicação de medicamentos tópicos, administração de fármacos sistêmicos, curativos sintéticos ou biológicos, fechamento cirúrgico primário, enxertos ou flapes, entre outros. Mesmo com tantas técnicas disponíveis, é uma busca constante dos profissionais da área de saúde o encontro de outros meios que potencializem esses procedimentos e/ou o processo de restauração natural dos tecidos.

Atualmente, tem sido muito reportado na literatura o emprego de um produto proveniente do sangue do próprio paciente, chamado de plasma rico em plaquetas (PRP). O produto de origem autógena é obtido por um processo que consiste na centrifugação do sangue total, objetivando concentrar uma maior quantidade de plaquetas em um menor volume de plasma.

A importância em aumentar a quantidade de plaquetas está no fato de que os α -grânulos localizados no seu interior sintetizam e liberam fatores de crescimento (FCs), quando estas são ativadas. Muitas pesquisas tem indicado que os FCs são moléculas bioativas fundamentais para o processo de reparação tecidual, pois são capazes de estimular a mitogênese, angiogênese, quimiotaxia e diferenciação celular e que quando o PRP é aplicado sobre um tecido em restauração, as etapas necessárias para que isso aconteça são antecipadas.

Existem relatos do uso do PRP em cirurgias odontológicas, ortopédicas, oftálmicas, neurológicas, laparoscópicas, reconstrutivas, entre outras. Apesar dos muitos experimentos realizados nessa área, a maior parte dos estudos estão relacionados ao uso do produto em seres humanos.

Embora muitos autores sugiram que haja grande evidência sobre os benefícios do uso do PRP como promotor da reparação tecidual, ainda existem alguns dados conflitantes na literatura e até o atual momento não existe um único protocolo estabelecido para a produção do mesmo, ficando em geral, a critério de cada pesquisador estabelecer um protocolo próprio que possa ser exequível diante das suas condições de trabalho.

Independente do método utilizado é recomendado que o mesmo seja capaz de aumentar a contagem plaquetária em uma concentração bem superior àquela encontrada no sangue total, desde que sejam preservadas a estrutura e função das plaquetas para que estas possam liberar os FCs quando estimuladas.

Objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo eficiente para a obtenção do PRP em animais da espécie canina por meio da análise comparativa entre dois métodos.

REVISÃO DE LITERATURA

De modo geral, denomina-se plasma rico em plaquetas (PRP) um produto derivado do sangue, que depois de processado (DA SILVA et al., 2007) resulta em um plasma contendo uma elevada concentração desse componente sanguíneo (MARX, 2001; FLORYAN e BERGHOFF, 2004; PAGLIOSA e ALVES, 2007; WHITLOW et al., 2008).

Na realidade o PRP é mais do que um concentrado de plaquetas, uma vez que também contém fatores de coagulação, serotonina (LOPEZ et al., 2007), leucócitos (BARBOSA et al., 2008) e outras substâncias, apesar da plaqueta ser considerada o elemento principal (MACEDO, 2004).

As plaquetas (ou trombócitos) são pequenos fragmentos citoplasmáticos de aproximadamente, 2 a 4 µm de diâmetro de formato discóide (WALKER, 2009), produzidas pela medula óssea a partir de uma célula pluripotencial chamada megacariócito (REBAR et al., 2003; GENTRY, 2006; REECE e SWENSON, 2006). Cada megacariócito pode dar origem a até 4.000 plaquetas. Das plaquetas produzidas, aproximadamente 2/3 ficam circulando na corrente sanguínea, enquanto o restante se encontra armazenado no baço (HOFFBRAND et al., 2004). Os valores de referência para as plaquetas no sangue total de

animais da espécie canina se encontram entre 200.000/ μ L a 500.000/ μ L (JAIN, 1993a; SANTOS, 2005).

São constituintes que atuam diretamente nos processos de hemostasia, cicatrização e reepitelização, pela liberação de diversos fatores de crescimento (FCs) (VENDRAMIN et al., 2006). Os FCs são proteínas sintetizadas e armazenadas nos α -grânulos plaquetários (ADLER e KENT, 2002) que são liberadas após a ativação das plaquetas (MARX, 2004; BOLTA, 2007).

Os principais FCs envolvidos na recuperação tecidual que comprovadamente estão presentes nas plaquetas são o fator de crescimento derivado das plaquetas (na suas três isoformas PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$, PDGF $\alpha\beta$), fator de crescimento transformador β (isoformas TGF β 1 e TGF β 2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) (FÜRST et al., 2003; MARX, 2004). Alguns autores também citam como sendo importante o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (ANITUA et al., 2004; MOREIRA et al., 2008).

A ação dos diferentes FCs são bem similares, mas o conhecimento sobre as moléculas e mecanismos específicos sobre os quais atuam ainda são bastante limitados. Pouco se sabe também a respeito da quantidade ideal de cada FC ou qual é a dose necessária para cada tipo de indicação terapêutica (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002), entretanto muitos estudos tem demonstrado que essas proteínas são capazes de estimular a angiogênese (GREEN e KLINK, 1998; MOREIRA et al., 2008), mitogênese, quimiotaxia (SÁNCHEZ et al., 2003) e incitar a proliferação e diferenciação de células progenitoras (LAGUNAS, 2006).

Em decorrência dessas potencialidades, o PRP se tornou uma opção para estimular o processo cicatricial (VENDRAMIN et al., 2006) e desde o momento em que foram evidenciadas indicações clínicas para o seu uso, vários protocolos de obtenção foram desenvolvidos (BARROSO et al., 2007).

Nas primeiras tentativas de produção eram utilizados grandes equipamentos de autotransusão que separavam o plasma das hemácias (JAMESON, 2007), entretanto era preciso colher grandes amostras de sangue (aproximadamente 450 mL) e um profissional experiente para realizar tal procedimento e manusear a máquina (VENDRAMIN et al., 2006).

Com o passar dos anos foram sendo desenvolvidos equipamentos automáticos menos sofisticados como o AutoloGel System[®], Megallan[®], Secquire Cell Separator[®], SmartPreP[®] e Platelet Concentrate System[®] (ROUKIS et al., 2006), entretanto esses ainda tem um custo bastante elevado, tornando o seu emprego restrito (LE MOS et al., 2002; ROSSI JUNIOR e SOUZA FILHO, 2004).

Visando reduzir os gastos na produção, outros protocolos foram criados utilizando centrífugas convencionais (EFEOGLU et al., 2004), embora muitas vezes o processo seja mais árduo e exija um profissional que tenha experiência com a técnica empregada (VENDRAMIN et al., 2006). Outra consideração importante é que usando a centrífuga laboratorial tem se obtido menores concentrações de plaquetas e, conseqüentemente, de FCs com relação ao aparelho automático (MARX, 2004) (Tabela 01).

Tabela 01: Comparação entre o emprego de centrífuga comum e aparelho automático com relação a quantidade de sangue necessário e contagem de plaquetas após a produção do PRP.

Método empregado	Quantidade de sangue em mL	Plaquetometria no PRP
Centrífuga laboratorial Protocolo de Anitua (2001)	9.5 ± 4.1	(433 ± 129) x 10 ³
Centrífuga laboratorial Protocolo de Landesberg (2000)	10.6 ± 2.4	(336 ± 141) x 10 ³
Centrífuga automática 3i PCCS®	7.0 ± 1.5	(939 ± 284) x 10 ³
Centrífuga automática SmartPREP®	7.4 ± 0.5	(1086 ± 227) x 10 ³

Fonte: Modificado de Marx, 2004.

Quando o PRP é preparado usando uma centrífuga convencional, a facilidade de transporte e manuseio constituem-se em vantagens (MACEDO, 2004) o que permite que o produto seja preparado em qualquer ambiente, desde o laboratório até a sala de cirurgia (MARX, 2004).

Com relação ao processo de centrifugação, podem ser distinguidos os procedimentos que envolvem uma única centrifugação e aqueles que requerem duas centrifugações (CAMARGO et al., 2002; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002; PAGLIOSA e ALVES, 2007) (Tabela 02).

Tabela 02: Alguns protocolos descritos na literatura para a obtenção do PRP.

<i>Referência</i>	<i>Protocolo</i>	<i>Material utilizado</i>	<i>Sangue</i>	<i>Ativação do PRP</i>
Lemos et al., 2002	Centrifugação única: 750 rpm por 10 minutos	- Tubos de 4,5 mL - Centrífuga Fanem	15 mL	Trombina bovina
Feres Junior et al., 2004	Centrifugação única: 1400 rpm por 10 minutos	- 4 frascos de 5 mL - Centrífuga Fanem	20 mL	Trombina autóloga
Macedo, 2004	Centrifugação única: 1200 rpm por 10 minutos	- 3 tubos de 5 mL - Centrífuga Fanem baby I	15 mL	Não foi realizado
Ossa e Orego, 2004	1ª centrifugação: 1200 rpm por 20 minutos 2ª centrifugação: 2000 rpm por 15 minutos	- Tubos de 5 mL - Centrífuga	20 a 50 mL	Trombina bovina
Barroso et al., 2007	1ª centrifugação: 200 g por 10 minutos 2ª centrifugação: 700 g por 15 minutos	- 10 frascos de 5 mL - Centrífuga	50 mL	Trombina autóloga
Da Silva et al., 2007	1ª centrifugação: 1000 rpm por 10 minutos 2ª centrifugação: 1500 rpm por 10 minutos	- 4 tubos de 3 mL - Centrífuga Excelsa II®	12 mL	Tromboplastina
Ferraz et al., 2007	1ª centrifugação: 800 rpm por 10 minutos 2ª centrifugação: 1600 rpm por 10 minutos	- 4 frascos de 10 mL - Centrífuga	40 mL	Não foi realizado
Lopez et al., 2007	1ª centrifugação: 500 g por 10 minutos 2ª centrifugação: 500 g por 10 minutos	- 4 tubos de 5 mL - Centrífuga Selecta®	20 mL	Trombina autóloga
Suaid et al., 2007	1ª centrifugação: 200 g por 10 minutos 2ª centrifugação: 200 g por 15 minutos	- 8 tubos de 4,5 mL - Centrífuga	36 mL	Trombina autóloga
Barbosa et al., 2008	1ª centrifugação: 1300 rpm por 8 minutos 2ª centrifugação: 1300 rpm por 8 minutos	- 4 tubos de 4,5 mL - Centrífuga	18 mL	Tromboplastina
De Rossi et al., 2009	1ª centrifugação: 300 g por 10 minutos 2ª centrifugação: 640 g por 10 minutos	- 2 tubos de 15 mL - Centrífuga Sigma	30 mL	Trombina autóloga

Muitos fatores devem ser levados em consideração no momento de decidir por qual técnica seguir, tais como qual vai ser o uso clínico do PRP, quem irá processar o material, que tipo de sistema de coleta será empregado (ex. bolsa de sangue ou frasco), qual velocidade será usada durante a centrifugação e quanto tempo vai durar esse processo (JAMESON, 2007).

Ao final da primeira centrifugação serão formadas três camadas dentro do tubo, sendo a parte superior, correspondente ao plasma pobre em plaquetas (PPP), a fração mediana, o próprio PRP e a parte inferior, as hemácias (CAMARGO et al., 2002; FERRAZ et al., 2007; NUNES FILHO et al., 2007), que tendem a se depositar no fundo por terem maior peso estrutural. Entre o plasma e os eritrócitos também é formada uma delgada camada constituída por leucócitos e plaquetas maiores (Figura 01), denominada camada leucoplaquetária (GREEN e KLINK, 1998), zona de névoa (JAIN, 1993b), creme leucocitário (REBAR et al., 2003) ou papa leucocitária (buffy coat) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). A parte superior (plasma) juntamente com a zona de névoa são pipetados e a camada eritrocitária, descartada (MACEDO, 2004).

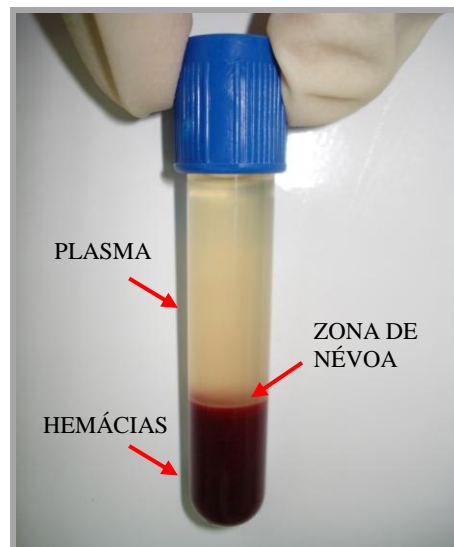


Figura 01: Plasma, zona de névoa e hemácias separadas após a primeira centrifugação.
Fonte: Aleixo, 2009.

Quando o plasma e zona de névoa são submetidos a uma segunda centrifugação, o procedimento levará à precipitação das plaquetas e das poucas hemácias (que por ventura possam estar presentes) no fundo do tubo (VENDRAMIN et al., 2006), enquanto que 80% da parte superior do plasma, correspondente ao PPP é rejeitado (PAGLIOSA e ALVES, 2007). O plasma remanescente é levemente agitado para resuspender o concentrado de plaquetas (botão

plaquetário) localizado no fundo do frasco e assim dar origem ao PRP (BARROSO et al., 2007).

Em seguida é necessário ativar as plaquetas, que consiste na sua degranulação (FLORYAN e BERGHOFF, 2004) e consequente, liberação dos FCs (ALBUQUERQUE et al., 2008). Alguns protocolos recomendam para ativação do PRP a adição da trombina bovina (MARX, 2004; JAMESON, 2007), tromboplastina (SANTOS, 2005; DA SILVA et al., 2007; BARBOSA et al., 2008) ou trombina autógena (FERES JUNIOR et al., 2004; ROSSI JUNIOR e SOUZA FILHO, 2004; LOPEZ et al., 2007). Isso resulta na formação de uma substância gelatinosa similar a um trombo denominada gel de plaquetas (BOLTA, 2007).

O preparo do PRP em todas as etapas (coleta, centrifugação e manipulação) deve ser realizado de forma cuidadosa para garantir a separação das plaquetas e evitar o dano à sua membrana, e consequente morte plaquetária (PAGLIOSA e ALVES, 2007), pois se as mesmas se rompem, liberando os FCs antecipadamente, a ação terapêutica do PRP será prejudicada (LOPEZ et al., 2007).

Após sua produção, a contagem plaquetária deve ser expressivamente superior ao do sangue total para que ocorra a adequada liberação dos FCs no local da sua aplicação (PAGLIOSA e ALVES, 2007). Segundo Lemos et al. (2002) e Marx (2004) o PRP deve apresentar uma concentração de plaquetas superior a 1.000.000/ μ L.

A contagem das plaquetas, procedimento recomendado para avaliação quantitativa do protocolo de obtenção do PRP, pode ser realizada em máquina automática, no hemocitômetro ou ainda por contagem indireta em esfregaço sanguíneo (COLES, 1984; SANTOS, 2005).

A análise qualitativa do concentrado de plaquetas pode ser feita pela avaliação morfológica das plaquetas em microscópio, citometria de fluxo (LANDI e MARQUES JÚNIOR, 2003), agregometria (HOFFBRAND et al., 2004) ou através da ativação do PRP pela adição de um agonista (BARROSO et al., 2007). De acordo com Coles (1984), o teste de agregação plaquetária, no qual a trombina é adicionada a uma amostra do PRP e se observa a formação do coágulo, é um exame bastante sensível.

MATERIAL E MÉTODOS

Previamente, à execução do experimento o projeto de pesquisa foi encaminhado para análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (Anexo A/Protocolo n° 23082.005458/2009).

Durante a primeira etapa da pesquisa, foram coletadas amostras de sangue de 20 cães adultos, machos (nove) e fêmeas (11), entre dois e cinco anos de idade e com peso variando entre 10 a 20 kg. Os animais não estavam sendo submetidos a nenhum tipo de terapia medicamentosa.

Usando um sistema de coleta de sangue a vácuo com agulha calibre 25 x 7 mm¹ e adaptador para coleta², foram obtidos de cada paciente dois frascos de sangue em tubos de vidro de 4,5 mL contendo citrato de sódio³, sendo cada frasco submetido a um diferente protocolo (Protocolo A ou B) para produção do PRP. Além dessas amostras, outro tubo de 2 mL contendo ácido etileno diamino tetra acético (EDTA)⁴ foi preenchido para realização do hemograma e quantificação plaquetária no sangue total (valor de referência).

A área da coleta tinha os pêlos removidos com uma lâmina de tricotomia e era higienizada com um chumaço de algodão embebido em solução de álcool a 70%⁵. A veia cefálica ou safena era escolhida dependendo da facilidade de acesso e calibre da mesma.

Após a coleta, os tubos foram homogeneizados e remetidos ao laboratório para serem processados. Um dos frascos com citrato de sódio foi empregado na produção do PRP pelo protocolo A que constava de uma única centrifugação a 1200 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos em uma centrífuga laboratorial de bancada⁶. Posteriormente, à primeira centrifugação, o tubo apresentava três camadas distintas formadas pelas hemácias (fundo do tubo), zona de névoa, composta pelos leucócitos e plaquetas maiores (camada intermediária) e o plasma (camada superior). Em torno de 80% da parte mais superficial do plasma foi descartado com um pipetador automático⁷ e ponteira estéril⁸ de 1 mL. O restante do plasma, correspondente à parte mais concentrada em plaquetas, e a camada leucoplaquetária foram pipetados com ponteira estéril de 100 µL e posteriormente 10 µL, para serem acondicionados em um frasco estéril de 3 mL sem aditivo⁹. A camada contendo as hemácias foi descartada.

O outro frasco foi submetido ao Protocolo B que constava de duas centrifugações. Após a primeira centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos, todo o plasma e zona de névoa foram aspirados com uma ponteira estéril de 1 mL, 100 e 10 µL (nessa sequência) e transferidos para um tubo estéril sem aditivo e o material retornava à centrífuga para uma

¹ Agulha de coleta múltipla preta – Vacuette do Brasil, Americana/SP

² Adaptador padrão – Vacuette do Brasil, Americana/SP

³ Tubo de coleta a vácuo com citrato de sódio a 3,2% – Labor Import, Osasco/SP

⁴ Tubo de coleta a vácuo com EDTA Vacuette® – Vacuette do Brasil, Americana/SP

⁵ Álcool etílico hidratado a 70% – Miyako do Brasil ind. e com. Ltda., Guarulhos/SP

⁶ Centrífuga de Bancada Baby® I Modelo 206 BL – Fanem®, Guarulhos/SP

⁷ Pipetador automático – Kacil indústria e comércio Ltda., Recife/PE

⁸ Ponteira tipo Gilson para pipeta automática – Cral artigos para laboratório Ltda., Cotia/SP

⁹ Tubo de coleta a vácuo sem aditivo Vacuette® – Vacuette do Brasil, Americana/SP

segunda rotação a 1600 rpm por 10 minutos. Em seguida, descartava-se aproximadamente 80% do sobrenadante com um pipetador automático de 1 mL, permanecendo apenas a parte mais concentrada em plaquetas e o botão plaquetário que se encontrava no fundo do tubo.

O fluxograma referente as etapas de produção do PRP através dos protocolos A e B podem ser visualizados na Figura 02.

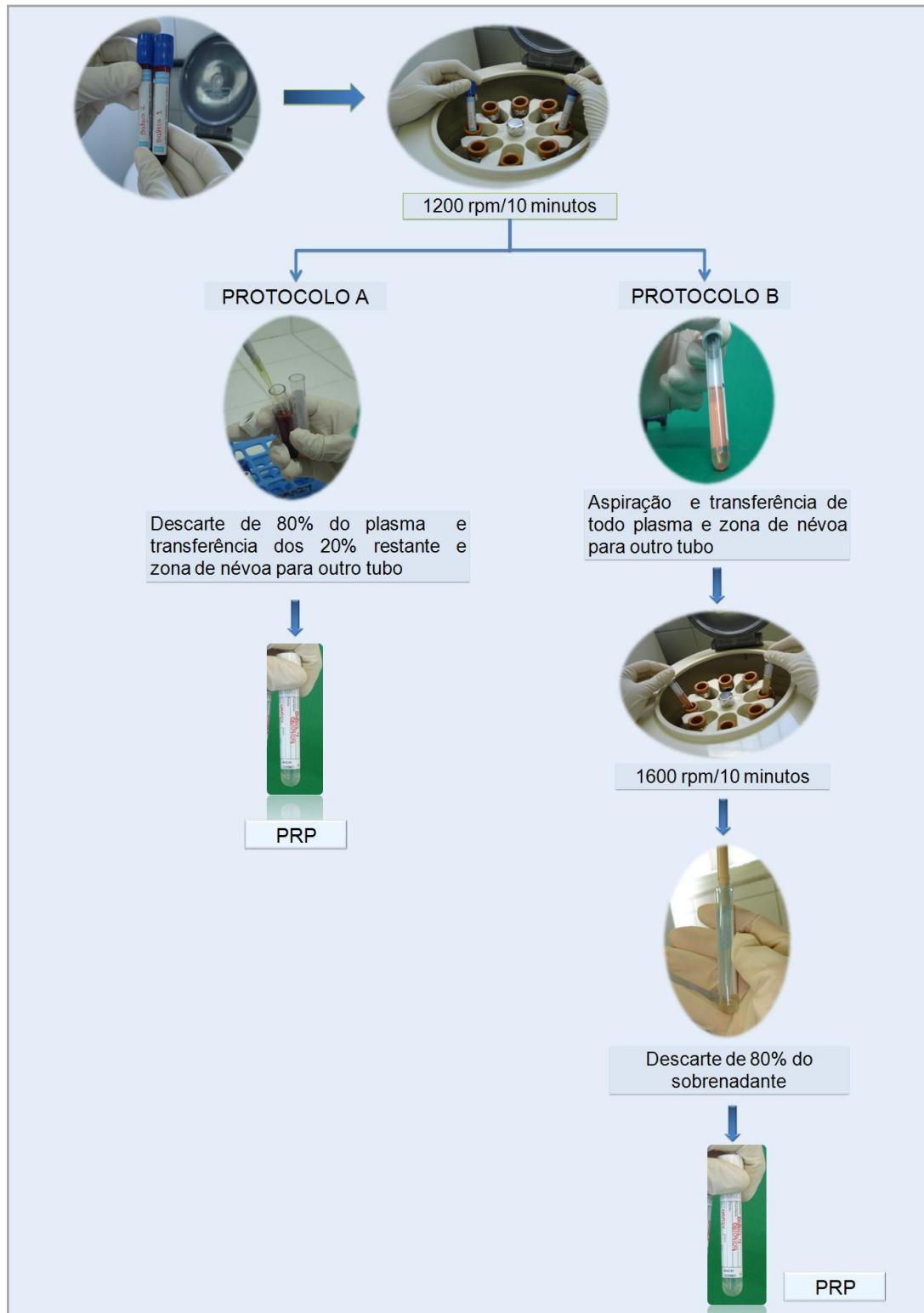


Figura 02: Fluxograma demonstrando as etapas para obtenção do PRP através dos protocolos A e B.

Fonte: Aleixo, 2009.

A plaquetometria do PRP obtido pelos protocolos A e B foi efetuada pelo método de contagem direta descrita por Coles (1984) utilizando o diluente de Rees-Ecker. Foram contadas no microscópio óptico¹⁰ (aumento de 400 X) as plaquetas encontradas dentro dos 25 quadrantes centrais de cada lado da câmara de Neubauer¹¹ e esse valor foi multiplicado por 1000 para fornecer a quantidade total de plaquetas por μL .

No sangue colhido no frasco com EDTA, realizou-se o hemograma e plaquetometria para avaliar as variações quantitativas e morfológicas dos elementos figurados do sangue e obter os valores de referência para as plaquetas dos animais. Efetuou-se a contagem do número total de hemácias, leucócitos e hemoglobina em contador semi-automático de células¹² e a contagem diferencial e análise morfológica das células através da leitura em esfregaço sanguíneo corado pelo método panótico¹³. A plaquetometria foi realizada pelo método direto através da contagem em câmara de Neubauer, como descrito para a contagem no PRP.

Para verificar a suficiência amostral, considerou-se o processo inteiramente aleatório com um erro adotado de 10%. A quantidade de plaquetas alcançadas em cada protocolo (A e B) e o valor basal (de referência) foram analisados por um delineamento inteiramente aleatório com três tratamentos e 20 repetições. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades (SILVA e SILVA, 1999).

Após a definição do protocolo no qual se alcançou uma maior plaquetometria no PRP (Protocolo B), o mesmo foi testado em novas amostras colhidas em outros 20 cães com o mesmo padrão de peso e idade, para avaliar o seu índice de reprodutibilidade. Foram calculadas as estatísticas descritivas de cada grupo e se observaram os comportamentos dos limites de confiança dos mesmos.

A análise qualitativa do PRP obtido pelo protocolo B foi efetuada pela observação da coagulação do produto após a adição de tromboplastina¹⁴ na proporção de 2:1 (plasma:tromboplastina) em uma amostragem de 10 animais escolhidos ao acaso e através da avaliação morfológica das plaquetas em esfregaço sanguíneo.

¹⁰ Microscópio óptico Olympus CH30RF200 – Olympus Optical Co. Ltda., Japão

¹¹ Neubauer improved Bright Line – Optic Labor, Balgach/Suíça

¹² Contador de células semi-automático Celm CC 530 – Celm Cia. Equipadora de Laboratórios, Barueri/SP

¹³ Instant Prov – Newprov Produtos para Laboratório Ltda., Pinhais/PR

¹⁴ Tempo de Protrombina (TP) – Laborlab, Guarulhos/SP

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao investigar em literaturas especializadas, percebe-se que o emprego do PRP tem ganhado muito destaque e sido bastante difundido na Medicina Humana por causa das diversas aplicações clínicas relacionadas ao mesmo. Além do já conhecido uso em ortopedia e odontologia, artigos descrevem o seu emprego em cirurgia reconstrutiva, oftálmica, cardíaca, urológica, laparoscópica, ginecológica e neurocirurgia, entre outras. Entretanto, quando se refere à Medicina Veterinária, as pesquisas e seu uso clínico são mais restritos, o que foi um dos fatores que motivou a execução desse experimento.

Durante a etapa inicial da pesquisa a equipe treinou toda metodologia necessária para a obtenção do PRP, desde a coleta de sangue até a adição da tromboplastina para produção do gel, pois de acordo com Vendramin et al. (2006), o treinamento é de fundamental importância para que seja possível o uso rotineiro da técnica e, após a fase inicial de aprendizagem e ajustes do protocolo, os resultados tendem a ser cada vez melhores. Marx (2004) também recomenda que o processo de centrifugação seja executado com muita precisão para que se obtenha um plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras, pois quando as plaquetas se encontram fragmentadas, elas não são capazes de liberar os FCs necessários para a reparação tecidual (FERRAZ et al., 2007), demonstrando mais uma vez a importância do treinamento prévio para uma melhor execução da técnica, o que é conhecido como curva de aprendizagem.

Foi determinado que todos os cães nos quais seriam coletados sangue para o experimento deveriam ser de médio porte e ter peso variando entre 10 e 20 kg, pois segundo Marx (2004), algumas pesquisas tem usado animais com pequeno volume sanguíneo como modelo experimental, sendo a quantidade de sangue desses pacientes insuficiente para produzir o PRP. Nesses casos específicos, acabou-se optando por doadores de sangue e o concentrado de plaquetas passou a ser homólogo, o que descaracteriza o verdadeiro PRP, que deve ser autólogo de acordo com o autor supracitado. Este relata ainda, que o uso de sangue de um animal doador pode gerar reações imunológicas, além das plaquetas homólogas não serem viáveis e possivelmente não secretarem adequadamente os FCs, o que pode levar a resultados falso-negativos a respeito da eficácia do produto. Lemos et al. (2002) e Rossi Junior e Souza Filho (2004) também citam que existem riscos relacionados ao desenvolvimento de reação imunogênica e transmissão de doenças quando o sangue usado na fabricação do PRP não é autógeno. Nas reações imunogênicas são desenvolvidos anticorpos

anti-plaquetas que aceleram a sua destruição, resultando em uma trombocitopenia imunomediada (REBAR et al., 2003).

Outro fator que interferiu na determinação do porte dos animais que iriam compor o grupo experimental foi o fato de ter sido usado um sistema de coleta a vácuo para obtenção do sangue, pois de acordo com Kerr (2003), o mesmo não deve ser empregado em pequenos animais por causar colapso em vasos de menor calibre e paredes finas.

A escolha por esse método de coleta foi direcionado pela maioria dos trabalhos consultados, no qual se empregavam tubos a vácuo, possivelmente, pela rapidez e facilidade em obter maiores volumes de sangue com relação ao método que utiliza seringas hipodérmicas. Uma vantagem que pode ser citada da coleta a vácuo foi a facilidade de encontrar no comércio tubos que já apresentam no seu interior o anti-coagulante citrato de sódio na proporção recomendada. Anitua et al. (2004), relatam que o anti-coagulante indicado para o PRP é o citrato de sódio, pois esse se liga aos íons de cálcio formando quelatos, impedindo que ocorra a coagulação do plasma. Outro benefício desse anti-coagulante é que se, posteriormente, for adicionado cloreto de cálcio para produção do gel de plaquetas, o coágulo é formado naturalmente (GENTRY, 2006).

Apesar de em volumes maiores (4,5 mL) só existirem tubos com citrato fabricados em vidro, verificou-se que o uso desse tipo de material não comprometeu a qualidade final do PRP, pois foi possível alcançar altas concentrações plaquetária após a sua produção. Em trabalho executado por Shimauti et al. (2002), os autores também constataram que não houveram diferenças significativas na plaquetometria quando o sangue foi colhido em frascos de vidro ou plástico.

Estimulava-se a permanência do proprietário no ambulatório durante a coleta, para auxiliar na contenção física e tentar acalmar o paciente com palavras e afagos, visando propiciar o menor desconforto possível para o mesmo, pois apesar de ser relatada uma trombocitose fisiológica (JAIN, 1993c; REBAR et al., 2003) associada a contração esplênica em situações de estresse e medo (WALKER, 2009), o que poderia resultar em uma maior concentração plaquetária na coleta, a estimulação do sistema nervoso simpático e liberação de adrenalina que também ocorrem nesse momento, propiciam a ativação das plaquetas (HOFFBRAND et al., 2004) o que não é desejável. Segundo Santos (2005), a ativação precoce das plaquetas com formação de agregações pode alterar a plaquetometria de maneira que a mesma vai se mostrar reduzida.

Com relação ao vaso escolhido para punção e coleta, Macedo (2004) recomenda que se dê preferência aos mais calibrosos e facilmente acessíveis e por esse motivo em alguns

animais a coleta foi realizada na veia cefálica, enquanto que em outros, na safena. Percebeu-se também durante a venopunção que a coleta na safena tinha uma tendência a ser mais tranquila, com mínima reação de defesa do paciente, possivelmente pelo fato da equipe se posicionar atrás dele durante a manobra, impossibilitando que o mesmo percebesse ou visualizasse o procedimento.

A comparação entre o protocolo de centrifugação única e de duas centrifugações se fundamentou no fato de alguns autores (GREEN e KLINK, 1998; NUNES FILHO et al., 2007; MESSORA et al., 2009) recomendarem a primeira técnica enquanto outros (SONNLEITNER et al., 2000; OSSA e OREGO, 2004; SILVA et al., 2009) indicam a segunda.

Para a centrifugação do plasma, optou-se pelo uso de 1200 e 1600 rpm, porque essas rotações eram executáveis na centrífuga utilizada e por estarem dentro da média estabelecida em outros trabalhos, apesar de não terem sido encontrados artigos com a combinação dessas mesmas velocidades. O aumento na velocidade de rotação na segunda centrifugação para 1600 rpm foi correspondente ao aumento de um nível de acordo com a capacidade da centrífuga utilizada, onde cada nível de graduação equivalia a 400 rpm (ex. nível 1: 400 rpm/nível 2: 800 rpm/nível 3: 1200 rpm/nível 4: 1600 rpm, etc). A necessidade de aumentar a velocidade de centrifugação no segundo processo, assim como realizado nos trabalhos de Aghallo et al. (2002), Scarso Filho (2002) e Ferraz et al. (2007), entre outros, foi baseado no fato de que Barroso et al. (2007), descrevem que uma segunda rotação de maior intensidade permite separar melhor a fração do PPP, que corresponde a parte superior, da parte inferior, que representa o PRP.

Não foram escolhidas centrifugações mais altas do que 1600 rpm como as realizadas por Ferraz et al. (2007), em que também foi testado 3200 rpm, pois Adler e Kent (2002) relatam que a velocidade da centrifugação excessiva poderá danificar as plaquetas e resultar em um PRP de má qualidade. Os resultados alcançados por Ferraz e colaboradores demonstraram que apesar da segunda centrifugação em 3200 rpm ter concentrado uma maior quantidade de plaquetas, estas se encontravam morfológicamente alteradas, interferindo desta maneira na qualidade do produto.

No protocolo A foi possível alcançar um aumento médio de 190,22% na plaquetometria com relação a contagem no sangue total. Com o protocolo B esse valor foi de 449,02%, demonstrando dessa forma, a superioridade do segundo método com relação a capacidade de concentrar as plaquetas (Figura 03).

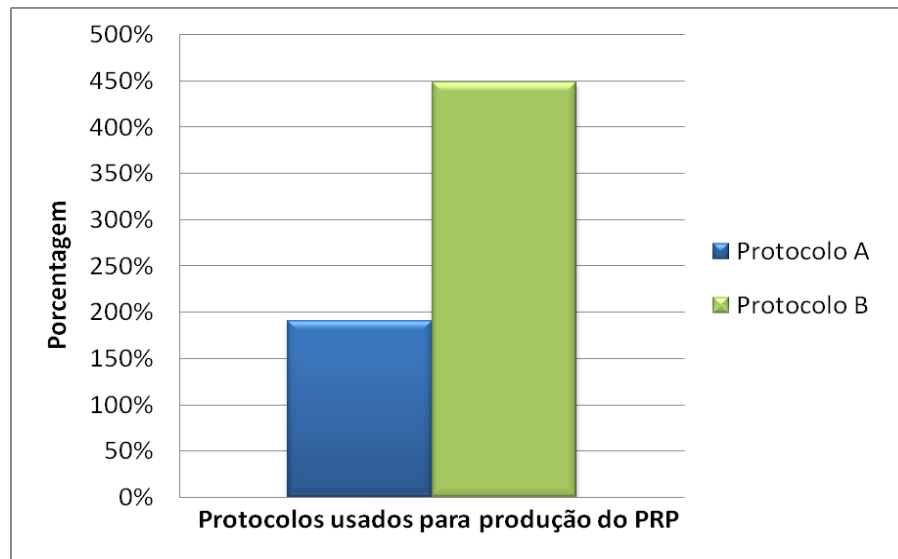


Figura 03: Aumento em porcentagem da plaquetometria no protocolo A (1200 rpm/10 min.) e B (1200 rpm/10 min. e 1600 rpm/10 min.) com relação ao sangue total.

Como a maior parte dos seres humanos apresenta concentração plaquetária no sangue basal entre 200.000 ± 75.000 , e o incremento na plaquetometria do PRP deve ser de quatro a cinco vezes, então 1.000.000 de plaquetas é o valor estipulado para que se atinja a ação terapêutica do PRP (MARX, 2004). Barroso et al. (2007), citam que esse valor pode ser entre 900.000 e 1.000.000/ μL . Como os valores de referência para as plaquetas em animais da espécie canina são similares aos dos humanos, é possível extrapolar esses dados para a Medicina Veterinária, sugerindo que uma contagem de 1.000.000 de plaquetas é recomendada para que o produto seja eficiente.

No presente experimento, o cálculo do tamanho da amostra indicou que seriam necessários 13,26 animais (no caso 14) com um erro real de amostragem de 8,15%. Como foram utilizados 20 animais e o erro foi inferior ao máximo adotado (10%), o número de pacientes foi considerado suficiente. Avaliando a figura 04, verificou-se que em três dos 20 animais (n. 7, 15 e 20) não foi atingido o valor de 1.000.000/ μL em ambos os protocolos. Em dois animais (n. 15 e 20) a plaquetometria ficou abaixo de 900.000/ μL , porém ainda foi possível incrementar a contagem plaquetária desses pacientes em cinco vezes com relação ao valor basal, portanto estes também podem ser considerados PRP.

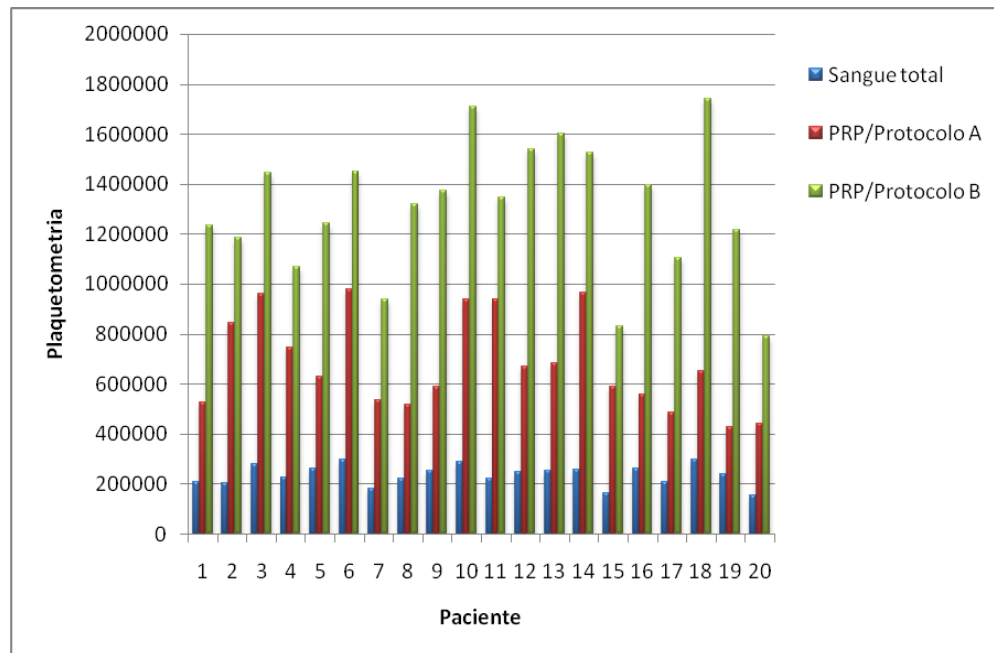


Figura 04: Contagem de plaquetas em cada paciente no sangue total e no plasma rico em plaquetas (PRP) obtido através do protocolo A (1200 rpm/10 min.) e B (1200 rpm/10 min. e 1600 rpm/10 min.).

O fato de não ter se atingido $1.000.000/\mu\text{L}$ nos três animais citados, pode ser justificado pelos mesmos terem apresentado uma contagem plaquetária inferior ao valor de referência para a espécie canina no sangue basal. Conforme afirmado por Floryan e Berghoff (2004), animais trombocitopênicos não devem ser usados para a produção do PRP, uma vez que o valor da plaquetometria do mesmo está diretamente relacionada a contagem no sangue total (BARBOSA et al., 2008). Os resultados aqui observados confirmam essa recomendação.

Diversas causas podem resultar em trombocitopenias, entre elas a hipoplasia medular (ex. induzida por fármacos), doenças infecciosas (ex. erliquiose), trombocitopenia imunomediada, coagulação intravascular disseminada (REBAR et al., 2003), doença esplênica, endotoxemia, deficiência nutricional severa entre outros (WALKER, 2009).

Entre as causas citadas, merece relevância a trombocitopenia causada pela *Anaplasma platys* cuja célula alvo é a plaqueta, pois o número de casos suspeitos de infecção por essa bactéria vem aumentando em todo mundo (PAZ e SILVA et al., 2009). Mais especificamente com relação a cidade do Recife, localidade onde o experimento foi executado, uma pesquisa realizada por Teixeira et al. (2002), com cães naturalmente infectados pelo parasito, constatou que o sinal laboratorial mais frequentemente observado nesses animais foi a trombocitopenia (79%).

Ao comparar dois protocolos de produção de PRP, Macedo (2004) percebeu que a técnica que constava de uma centrifugação (grupo I) propiciou um aumento de 143% na

concentração plaquetária e que após duas centrifugações (grupo II) esse valor chegou a 327%, concordando com os resultados aqui alcançados onde o método de duas centrifugações teve resultados superiores. Uma diferença a ser destacada entre os experimentos é que no grupo I do trabalho supracitado todo o plasma foi aspirado e considerado PRP, enquanto que nesta pesquisa, ainda foi descartado aproximadamente 80% da parte mais superficial do plasma, que foi considerado como PPP, e provavelmente por isso, a porcentagem de aumento do grupo I do referido trabalho foi inferior ao alcançado no protocolo A desta pesquisa.

Aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades, foram encontrados os resultados descritos na Tabela 03.

Tabela 03: Resultados do teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades.

TRATAMENTO	MÉDIA	
PRP/Protocolo B	1303000	A
PRP/Protocolo A	683000	B
Sangue Total	236750	C

* Letras iguais significam que os tratamentos não diferem entre si.

O teste de Tukey demonstrou que as três plaquetometrias foram diferentes entre si, sendo, o protocolo B mais eficiente por concentrar um maior número de plaquetas por animal analisado. Em termos percentuais, o protocolo B alcançou em média 90,78% mais plaquetas que o protocolo A.

Para confirmar que o protocolo B foi o mais eficiente, aplicou-se tal método em outros 20 animais para observar a reprodutibilidade do mesmo (Tabela 04).

Tabela 04: Estatísticas para as relações entre a contagem de plaquetas no protocolo B nos 20 animais da primeira etapa do experimento (EI) e nos 20 animais da segunda etapa (EII) usados para avaliar a reprodutibilidade do método.

Estatísticas	Animais EI	Animais EII
Número de animais	20	20
Média	5,489	5,374
Limite Superior*	5,805	5,786
Limite Inferior*	5,174	4,962

* 99% de confiabilidade.

As relações entre a plaquetometria do protocolo B nos primeiros 20 animais e nos outros 20 usados para verificar a estabilidade do método e de treinamento e eficiência da equipe, apresentaram resultados muito próximos e com limites de confiança cruzando entre si, o que demonstrou que o procedimento se repetiu na EII, corroborando com os dados alcançados por Vendramin et al. (2006), nos quais os concentrados de plaquetas produzidos após a definição de um protocolo foram reprodutíveis em todos os outros dez testes realizados com essa finalidade.

A observação morfológica das plaquetas do PRP em esfregaço sanguíneo não demonstrou nenhuma alteração, sendo a mesma recomendada com técnica para avaliar a qualidade do produto, pois quando as plaquetas estão ativadas elas mudam de forma passando a apresentar pseudópodos citoplasmáticos (REBAR, et al., 2003). A ativação plaquetária durante o processamento do PRP pode antecipar a liberação dos FCs pelos α -grânulos, resultando na perda desses no plasma (EPPLEY et al., 2004).

Na avaliação qualitativa do PRP produzido pelo protocolo B usando o teste de agregação plaquetária em uma amostragem de dez animais, aproximadamente seis segundos após a adição do reativo agonista, foi observado a formação do gel de plaquetas (Figura 05).



Figura 05: Gel de plaquetas (seta vermelha) formado após a adição do agonista tromboplastina.
Fonte: Aleixo, 2009.

Procedimento semelhante foi realizado em pesquisa de Barroso et al. (2007), em que a avaliação da função plaquetária foi desempenhada pela ativação do PRP depois da adição de trombina e observação da formação do coágulo em oito amostras de um total de 45 pacientes. Os autores também submeteram o material a uma análise pela citometria de fluxo, porém de acordo com Landi e Marques Júnior (2003) a necessidade de mão-de-obra especializada e do citômetro de fluxo limitam o emprego dessa técnica.

Deu-se preferência ao uso da tromboplastina, pois o mesmo é citado como uma das opções disponíveis para promover a ativação plaquetária e pelos resultados pré-experimentais favoráveis encontrados com seu emprego. Barbosa et al. (2008), também trabalharam com a tromboplastina para confecção do gel de PRP, justificando que a trombina bovina não é facilmente encontrada no Brasil. Além disso, de acordo com Vendramin et al. (2006), quando se utiliza a trombina autóloga a concentração da mesma deve ser medida por ensaio de atividade amidolítica usando um substrato cromogênico específico. O fato de ser necessário quantificar a trombina autóloga e dispor de equipamentos e/ou materiais específicos para isso, o que resulta em maior custo de produção, além das etapas extras necessárias para a sua fabricação, acabaram desencorajando o seu uso.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) em animais da espécie canina, constituído de duas centrifugações, sendo a primeira a 1200 e a segunda a 1600 rpm por 10 minutos cada ciclo, propicia uma maior concentração plaquetária quando comparado ao protocolo de centrifugação única a 1200 rpm por 10 minutos.

REFERÊNCIAS

1. ADLER, S. C.; KENT, K. J. Enhancing wound healing with growth factors. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 10, p. 129-146, 2002.
2. AGHALLO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects. A pilot study. **Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 10, p. 1176-81, 2002.
3. ALBUQUERQUE, D. P.; OLIVEIRA, T. M. F.; MARANHÃO FILHO, A. W. A.; MILHOMENS FILHO, J. A.; GUSMÃO, E. S. Aplicação clínico-cirúrgica do plasma rico em plaquetas – estudo revisional. **Odontologia Clín.-Científ.**, v. 7, n. 2, p. 119-122, 2008.
4. ANITUA, E.; ANDÍA, I.; SÁNCHEZ, M. PRGF (plasma rich in growth factors). **Dental dialogue**, v. 3, p. 1-15, 2004.
5. BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335-1340, 2008.

6. BARROSO, C. S. T.; BENITO, J. C.; PUIG, A. G. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. **Ver. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.**, v. 29, n. 4, p. 240-248, 2007.
7. BOLTA, P. R. Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatoven APA**, v. 16, n. 4, p. 156- 165, 2007.
8. 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. **J. Period. Res.**, v. 37, p. 300-306, 2002.
9. COLES, E. H. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: _____. **Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. Cap. 5, p. 144-163.
10. DA SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007.
11. DE ROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S.; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, 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.
12. EFEOGLU, C.; AKCAY Y, D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 1403–1407, 2004.
13. EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. B. S. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 114, n. 6, p. 1502-1508, 2004.
14. FERES JUNIOR, F.; PASSANEZI, E.; GREGHI, S. L. A.; PASSANEZI, A. Análise comparativa do índice de sucesso dos implantes osteointegrados com e sem a utilização de PRP, no protocolo de fixação. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, p. 9-228, 2004.
15. FERAZ, V. C. M.; FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of plateletrich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.
16. FLORYAN, K. M.; BERGHOFF, W. J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. **AORN Journal**, v. 80, n. 4, p. 668-674, 2004.

17. FÜRST, G.; GRUBER, R.; TANGL, S.; ZECHNER, W.; HAAS, R.; MAILATH, G.; SANROMAN, F.; WATZEK, G. Sinus grafting with autogenous platelet-rich-plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, p. 500–508, 2003.
18. GENTRY, P. A. Coagulação sanguínea e hemostasia. In: REECE, W. O. **Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 4, p. 49-64.
19. GREEN, D.; KLINK, B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 101, n. 4, p. 1161-1162, 1998.
20. HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: _____. **Fundamentos em Hematologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 18, p. 244-257.
21. JAIN, N. C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 2, p. 19-53 (a).
22. JAIN, N. C. Examination of the blood and bone marrow. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 1, p. 1- 18 (b).
23. JAIN, N. C. The platelets. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 6, p. 105-132 (c).
24. JAMESON, C. A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. **Labmedicine**, v. 38, n. 1, p. 39- 42, 2007.
25. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sangue. In: _____. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 9, p. 181-198.
26. KERR, M. G. Plaquetas (trombócitos) e fatores de coagulação. In: _____. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 2, p. 45- 59.
27. LAGUNAS, J. G. Plasma rico em plaquetas. **Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.**, v. 28, n. 2, p. 89-99, 2006.
28. LANDI, E. P.; MARQUES JÚNIOR, J. F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 25, n. 1, p. 39-46, 2003.
29. LEMOS, J. J.; ROSSI JUNIOR, R.; PÍSPICO, R. (2002). **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos - proposta de um protocolo de obtenção simplificado**.

- Disponível em: <<http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225>>. Acesso em: 06.11.09.
30. LÓPEZ, J. L.; CHIMENOS, E.; SANCHEZ, J. M.; CASTAÑEDA, P. Plasma rico en factores de crecimiento y regeneración ósea. **Dentum**, v. 7, n. 3, p. 108-112, 2007.
 31. MACEDO, A. P. **Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção**. 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.
 32. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. M.; SÁNCHEZ, J. C.; LAFUENTE, J. C. G.; TRAPERO, J. C.; GÓMEZ, G. C. E.; LESTÓN, J. M. S. Do ambulatory-use platelet-rich plasma (PRP) concentrates present risks? **Medicina Oral**, v. 7, n. 5, p. 383-390, 2002.
 33. MARX, R. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.
 34. MARX, R. E. Platelet-rich plasm: evidence to support its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, n. 62, p. 489-496, 2004.
 35. MESSORA, M. E.; NAGATA, M. J. H.; MELO, L. G. N.; FURLANETO, F. A. C.; DELIBERADOR, T. M.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009.
 36. MOREIRA, D. C.; SADIGURSKY, M.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, M. G. S. Fatores de crescimento plaquetários. Revisión de literatura. **Revista Venezolana de Investigación Odontológica**, v. 8, n. 1, p. 14-25, 2008.
 37. NUNES FILHO, D. P.; LUPPINO, F.; YAEDÚ, R. Y. F.; CARVALHO, P. S. P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 3, p. 263-269, 2007.
 38. OSSA, S. G.; ORREGO, G. E. O. Plasma rico en plaquetas: una alternativa para acelerar el proceso de cicatrización ósea. **Revista CES Odontología**, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2004.
 39. PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p.1202-1205, 2007.
 40. PAZ E SILVA, F. M.; TEIXIERA, M. N.; LOPES, R. S.; ARAÚJO JUNIOR, J. P. Erlichioses. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 290-302, 2009.
 41. REBAR, A. H.; MACWILLIAMS, P. S.; FELDMAN, B. F.; JR METZGER, F. L.; POLLOCK, R. V. H.; ROCHE, J. Plaquetas. In: _____. **Guia de Hematologia para Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 10, p. 131-156.

42. REECE, W. O.; SWENSON, M. J. Composição e funções do sangue. In: REECE, W. O. **Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 3, p. 24- 48.
43. ROSSI JUNIOR, R.; SOUZA FILHO, M. A. P. Obtenção de trombina autógena: proposta de um protocolo simplificado e de fácil reprodução clínica. **Revista Paulista de Odontologia**, v. 26, n. 5, p. 4-9, 2004.
44. ROUKIS, T. S.; ZGONIS, T.; TIERNAN, B. Autologous platelet-rich plasma for wound and osseous healing: A review of the literature and commercially available products. **Advances in Therapy**, v. 23, n. 2, 2006.
45. SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18, p. 93-103, 2003.
46. SANTOS, A. P. Avaliação da hemostasia e distúrbios da coagulação. In: 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. **Anais do 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: UFRGS, 2005.
47. SCARSO FILHO, J. **Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular. Estudo “in vitro”**. 2002. 75 f. Tese (Doutorado em Odontologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
48. SHIMAUTI, E. L. T; FUKUSHIGE, Y; ARAÚJO, F. A. T. E. Estudo comparativo entre contagem de plaquetas em sangue colhido em tubos de vidro e plástico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 34, n. 1, p. 11-13, 2002.
49. SILVA, I. P.; SILVA, J. A. A. **Modelos estatísticos aplicados à pesquisa científica: uma abordagem para profissionais da pesquisa agropecuária**. Recife: UFRPE, 1999. 305 p.
50. SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTERIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 129-134, 2009.
51. SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. A simplified technique for producing plateletrich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 15, p. 879-882, 2000.
52. SUAID, F. F.; SANTAMARIA, M. P.; CARVALHO, M. D.; SOUZA, H. W.; SALLUM, E. A.; NOCITTI JUNIOR, F. H. Avaliação clínica da associação do plasma rico em

- plaquetas (PRP) com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em retrações gengivais criadas em cães. **Periodontia**, v. 17, n. 1, p. 68-75, 2007.
53. TEIXEIRA, M. N.; OLIVEIRA, J. B.; TAKAHIRA, R. K. ; CARNEIRO, A. S.; CARRAZZONI, P. G.; MAGALHÃES, P. K. L.; FRANZ, K. ; SOUZA, E. F.; BARBOSA, L. V.; SILVA, T. L. A. Infecção natural por Ehrlichia platys em caninos na cidade do Recife, estado de Pernambuco. In: XII Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, 2002. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, 2002.**
54. 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 Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.
55. WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3. ed. São Paulo: MedVet, 2009. Cap. 26, p. 390-422.
56. WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A. G.; SIEVERT, A. N.; SISTINO, J. J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v. 23, p. 283-289, 2008.

ARTIGO II

PRODUÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO PERÍODO PRÉ OU TRANS-OPERATÓRIO: MOMENTO IDEAL PARA SUA OBTENÇÃO

PRODUCTION OF PLATELET-RICH PLASMA DURING PRE OR TRANS SURGICAL PERIOD: THE IDEAL MOMENT TO OBTAIN IT

RESUMO

Avaliando a prática de outros pesquisadores com relação a produção do plasma rico em plaquetas (PRP) é possível constatar que não existe uma unanimidade com relação ao momento em que o sangue deve ser coletado e processado. Alguns relatam a coleta e preparação pré-operatória, antes da administração de fármacos, fluidos ou trauma cirúrgico, enquanto outros descrevem e indicam que esses procedimentos sejam realizados durante o período trans-operatório. Neste artigo se objetivou determinar qual é o melhor momento para realizar a coleta da amostra de sangue e produção do PRP, baseado na quantidade de plaquetas alcançadas. Foram coletadas amostras de sangue de 20 cadelas híginas, de médio porte (10 a 20 kg), com idade variando entre dois e cinco anos que seriam submetidas à castração eletiva. As coletas foram efetuadas em dois momentos distintos: na etapa pré-cirúrgica antes das pacientes serem submetidas a anestesia e fluidoterapia (M_0) e posteriormente, no ambiente cirúrgico, após a administração dos fármacos anestésicos e fluido intravenoso (M_1). Visando a obtenção do PRP, foi empregado uma metodologia onde o sangue foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos e na sequência a 1600 rpm por 10 minutos. Como os resultados alcançados demonstraram que a coleta de sangue realizada no M_1 apresentou uma redução de 29% na concentração plaquetária do PRP com relação a M_0 , recomenda-se que essa etapa, considerada essencial para produção do concentrado de plaquetas, seja realizada no período pré-cirúrgico.

Palavras-chaves: Cão, cirurgia, concentrado de plaquetas.

ABSTRACT

Evaluating the practice of other researchers regarding production of platelet-rich plasma (PRP) it's observed that there is no unanimity about the moment in which the blood must be collected and processed. Some report the collection and preparation in preoperative time, prior to drugs and fluid administration or surgical trauma, while others describe and

indicate that these procedures should be performed during surgery. This paper aimed to determine which is the best time to perform blood collection and PRP production, based on the number of platelets in the product. Blood samples were collected from 20 healthy medium sized (10 to 20 kg) dogs, between two and five years old, that were undergoing elective castration at two different times: in pre-surgical period prior to patient's anesthesia and fluid therapy (M_0) and thereafter, at the surgical environment and after administration of anesthetic drugs and intravenous fluid (M_1). In order to obtain the PRP the blood was centrifuged at 1200 rpm for 10 minutes and in sequence at 1600 rpm for 10 minutes. As the results showed that blood collection performed in M_1 decreased in 29% platelet count of PRP compared to M_0 , it is recommended that this step, considered essential for production of platelet concentrates, should be performed in pre-surgery moment (M_0).

Keywords: Dog, surgery, platelet concentrate.

INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto obtido a partir da centrifugação do sangue do paciente, visando concentrar uma alta quantidade de plaquetas em um reduzido volume de plasma.

O produto tem sido amplamente estudado, pois existem indícios de que o mesmo é capaz de incrementar o processo cicatricial de tecidos moles e duros. Muitos protocolos foram desenvolvidos para a sua obtenção e esses variam em diversos aspectos, tais como a quantidade de sangue coletado, número e velocidade de centrifugação e equipamentos utilizados.

O momento para a produção do PRP é um tema que não tem sido amplamente discutido, mas que possivelmente pode exercer alguma influência com relação a plaquetometria do produto.

Percebe-se que alguns pesquisadores preferem realizar a coleta e processamento do sangue antes da cirurgia, alguns até descrevendo a realização dessas etapas 24 horas antes do uso do PRP com o principal intuito de não atrasar o ato operatório caso haja uma demora imprevisível na produção do material, enquanto outros optam por obter o sangue durante o ato operatório. Geralmente, nesses casos são usados equipamentos automatizados, nos quais toda a metodologia de preparo não ultrapassa 30 minutos, o que dificilmente, levaria a um atraso no procedimento cirúrgico.

Entretanto outros fatores além do tempo necessário para o preparo do PRP precisam ser levados em consideração, como a influência dos fármacos administrados, fluidoterapia instituída, interferência do trauma cirúrgico, além dos riscos que podem ser gerados para o paciente.

Como na literatura atual ainda não existem artigos que façam uma comparação com relação a coleta e processamento do PRP nos períodos pré e trans-operatório e, principalmente, relatem se existem diferenças na concentração plaquetária entre esses momentos, esta pesquisa foi executada com esse objetivo.

REVISÃO DE LITERATURA

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de aproximadamente 2 a 4 μm (KIERSZENBAUM, 2004) produzidos na medula óssea pelos megacariócitos (GENTRY, 2006; REECE e SWENSON, 2006; MOTA e TUDURY, 2009).

Uma das principais funções das plaquetas é atuar na coagulação sanguínea (JAIN, 1993a; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; KIERSZENBAUM, 2004), porém além dessa função já consagrada, as mesmas são capazes de liberar substâncias conhecidas por fatores de crescimento (FCs) que promovem a angiogênese, mitogênese, quimiotaxia (MAIA e SOUZA, 2009) síntese de matriz e diferenciação tecidual (LAGUNAS, 2006; BARBOSA et al., 2008).

São componentes extremamente numerosos no sangue e a contagem plaquetária pode variar entre as diferentes espécies (REECE e SWENSON, 2006), entretanto em cães saudáveis os valores de referência para a plaquetometria vão de 200.000 a 500.000/ μL (JAIN, 1993b; WALKER, 2009).

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto orgânico e atóxico (MARX et al., 1998; ANITUA, 1999; FERES JUNIOR et al., 2004) que é conseguido mediante a centrifugação de sangue autógeno (BARROSO et al., 2007; DA SILVA et al., 2007). Ele é capaz de concentrar em três a cinco vezes a quantidade de plaquetas em comparação ao sangue basal (WHITLOW et al., 2008) e o número aumentado de plaquetas, resulta em uma maior concentração de FCs (MAN et al., 2001; MARX, 2001; MESSORA et al., 2009).

Em decorrência das potencialidades atribuídas aos FCs citados acima, o PRP tem sido empregado desde a década de 1990 como um complemento aos procedimentos de regeneração tecidual (AGHALLO et al., 2002; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002).

Independente do método utilizado para a sua produção, o mesmo deve ser bem explorado de forma que se consiga atingir a concentração de plaquetas considerada seu nível terapêutico (1.000.000/ μ L) (JAMESON, 2007).

Nas primeiras tentativas de fabricação do PRP eram utilizadas grandes máquinas de autotransfusão localizadas dentro do ambiente cirúrgico (VENDRAMIN et al., 2006; JAMESON, 2007). A coleta de sangue era realizada com um cateter venoso central posicionado no paciente durante a cirurgia e eram necessários, aproximadamente, 400 a 500 mL de sangue, além de um técnico especializado para operar o equipamento, o que acabava limitando o procedimento aos centros cirúrgicos e resultavam em maior risco de morbidade para o paciente (KEYVY e JACOBSON, 2004; DE ROSSI et al., 2009). Outra desvantagem citada era que a técnica era muito dispendiosa, o que dificultou a sua implementação a nível ambulatorial (MARX et al., 1998; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002).

Alguns anos mais tarde foram desenvolvidos equipamentos automáticos visando facilitar o procedimento, reduzir os custos (VENDRAMIN et al., 2006) e minimizar os riscos para o paciente (ROUKIS et al., 2006).

Esses aparelhos requerem menores volumes de sangue (MAN et al., 2001; KEYVY e JACOBSON, 2004; LAGUNAS, 2006; THEORET, 2008) e todo o processo leva no máximo 30 minutos (GREEN e KLINK, 1998; ROUKIS et al., 2006) e por isso autores como Marx et al. (1998), sugerem que como o mesmo não aumenta o tempo cirúrgico, a produção do PRP pode ser realizado durante o período trans-operatório.

Em seguida, foram desenvolvidos protocolos empregando centrífugas comuns que simplificaram ainda mais a obtenção do PRP ao ponto de permitir que o produto pudesse ser preparado em qualquer ambiente, desde o laboratório até a sala de cirurgia (MARX, 2004; VENDRAMIN et al., 2006).

Isso pode ser considerado uma vantagem, pois a coleta, preferencialmente, deve ser realizada no período pré-operatório antes da administração de qualquer fluido intravenoso, para evitar a diluição da amostra (ROUKIS et al., 2006) e porque a ativação precoce das plaquetas que pode acontecer durante o ato cirúrgico resulta em agregação plaquetária (ADLER e KENT, 2002) e é possível que ocorram alterações que acabarão interferindo na qualidade final do produto (LANDI e MARQUES JÚNIOR, 2003).

Na opinião de Barbosa et al. (2008), a fabricação do PRP deve anteceder o procedimento cirúrgico, pois se for realizado durante o trans-operatório pode acarretar no atraso da cirurgia, resultando assim, em maior exposição do paciente aos agentes anestésicos, sendo isso, particularmente, importante quando são usados métodos que empregam

centrífugas laboratoriais que demoram mais tempo para serem executados do que os procedimentos automatizados.

Também deve ser levado em consideração que alguns fármacos podem resultar na diminuição na contagem (JAIN, 1993a; REBAR et al., 2003) e/ou função plaquetária (REBAR et al., 2003), inclusive aqueles administrados na cirurgia como parte do protocolo anestésico como os anestésicos gerais, anestésicos locais, tranquilizantes, antiinflamatórios não-esteroidais e antibióticos (KERR, 2003) (Quadro 01).

Quadro 01: Fármacos que podem resultar em trombocitopenia e/ou trombocitopatia.

TROMBOCITOPENIA	TROMBOCITOPATIA
<ul style="list-style-type: none"> ❖ <i>Antiinflamatórios não esteróides</i>¹ ❖ <i>Antibióticos</i>^{1,2} ❖ <i>Anticonvulsivantes</i>¹ ❖ <i>Quimioterápicos</i>¹ ❖ <i>Diuréticos</i>¹ ❖ <i>Anti-coagulantes</i>¹ ❖ <i>Anestésicos barbitúricos</i>² 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ <i>Antiinflamatórios não esteróides</i>³ ❖ <i>Antibióticos</i>¹ ❖ <i>Bloqueadores dos canais de cálcio</i>¹ ❖ <i>Anestésicos gerais</i>¹ ❖ <i>Anti-coagulantes</i>¹ ❖ <i>Quimioterápicos</i>¹

Fonte: 1. Rebar et al., 2003; 2. Walker, 2009; 3. Gentry, 2006.

MATERIAL E MÉTODOS

Previamente, a realização do experimento, o mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Anexo A) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob o número de protocolo 23082.005458/2009.

O grupo experimental foi composto por 20 cadelas, com peso entre 10 e 20 kg e idade variando de dois a cinco anos. Todas as cadelas foram avaliadas através de exame clínico e hemograma e os resultados demonstraram que as mesmas estavam clinicamente saudáveis e, portanto aptas para serem submetidas a ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva.

Em cada paciente foram colhidas amostras de sangue em dois momentos distintos: no período pré-operatório antes de serem anestesiadas e submetidas a fluidoterapia (M₀) e no trans-cirúrgico após a obtenção do plano anestésico e administração de fluido intravenoso, porém antes do trauma cirúrgico (M₁). Em ambos os tempos, e utilizando um sistema de coleta a vácuo, foram coletados 6,5 mL de sangue em dois frascos, sendo um de vidro com o

anti-coagulante citrato de sódio¹ para produção do PRP e quantificação plaquetária (4,5 mL) e outro de plástico com ácido etileno diamino tetra acético (EDTA)², para realização da plaquetometria no sangue total (2 mL).

A primeira coleta foi realizada com a paciente ainda na sala de preparação cirúrgica. Os pêlos no local da venopunção foram removidos com lâmina de tricotomia³ e se higienizava a área com solução de álcool a 70%⁴. O membro foi garroteado com um torniquete de elástico⁵ e, puncionou-se a veia cefálica ou safena (dependendo da facilidade de acesso e calibre da mesma) para o preenchimento dos dois tubos, os quais foram delicadamente inclinados algumas vezes para promover a homogeneização do sangue com o anti-coagulante e evitar a coagulação e perda do material.

Os frascos foram enviados de imediato para o laboratório onde o tubo colhido para produção do PRP foi submetido a uma primeira centrifugação a 1200 rpm durante 10 minutos em centrífuga laboratorial comum⁶. Em seguida, todo o plasma e a camada leucoplaquetária que se localizavam acima das hemácias decantadas no fundo do tubo, foram transferidos para um segundo frasco estéril sem aditivo⁷ usando uma pipeta de precisão⁸ e ponteira estéril⁹, para ser centrifugado novamente a 1600 rpm por 10 minutos. Posteriormente, descartou-se aproximadamente 80% do sobrenadante, mantendo no frasco apenas a parte final do plasma e o botão plaquetário. Esse material foi levemente agitado para promover a resuspensão das plaquetas, como sugerido por Aghallo et al. (2002), resultando assim na produção do PRP.

Na sequência, se procedia a plaquetometria do PRP e do sangue total através do método de contagem direta em câmara de Neubauer¹⁰ descrita por Coles (1984), usando o diluente de Rees-Ecker.

Simultaneamente em outra sala, foram realizadas a tricotomia do campo operatório e os procedimentos anestésicos, visando preparar a paciente para a cirurgia.

O protocolo anestésico utilizado constituiu-se de cloridrato de acepromazina¹¹ na dose de 0,1 mg/kg, pela via intramuscular (IM) associado a 1 mg/kg de cloridrato de tramadol¹²

¹ Tubo de coleta a vácuo com citrato de sódio a 3,2% – Labor Import, Osasco/SP

² Tubo de coleta a vácuo com EDTA Vacuette® – Vacuette do Brasil, Americana/SP

³ Lâmina Wilkinson Sword® – Gillete do Brasil, Manaus/AM

⁴ Álcool etílico hidratado a 70% – Miyako do Brasil ind. e com. Ltda., Guarulhos/SP

⁵ Torniquete Vacuette® – Vacuette do Brasil – Americana/SP

⁶ Centrífuga de Bancada Baby® I Modelo 206 BL – Fanem®, Guarulhos/SP

⁷ Tubo de coleta a vácuo sem aditivo Vacuette® – Vacuette do Brasil, Americana/SP

⁸ Pipetador automático – Kacil indústria e comércio Ltda., Recife/PE

⁹ Ponteira tipo Gilson para pipeta automática – Cral artigos para laboratório Ltda., Cotia/SP

¹⁰ Neubauer improved Bright Line – Optic Labor, Balgach/Suíça

¹¹ Acepromazin® 0,2% – Syntec do Brasil Ltda., Cotia/SP

¹² Tramal® 5% – União Química, Pouso Alegre/MG

pela mesma via, como medicações pré-anestésicas. Com o paciente tranquilizado, realizava-se a ampla tricotomia da região abdominal ventral e lateral do pescoço, para propiciar acesso ao campo operatório e veia jugular, respectivamente.

Após o transporte do paciente para a sala de cirurgia, procedeu-se a venopunção da cefálica para realização da fluidoterapia de manutenção com solução de ringer com lactato de sódio¹³ e indução anestésica com propofol¹⁴ na dose de 4 mg/kg. A manutenção do plano anestésico foi realizada com isoflurano¹⁵ em 100% de oxigênio livre em circuito semi-fechado após a intubação orotraqueal.

Logo após a estabilização anestésica e com o paciente posicionado em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica (para permitir acesso a linha média ventral), realizou-se a segunda coleta sanguínea (M_1) através da veia jugular (Figura 01) onde 6,5 mL foram coletados e distribuídos em dois frascos, um com citrato de sódio e um com EDTA, sendo o primeiro utilizado para produzir e contar as plaquetas no PRP e o outro para realizar a plaquetometria no sangue total.



Figura 01: Coleta de sangue na veia jugular com a paciente anestesiada.
Fonte: Aleixo, 2009.

Os passos seguintes, com relação à realização da plaquetometria no sangue total e produção e contagem de plaquetas no PRP seguiram a mesma metodologia descrita em M_0 .

Em continuidade, procedeu-se a cirurgia de OSH seguindo técnica preconizada por Stone (2007).

Para o cálculo da suficiência amostral foi adotado um processo inteiramente aleatório com um erro estipulado de 10% (MEUNIER et al., 2001). A análise estatística foi realizada

¹³ Ringer Lactato® – Biosintética, Ribeirão Preto/SP

¹⁴ Propovan® 1% – Cristália, Itapira/SP

¹⁵ Isoforine® – Cristália, Itapira/SP

considerando um delineamento inteiramente aleatório, aplicando o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SYSTAT 10 (versão demo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura não foram encontrados artigos que tenham realizado uma análise comparativa com relação a coleta de sangue e produção do PRP nos momentos pré e trans-operatório, apesar de muitas pesquisas já terem sido descritas desde a década de 1990 avaliando a ação de diversos fatores tais como a velocidade de centrifugação (VENDRAMIN et al., 2006; FERRAZ et al., 2007) equipamento (WEIBRICH et al., 2002; ROUKIS et al., 2006), anti-coagulante (LACOSTE et al., 2003) ou protocolo utilizado (SONNLEITNER et al., 2000; KEVY e JACOBSON, 2004; MESSORA et al., 2009). Entretanto, esse é um assunto que precisa ser mais explorado, já que não existe um consenso entre os pesquisadores e alguns recomendam que esses procedimentos sejam efetuados durante o pré-operatório (ANITUA, 1999; FLORYAN e BERGHOFF, 2004; SANTOS, 2007; DE ROSSI et al., 2009; SILVA et al., 2009), enquanto outros aconselham o trans-cirúrgico (MAN et al., 2001; ROSSI JUNIOR, 2001; LEMOS et al., 2002; GARCIA, 2005; DA SILVA et al., 2007; NUNES FILHO et al., 2007; MESSORA et al., 2009).

Se o objetivo principal da sua produção é a obtenção de um plasma com uma maior concentração plaquetária possível, para que o mesmo possa exercer um efeito terapêutico sobre os tecidos nos quais ele é aplicado, ressalta-se a importância de uma avaliação mais criteriosa sobre a diferença que pode existir na plaquetometria do PRP quando a coleta de sangue é realizada na fase pré-cirúrgica em ambiente ambulatorial (M_0) ou na sala de cirurgia com o paciente já anestesiado (M_1).

Com esse intuito, coletou-se sangue de 20 cadelas que posteriormente, seriam submetidas a castração eletiva, nos dois momentos citados acima e os resultados alcançados (Tabela 01) foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades (Tabela 02), onde foi constatado que existe diferença significativa entre a plaquetometria do PRP no M_0 e M_1 .

Tabela 01: Contagem plaquetária de cada animal no sangue total e PRP em M_0 e M_1 .

Paciente	M_0		M_1	
	Sangue total	PRP	Sangue total	PRP
1	315000	1422000	240000	1045000
2	227000	1350000	174000	927000
3	258000	1525000	179000	1079000
4	272000	1481000	179000	1023000
5	299000	1740000	202000	1296000
6	238000	1418000	161000	1009000
7	319000	1694000	239000	1221000
8	309000	1640000	216000	1100000
9	204000	1078000	157000	790000
10	218000	1197000	185000	834000
11	304000	1517000	200000	807000
12	222000	1039000	198000	771000
13	279000	1391000	191000	1035000
14	221000	1292000	155000	918000
15	201000	1009000	152000	800000
16	241000	1114000	184000	819000
17	246000	1395000	195000	944000
18	237000	1129000	184000	860000
19	287000	1345000	195000	1004000
20	217000	1293000	152000	920000

OBS: O cálculo de suficiência amostral demonstrou que o n adotado foi suficiente para permitir a realização do experimento.

Tabela 02: Resultados para os tratamentos analisados no teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidades.

TRATAMENTO ANALISADO	MÉDIA	REPETIÇÕES	GRUPO DE TUKEY
Plaquetas/Sangue total/ M_0	255700	20	C
Plaquetas/Sangue total/ M_1	186900	20	C
Plaquetas/PRP/ M_0	1351450	20	A
Plaquetas/PRP/ M_1	960100	20	B

* Letras iguais significam que os tratamentos não diferem entre si.

No M_0 a plaquetometria no sangue total variou entre 201.000 e 319.000 (média 255.700) e no PRP entre 1.009.000 a 1.740.000 (média 1.351.450), enquanto que os valores alcançados no M_1 foram de 152.000 a 240.000 (média 186.900) no sangue total e 771.000 a 1.296.000 (média 960.100) no PRP.

Os tratamentos demonstraram mesmo padrão na contagem plaquetária no sangue total e no PRP, no qual os valores alcançados em M_0 tiveram um decréscimo em M_1 (Figuras 02 e 03). Os dados foram homogêneos, não tendo sido constatado em nenhum paciente um acréscimo na contagem plaquetária no sangue total ou no PRP em M_1 quando comparado com M_0 .

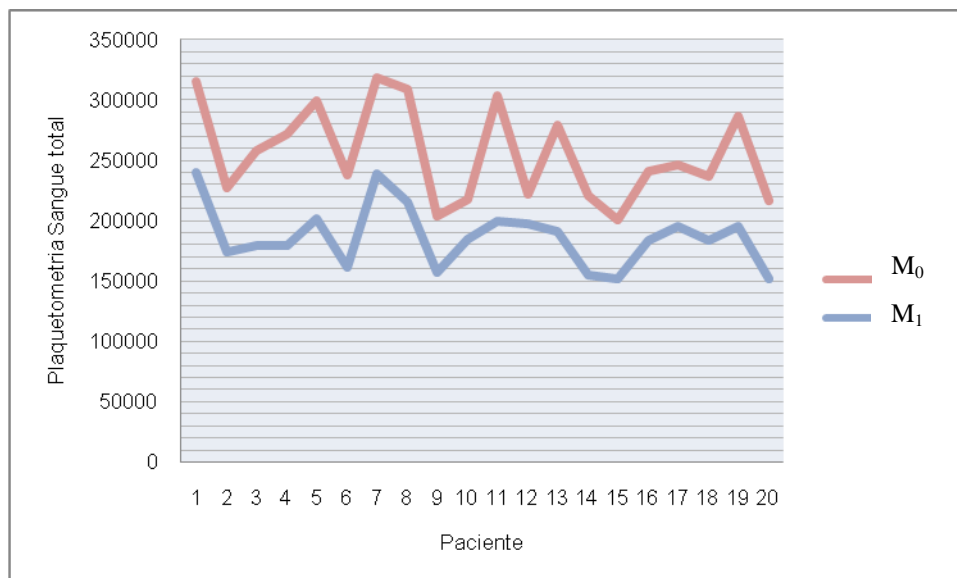


Figura 02: Plaquetometria alcançada no sangue total nos momentos M_0 e M_1 .

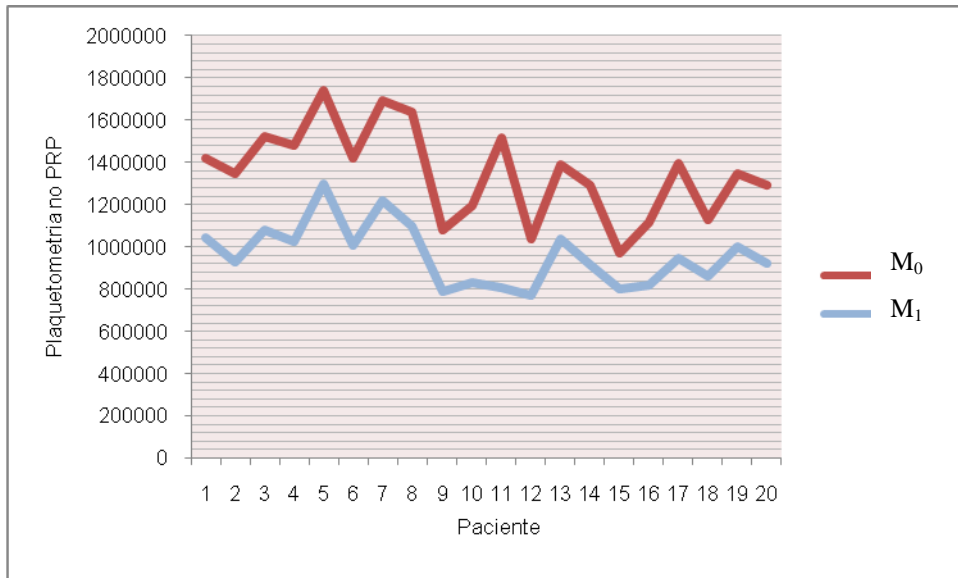


Figura 03: Contagem plaquetária do PRP em M₀ e M₁.

Quando ocorre uma diminuição das plaquetas no sangue total em M₁ como visualizado na figura 02 é de se esperar que o mesmo aconteça com as plaquetas do PRP (Figura 03), pois de acordo com Barbosa et al. (2008), a contagem de plaquetas no PRP é diretamente proporcional com a sua concentração no sangue basal. Ao analisar em valores percentuais, constatou-se que a coleta de sangue realizada no M₁ apresentou uma redução de 29% na concentração plaquetária do PRP com relação a M₀.

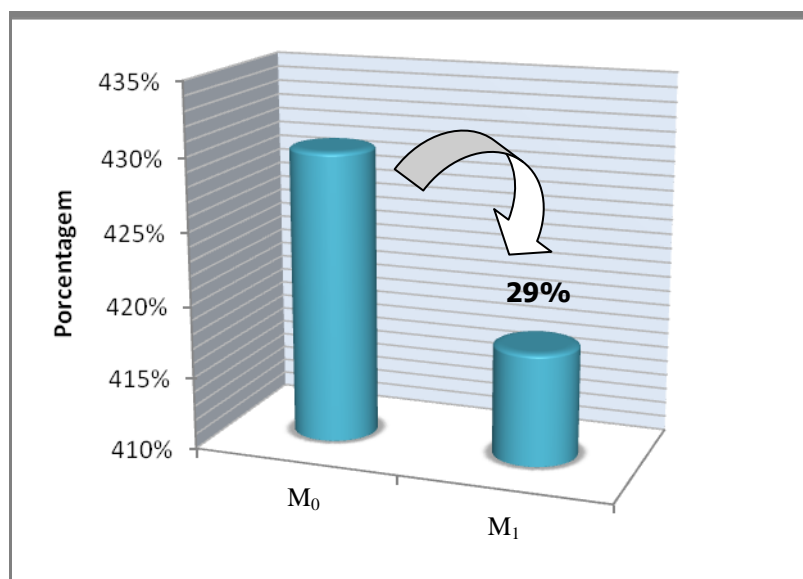


Figura 04: Média da concentração plaquetária alcançada após a produção do PRP com relação ao sangue total em M₀ e M₁ e a redução observada na plaquetometria entre os referidos momentos.

A redução evidente na plaquetometria do PRP em M_1 pode comprometer a ação terapêutica do produto, pois de acordo com Marx (2001), Jameson (2007) e Pagliosa e Alves (2007) para que o mesmo exerça sua ação biológica é necessário que ele apresente no mínimo 1.000.000 de plaquetas/ μ L. Observando a tabela 01, percebe-se que em alguns animais em M_1 não foi possível atingir esse valor e, portanto se esse PRP fosse clinicamente empregado com o intuito de melhorar a cicatrização tecidual e os resultados obtidos fossem desfavoráveis, não seria possível determinar com convicção se esses achados foram devido ao fato da concentração plaquetária alcançada se encontrar abaixo do valor recomendado ou se o produto foi realmente ineficiente.

As únicas mudanças entre M_0 e M_1 que podem ter contribuído para a redução na plaquetometria no sangue total e PRP no segundo momento, foi a fluidoterapia instituída com ringer com lactato de sódio e os fármacos administrados para anestesiá-los os pacientes (acepromazina, tramadol, propofol e isoflurano), uma vez que se optou por realizar a coleta antes do trauma cirúrgico, para diminuir a quantidade de variáveis que poderiam interferir na plaquetometria. De acordo com Man et al. (2001), o estímulo cirúrgico pode desencadear a ativação plaquetária e dos fatores de coagulação. Marx (2001) cita que durante a cirurgia é iniciada a coagulação e cicatrização o que reduz a quantidade de plaquetas no sangue total, justificando dessa maneira que a obtenção do sangue seja realizada antes de começar o procedimento cirúrgico (ADLER e KENT, 2002).

Com relação aos trabalhos realizados em veterinária ou adotando animais como modelo experimental, podem ser citados as pesquisas realizadas por Lemos et al. (2002), onde o sangue era coletado da veia jugular de cães após a sedação dos mesmos, Messoria et al. (2009), em que as amostras de sangue de coelhos só eram coletadas após a administração de xilazina e quetamina, Garcia (2005), que realizou a coleta após a anestesia geral dos cães com halotano e Suaid et al. (2007), onde o sangue era coletado dos cães após a anestesia geral. Da Silva et al. (2007), realizou as coletas com os cães anestesiados após a administração dos fármacos acepromazina, morfina, propofol e isoflurano, protocolo bastante similar ao utilizado em M_1 onde foram administrados acepromazina, tramadol, propofol e isoflurano. Possivelmente esses pacientes já estavam recebendo fluidos intravenosos, pois segundo Morais et al. (2002), a fluidoterapia é empregada durante o ato cirúrgico para a manutenção de uma via de acesso e administração dos fármacos. A administração de fluidos durante o ato cirúrgico pode definitivamente interferir na contagem plaquetária, e, portanto na qualidade final do PRP, porque de acordo com Marx (2001) e

Roukis et al. (2006) ela dilui o sangue total, o que resulta na diminuição da contagem plaquetária.

É provável que esses pesquisadores tenham optado por realizar as coletas como os pacientes anestesiados para que o procedimento fosse mais facilmente executável, especialmente, quando são utilizados protocolos ou equipamentos que exigem maiores volumes de sangue, como os empregados por Green e Klink (1998), Scarso Filho (2002), Fürst et al. (2003) e Henderson et al. (2003), que coletaram entre 300 e 450 mL de cada paciente. Entretanto, Jain (1993c) cita que anestesiá-lo para coletar sangue deve ser uma prática desaconselhável, mesmo que o intuito da contenção farmacológica seja facilitar o procedimento, porque isso pode alterar os valores de muitos parâmetros hematológicos.

Weiss (2000), Zimmerman (2000), Rebar et al. (2003), Gentry (2006) e Walker (2009) relatam que muitos fármacos podem induzir tanto uma diminuição na contagem quanto na função plaquetária. Entretanto não foi possível determinar se os fármacos especificamente empregados na anestesia dos pacientes em M_1 interferiram na diminuição da plaquetometria, pois muitos são os mecanismos sobre os quais diferentes classes farmacológicas podem atuar induzindo a uma trombocitopenia, como por exemplo, supressão ou diminuição da síntese, produção de anticorpos contra plaquetas ou complexos formados pelo fármaco e plaqueta, sequestro (REBAR et al., 2003), inibição da liberação (KERR, 2003), aumento no consumo, agregação direta ou perda excessiva (ZIMMERMAN, 2000), entretanto pouca informação a respeito desse assunto em animais tem sido relatada (JAIN, 1993a). Sabe-se, entretanto, que alguns desses mecanismos podem levar alguns dias para surtir efeito sobre a plaquetometria (ex. supressão medular), e levando em consideração o fato da trombocitopenia em M_1 ter sido notada alguns minutos após a administração dos fármacos, caso estes tenham induzido a uma diminuição plaquetária, a mesma só pode ter sido em decorrência de uma ação mais imediata (ex. sequestro esplênico).

Outro agravante que impossibilita sugerir e principalmente, indicar se algum deles teve ação deletéria sobre a quantidade de plaquetas nos animais em questão é que até o atual momento não existe na literatura a descrição da ação dos fármacos acepromazina, tramadol, propofol e isoflurano sobre a contagem plaquetária, apesar de ser descrito que os anestésicos gerais (REBAR et al., 2003) e fenotiazinas (KERR, 2003) podem produzir uma alteração funcional (trombocitopatia). Porém, mesmo que esses fármacos não tenham levado a uma diminuição na contagem plaquetária, não se recomenda a coleta de sangue após sua administração, em decorrência da possibilidade dos mesmos induzirem a uma alteração na

função das plaquetas, diminuindo o seu poder de agregação e ativação, o que não é desejável para o PRP.

A determinação do intervalo de tempo entre a coleta e uso de PRP em M_0 pode estar diretamente relacionada a metodologia de produção empregada. Como os aparelhos automatizados preparam o PRP em no máximo 30 minutos é possível que o sangue seja coletado entre 1 hora a 30 minutos antes da cirurgia. Quando são empregados protocolos que usam centrífugas laboratoriais, no qual todo processo de separação dos constituintes sanguíneos é manual e, conseqüentemente, mais demorado, recomenda-se que a coleta seja realizada entre 2 a 3 horas antes da cirurgia, como descrito em pesquisa realizada por Quintana (2008), em que esse procedimento era realizado 72 horas prévio à cirurgia. Esse seria o tempo necessário para a coleta do sangue, centrifugação do material, aspiração do plasma, dissolução do botão plaquetário e adição do fator ativador ou preparação do mesmo (caso seja usado a trombina autóloga).

Essa recomendação é, especialmente, importante quando a equipe ainda não tem muito prática com a metodologia usada na fabricação do PRP, principalmente, se é usado uma centrífuga comum, pois durante a etapa de aprendizagem o processo pode ser bem laborioso e lento. Em alguns pacientes do projeto piloto no qual a coleta foi realizada poucos minutos antes da cirurgia, os animais foram mantidos sob efeito da anestesia mesmo após a realização da OSH até que se concluísse o preparo do PRP, o que expõe o animal a um maior risco anestésico.

Se o cirurgião desejar aprender o protocolo para adquirir experiência e produzir o PRP todas as vezes em que for utilizá-lo visando reduzir os erros operacionais, é imprescindível que o processamento do material seja na fase pré-operatória (M_0), pois durante o trans-cirúrgico o mesmo já se encontrará paramentado, impossibilitando dessa maneira, que prepare o concentrado de plaquetas. De acordo com Garcia (2005), mesmo que todo processo seja realizado por um único operador e cuidados sejam tomados durante a preparação do PRP, ainda assim, pequenas modificações técnicas podem ocorrer, uma vez que o produto é manipulado repetidas vezes. Se essas variações são passíveis de ocorrerem quando a metodologia é realizada por um único operador, estima-se que maiores alterações ocorrerão se a cada vez que o PRP for preparado, uma pessoa diferente seja responsável por isso. Entretanto alguns artigos descrevem a preparação do PRP sendo realizada por enfermeiros (MAN et al., 2001) ou anestesistas (WHITMAN et al., 1997; FLORYAN e BERGHOFF, 2004).

Apesar da coleta no M_0 também poder ter alguma utilidade no que diz respeito a possibilidade de armazenamento do material para uso posterior, não se recomenda que a mesma seja realizada muitas horas antes da cirurgia, como relatado por Feres Junior et al. (2004), no qual o preparo ocorreu no período de até 24 horas anterior a cirurgia. Como os hemoderivados processados em circuito aberto devem ser utilizados em no máximo 6 horas após sua obtenção (BARROSO et al., 2007), a mesma recomendação deve ser seguida para o PRP (SÁNCHEZ et al., 2003; FLORYAN e BERGHOFF, 2004; BARROSO et al., 2007), pois durante seu estoque as plaquetas podem ser ativadas, resultando no comprometimento da sua função biológica (LANDI e MARQUES JÚNIOR, 2003). Em estudo realizado por Neiva et al. (2003), foi demonstrado que a concentração de plaquetas e o poder de agregação foram reduzidos, significativamente, após 24 horas de estocagem.

Segundo Lemos et al. (2002), o PRP deve ser preparado durante a cirurgia, para reduzir as chances de rotular, equivocadamente, uma amostra e trocar o material proveniente de diferentes pacientes. Todavia isso é solucionado usando o frasco a vácuo, que por apresentar rótulo, permite a adequada identificação de cada paciente.

CONCLUSÃO

O melhor momento para realizar a coleta do sangue e processamento desse material visando a obtenção de um plasma rico em plaquetas é no período pré-operatório (M_0).

REFERÊNCIAS

1. ADLER, S. C.; KENT, K. J. Enhancing wound healing with growth factors. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.10, p. 129-146, 2002.
2. AGHALLO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects. A pilot study. **Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 10, p. 1176-81, 2002.
3. ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, p. 529–535, 1999.
4. BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335–1340, 2008.

5. BARROSO, C. S. T.; BENITO, J. C.; PUIG, A. G. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. **Ver. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.**, v. 29, n. 4, p. 240-248, 2007.
6. COLES, E. H. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: _____. **Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. Cap. 5, p. 144-163.
7. DA SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007.
8. DE ROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S.; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, 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.
9. FERES JUNIOR, F.; PASSANEZI, E.; GREGHI, S. L. A.; PASSANEZI, A. Análise comparativa do índice de sucesso dos implantes osteointegrados com e sem a utilização de PRP no protocolo de fixação. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, p. 9-21, 2004.
10. FERRAZ, V. C. M.; FERRIGNO, C. R. A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of plateletrich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 435-440, 2007.
11. FLORYAN, K. M.; BERGHOFF, W. J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. **AORN Journal**, v. 80, n. 4, p. 668-674, 2004.
12. FÜRST, G.; GRUBER, R.; TANGL, S.; ZECHNER, W.; HAAS, R.; MAILATH, G.; SANROMAN, F.; WATZEK, G. Sinus grafting with autogenous platelet-rich-plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, p. 500-508, 2003.
13. GARCIA, R. V. **Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica**. 2005. 93f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2005.
14. GENTRY, P. A. Coagulação sanguínea e hemostasia. In: REECE, W. O. **Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 4, p. 49-64.

15. GREEN, D.; KLINK, B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 101, n. 4, p. 1161-1162, 1998.
16. 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 autologous platelet gel on wound healing. **Ear Nose & Throat Journal**, v. 82, n. 8, p. 598- 602, 2003.
17. JAIN, N. C. The platelets. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 6, p. 105-132 (a).
18. JAIN, N. C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 2, p. 19-53 (b).
19. JAIN, N. C. Examination of the blood and bone marrow. In: _____. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 1, p. 1- 18 (c).
20. JAMESON, C. A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. **Labmedicine**, v. 38, n. 1, p. 39- 42, 2007.
21. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Células do sangue. In: _____. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 12, p. 223-237.
22. KERR, M. G. Plaquetas (trombócitos) e fatores de coagulação. In: _____. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 2, p. 45-59.
23. KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **The Journal of the American Society of Extra-Corporeal Technology**, v. 36, p. 28-35, 2004.
24. KIERSZENBAUM, A. L. Sangue e hematopoiese. In: _____. **Histologia e Biologia Celular**. Uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 6, p. 157-188.
25. LACOSTE, E.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet concentrates: effect of calcium and thrombin on endothelial cells proliferation and growth factor release. **Journal Periodontal.**, v. 74, n. 10, p. 1498-1507, 2003.
26. LAGUNAS, J. G. Plasma rico em plaquetas. **Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.**, v. 28, n. 2, p. 89-99, 2006.
27. LANDI, E. P.; MARQUES JÚNIOR, J. F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 25, n. 1, p.39-46, 2003.

28. LEMOS, J. J.; JUNIOR ROSSI, R.; PÍSPICO, R. (2002). **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos - Proposta de um protocolo de obtenção simplificado.** Disponível em: <http://www.odontologia.com.br>. Acesso em: 30.11.08.
29. MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1267-1274, 2009.
30. MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107, p. 229-237, 2001.
31. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. M.; SÁNCHEZ, J. C.; LAFUENTE, J. C. G.; TRAPERO, J. C.; GÓMEZ, G. C. E.; LESTÓN, J. M. S. Do ambulatory-use Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks? **Medicina Oral**, v. 7, n. 5, p. 383-390, 2002.
32. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.
33. MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.
34. MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, n. 62, p. 489-496, 2004.
35. MESSORA, M. E.; NAGATA, M. J. H.; MELO, L. G. N.; FURLANETO, F. A. C.; DELIBERADOR, T. M.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009.
36. MEUNIER, I. M. J.; SILVA, J. A. A.; FERREIRA, R. L. C. **Inventário Florestal. Programa de estudo.** Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 2001. 189 p.
37. MORAIS, H. A.; DEARO, A. C. O.; PEREIRA, P. M.; REICHMANN, P. Fluidoterapia e transfusão sanguínea. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 19, p. 477-501.
38. MOTA, T. M.; TUDURY, E. A. Hemostasia fisiológica. In: TUDURY, E. A.; POTIER, G. M. A. **Tratado de Técnica Cirúrgica Veterinária.** São Paulo: MedVet, 2009. Cap. 7, p. 101-107.
39. NEIVA, T. J. C.; MACHADO, M. J.; HOEHN, M.; HERMES, E. M.; VITURI, C. L.; FERREIRA, J. S.; D'AMICO, E. A. Evaluation of platelet aggregation in platelet

- concentrates: storage implications. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 25, n. 4, p. 207-212, 2003.
40. NUNES FILHO, D. P.; LUPPINO, F.; YAEDÚ, R. Y. F.; CARVALHO, P. S. P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 3, p. 263-269, 2007.
41. PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1202-1205, 2007.
42. QUINTANA, V. M. M. **Análisis de la consolidación ósea en fracturas de ángulo mandibular tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento**. 2008. 48f. Monografia (Residência em cirurgia plástica e reconstrutiva) – Instituto Mexicano del Seguro Social Unidad Médica de Alta Especialidad, Guadalajara, 2008.
43. REBAR, A. H.; MACWILLIAMS, P. S.; FELDMAN, B. F.; JR METZGER, F. L.; POLLOCK, R. V. H.; ROCHE, J. Plaquetas. In: _____. **Guia de Hematologia para Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 10, p. 131-156.
44. REECE, W. O.; SWENSON, M. J. Composição e funções do sangue. In: REECE, W. O. **Dukes/Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 3, p. 24-48.
45. ROSSI JUNIOR, R. (2001). **Protocolo simplificado para obtenção de P.R.P.** Disponível em: <www.plaquetas.net>. Acesso em: 17.12.08.
46. ROUKIS, T. S.; ZGONIS, T.; TIERNAN, B. Autologous platelet-rich plasma for wound and osseous healing: A review of the literature and commercially available products. **Advances in Therapy**, v. 23, n. 2, p. 218–237, 2006.
47. SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18, p. 93–103, 2003.
48. SANTOS, L. A. U. **Efeito da utilização do plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos**. 2007. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2007.
49. SCARSO FILHO, J. **Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular. Estudo “in vitro”**. 2002. 75f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

50. SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTERIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 129-134, 2009.
51. SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 15, p. 879-882, 2000.
52. STONE, E. A. Sistema Reprodutivo. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. Vol. II. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 98, p. 1487-1502.
53. SUAID, F. F.; SANTAMARIA, M. P.; CARVALHO, M. D.; SOUZA, H. W.; SALLUM, E. A.; NOCITTI JUNIOR, F. H. Avaliação clínica da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em retrações gengivais criadas em cães. **Periodontia**, v. 17, n. 1, p. 68-75, 2007.
54. THEORET, C. The use of platelet-rich plasma (PRP) in wound management. In: NAVC North American Veterinary Conference, Orlando, 2008. **Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference**, Orlando, 2008.
55. 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 Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.
56. WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3. ed. São Paulo: MedVet, 2009. Cap. 26, p. 390-422.
57. WEIBRICH, G.; KLEIS, W. K. G.; HAFNER, G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 17, n. 2, p. 184-190, 2002.
58. WEISS, D. J. Platelet production defects. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap. 66, p. 469-471.
59. WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A. G.; SIEVERT, A. N.; SISTINO, J. J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v. 23, p. 283-289, 2008.

60. WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, p. 1294-1299, 1997.
61. ZIMMERMAN, K. L. Drug-induced thrombocytopenia. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap. 67, p. 472-477.

ARTIGO III

AVALIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ATIVADO COM TROMBOPLASTINA NA INTEGRAÇÃO DE FLAPES CUTÂNEOS EM CÃES

EVALUATION OF PLATELET-RICH PLASMA ACTIVATED WITH THROMBOPLASTIN ON SKIN FLAPS INTEGRATION IN DOGS

RESUMO

A cirurgia reconstrutiva é um ramo da Medicina muito explorado, em decorrência da alta frequência de acidentes envolvendo grandes perdas de pele e/ou outros tecidos. Uma opção bastante empregada para restaurar esses defeitos é a utilização de flapes cutâneos, entretanto dependendo da sua dimensão, pode ocorrer necrose parcial do mesmo por causa da vascularização deficiente na sua extremidade distal. Muitos produtos tem sido testados visando aumentar a angiogênese de flapes e, conseqüentemente a sua viabilidade. O plasma rico em plaquetas (PRP), um produto de origem autógena obtido após a centrifugação do sangue, estimula a formação de novos vasos. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar por meio de análises clínicas, histológicas e morfométricas, o uso do plasma rico em plaquetas ativado com tromboplastina no estímulo da angiogênese e, conseqüentemente, no incremento da integração de flapes cutâneos de avanço randomizado experimentalmente produzidos em animais da espécie canina. O grupo experimental foi composto por oito cadelas (idade de 2 a 5 anos) com peso entre 10 a 15 kg, no qual foram confeccionados dois flapes de avanço randomizado na região abdominal ventral. Em um dos flapes, considerado controle (FC) não foi utilizado nenhum produto terapêutico, enquanto que no flape contralateral, denominado tratado (FT), foi aplicado entre o mesmo e o leito receptor um gel de PRP. As áreas foram clinicamente avaliadas a cada dois dias até o 7º dia de pós-operatório e os resultados analisados pelo Índice de Eficiência do Tratamento (IET). Com 10 dias foi realizada biopsia de ambos os flapes para submeter o material ao exame histológico e efetuar a morfometria dos vasos sanguíneos. Os resultados clínicos, histológicos e morfométricos demonstraram que não houve diferença significativa na viabilidade dos flapes tratados com PRP ativado com tromboplastina em relação ao grupo controle até o décimo dia de pós-operatório.

Palavras-chaves: Gel de plaquetas, fatores de crescimento, retalhos cutâneos.

ABSTRACT

Reconstructive surgery is a very explored field in medicine, due to high incidence of accidents involving large loss of skin and other tissues. A good option is the use of skin flaps, however depending on their size, partial necrosis of the tissue can occur due to a poor vascularization at its distal part. Many products have been tested to increase vascularity of flaps and therefore its viability. According on literature, the platelet-rich plasma (PRP), an autogenous product obtained after blood centrifugation, can stimulate the formation of new blood vessels. The objective of this study was to evaluate by clinical, histological and morfometric analysis the use of platelet-rich plasma activated with thromboplastin to stimulate angiogenesis and consequently the integration of advanced random skin flap experimentally produced in dogs. The experimental group consisted of eight dogs (2 to 5 years) weighing 10 to 15 kg, in which were made two advanced random flaps on the ventral abdominal region. In one of the flaps, considered control (FC) no therapeutic product was used, whereas in the other flap, named treated (FT), was applied a PRP gel. The areas were clinically evaluated every two days until the 7th day after surgery and the results analyzed by a Ratio of Treatment Efficiency. With 10 days biopsy were performed on both flaps for histological and morphometric examination. The clinical, histological and morphometric results showed no significant difference in viability of flaps treated with PRP compared to control group until the 10th day after surgery.

Key-words: platelet gel, growth factors, skin flaps.

INTRODUÇÃO

Em Medicina Veterinária os traumas cutâneos resultantes de diversas causas, entre elas os atropelamentos e brigas entre animais, são motivos frequentes de atendimento clínico e/ou cirúrgico. Pelo fato da pele exercer diversas funções importantes, especialmente servir como barreira contra os agentes externos, o comprometimento de grandes proporções da mesma pode resultar em perda da função local, infecção ou morte do paciente.

Dependendo das características da lesão, como tamanho, profundidade, grau de contaminação, tempo desde o trauma, etiologia, localização, entre outros, o profissional vai ter a seu dispor muitas alternativas para restaurar esse tecido, desde a cicatrização por primeira intenção, até a utilização de técnicas mais elaboradas como os expansores cutâneos.

Os flapes (ou retalhos cutâneos) são uma opção para o recobrimento imediato de áreas lesadas, tendo uma maior integração ao leito receptor quando comparado ao enxerto, pois ele é um tecido cuja vascularização é mantida através dos vasos provenientes da sua base.

Mesmo apresentando vascularização própria, algumas vezes quando os flapes tem grandes dimensões, o suprimento sanguíneo pode não alcançar a sua extremidade mais distal, resultando na perda parcial do mesmo, sendo essa, uma das principais complicações associadas ao emprego dessa técnica reconstrutiva.

Muitos estudos já foram e continuam a ser desenvolvidos testando uma série de produtos e técnicas visando melhorar o aporte sanguíneo à extremidade distal do flape, para permitir que 100% do tecido seja mantido viável após a sua transferência.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto cujo uso tem sido relatado desde 1990 em seres humanos em muitos tipos de procedimentos cirúrgicos, inclusive os reconstrutivos, pois é relato que o mesmo tem a capacidade de estimular vários processos celulares importantes para a restauração de tecidos danificados, como a mitose, diferenciação celular, quimiotaxia e angiogênese. Isso ocorre pelo estímulo provocado pelos fatores de crescimento que se encontram armazenados nas plaquetas e que são liberados “in situ” após a sua ativação. Mais especificamente com relação a angiogênese, essa potencialidade já foi atribuída a muitos deles, como o fator de crescimento vascular endotelial.

Baseado nessas informações foi objetivo desse experimento avaliar por meio de análises clínicas, histológicas e morfométricas, o uso do plasma rico em plaquetas no estímulo da angiogênese e, conseqüentemente, no incremento da integração de flapes cutâneos de avanço randomizado experimentalmente produzidos em animais da espécie canina.

REVISÃO DE LITERATURA

A pele é o órgão que recobre a superfície corporal, sendo formada por uma camada de tecido epitelial conhecida por epiderme e uma camada de tecido conjuntivo, denominada derme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; PAVLETIC, 2007a), formando uma barreira completa contra o ambiente externo. Apresenta ainda as funções de termoregulação, armazenamento, secreção, sensorial entre outras (ASPINALL e O'REILLY, 2004).

A mesma é continuamente exposta a traumatismos que resultam em perdas extensas de tecido, que em geral necessitam de tratamento especializado para que a região restabeleça sua anatomia e função (COELHO et al., 1999).

Para tratar tais lesões podem ser realizadas a aproximação direta das margens através de suturas (TROUT, 2007), a aplicação de substitutos temporários de pele (COELHO et al., 1999), o emprego de produtos fitoterápicos (NITZ et al., 2006; ESTEVÃO et al., 2009), enxertos (PAIM et al., 2002) ou flapes (FARIA et al., 1986; SAKUMA et al., 2003; RAMOS et al., 2007) ou até mesmo a associação entre diferentes técnicas cirúrgicas (MOTA, 2009).

Os flapes (retalhos ou transplantes pediculados) representam um segmento de pele transferido de uma área doadora para outra chamada receptora, onde irão cobrir defeitos (HEDLUND, 2005), mas mantendo com a primeira uma conexão por meio de um pedículo que preserva sua irrigação sanguínea (KAMAKURA et al., 1986; PAVLETIC, 2007b). Como apresenta vascularização própria e não depende daquela proveniente do leito receptor (KAMAKURA et al., 1986), o sangue proveniente de seu pedículo é essencial para a sua sobrevivência (OLOUMI, 2004).

Apresentam a vantagem de permitir a cobertura imediata da região o que diminui o tempo de cicatrização (HEDLUND, 2005) e os custos com o tratamento (SAKUMA et al., 2003), apresentando ainda, excelentes resultados estéticos e funcionais (BIONDO-SIMÕES et al., 2000).

As principais indicações para o uso de retalhos são para cobrir áreas cruentas com vascularização prejudicada, promover a proteção de regiões submetidas a compressão contínua (ex. escaras de decúbito) ou onde estão expostas estruturas importantes (ex. vasos sanguíneos, nervos) (KAMAKURA et al., 1986; PAVLETIC, 2007b) ou em locais onde o fechamento primário com suturas resultaria em uma tensão excessiva (TOBIAS, 2009). Na presença de grandes lesões de pele, esses podem ser em muitas vezes a única opção terapêutica para restaurar cirurgicamente o local (BIONDO-SIMÕES et al., 2000).

Os flapes são classificados de diferentes maneiras, levando em consideração a sua localização, forma, irrigação ou tecidos que o constituem (SAKUMA et al., 2003; HEDLUND, 2005). Podem ser categorizados ainda de acordo com a quantidade de pedículos, em monopediculado, bipediculado ou multipediculado (KAMAKURA et al., 1986).

Com relação a constituição, os simples são aqueles formados apenas pela pele e tela subcutânea (KAMAKURA et al., 1986), enquanto que compostos, complexos ou mistos são aqueles que apresentam além da pele, outros tecidos, tais como músculo, gordura, osso ou cartilagem (PAVLETIC, 2007b).

Flapes usados para cobrir defeitos próximos a eles são denominados de retalhos locais, enquanto que aqueles empregados para cobrir regiões afastadas recebem o nome de distantes (HEDLUND, 2005; PAVLETIC, 2007b).

De acordo com a forma, podem ser de avanço (de pedículo único, bipediculado, H plastia e V-Y), rotacional, de transposição, de interpolação, em bolsa ou em dobradiça (HEDLUND, 2005). Nos flapes de avanço a direção da pele não é modificada, sendo esse um dos mais simples a ser realizado, pois não é necessário criar uma nova ferida para cobrir o defeito primário (TOBIAS, 2009).

Referente a sua vascularização, quando o retalho incorpora uma artéria e veia cutânea direta é considerado de padrão axial. Quando é irrigado por ramos terminais da artéria cutânea direta através do plexo venoso subdérmico (ou profundo) ele é denominado de flape de plexo subdérmico (ou randomizado), sendo esse o tipo mais frequentemente utilizado em cães e gatos (PAVLETIC, 2007b).

A viabilidade dos flapes é, altamente, dependente da sua vascularização (CAMPOS et al., 2001) e por isso o emprego de substâncias visando incrementar a sua irrigação é uma prática relativamente comum (ESTEVÃO et al., 2009).

O plasma rico em plaqueta (PRP) é um concentrado de plaquetas de origem autógena (BARROSO et al., 2007) obtido com a centrifugação de amostras de sangue (DA SILVA et al., 2007; PAGLIOSA e ALVES, 2007).

O uso terapêutico do PRP é uma biotecnologia relativamente nova (QUINTANA, 2008) descrita desde 1990 para contribuir com a cicatrização de tecidos moles e duros (FLORYAN e BERGHOFF, 2004).

Quando aplicado sobre o leito cirúrgico, deposita no local fatores de crescimento (FCs), além de muitos outros elementos presentes no plasma tais como, fatores de coagulação, catecolaminas, serotonina e ATP (LOPEZ et al., 2007). Os FCs são importantes para a reparação tecidual porque promovem a angiogênese, mitogênese, quimiotaxia (MAIA e SOUZA, 2009) e diferenciação celular (LAGUNAS, 2006).

Muitos dos benefícios citados com relação ao uso do PRP são aplicáveis para as cirurgias de pele e particularmente, os flapes (ADLER e KENT, 2002). Nas cirurgias de retalhos, o PRP auxilia no processo de hemostasia e estimula a formação de novos vasos sanguíneos, o que por sua vez, reduz as complicações pós-operatórias como o hematoma, seroma e isquemia (MAN et al., 2001; VENDRAMIN et al., 2006). Outros autores que já descreveram sobre o potencial do PRP em intensificar a angiogênese foram Green e Klink (1998), Barroso et al. (2007), Jameson (2007), Moreira et al. (2008) e De Rossi et al. (2009).

Ao total já foram identificados em torno de sete FCs (MARX, 2004), entretanto os que comprovadamente tem participação na formação vascular são o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (LEMOS et al., 2002; EPPLEY et al., 2004; FLORYAN e

BERGHOFF, 2004), fator de crescimento epitelial (EGF) (VENDRAMIN et al., 2006), fator de crescimento transformador beta (TGF β) (EPPLEY et al., 2004), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2002).

O VEGF, também conhecido por fator de permeabilidade vascular (VPF), é um dos mais importantes na estimulação da angiogênese “*in vivo*” através de um processo complexo que envolve a mitose das células endoteliais. Apresenta ainda a capacidade de aumentar a permeabilidade de microvasos da pele, parede peritoneal, mesentério e diafragma (DVORAK et al., 1995).

Já o PDGF atua pela estimulação da mitose de células do endotélio vascular (PIERCE e MUSTOE, 1995; MOREIRA et al., 2008) e das células musculares lisas dos vasos sanguíneos (HOFFBRAND et al., 2004), sendo a angiogênese uma das suas principais funções (MARX et al., 1998).

O EGF também apresenta potencial mitogênico sobre as células endoteliais (EPPLEY et al., 2004) enquanto que o FGF estimula as células do músculo liso e endoteliais (PIERCE e MUSTOE, 1995).

O processo de produção do PRP envolve a coleta atraumática de amostras de sangue total (SANTOS, 2005; JAMESON, 2007), centrifugação do material (REECE e SWENSON, 2006) e ativação do concentrado de plaquetas pela adição de um agente agonista (CAMARGO et al., 2002; GENTRY, 2006) para que haja a efetiva liberação dos FCs no local da sua aplicação (WHITMAN et al., 1997; ROUKIS et al., 2006). A necessidade de ativar as plaquetas no momento da sua aplicação e não antes disso, tem a finalidade de prevenir a degranulação das plaquetas e liberação precoce dos FCs (BARROSO et al., 2007).

Apesar de muitos artigos descreverem que o PRP aplicado em feridas tem o potencial de incrementar a regeneração tecidual, o uso difundido do produto ainda não ocorreu (WHITLOW et al., 2008) e também existem controvérsias na literatura com relação aos benefícios do seu uso (FRÉCHETTE et al., 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Antes do desenvolvimento da pesquisa, o projeto foi encaminhado para apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), tendo sido aprovado pela mesma (Anexo A/Protocolo nº 23082.005458/2009).

Para obter uma amostra mais homogênea e conseqüentemente, diminuir a variabilidade visando trabalhar com um menor número de animais possíveis foram amostradas somente fêmeas de médio porte (entre 10 e 15 kg), adultas (dois a cinco anos) e clinicamente saudáveis.

Cadelas foram avaliadas por meio de uma triagem com o intuito de selecionar as que iriam compor o grupo experimental. Essas foram submetidas a exame clínico, no qual foram colhidas amostras de sangue para realização de hemograma e bioquímica sérica (Alanina Aminotransferase¹, Fosfatase Alcalina², Uréia³ e Creatinina⁴).

Após a obtenção dos resultados desses exames, as oito cadelas selecionadas nas quais não existiam sinais de doença local ou sistêmica foram vacinadas contra raiva⁵ pela via subcutânea (SC) e vermifugadas pela via oral (VO) com medicamento a base de praziquatel, pamoato de pirantel e febantel⁶.

Três semanas antes da data prevista para o procedimento cirúrgico as pacientes foram internadas no canil do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), onde permaneceram em boxe individual, para que houvesse um período de adaptação ao ambiente e manejo. Como dieta, proporcionou-se ração comercial⁷ duas vezes ao dia e água “*ad libitum*”.

Após jejum alimentar de 12 horas e hídrico de quatro horas e, aproximadamente, três horas antes do procedimento cirúrgico, procedeu-se a coleta do sangue para produção do PRP que seria posteriormente, utilizado no flape cutâneo.

A área da coleta tinha os pêlos removidos com uma lâmina de tricotomia descartável⁸ e era higienizada com solução de álcool a 70%⁹. Com a paciente em decúbito lateral e fisicamente contida, realizava-se a venopunção da cefálica ou safena usando um sistema de

¹ ALT/GPT Liquiform – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa/MG

² Fosfatase Alcalina Liquiform – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa/MG

³ Uréia CE – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa/MG

⁴ Creatinina K– Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa/MG

⁵ Vacina anti-rábica Fuenzalida Modificada – Tecpar, Curitiba/PR

⁶ Printel Plus – Centagro, Batatais/SP

⁷ K&S Pedacos macios com carne – Total Alimentos, Três Corações/MG

⁸ Lâmina Wilkinson Sword® – Gillete do Brasil, Manaus/AM

⁹ Álcool etílico hidratado a 70% – Miyako do Brasil ind. e com. Ltda., Guarulhos/SP

coleta a vácuo. Foram preenchidos quatro frascos de vidro de 4,5 mL contendo citrato de sódio como anti-coagulante¹⁰ (para produção do PRP) e um tubo de plástico de 2 mL com ácido etileno diamino tetra acético (EDTA)¹¹ (para o hemograma e plaquetometria no sangue total). Após os procedimentos de coleta, as amostras de sangue foram encaminhadas ao laboratório para serem processadas imediatamente (Figura 01).

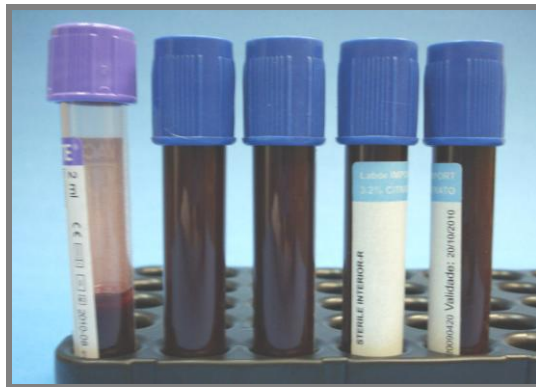


Figura 01: Tubos colhidos para realização do hemograma e plaquetometria no sangue total (primeiro frasco à esquerda) e produção e contagem plaquetária no PRP (demais frascos).
Fonte: Aleixo, 2009.

Os quatro tubos usados para produzir o PRP foram centrifugados a 1200 rotações por minutos (rpm) por 10 minutos, em centrífuga laboratorial comum¹². Após a primeira centrifugação, pipetou-se todo o plasma e a camada leucoplaquetária de cada frasco com uma pipeta automática de precisão¹³ e ponteiras estéreis¹⁴ (1 mL, 100 μ L e 10 μ L), os quais foram transferidos para outros quatro frascos estéreis (sem aditivo)¹⁵ para a realização de uma segunda centrifugação a 1600 rpm por 10 minutos no mesmo equipamento. Após esse procedimento, descartava-se 80% do plasma sobrenadante, sendo o restante homogeneizado às plaquetas decantadas (botão plaquetário), obtendo-se assim, o PRP. Um dos frascos era reservado para realização da avaliação quantitativa do produto pelo método da contagem direta descrita por Coles (1984) na câmara de Neubauer¹⁶ usando o diluente de Rees-Ecker e avaliação morfológica das plaquetas através do exame microscópico do esfregaço sanguíneo.

¹⁰ Tubos de coleta a vácuo com citrato de sódio a 3,2% – Labor Import, Osasco/SP

¹¹ Tubo de coleta a vácuo com EDTA Vacuette® – Vacuette do Brasil, Americana/SP

¹² Centrífuga de Bancada Baby® I Modelo 206 BL – Fanem®, Guarulhos/SP

¹³ Pipetador automático – Kacil indústria e comércio Ltda., Recife/PE

¹⁴ Ponteira tipo Gilson para pipeta automática – Cral artigos para laboratório Ltda., Cotia/SP

¹⁵ Tubo de coleta a vácuo sem aditivo Vacuette® – Vacuette do Brasil, Americana/SP

¹⁶ Neubauer improved Bright Line – Optic Labor, Balgach/Suíça

Do sangue coletado no frasco com EDTA, efetuou-se o hemograma e a contagem plaquetária, para avaliar o estado de saúde do paciente no dia da cirurgia e determinar a plaquetometria, que serviria de referência para o valor encontrado no PRP.

Enquanto se executavam todas as etapas anteriormente descritas, a paciente era encaminhada para a sala de preparação cirúrgica onde era realizada ampla tricotomia da região abdominal e os procedimentos pré-anestésicos.

O protocolo anestésico instituído foi composto pelos fármacos acepromazina¹⁷ (0,1 mg/kg) e cloridrato de tramadol¹⁸ (1 mg/kg), associados na mesma seringa pela via intramuscular (IM) como medicação pré-anestésica (MPA). Na sequência foram administrados meloxicam¹⁹ (0,1 mg/kg) e enrofloxacin²⁰ (5 mg/kg), ambos pela via SC. Após o transporte da paciente para a sala de cirurgia, a indução anestésica foi realizada com propofol²¹ (4 mg/kg) via intravenosa (IV), seguidos de intubação endotraqueal, para manutenção da anestesia com isoflurano²² em aparelho de anestesia inalatória em circuito semi-fechado. A paciente permaneceu em venoclise com administração de ringer com lactato de sódio²³ durante todo procedimento cirúrgico.

Realizou-se a anti-sepsia da área cirúrgica por meio do pincelamento com solução de álcool a 70%²⁴ no primeiro momento, seguido pela tintura de iodo a 2%²⁵, finalizando com digluconato de clorexidina a 2%²⁶ dois minutos após a aplicação do segundo anti-séptico e os panos de campo foram posicionados delimitando o campo operatório.

Para ter acesso a cavidade abdominal e realizar a ovariosalpingohisterectomia (OSH) de acordo com técnica preconizada por Stone (2007), efetuou-se a partir da cicatriz umbilical (em sentido caudal) uma incisão retilínea na linha média ventral de 10 cm de comprimento. Nesse momento, também foram realizadas duas incisões de pele de 4 cm de comprimento (a partir das extremidades cranial e caudal da incisão na linha média) paralelas à primeira, sendo uma do lado direito (margem cranial) e a outra à esquerda (margem caudal) e duas incisões transversais de 1 cm, visando conectar as incisões paralelas à incisão central (Figura 02). As incisões foram realizadas superficialmente e previamente à realização da OSH para demarcar

¹⁷ Acepromazin[®] 0,2% – Syntec do Brasil Ltda., Cotia/SP

¹⁸ Tramal[®] 5% – União química, Pouso Alegre/MG

¹⁹ Maxicam[®] 0,2% – Ourofino Saúde Animal Ltda. – Cravinhos/SP

²⁰ Baytril[®] 5% – Bayer, São Paulo/SP

²¹ Propovan[®] 1% – Cristália, Itapira/SP

²² Isoforine[®] – Cristália, Itapira/SP

²³ Ringer Lactato[®] – Biosintética, Ribeirão Preto/SP

²⁴ Álcool etílico hidratado a 70% – Miyako do Brasil ind. e com. Ltda., Guarulhos/SP

²⁵ Tintura de Iodo 2% – Rioquímica Indústria farmacêutica, São José do Rio Preto/SP

²⁶ Handex[®] 2% – Saneativo laboratório farmacêutico Ltda., Brasília/DF

a área de cada flape e prevenir o deslocamento da pele que, naturalmente, ocorreria após a cirurgia, o que dificultaria a criação dos retalhos nas dimensões determinadas.

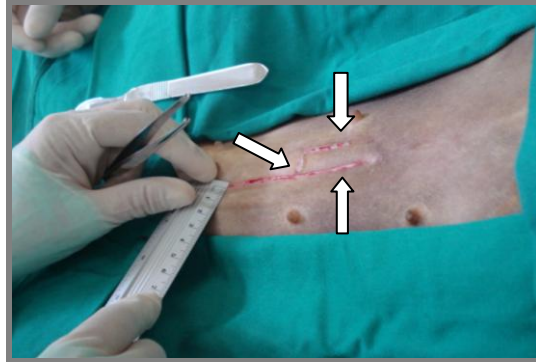


Figura 02: Incisões de pele (setas brancas) delimitando a área do flape cranial.
Fonte: Aleixo, 2009.

Após a castração e abolição dos planos teciduais mais profundos, as incisões dos flapes foram aprofundadas com um bisturi e, com uma tesoura de Metzembaum de pontas romba, a pele foi divulsionada e os flapes cranial (tratado) e caudal (controle) rebatidos.

Com uma tesoura foi removido 1 cm de tecido (Figura 03) da extremidade distal de cada flape, visando criar um flape de avanço. O comprimento de cada incisão efetuada foi medida e guiada por uma régua de aço inoxidável esterilizada.



Figura 03: Remoção de 1 cm da extremidade distal do retalho (seta branca).
Fonte: Aleixo, 2009.

Na sequência, foram confeccionados pontos interrompidos simples com fio de náilon monofilamentar agulhado²⁷ n° 3-0 para promover a síntese da pele da linha média, flape cranial e caudal, deixando apenas uma abertura suficiente para posicionar o gel de PRP entre o flape tratado (FT) e seu leito receptor (Figura 04).



Figura 04: Momento da colocação do PRP sob o flape tratado.
Fonte: Aleixo, 2009.

Antes da colocação do PRP no leito cirúrgico, os três frascos restantes contendo o produto foram homogeneizados e depositados em uma cuba de inox estéril onde era adicionada a tromboplastina²⁸ na proporção de 2:1, (1 mL de PRP para 0,5 mL do ativador de plaquetas) para ativar o concentrado de plaquetas, que passou a apresentar uma consistência gelatinosa (gel de plaquetas). Entre o flap caudal e seu leito receptor não foi aplicado nenhum produto, e conseqüentemente, esse retalho foi considerado controle (FC).

A ferida cirúrgica foi protegida com fita cirúrgica hipoalergênica²⁹ e o local enfaixado com atadura de crepe³⁰ e esparadrapo³¹ e após a recuperação anestésica, encaminhou-se a paciente para o canil, onde a mesma permaneceu internada por um período de onze dias.

Para a análise bacteriológica do PRP ao longo do seu processo de produção, foram realizadas coletas de material utilizando “swab” estéril³² em três momentos: na transição do PRP de um frasco para o outro após a primeira centrifugação; ao abrir o tubo para descartar o sobrenadante do PRP depois da segunda centrifugação; e na cuba estéril após a produção do gel de plaquetas.

²⁷ Nylon fio cirúrgico não absorvível – Somerville LTDA, Jaboatão dos Guararapes/PE

²⁸ Tempo de Protrombina (TP) – Laborlab, Guarulhos/SP

²⁹ Fita cirúrgica adesiva hipoalergênica – Wiltex Pore, Riasa S.R.L., Argentina

³⁰ Atadura de Crepom Neve – Neve ind. e com. de produtos cirúrgicos Ltda., São Paulo/SP

³¹ Esparadrapo impermeável extra flexível – Missner & Missner Ltda., Blumenau/SC

³² Swab em tubo para coleta e transporte de amostras – S.R.L., Itália

As amostras foram semeadas em placas de Petri, contendo Ágar Sangue Ovino e incubadas em estufa bacteriológica à 37°C, durante 48 horas com observações das placas a cada 24 horas. Posteriormente, foram efetuadas as leituras em microscópio óptico, anotando-se os aspectos de crescimento das colônias e produção de hemólise no meio de cultura. A classificação dos microrganismos foi realizada de acordo com as características morfológicas das colônias e morfotintórias à técnica do Gram (CARTER, 1988).

Durante o internamento pós-operatório foram prescritos a administração do antibiótico enrofloxacin³³ (5 mg/kg) uma vez ao dia (VO) e antiinflamatório meloxicam³⁴ (0,1 mg/kg) a cada 24 horas (VO), mantendo-se a administração de cada fármaco por sete e quatro dias, respectivamente. Os animais foram mantidos com colar elizabetano³⁵ e roupa cirúrgica³⁶ durante todo o período de internamento pós-operatório para evitar a lesão auto-infligida.

No primeiro dia após a cirurgia (D₁), realizou-se a primeira avaliação clínica dos FC e FT e a partir de então, o curativo era trocado e os retalhos clinicamente examinados a cada dois dias até o sétimo dia (D₃, D₅ e D₇).

Na avaliação foi preenchida uma ficha (Apêndice A) desenvolvida para esse experimento (adaptada de PAIM et al., 2002) na qual foram anotadas as alterações observadas com relação a presença e intensidade do edema, hiperemia, hematoma, deiscência, odor, secreção e coloração. Ainda com relação às alterações observadas, as mesmas foram classificadas de acordo com uma escala de graduação em que:

- : Ausente
- +: Discreto
- + +: Moderado
- + + +: Intenso

Em cada momento (D₁, D₃, D₅ e D₇), ambos os flapes foram fotografados com câmera digital³⁷ para registro macroscópico da região e posterior cálculo da área de necrose através do software Imagelab[®] 2000 como descrito por Almeida et al. (2004) e Estevão et al. (2009). As fotos foram obtidas com a máquina posicionada mantendo sempre a mesma distância focal de 5 cm entre a lente e a região a ser fotografada.

³³ Centril[®] 50 mg – Centagro, Batatais/SP

³⁴ Meloxivet[®] 2 mg – Duprat Ltda., São Paulo/SP

³⁵ Colar elizabetano – Mamuty acessórios para pequenos animais, Marialva/PR

³⁶ Roupa cirúrgica – Dalva confecções, Recife/PE

³⁷ Sony Cyber-shot 7.2 mega pixels – Sony, Estados Unidos

Com dez dias (D₁₀) foi realizada a biopsia de ambos os flapes (FC e FT) e estes foram submetidos à análise histológica. Para tal procedimento, administraram-se 0,022 mg/kg de sulfato de atropina³⁸ (SC) e 1 mg/kg de xilazina³⁹ (SC), 15 minutos depois do primeiro fármaco e após colocar a paciente em venoclise, 0,5 mg/kg de diazepam⁴⁰ e posteriormente, 7 mg/kg de cloridrato de cetamina⁴¹ (IV).

Em seguida a remoção dos pontos cutâneos, anti-sepsia da região e colocação dos panos de campo estéreis, os flapes foram divulsionados com uma tesoura de Metzembraum de ponta romba, até o seu completo rebatimento. A extremidade proximal do retalho, correspondente a sua base, foi seccionada e o tecido excisado, imerso em um frasco de vidro estéril contendo solução tamponada de formaldeído a 10%⁴². Suturou-se a área empregando um padrão isolado simples com fio de náilon monofilamentar agulhado n° 3-0.

Com 24 horas o material colhido foi transferido para outro frasco de vidro contendo solução de álcool a 70% e encaminhado ao laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE.

As amostras foram clivadas com lâmina de tricotomia⁴³ em todos os seus lados, para remover as extremidades danificadas pelos pontos de sutura e incluídas em parafina fundida para produção do bloco. Após 24 horas, tempo necessário para a parafina secar e o bloco ficar rígido, procedeu-se o corte histológico de 5 µm no micrótomo rotativo⁴⁴.

A leitura das lâminas coradas pelo método Hematoxilina-eosina (HE) foram efetuadas em microscópio óptico, onde foram observadas as características do tecido com relação a presença de necrose, infiltrado inflamatório e angiogênese ou qualquer outra alteração digna de nota. A morfometria dos vasos sanguíneos foi realizada com a adaptação de um retículo quadriculado de 100 quadrados à lente do microscópio. No corte histológico, selecionou-se três campos, e em cada área foram contados os vasos encontrados dentro dos 10 quadrados da coluna central do retículo.

No 11° dia pós-cirúrgico, os animais receberam alta médica e foram entregues aos seus tutores e oito dias após a realização da biopsia, foram removidos os pontos de pele.

³⁸ Pasmoxed[®] 0,025% – Isofarma, Eusébio/CE

³⁹ Xilazin[®] 2% – Syntec do Brasil Ltda., Cotia/SP

⁴⁰ Diazepam 0,5% - Hipolabor, Sabará/MG

⁴¹ Cetamin[®] 10% – Syntec do Brasil Ltda., Cotia/SP

⁴² Fabricação própria do Laboratório de Histologia do DMFA, Recife/PE

⁴³ Lâmina Wilkinson Sword[®] – Gillete do Brasil, Manaus/AM

⁴⁴ Micrótomo rotativo RM2125 RT – Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha

As análises estatísticas para a contagem de vasos no FC e FT foram realizadas pelo Teste de F ao nível de 1% de probabilidades. O desenho experimental utilizado foi o inteiramente aleatório, em função da homogeneidade entre os animais.

Os achados macroscópicos da avaliação clínica dos retalhos foram analisados e calculados por meio do Índice de Eficiência do Tratamento (IET) exclusivamente desenvolvido para esse experimento. O FC e FT de cada paciente em D₁, D₃, D₅ e D₇ foram categorizados de acordo com o somatório de cruzes para todos os itens avaliados na ficha, em que:

- : Excelente (E)
- + a + +: Bom (B)
- + + + a + + + +: Regular (R)
- + + + + +: Deficiente (D)
- > + + + + +: Inviável (I)

Com base nesses resultados foram calculados o IET para os grupos controle e tratado em cada momento (D₁, D₃, D₅ e D₇) pela fórmula:

$$\text{IET} = \frac{[(4)(E\%) + (3)(B\%) + (2)(R\%) + (1)(D\%) + (0)(I\%)]}{4} \times 100$$

Com o IET dos dois grupos nos diferentes momentos, calculava-se a média geral do índice para cada grupo e, estabelecia-se a categoria em que o flape se enquadrava (Tabela 01).

Tabela 01: Classificação do flape de acordo com o IET%.

VALOR DO IET%	CATEGORIA
> 90	Excelente
75 a 89	Bom
60 a 74	Regular
50 a 59	Deficiente
< 50	Inviável

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lesões traumáticas, especialmente aquelas que resultam em comprometimento de grandes porções da pele, têm alta frequência dentro da Medicina Veterinária e por isso a cirurgia reconstrutiva, área cujo objetivo é a recuperação das lesões que comprometem a anatomia e funcionalidade, tem muita utilidade e merece destaque.

Muitos estudos tem sido desenvolvidos buscando aprimorar as já existentes ou criar novas técnicas para reparar tais lesões, uma vez que elas podem ser limitantes para o paciente e caso tenham uma evolução desfavorável, podem resultar em óbito.

Dentro das técnicas já consagradas para restaurar os tecidos, uma das utilizadas com maior frequência é o flape cutâneo, pois segundo Pavletic (2007b), a mesma é uma das mais fáceis e esteticamente disponíveis para cobrir defeitos em cães e gatos.

Trabalhos experimentais com animais da espécie canina com o intuito de avaliar a integração de flapes cutâneos são raros e como a maioria dos pesquisadores adotaram ratos como modelo experimental (BIONDO-SIMÕES et al., 2000; CAMPOS et al., 2001; ZACCHÊ de SÁ et al., 2002; ALMEIDA et al., 2004; ESTEVES JUNIOR et al., 2005; ESTEVÃO et al., 2009) encontrar artigos científicos para efetuar uma análise comparativa com os resultados aqui alcançados, foi um fator limitante.

Entre os diferentes tipos de flapes disponíveis, optou-se pelo uso do flape de avanço pelo fato do mesmo ser um dos mais aplicáveis e pelos bons resultados alcançados com seu uso. Em trabalho realizado por Sakuma et al. (2003) com animais atendidos no Hospital Veterinário da USP, de um total de 25 cães nos quais foram utilizados flapes cutâneos, 12 deles foram de avanço, demonstrando dessa maneira a frequência com que são utilizados. Mota (2009) descreveu a utilização de flapes de avanço em nove cães de um total de 11 animais, o que representa 81,8%, demonstrando a preferência pela referida técnica. De acordo com o autor, a escolha por esse tipo de retalho se deu pela sua praticidade e aplicabilidade.

Os flapes foram confeccionados na região abdominal ventral junto à incisão efetuada na linha média para realização da OSH, diminuindo dessa forma a quantidade de incisões necessárias para fazer cada flape e porque de acordo com Hedlund (2005) devem ser evitados locais com movimento e tensão excessiva.

Como as pacientes já seriam submetidas aos riscos associados a anestesia e cirurgia durante a criação dos flapes, foi decidido aproveitar o momento para realizar a castração eletiva das mesmas. Essa foi uma forma encontrada de aliar a experimentação ao bem estar animal, uma vez que ao efetuar tal procedimento cirúrgico foram reduzidas as chances dessas

cadelas posteriormente, desenvolverem problemas uterinos ou ovarianos no quais muitas vezes a cirurgia é o tratamento indicado, além de se contribuir para o controle populacional de cães. A castração também foi um fator determinante para que houvesse o consentimento dos tutores para que seus animais participassem do experimento.

Com relação ao suprimento sanguíneo, foram usados flapes irrigados pelas ramificações das artérias cutâneas diretas, conhecidos por randomizados ou de plexo subdérmico. Quando a irrigação do flape ocorre ao acaso, a sua vascularização pode variar, portanto não se pode determinar a proporção específica entre o comprimento e largura do mesmo. Mas, recomenda-se que seja o mais curto possível para cobrir a região sem tensão (TOBIAS, 2009), pois quando o flape é muito longo, ocorre um prejuízo no alcance do sangue na sua porção mais distal (ACEVEDO-BOGADO et al., 2001).

A determinação da área total que seria necessária para manutenção da irrigação, visando favorecer a viabilidade do tecido, continua a ser um grande desafio para os cirurgiões (ALMEIDA et al., 2004). Optou-se por exceder os limites recomendados pela maioria dos autores adotando a proporção de 4:1 entre comprimento e largura, procedimento similar ao realizado por Almeida et al. (2004) e ainda foi removido 1 cm da margem distal do mesmo, para avaliar a viabilidade e vascularização do tecido sob condições menos favoráveis de tensão e retorno venoso como descrito por Estevão et al. (2009). A literatura cita trabalhos empregando diversas relações entre o comprimento e largura de flapes desde 1:1 (CAMPOS et al., 2001), 2:1 (FARIA et al., 1986), 2,25:1 (BIONDO-SIMÕES et al., 2000), 2,5:1 (ESTEVEZ JUNIOR et al., 2005) até 4:1 (ALMEIDA et al., 2004), entretanto, segundo Tobias (2009), de maneira geral, quando o flape apresenta um comprimento 2 vezes maior que a sua largura, eles sobrevivem se o suprimento sanguíneo for adequado.

Pesquisas tem sido realizadas visando aumentar a taxa de sobrevivência de flapes cutâneos ao incrementar sua vascularização. Como diversos autores (GREEN e KLINK, 1998; MAN et al., 2001; VENDRAMIN et al., 2006; BARROSO et al., 2007; JAMESON, 2007; MOREIRA et al., 2008; DE ROSSI et al., 2009) já relataram o potencial angiogênico dos FCs presentes no PRP, optou-se por testar essa capacidade do produto sobre flapes de avanço em animais da espécie canina.

Após a produção do PRP, foi constatado que as plaquetas foram bem preservadas, pois ao exame microscópico não demonstravam alteração morfológica e o material agiu rapidamente ao estímulo do agonista, formando um coágulo consistente em poucos segundos. Segundo Barroso et al. (2007), uma boa função plaquetária é mantida durante o

processamento do PRP se após adicionar o fator coagulante, há uma resposta satisfatória das plaquetas com a formação do coágulo.

Baseado nas contagens plaquetárias alcançadas no sangue total e PRP, observou-se que foi possível propiciar um aumento de quatro a cinco vezes na plaquetometria, assim como em trabalho executado por Clevens (2002), o que caracteriza o alcance da concentração considerada como terapêutica por muitos pesquisadores como Marx (2004) e Whitlow et al. (2008).

Segundo Marx (2004) e Messora et al. (2009) a preparação do PRP requer o emprego de técnica asséptica. Em trabalho realizado por Santos (2007), todo o procedimento foi executado com vestimenta cirúrgica completa, que incluía avental, gorro, máscara, luvas e óculos. Segundo os autores, não houve crescimento bacteriano nem fúngico durante a avaliação microbiológica do PRP. Neste trabalho, optou-se pelo uso de máscara, gorro e luvas estéreis, além dos tubos estéreis para coleta do sangue, entretanto o processamento do material, não foi realizado em capela de fluxo laminar. De acordo com Messora et al. (2009), como a grande maioria dos hospitais e clínicas não dispõem de ambiente com filtro de ar com fluxo laminar existe um risco de contaminação do PRP durante sua produção com partículas suspensas no ar.

Mesmo assim, autores como Martínez-González et al. (2002) e Marx (2004) relataram que nas diversas vezes em que fizeram uso clínico do PRP não houveram complicações associadas a infecção da ferida. Apesar de ser apenas uma especulação, a alta concentração de leucócitos da camada leucoplaquetária pode induzir a um efeito antimicrobiano no gel de plaquetas (GREEN e KLINK, 1998).

Da Silva et al. (2007), informaram que a técnica de produção manual do PRP apresenta dois momentos em que o risco de contaminação pode ser maior, sendo estes a hora em que o produto é transferido de um frasco para outro após a 1ª centrifugação e no momento da aspiração do plasma sobrenadante após a 2ª centrifugação. Dos oito animais operados pelos autores supracitados, um deles desenvolveu sinais de osteomielite na fratura tratada com PRP, entretanto esses não conseguiram identificar se a infecção foi em decorrência da contaminação do PRP ou da ferida cirúrgica durante o ato operatório.

Levando em consideração os momentos de maior risco de contaminação citados por esses autores e com o intuito de avaliar a possibilidade da mesma ocorrer na hora da ativação do PRP (Figura 05), foram realizadas coletas de material com posterior cultura bacteriológica nesses três momentos.



Figura 05: Uso do “swab” para a coleta de uma amostra do PRP para realização de cultura bacteriana.

Fonte: Aleixo, 2009.

Os resultados alcançados indicaram que houve contaminação, com bactérias do gênero *Staphylococcus sp.* de uma amostra em cada um dos tempos, totalizando três contaminações (37,5%) (Quadro 01), portanto não foi identificado uma etapa crítica em que o risco tenha se mostrado maior.

Quadro 01: Momento da contaminação do PRP e bactéria isolada.

Paciente	Após a 1ª centrifugação	Após a 2ª centrifugação	Produção do gel de PRP
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	<i>Staphylococcus sp.</i>	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	<i>Staphylococcus sp.</i>
7	-	-	-
8	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-

Mesmo tendo sido constatado a contaminação com *Staphylococcus sp.*, considerado habitante natural da pele (SHMON, 2007), podendo portanto o operador ter sido a fonte de contaminação, a mesma não foi suficiente para evoluir para um processo infeccioso. Segundo Dunning (2007) são necessários 10^5 bactérias/grama de tecido para que uma infecção seja instalada, então possivelmente essa quantidade de bactérias não foi alcançada, apesar de não ter sido realizado uma análise quantitativa para confirmar tal informação, pois sinais característicos de infecção não foram evidenciados localmente nos FT contaminados (ex. exudato inflamatório, secreção purulenta, odor ou deiscência), nem sistemicamente em nenhum dos pacientes (ex. febre).

Além da infecção, outras complicações associadas aos flapes e que podem interferir sobre sua viabilidade são a presença de hematoma (PAVLETIC, 2007b), deiscência (TOBIAS, 2009), edema (ACEVEDO-BOGADO et al., 2001) e necrose (BIONDO-SIMÕES et al., 2000). As avaliações desses aspectos foram realizadas de maneira contínua a cada dois dias até o 7º dia a partir da primeira avaliação com 24 horas, pois segundo Pavletic (2007b), as observações periódicas são necessárias para a determinação da sobrevida do retalho nos dias que se seguem após o transplante.

Macroscopicamente, em D₁ ambos os flapes apresentavam edema e hiperemia, estando o edema presente em cinco flapes do grupo controle e seis do tratado. A hiperemia ocorreu em menor frequência, sendo observada em quatro flapes controles e dois tratados. Essas alterações eram esperadas nesse momento como resultado do trauma cirúrgico, pois qualquer estímulo que seja capaz de incitar uma reação inflamatória, inclusive a cirurgia, levará a ativação de vários mediadores inflamatórios (ex. prostaglandina) com o objetivo de debelar o agente que causou a injúria (TASAKA, 2006). Após a vasoconstricção reflexiva inicial que ocorre em resposta ao dano tecidual, são observados vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (POUMIÁN, 2004). Todos esses eventos visam facilitar a passagem das proteínas, células inflamatórias e plasma para o tecido lesado (TASAKA, 2006). Estima-se que em áreas inflamadas ocorre um extravasamento de líquidos entre cinco a sete vezes maior do que em áreas não inflamadas (JEFFERSON, 1988a). Como resultado da dilatação dos vasos, aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, o local se apresenta avermelhado, tumefeito e com temperatura elevada (JEFFERSON, 1988b).

A inflamação, caracterizada pelas alterações vasculares, tem duração média entre quatro horas a três dias, entretanto quando há a lesão direta sobre os vasos, essa fase pode ser prolongada (POUMIÁN, 2004) e, portanto, se esse processo persistir por mais alguns dias após uma cirurgia, isso pode ser em consequência dos vasos terem sido seccionados diretamente. Ainda assim, a preocupação com relação ao edema é justificada, pois segundo Acevedo-Bogado et al. (2001), a edemaciação também pode ser um fator determinante para que ocorra a perda parcial ou total de um flape.

A partir de D₃ essas características resultantes do trauma cirúrgico começaram a reduzir progressivamente e no quinto dia já não eram mais evidentes, entretanto ainda em D₅ e D₇ foram identificadas discretas áreas de edema e hiperemia em alguns flapes dos grupos controle e tratado, próximas aos pontos de sutura. Essas alterações não foram levadas em consideração para o cálculo do IET, pois pela sua localização, acredita-se que tenham sido

consequência de um processo natural do organismo de reação a um corpo estranho, nesse caso, o fio de sutura.

A presença de secreção seromucosa foi frequente apenas no grupo tratado (4/8) em D₁, entretanto essa alteração não foi atribuída a ferida em si, e sim, ao produto aplicado nesse grupo e, desta maneira, não foram considerados na análise estatística. Observou-se que ao entrar em contato com o leito receptor, o gel de PRP modificou discretamente de consistência, e logo após a sutura do flape, um líquido começou a fluir através das bordas da ferida em alguns animais. Nesse momento foi realizada uma leve compressão local com uma compressa cirúrgica, pois, de acordo com Jameson (2007) uma gaze deve ser enrolada sobre o flap para remover qualquer líquido em excesso e ajudar a espalhar o gel.

Possivelmente, no período pós-operatório imediato, o calor gerado pela intensificação das reações biológicas no local da inflamação (POUMIÁN, 2004) também tenha contribuído para a liquefação do produto, com extravazamento posterior do mesmo através das bordas da ferida.

A ausência de secreção em todas as feridas nos dias seguintes (D₃, D₅ e D₇) reforçam a hipótese de que a secreção tenha sido proveniente do PRP, ao invés de ser resultante de um processo inflamatório mais exarcebado ou infecção local.

Segundo Faria et al. (1986), a adequada hemostasia também é importante para que se mantenha a viabilidade de um flape, pois o hematoma pode levar a sua necrose por causa da pressão provocada pelo mesmo sob o retalho (PAVLETIC, 2007b).

Em um paciente do grupo controle foi identificado um hematoma em D₃ que persistiu até o D₅, desaparecendo em D₇. A mesma alteração não foi evidenciada no grupo tratado em nenhuma das avaliações. Isso pode ser fundamentado no fato do PRP prevenir sangramentos por causa da participação das plaquetas na coagulação sanguínea, sendo inclusive, essa uma das primeiras finalidades do seu uso em cirurgia. Os resultados corroboram com Bolta (2007) que cita que o gel de plaquetas se mostrou efetivo para diminuir os sangramentos capilares em flapes cirúrgicos de 20 pacientes humanos. Na experiência dos autores Adler e Kent (2002), os mesmos relatam que o PRP promoveu um aumento na aderência do flape ao leito receptor, eliminado assim o espaço morto e melhorando a hemostasia.

A necrose foi avaliada, macroscopicamente, pela coloração da pele, onde as áreas que inicialmente se apresentavam pálidas em D₃ foram evoluindo continuamente para uma coloração roxa em D₅, e posteriormente preta em D₇. Segundo Tobias (2009), a necrose do flape pode não ser evidente até seis dias depois da cirurgia, sendo necessário esperar uma semana para identificar áreas viáveis e não viáveis (PAVLETIC, 2007b). As áreas de necrose

identificadas clinicamente na extremidade distal de três flapes de cada grupo foram confirmadas pela histologia, onde foi visualizado o comprometimento da epiderme e derme papilar (Figura 06). Nesses locais foram observados o desaparecimento total do núcleo, indicando morte celular como sugerido por Jefferson (1988c).

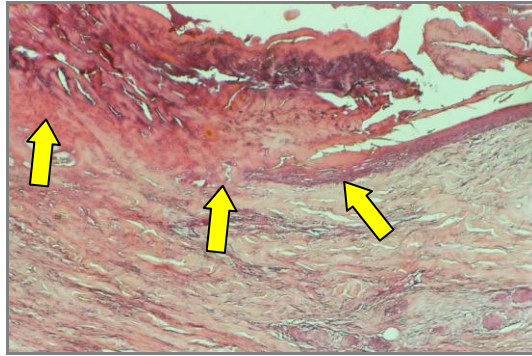


Figura 06: Área de necrose (setas) na extremidade distal de um flape cutâneo identificada no exame histopatológico (Coloração HE e aumento de 160X).

Fonte: Aleixo, 2009.

Fatores como infecção, compressão e tensão podem contribuir para o desenvolvimento de necrose em um flape, porém a irrigação do tecido é o principal, uma vez que os vasos são responsáveis pela nutrição local (CAMPOS et al., 2001). A vascularização inadequada possivelmente foi o que ocasionou a necrose em todos os flapes, pois não foram constatados sinais de infecção e se o motivo fosse tensão excessiva, provavelmente alguns pontos cirúrgicos teriam rompido e seriam identificadas áreas de deiscência. Os flapes também não foram submetidos a demasiada compressão durante o pós-operatório, pois a proteção da ferida foi realizada com um curativo composto por uma única camada de fita hipoalergênica e roupa cirúrgica não compressiva. Além disso, de acordo com Cantón (2004), a necrose de característica seca, como a observada nos animais em questão, ocorre em decorrência da diminuição do aporte sanguíneo ao tecido.

No grupo controle e tratado não foram evidenciados em todas as avaliações odor ou deiscência, mesmo nas regiões necrosadas como citado anteriormente, apesar da deiscência ser uma das principais complicações associadas ao uso de flapes cutâneos (SAKUMA et al., 2003). Isso possivelmente ocorreu em decorrência da necrose ter sido mais superficial, com comprometimento apenas da epiderme e derme papilar. Acredita-se que a força exercida pela derme reticular, tenha sido suficiente para manter o flape e as bordas da ferida cirúrgica

aproximadas pelos pontos, uma vez que essa camada apresenta feixes espessos de fibras colágenas e elásticas (KIERSZENBAUM, 2004).

A identificação e intensidade de todas as variáveis avaliadas em D₁, D₃, D₅ e D₇ foram submetidas a um cálculo estatístico para determinar a porcentagem de viabilidade do tecido, que recebeu a denominação de Índice de Eficiência do Tratamento (IET) (Tabelas 02 e 03).

Tabela 02: Cálculo do IET para cada dia de avaliação no grupo controle.

Avaliação	% Excelente	% Bom	% Regular	% Deficiente	% Inviável	% IET
D ₁	12,50	75,00	12,50	0,00	0,00	75,00
D ₃	25,00	50,00	25,00	0,00	0,00	75,00
D ₅	62,50	0,00	37,50	0,00	0,00	81,25
D ₇	62,50	0,00	37,50	0,00	0,00	81,25

Tabela 03: Cálculo do IET para cada dia de avaliação no grupo tratado.

Avaliação	% Excelente	% Bom	% Regular	% Deficiente	% Inviável	% IET
D ₁	25,00	50,00	25,00	0,00	0,00	75,00
D ₃	25,00	50,00	25,00	0,00	0,00	75,00
D ₅	50,00	12,50	37,50	0,00	0,00	78,13
D ₇	62,50	0,00	37,50	0,00	0,00	81,25

As médias do cálculo do IET para o grupo controle e tratado em todas as avaliações foram 78,13% e 77,34% respectivamente, estando os dois valores dentro das margens estabelecidas para a categoria “Bom” (75 a 89%), portanto não houve diferença entre os dois grupos de acordo com as análises clínicas. Mesmo tendo sido identificado áreas de necrose em três flapes de cada grupo, a categoria, na qual os grupos foram enquadrados, pode ser atribuída ao fato das mesmas terem sido restritas a margem distal dos flapes, o que segundo Esteves Junior et al. (2005), é o local mais propício para o desenvolvimento dessa alteração como resultado de uma inadequada vascularização sanguínea local, não havendo portanto, comprometimento total do tecido (Tabela 04). Em pesquisa executada por Sakuma et al. (2003), a necrose desenvolvida em 24% dos animais se localizava sempre na extremidade distal do flape, corroborando com os resultados aqui encontrados.

Tabela 04: Áreas de necrose dos flapes controle e tratado calculadas pelo programa Imagelab 2000®.

Paciente	ÁREA DE NECROSE	
	FLAPE CONTROLE	FLAPE TRATADO
1	0,00%	0,00%
2	0,00%	0,00%
3	14,00%	17,77%
4	0,00%	0,00%
5	0,00%	0,00%
6	10,00%	14,51%
7	10,48%	11,67%
8	0,00%	0,00%

Além das avaliações macroscópicas, que são consideradas mais subjetivas, uma vez que são determinadas de acordo com a observação do avaliador, foram efetuadas análises microscópicas dos tecidos obtidos na biopsia realizada ao 10º dia. A realização do exame histopatológico e morfométrico tiveram o intuito de fundamentar ou complementar as informações determinadas nos exames clínicos. Em trabalho realizado por Suaid et al. (2007), avaliando a ação do PRP em enxertos para a cobertura de retração gengival em cães, as avaliações foram baseadas apenas em observações clínicas, entretanto os mesmo autores citaram que isso não é suficiente para analisar a ação do gel de plaquetas, sendo necessário recorrer ao exame histológico.

Microscopicamente, os achados mais frequentes tanto nos FC quanto nos FT foram a presença de necrose em algumas regiões da derme profunda e infiltrado inflamatório. Ambos eram previsíveis, sendo o primeiro uma evidência normal decorrente do divulsionamento do tecido na hora da confecção dos flapes e o segundo, relacionado ao processo de reparação tecidual fisiológico.

Uma alteração digna de nota evidenciada apenas no grupo tratado (6/8) foi uma reação do tipo corpo estranho na região dérmica profunda, caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas, macrófago, leucócitos e linfócitos (Figura 07).

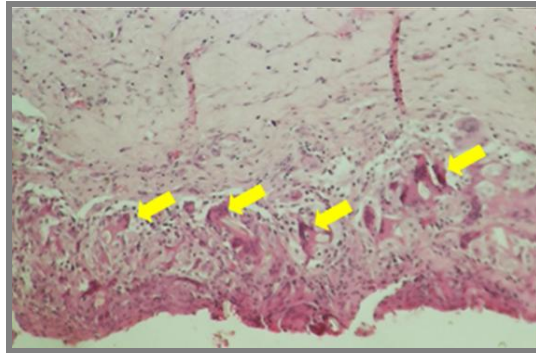


Figura 07: Área da derme profunda com células gigantes multinucleadas (setas) em um flape tratado com PRP, visualizada no aumento de 250X (Coloração HE).
Fonte: Aleixo, 2009.

Esse achado foi similar ao encontrado por Coelho et al. (1999), usando curativos de poliuretano, hemocelulose, hidrocolóide e vaselina em feridas abertas de cães, que segundo os autores supracitados, provavelmente, foi provocado pelos componentes dos curativos.

Corroborando com Coelho et al. (1999), acredita-se que a reação tenha ocorrido por causa do agente agonista empregado para ativar o PRP, uma vez que essa característica histológica não foi evidenciada em nenhum dos flapes do grupo controle e pelo fato de ter sido identificada apenas na região profunda da derme, local onde o produto foi aplicado.

Segundo Bolta (2007) o melhor fator ativador para o PRP ainda não foi identificado. A escolha pela tromboplastina foi realizada visando facilitar o processamento do gel de plaquetas, uma vez que o produto é comercialmente disponibilizado não sendo necessário prepará-lo, diferentemente da trombina autógena, além dos resultados favoráveis apresentado por alguns autores como Santos (2007) e Barbosa et al. (2008) com o seu uso. Ainda de acordo com Barbosa et al. (2008), a trombina bovina tópica é de difícil aquisição no Brasil, e portanto ela vem sendo substituída pela tromboplastina com bons resultados. Outra desvantagem citada no uso da trombina bovina é que a mesma pode levar a formação de anticorpos contra os fatores de coagulação V e XI, resultando no desenvolvimento de coagulopatias graves (SANCHEZ et al., 2003; MAIA e SOUZA, 2009).

Apesar dos resultados promissores citados por alguns pesquisadores empregando o PRP ativado pela tromboplastina, Da Silva et al. (2007), não encontraram diferença no uso do produto com relação ao grupo controle, apesar dos mesmos não terem atribuído diretamente esses resultados ao agente agonista. Em trabalho executado por Silva et al. (2009), foi relatado que o concentrado de plaquetas falhou em potencializar a cicatrização óssea e os autores atribuíram isso ao fato de terem utilizado tromboplastina para ativar o produto, o que resultou

em uma reação inflamatória a corpo estranho atuando de forma negativa na fase inicial de restauração do tecido, estando os dados aqui encontrados em concordância com esses resultados.

A análise da variância para a contagem morfométrica realizada pelo teste de F apresentou resultado inferior ao tabelado, indicando, portanto não existirem diferenças estatísticas significativas entre o grupo controle e tratado (Tabela 05). Mesmo não ocorrendo diferença com base na análise estatística, o grupo tratado apresentou 33,14% mais vasos do que o controle, o que pode ter algum significado clínico, uma vez que essa vascularização poderia, possivelmente, contribuir com a neoangiogênese que ocorre durante a evolução do processo de integração.

Tabela 05: Média de vasos identificados por mm^2 no flape controle e tratado.

TRATAMENTOS	MÉDIAS
Flape controle (FC)	21,125 por mm^2
Flape tratado (FT)	28,125 por mm^2

Segundo Marx (2004), a maioria dos trabalhos sobre PRP indicam efeitos benéficos após o seu uso, entretanto os resultados aqui alcançados corroboram com outros pesquisadores como Aghaloo et al. (2002), Garcia (2005), Da Silva et al. (2007), Gurgel et al. (2007), Nunes Filho et al. (2007), Santos (2007) e Suaid et al. (2007), nos quais não foram constatados diferenças entre o grupo tratado com PRP e o não tratado.

Um fator importante a ser levado em consideração com relação aos artigos que demonstram efeito favorável do PRP sobre a reparação tecidual, é que a maioria deles baseiam seus resultados satisfatórios apenas em análises clínicas, especialmente, quando os experimentos são realizados com humanos. Recomenda-se, entretanto que o exame histológico seja parte essencial da avaliação da efetividade do PRP, pois muitas alterações, como a reação a corpo estranho e presença de infiltrado inflamatório só podem ser identificados por meio de uma análise microscópica.

CONCLUSÃO

Dentro das condições nas quais o experimento foi realizado, os resultados alcançados permitiram concluir que o plasma rico em plaquetas (PRP) ativado com tromboplastina não incrementou a viabilidade de flapes cutâneos de avanço randomizado em cães.

REFERÊNCIAS

1. ACEVEDO-BOGADO, C. E.; BINS-ELY, J.; D'ACAMPORA, A. J.; NEVES, R. E. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratas. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, supl. 1, p. 14-16, 2002.
2. ADLER, S. C.; KENT, K. J. Enhancing wound healing with growth factors. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v.10, p. 129-146, 2002.
3. AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. Investigation of Platelet-Rich Plasma in Rabbit Cranial Defects: A Pilot Study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**,v. 60: p. 1176-1181, 2002.
4. ALMEIDA, K. G.; FAGUNDES, D. J.; MANNA, M. C. B.; MONTERO, E. F. S. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 6, p. 649-657, 2004.
5. ASPINALL, V.; O'REILLY, M. Common integument. In:_____. **Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology**. Philadelphia: Elsevier, 2004. Cap. 12, p. 151-158.
6. BARBOSA, A. L. T.; DEL CARLO, R. J.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, B. N. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.
7. BARROSO, C. S. T.; BENITO, J. C.; PUIG, A. G. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. **Ver. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.** , v. 29, n. 4, p. 240-248, 2007.
8. BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; GRECA, F. H.; PAULA, J. B.; CHIN, E. W. K.; SANTOS, E. A. A.; STALHSCHMIDT, F. L. Influência do buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos - estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, supl. 3, p. 34-40, 2000.
9. BOLTA, P. R. Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. **Acta Dermatoven APA**, v.16, n. 4, p. 156-165, 2007.

10. 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. **J Periodontol Res**, v. 37, p. 300-306, 2002.
11. CAMPOS, H.; FERREIRA, L. M.; SANTOS, W. L. C.; ARAÚJO, M. C. M. Efeitos da nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n. 4, 2001.
12. CANTÓN, B. V. Alteraciones celulares y tisulares. Transtornos circulatorios. In: TAVERA., F J. T.; ELIZONDO, G. V. **Patología General Veterinaria**. 4. ed. México: Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia, 2004. Cap. 3, p. 79-150.
13. CARTER, G. R. **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1988. 249 p.
14. CLEVENS, R. A. Autologous platelet rich plasma in facial plastic surgery. In: 8th International Symposium of Facial Plastic Surgery, New York, 2002. **Proceedings from the 8th International Symposium of Facial Plastic Surgery**, New York, 2002.
15. COELHO, M. C. O. C.; REZENDE, C. M. F.; TENÓRIO, A. P. M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.
16. COLES, E. H. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: _____. **Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. Cap. 5, p. 144-163.
17. DA SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007.
18. DE ROSSI, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S.; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, 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.
19. DUNNING, D. Infecção da ferida cirúrgica e uso de antimicrobianos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Vol. I. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 6, p. 113-122.
20. DVORAK, H. F.; BROWN, L. F.; DETMAR, M.; DVORAK, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 5, p. 1029-1039, 1995.

21. EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. B. S. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 114, n.6, p. 1502-1508, 2004.
22. ESTEVÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; EVÊNCIO, L. B.; GUIMARÃES, E. C.; CÂMARA, C. A. G.; EVÊNCIO-NETO, J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 406-412, 2009.
23. ESTEVES JUNIOR, I.; MASSON, I. B.; FERREIRA, L. M.; LIEBANO, R. E.; BALDAN, C.; GOMES, A. C. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 164-166, 2005.
24. FARIA, M. A. R.; PIPPI, N. L.; MORAIS, A. N.; RODASKI, S. Reconstituição de ferida de pele no membro anterior de cão usando flape bipediculado. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 18, n. 1, p. 29-37, 1986.
25. FLORYAN, K. M.; BERGHOFF, W. J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. **AORN Journal**, v. 80, n. 4, p. 668-674, 2004.
26. FRÉCHETTE, J. P.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 84, p. 434-439, 2005.
27. GARCIA, R. V. **Utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a implantes intra-ósseos em mandíbula de cães. Análise histológica.** 2005. 93f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2005.
28. GENTRY, P. A. Coagulação sanguínea e hemostasia. In: REECE, W. O. **Dukes/Fisiologia dos Animais Domésticos.** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 4, p. 49-64.
29. GREEN, D.; KLINK, B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 101, n. 4, p. 1161-1162, 1998.
30. GURGEL, B. C. V.; GONÇALVES, P. F.; PIMENTEL, S. P.; AMBROSANO, G. M. B.; NOCITI JR., F. H.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z. Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 649, n. 654, p. 649-654, 2007.

31. HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. Vol. II. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 18, p. 135-230.
32. HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In:_____. **Fundamentos em Hematologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 18, p. 244-257.
33. JAMESON, C. A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. **Labmedicine**, v. 38, n. 1, p. 39- 42, january 2007.
34. JEFFERSON, A. S. Inflamação. In: _____. **Patologia Geral dos Animais Domésticos (Mamíferos e Aves)**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara,1988. Cap. 10, p. 159-219 (a).
35. JEFFERSON, A. S. Distúrbios circulatórios: Hiperemia, edema e hemorragia. In: _____. **Patologia Geral dos Animais Domésticos (Mamíferos e Aves)**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara,1988. Cap. 13, p. 361- 378(b).
36. JEFFERSON, A. S. Necrose. In: _____. **Patologia Geral dos Animais Domésticos (Mamíferos e Aves)**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara,1988. Cap. 5, p. 69- 83 (c).
37. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: _____. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 18, p. 359-370.
38. KAMAKURA, L.; SPINA, V.; MODOLIN, M. Retalhos de pele. In: GOFFI, F. S. **Técnica Cirúrgica: Bases Anatômicas, Fisiopatológicas e Técnica da Cirurgia**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1986. Cap. 35, p. 383-392.
39. KIERSZENBAUM, A. L. Sistema tegumentar. In:_____. **Histologia e biologia celular**. Uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 6, p. 157-188.
40. LAGUNAS, J. G. Plasma rico em plaquetas. **Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.**, v. 28, n. 2, p. 89-99, 2006.
41. LEMOS, J. J.; ROSSI JUNIOR, R.; PÍSPICO, R. (2002). **Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos - proposta de um protocolo de obtenção simplificado**. Disponível em:< <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225>>. Acesso em: 06.11.09.
42. LÓPEZ, J. L.; CHIMENOS, E.; SANCHEZ, J. M.; CASTAÑEDA, P. Plasma rico en factores de crecimiento y regeneración ósea. **Dentum**, v. 7, n. 3, p. 108-112, 2007.
43. MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteoarticulares em animais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1267-1274, 2009.

44. MAN, D.; PLOSKER, H.; WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 107, p. 229-237, 2001.
45. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. M.; SÁNCHEZ, J. C.; LAFUENTE, J. C. G.; TRAPERO, J. C.; GÓMEZ, G. C. E.; LESTÓN, J. M. S. Do ambulatory-use Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks? **Medicina Oral**, v. 7, n. 5, p. 383-390, 2002.
46. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.
47. MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, n. 62, p. 489-496, 2004.
48. MESSORA, M. E.; NAGATA, M. J. H.; MELO, L. G. N.; FURLANETO, F. A. C.; DELIBERADOR, T. M.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Análise de um protocolo de única centrifugação para o preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) – estudo em coelhos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 135-141, 2009.
49. MOREIRA, D. C.; SADIGURSKY, M.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, M. G. S. Fatores de crescimento plaquetários. Revisión de literatura. **Revista Venezolana de Investigación Odontológica**, v. 8, n. 1, p.14-25, 2008.
50. MOTA, A. K. R. **Utilização de diferentes técnicas de cirurgia reconstrutiva para fechamento de defeitos cutâneos**. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife.
51. MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. Estrutura e funções da pele, In: _____. **Dermatologia dos Pequenos Animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1985. Cap. 1, p. 1-48.
52. NITZ, A. C.; ELY, J. B.; D'ACAMPORA, A. J.; TAMES, D. R.; CORRÊA, B. P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos usando *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 4, p. 74-79, 2006.
53. NUNES FILHO, D. P.; LUPPINO, F.; YAEDÚ, R. Y. F.; CARVALHO, P. S. P. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 3, p. 263-269, 2007.
54. OLOUMI, M. M. Severe wound of stifle region, treated by a thoracic-based body flap in a dog: case report. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 5, n. 2, p. 114-116, 2004.

55. PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1202-1205, 2007.
56. 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.
57. PAVLETIC, M. M. Tegumento. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Vol. I. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 20, p. 250-259 (a).
58. PAVLETIC, M. M. Enxertos pediculados. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Vol. I. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 23, p. 292-321 (b).
59. PIERCE, G.F.; MUSTOE, T.A. Pharmacologic enhancement of wound healing. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p 467-481, 1995.
60. POUMIÁN, A. M. Proceso inflamatorio. In: TAVERA, F J. T.; ELIZONDO, G. V. **Patología General Veterinaria**. 4. ed. México: Facultad de Medicina Veterinária y Zootecnia, 2004. Cap. 4, p. 151-252.
61. QUINTANA, V. M. M.. **Análisis de la consolidación ósea en fracturas de ángulo mandibular tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento**. Monografía (Residência em cirurgia plástica e reconstrutiva) Instituto Mexicano del Seguro Social Unidad Médica de Alta Especialidad, Guadalajara, Jalisco, 2008.
62. RAMOS, R. S.; SILVA, M. C. V.; PIPPI, N. L.; OLIVEIRA, T. C.; COSTA, W. P. Avaliação macroscópica de feridas localizadas na porção distal de membros torácicos de cães reparadas por meio de flape bipediculado à distância e imobilizados com gesso. **Acta Veterinária Brasileira**, v.1, n.1, p.38-42, 2007.
63. REECE, W. O.; SWENSON, M. J. Composição e funções do sangue. In: REECE, W. O. **Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 3, p. 24- 48.
64. ROUKIS, T. S.; ZGONIS, T.; TIERNAN, B. Autologous platelet-rich plasma for wound and osseous healing: a review of the literature and commercially available products. **Advances in Therapy**, v. 23, n. 2, p. 218-237, 2006.
65. SAKUMA, C. H.; MATERA, J. M.; VALENTE, N. S. Estudo clínico sobre aplicação do retalho cutâneo pediculado em cirurgia oncológica no cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, supl, 1, p. 32-37, 2003.

66. SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18, p. 93–103, 2003.
67. SANTOS, A. P. Avaliação da hemostasia e distúrbios da coagulação. In: 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, Porto Alegre, 2005. **Anais do 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, Porto Alegre, 2005**.
68. SANTOS, L. A. U. **Efeito da utilização do plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos**. 2007. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2007.
69. SHMON, C. Avaliação e preparação do paciente e da equipe cirúrgica. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Vol. I. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 12, p. 162-179.
70. SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTERIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 129-134, 2009.
71. STONE, E. A. Sistema Reprodutivo. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. Vol. II. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 98, p. 1487–1502.
72. SUAID, F. F.; SANTAMARIA, M. P.; CARVALHO, M. D.; SOUZA, H. W.; SALLUM, E. A.; NOCITTI JUNIOR, F. H. Avaliação clínica da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) com o enxerto de tecido conjuntivo subepitelial em retrações gengivais criadas em cães. **Periodontia**, v. 17, n. 01, p. 68-75, 2007.
73. TASAKA, A. C. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 21, p. 256-272.
74. TOBIAS, K. M. Basic flaps. In: _____. **Manual of Small Animal Soft Tissue Surgery**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. Cap. 3, p. 27-35.
75. TROUT, N. J. Princípios da cirurgia plástica e reconstrutiva. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Vol. I. São Paulo: Manole, 2007. Cap. 22, p. 274-292.
76. 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 Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24–28, jan./fev., 2006.
77. WHITMAN, D. H., BERRY, R. L., GREEN, D. M. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, p. 1294-1299, 1997.
78. WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A. G.; SIEVERT, A. N.; SISTINO, J. J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v. 23, p. 283-289, 2008.
79. ZACCHÊ DE SÁ, J.; AGUIAR, J. L. A.; MORAIS, J.; COELHO, A. R. B.; LOPES, S. M. L.; MELO, C. B. Área viável e vascularização, pós autonomização cirúrgica, de retalho pré-fabricado por implante vascular em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, suppl.1, p. 2002.

4 APÊNDICE

5 ANEXO

ANEXO A: Licença concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para o uso de animais no experimento.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



LICENÇA PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Licença nº: 019/2009

Protocolo nº: 23082.005458/2009

Nome do Solicitante: Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

Instituição do Solicitante: UFRPE

Título do projeto: Utilização do plasma rico em plaquetas como método auxiliar na integração de flaps cutâneos randomizados de avanço em cães

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS concede licença para uso de animais em pesquisa para o projeto acima referenciado uma vez que atende às normas éticas de uso de animais, conforme estabelecidas na legislação vigente e no regimento interno da CEUA-UFRPE, de acordo com a Resolução 269/2007 do CEPE-UFRPE, tendo a presente licença validade de dois anos a partir da data de sua expedição. O projeto foi recebido no dia 06/04/2009 e aprovado sem modificações na reunião ordinária do dia 11/05/2009.

Recife, 11 de Maio de 2009.

Carlos Antônio Alves Pomes



**Carlos Antônio Alves Pomes
Presidente
CEUA - UFRPE**