

COMPARAÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS
TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

DIANE DE VASCONCELOS BARRIONUEVO

COMPARAÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS
TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

DIANE DE VASCONCELOS BARRIONUEVO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal-Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Braga Laposy

636.089 615 Barrionuevo, Diane de Vasconcelos.
B276c Comparação de feridas induzidas experimentalmente em coelhos tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas/Diane de Vasconcelos Barrionuevo. – Presidente Prudente, 2014.
26 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Cecília Braga Laposy

1. Plasma rico em plaquetas. 2. Curativo biológico. 3. Feridas. 4. Coelhos. Título.

**COMPARAÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS
TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 23 de setembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cecília Braga Laposy
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho
Universidade Estadual Paulista- Unesp
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista- Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo as pessoas que lutam diariamente ao meu lado, transmitindo fé, amor, alegria, determinação, paciência e coragem, tornando os meus dias mais felizes e bonitos.

Aos meus filhos Letícia e Marcelinho, vocês são a minha vida e minha fonte de inspiração.

Ao meu esposo Marcelo, meu infinito agradecimento. Sempre acreditou em minha capacidade e me achou “a melhor” de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser “a melhor”, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional que tem por mim e por nossos filhos e por ocupar meu lugar de mãe quando foi preciso, devido minhas ausências.

Aos meus pais, por tudo que sempre fizeram por mim, pela simplicidade, exemplo, amizade e carinho, fundamentais na construção do meu caráter.

À minha enteada Rafaela, minha sogra, meus irmãos e meus cunhados, por todo apoio e carinho.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

À orientadora Profa. Dra. Cecília Braga Laposy, só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, orientações, incentivos, puxões de orelha, paciência e dedicação. Além da indiscutível amizade e compreensão de minhas limitações.

À Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, não somente pelas valiosas considerações e sugestões, mas sim pela receptividade quando a procurei para que me ajudasse.

Ao Prof^o. Dr. Rogério Giuffrida pela atenção e contribuição neste trabalho realizando a análise estatística.

À Prof^a. Dr^a. Gisele Alborgheti Nai, pela realização das análises histológicas deste estudo.

A todos os professores do Mestrado em Ciência Animal, pelo apoio e todo conhecimento transmitido.

Aos funcionários da secretaria e do Biotério Central da Unoeste, pela atenção e ajuda.

À minha amiga e colaboradora Karina Gomes Barros Abegão, obrigada pela ajuda, incentivo e por agradáveis momentos que passamos juntas.

Aos alunos da graduação e iniciação científica Inara Guastini Delfim e Bruno Bracale pela grande ajuda durante a realização do experimento.

Aos animais, o meu respeito.

À direção e coordenação da Faculdade de Enfermagem pelo apoio e incentivo.

À querida amiga Milena Colanhese Camargo, obrigada pela força e por não ter me deixado desistir, quando ainda era sua orientanda de graduação. Você me apresentou o mundo da pesquisa e faz parte deste grande sonho. A você toda admiração de uma fã!

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."

Autora: Clarice Lispector

RESUMO

COMPARAÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS TRATADAS COM DIFERENTES FONTES DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Ao longo dos anos, o plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo tem sido utilizado com grandes vantagens na cicatrização de feridas agudas e crônicas. No entanto, algumas situações inviabilizam o uso desta fonte, devendo ser consideradas outras alternativas de PRPs como homóloga ou heteróloga. Com o objetivo de avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) na forma gel autólogo, heterólogo e homólogo sobre a cicatrização de feridas cutâneas in vivo, foram utilizados 24 coelhos (9 machos e 9 fêmeas) divididos em 3 grupos para o experimento e 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) foram doadores de PRP. Para o grupo heterólogo, utilizou-se um cão, adulto, sem raça definida para obtenção do PRP. As lesões foram feitas com auxílio de um punch de 8 mm, sendo que o lado direito foi tratado com NaCl 0,9%® (A) e o lado esquerdo (B) aplicado gel de PRP (GA=autólogo; GHE=heterólogo e GHO=homólogo). As lesões foram avaliadas por um período de 17 dias. Nos dias 0, 3, 7, 10, 14 e 17 os animais foram avaliados clinicamente por meio de peso e dor, e no 17º dia foi feita biópsia para avaliação histopatológica das feridas. O percentual de contração foi evidente no lado B (tratado), o que também foi comprovado nas análises microscópicas dos cortes histológicos. Com isso, concluiu-se que o PRP, independente da fonte, melhora e acelera o processo de cicatrização, comprovando seu potencial terapêutico sobre as lesões cutâneas, podendo ser utilizado em pacientes com dificuldades de cicatrização.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas, curativo biológico, feridas, coelhos

ABSTRACT

COMPARISON OF WOUND INDUCED EXPERIMENTALLY IN RABBITS TREATED WITH DIFFERENT SOURCES OF PLATELET-RICH PLASMA

Over the years, the platelet-rich plasma (PRP) autologous has been used to great advantage in the healing of acute and chronic wounds. However, some situations make it impossible to use this source, should be considered as alternatives to PRP homologous or heterologous. Aiming to evaluate the effect of platelet-rich plasma (PRP) in autologous, heterologous and homologous form gel on cutaneous wound healing in vivo, 24 rabbits (9 males and 9 females) divided into three groups were used for the experiment and 6 animals (3 males and 3 females) were donors PRP. For the heterologous group, used a dog, adult mongrel to obtain PRP. The lesions were performed using a punch of 8 mm, and the right side was treated with 0.9% NaCl ® (A) and left side (B) applied PRP gel (GA = autologous, GHE=heterologous, and GHO = homologous). Lesions were evaluated for a period of 17 days. On days 0, 3, 7, 10, 14 and 17 animals were clinically evaluated by weight and pain, and on day 17 biopsies were taken for histopathological assessment of wounds. The percentage of contraction was evident in side B (treated) in all groups, which was also confirmed in the microscopic analysis of histological sections. Thus, it was concluded that the PRP, regardless of source, improves and accelerates the healing process, demonstrating their therapeutic potential on skin lesions and can be used in patients with impaired wound healing.

Keywords: Platelet-rich plasma, biological dressing, wound, rabbits

LISTA DE SIGLAS

PRP- Plasma Rico em Plaquetas

PPP- Plasma Pobre em Plaquetas

PC- Percentual de contração

Ai- Área inicial

Af- Área final

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO	11
---------------------------	----

1 ARTIGO CIENTÍFICO*

Comparação de feridas induzidas experimentalmente em coelhos tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas

DV Barrionuevo, CB Laposy, KGB Abegão, RMB Nogueira, GA Nai, BN Bracale, IG Delfim

Universidade do Oeste Paulista, Mestrado em Ciência Animal, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, 190075-175, Presidente Prudente, Brazil.

Autor para correspondência: C B Laposy. Email: claposy@unoeste.br

Resumo

Ao longo dos anos, o plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo tem sido utilizado com grandes vantagens na cicatrização de feridas agudas e crônicas. No entanto, algumas situações podem inviabilizar o uso desta fonte, devendo ser consideradas outras alternativas de PRP como homóloga ou heteróloga. Com o objetivo de avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) na forma gel autólogo, heterólogo e homólogo sobre a cicatrização de feridas cutâneas in vivo, foram utilizados 24 coelhos (9 machos e 9 fêmeas) divididos em 3 grupos para o experimento e 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) foram doadores de PRP. Para o grupo heterólogo, utilizou-se um cão, adulto, sem raça definida para obtenção do PRP. As lesões foram feitas com auxílio de um punch de 8 mm, sendo que o lado direito foi tratado com NaCl 0,9%® (A) e o lado esquerdo (B) aplicado gel de PRP (GA=autólogo; GHE=heterólogo e GHO=homólogo). As lesões foram avaliadas por um período de 17 dias. Nos dias 0, 3, 7, 10, 14 e 17 os animais foram avaliados por meio de peso e dor, e no 17º dia foi feita biópsia para avaliação histopatológica das feridas. O percentual de contração foi evidente no lado B (tratado), o que também foi comprovado nas análises microscópicas dos cortes histológicos. Com isso, concluiu-se que o PRP, independente da fonte, melhora e acelera o processo de

* Artigo elaborado segundo as normas da revista Laboratory Animals.

cicatrização, comprovando seu potencial terapêutico sobre as lesões cutâneas, podendo ser utilizado em pacientes com lesões cutâneas.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas, curativo biológico, feridas, coelhos

Título corrido: Feridas tratadas com diferentes PRPs.

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo que envolve respostas celulares e moleculares com intuito de reorganizar inicialmente os componentes da matriz extracelular visando um fechamento rápido da ferida, bem como obter uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória^{1,2}. Embora não haja dados que quantifiquem os portadores de feridas no Brasil, as alterações na integridade da pele interferem na qualidade de vida da população e constituem um sério problema de saúde pública, pois causam impactos físicos, psicológicos e sociais, somado a um elevado custo econômico³.

Estudos sobre plasma rico em plaquetas (PRP) estão voltados à avaliação de seus fatores de crescimentos, os quais são importantes no reparo das feridas em cicatrização e que são liberados a partir da degranulação plaquetária. A secreção ativa destes fatores tem início 10 minutos após a coagulação plaquetária, onde mais de 95% destes fatores são secretados dentro de 1 hora⁴; e estes quando em contato com seus receptores nucleares respectivos estimulam a angiogênese, replicação dos tecidos, cicatrização e crescimento de novas estruturas orgânicas^{5,6}.

O plasma rico em plaquetas é um concentrado de plaquetas, por meio do qual se adquire altas concentrações de fatores de crescimento⁷. Para apresentar propriedades regenerativas e efeito terapêutico desejado, sua concentração deve ser superior a 300.000 plaquetas/ μ L, porém outros autores relatam que para obter uma melhor eficácia esta concentração ideal deve ser em torno de 1.000.000 plaquetas/ μ L, ou seja, cerca de 5 vezes acima sobre a concentração basal^{8,9}.

As fontes de PRP podem ser autóloga, homóloga ou heteróloga, onde a primeira possui a vantagem de diminuir a transmissão de doenças infecto contagiosas e reações imunológicas por rejeição^{6,9}. Dentre os fatores limitantes para o uso de PRP autólogo estão os portadores de feridas associadas a doenças crônicas como cardiopatias, diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica, pois estes pacientes possuem saúde debilitada, que a longo prazo desenvolvem um quadro de trombocitopenia, inviabilizando sucessivas coletas de sangue¹⁰. Há também as situações de lesões de grande extensão causadas por queimaduras¹¹. Nestes casos torna-se interessante a possibilidade de utilização de outras fontes de PRP. No entanto, uma possível desvantagem do uso de fontes heteróloga ou homóloga seria a impossibilidade das plaquetas secretarem de forma adequada todos os fatores de crescimento, além de conter fatores de antigenicidade^{6,9}. Estudos recentes revelaram resultados satisfatórios no tratamento de feridas de membros inferiores de pacientes diabéticos tratados com gel de PRP obtido a partir de plaquetas homólogas compatíveis e cicatrização de úlcera corneana em coelhos com associação de PRP e soro sanguíneo heterólogo^{10,12}.

A obtenção do PRP é simples e o procedimento pode ser adaptado facilmente para a maioria das situações clínicas com infraestrutura mínima, mantendo boa relação custo/benefício, pois sua aplicação pode resultar em uma melhor qualidade de vida ao paciente por acelerar o processo de cicatrização e reduzir os custos do tratamento^{5,10}.

Sendo assim, o trabalho objetivou comparar a viabilidade do uso do PRP autólogo, heterólogo e homólogo em feridas induzidas experimentalmente em coelhos, por meio de avaliação clínica, morfológica e morfométrica. A hipótese do ensaio é que o uso dos diferentes protocolos de PRP melhore e acelere o processo de cicatrização em escala decrescente de eficiência, respectivamente das fontes autóloga, homóloga e heteróloga.

Material e Métodos

Animais

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo número 1639 da Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, S.P., Brasil. Foram utilizados 24 coelhos (n=12machos, n=12 fêmeas) da raça Nova Zelândia Branco, saudáveis, provenientes do Biotério Central da Instituição, sem lesões dermatológicas visíveis, adultos, com peso médio de 3.0 ± 1.0 Kg. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo (12 horas claro/escuro), iniciando o claro às 7:00 horas, humidade de $55\%\pm 5$ controlados e com aclimação de 7 dias. Durante todo o período experimental receberam ração peletizada e água *ad libitum* e foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal da Unoeste. Do total de 24 animais, seis (3 machos e 3 fêmeas) foram utilizados somente como doadores para confecção do PRP homólogo. Um cão adulto, sem raça definida, clinicamente saudável, peso médio de 25Kg foi utilizado como único doador para o preparo do PRP gel do grupo heterólogo, mantido em baia individual no Hospital Veterinário da mesma instituição com água e ração *ad libitum*.

Indução e tratamento das feridas

Os coelhos foram distribuídos em grupos: autólogo GA (n=6), heterólogo GHE (n=6) e homólogo GHO (n=6 tratamento e n=6 doadores). Os animais foram contidos manualmente e realizada a tricotomia da região dorsal direita e esquerda com máquina de tosa (Andis, AGC2 - USA), utilizando lâmina nº. 40. Em seguida, foram anestesiados com uma associação de cloridrato de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil[®] 50, 15mg/kg) intramuscular (IM)¹³.

Inicialmente, foi realizada antissepsia da pele com álcool 70%¹⁴, demarcação do local da lesão (caneta Pilot[®]), e aplicado 1,0 mL subcutâneo (SC) de anestésico local (cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor). Utilizou-se um punch de 8mm para realização da ferida cirúrgica, tanto na região dorsal do lado esquerdo (A) como direito (B)¹⁵.

A pele foi retirada com auxílio de uma pinça anatômica, preservando a musculatura. Antecedendo a terapia tópica, as feridas foram limpas utilizando gaze estéril e solução de cloreto de sódio a 0,9%. A ferida considerada controle (lado A) foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9%[®] e a ferida do lado direito foi tratada com PRP na forma gel (B). Em seguida foi colocado um curativo sobre as duas feridas (A e B) com ryon estéril e curativo adesivo (Band Aid[®]) pelo tempo médio de (4horas \pm 1). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam cloridrato Tramadol (0,5mg/Kg), IM, 12/12h¹³ durante 3 dias consecutivos, a fim de minimizar o desconforto inicial.

A primeira troca dos curativos foi feita três dias após a indução das feridas, seguindo o mesmo protocolo anestésico, procedimento de limpeza e tratamento utilizado no dia da indução da ferida. A partir disso, as trocas ocorreram a cada quatro dias, segundo protocolo estabelecido por Vendramin et al.¹⁶, com modificações, até completarem 16 dias de experimento. No 17^o dia, foi feita a biópsia da ferida (utilizando um punch de 8 mm e pinça anatômica) para avaliação histopatológica das lesões e observar o início da fase de remodelação da cicatriz.

Obtenção e processamento do plasma rico em plaquetas autólogo, heterólogo e homólogo.

Para o PRP autólogo utilizou-se sangue do próprio coelho e para o PRP homólogo foi utilizado um coelho saudável para cada coelho com ferida.

Para o PRP heterólogo, após a contenção manual do cão, colheu-se 4 mL de sangue da veia jugular externa, utilizando tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA e agulhas 25x8mm. Nos grupos autólogo e homólogo, a colheita de sangue dos coelhos foi realizada na veia auricular após procedimento anestésico adotando o mesmo protocolo utilizado para a indução da ferida. Colheu-se 4mL de sangue venoso utilizando scalp 25G. O material foi transferido para um frasco contendo o anticoagulante citrato de sódio, onde foi retirada uma alíquota para

a contagem automática de plaquetas (contador automático Sysmex Poch Diff 100iV-Roche) e depois centrifugado, inicialmente a 200G (centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos para formação de dois níveis: toda a fração correspondente ao plasma mais 200 μ L da fração vermelha foi transferida para outro tubo para nova centrifugação (400G por 10 minutos).

Nesta etapa formaram-se dois níveis distintos: um superior com coloração levemente amarelada denominada plasma pobre em plaquetas (PPP) e um inferior, avermelhado. Retirou-se o PPP e do restante foi realizada uma nova contagem de plaquetas, com o objetivo de verificar se houve uma concentração superior a seis vezes do inicial¹⁷. As plaquetas foram contadas em sistemas automatizado e manual (hemocitômetro)¹⁸.

Constatada a concentração plaquetária adequada, o PRP líquido foi transformado em gel, com adição de gluconato de cálcio a 10%, na proporção de 4:1¹⁶. O volume final de PRP em gel foi de aproximadamente 0,5mL.

Avaliações clínica e morfológica

Nos dias 0, 3, 7,10,14 e 17, os animais foram avaliados com relação ao peso em gramas (g) utilizando balança digital marca ELC-10[®] e observação das características da ferida em relação a cor considerando-se os escores: 1-rósea; 2-amarelada; 3-pálida; 4-cianótica; característica do exsudato: 1-seroso; 2-sanguinolento; 3-purulento; tecido de granulação, crosta, hiperemia, edema e exsudato: 0-ausente, 1-presente; sensibilidade: 0-ausente, 1-presente, considerando mudanças no comportamento como: agitação, vocalização e movimentos de virar a cabeça com intenção de morder após a palpação do local da ferida¹⁴.

A mensuração das bordas das feridas (largura e altura) em milímetros foi feita com o auxílio de um paquímetro digital (DC-60 Western[®]). As medidas obtidas na mensuração foram usadas para calcular a área da ferida através da fórmula: $A = \pi \times R \times r$, onde A é igual à área, R é igual ao raio maior e r é igual ao raio menor^{19,20}.

O percentual de contração da lesão foi calculado utilizando modelo matemático onde a percentagem de contração (Pc) é igual a área final (Af) menos a área inicial (Ai) vezes 100 (x100), dividido pela área inicial (Ai), ou seja: $Pc = (Af - Ai) \times 100 / Ai^{21}$. Em todos os momentos a ferida foi fotografada com câmera digital (Nikon®).

Avaliação Histopatológica

Previamente à retirada do fragmento (17º dia), foi realizado o mesmo protocolo anestésico utilizado no momento da indução das feridas. Na epiderme foi avaliada degeneração, necrose e regeneração, e na derme: edema, hemorragia, grau de neovascularização, fibrose e tipo de infiltrado inflamatório. Para todos os parâmetros analisados, foi aplicado o sistema de escore, onde: (0) ausência, (1) alteração leve, (2) moderada e (3) acentuada¹⁴. As amostras de pele foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por 24 a 48 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70%. Em seguida foram processadas conforme a técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina. Com auxílio de micrótomo rotativo, seções de 5 µm de espessura de todas amostras foram obtidas e coradas pelos métodos de hematoxilina-eosina (H/E) e de tricômio de Masson para identificação de fibras colágenas^{22,23}. Todas as avaliações foram feitas por um único observador e de forma cega.

Análise Estatística

Para validação dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foram realizados respectivamente os testes de Shapiro-Wilk e Levene. O teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar os escores de cor da ferida entre momentos dentro de cada grupo. Para determinar se os escores histopatológicos diferiram entre grupos no lado A e no lado B, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Student-Newman-Keuls. Para determinar se os mesmos

escores diferiram entre os lados A e B, dentro de cada grupo recorreu-se ao teste de Wilcoxon.

Para verificar se as médias do percentual de contração da ferida do lado A em relação ao lado B diferiram entre grupos dentro de cada momento, utilizou-se a análise de variância em uma via (ANOVA *one-way*).

Para verificar se o percentual final (M17-M0) de contração da ferida diferiu entre lados, dentro de cada grupo, utilizou-se o teste t-pareado.

Foi utilizada regressão linear simples para modelar os percentuais de contração da ferida (variável dependente) em relação ao tempo em dias (variável independente) para cada um dos grupos e para os lados A e B. Para determinar os coeficientes de regressão e interceptos diferiram entre as retas ajustadas para cada grupo, empregou-se o teste t não pareado. Todas as análises foram conduzidas com auxílio do programa Biostat 5.0 e com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Os animais foram avaliados em todos os momentos em relação ao peso, sem variações significantes (peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg) e sem alterações de comportamento. O uso do cloridrato de tramadol no pós-cirúrgico pode ter contribuído para o bem estar dos animais²⁴. Além disso, alguns autores que trabalharam com PRP na cicatrização de feridas relataram um possível efeito analgésico com o uso do concentrado de plaquetas por conter endocanabióides, que sob condições inflamatórias, aumentam significativamente sua produção para conferir analgesia²⁵. O aspecto das feridas (A e B) nos três tipos de tratamento permaneceu com coloração rósea durante todo o experimento, sem características macroscópicas de contaminação, excesso de granulação ou presença de exsudato como mostra a Figura 1.

Com relação à avaliação histopatológica, verificou-se que, todos os animais tratados com os três tipos de PRP apresentaram reepitelização total. A presença de crosta fibrino-leucocitária e

angiogênese foram verificadas nas feridas A e B dos três grupos ($P>0,05$). Estas observações estão condizentes com a fase inflamatória da cicatrização e oferecem proteção para uma reparação tecidual eficiente²⁶.

O infiltrado inflamatório verificado nos grupos A e HO foi do tipo linfocítico, com discreta presença de macrófagos, tanto nas feridas A como B maior ou igual a 50%. Já no GHE, verificou-se a presença discreta de neutrófilos. Apesar deste achado, o uso do PRP heterólogo não implicou na presença de infecção ou reação alérgica, corroborando outras pesquisas que utilizaram fontes heterólogas de PRP^{12,27}.

As fibras colágenas estiveram presentes em todos os grupos (Figura 2), com maior quantidade nos coelhos tratados dos grupos GA e GHO ($P>0,05$). O mesmo foi verificado em lesões em tendão de coelhos que foram tratadas com PRP e colágeno suíno. Os pesquisadores observaram que além do aumento, houve orientação longitudinal das fibras colágenas, o que favoreceu o processo cicatricial²⁸. No GHE foi possível observar moderada quantidade de fibras colágenas nas lesões A e B. Resultado semelhante foi observado ao utilizar o PRP bovino em lesões corneanas de coelhos, onde estas fibras eram delgadas e organizadas⁶.

O uso das diferentes fontes de PRPs proporcionou um percentual de contração das feridas bem semelhante (Tabela 1). Observou-se que, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, as fontes heteróloga e homóloga mostraram-se tão eficientes quanto à fonte autóloga, entretanto houve predomínio de infiltrado inflamatório neutrofílico nas lesões tratadas com PRP heterólogo, o que poderia indicar um início de reação inflamatória, e retardar o processo cicatricial. Os achados do presente estudo sugerem que a migração celular e diferenciação dos miofibroblastos ocorreu de forma similar em todos os protocolos. A partir do 14^o dia pós-lesão, ocorreu uma maior contração das feridas em todos os grupos, mas especialmente nos lados tratados com as diferentes fontes de PRP e no 17^o dia alcançou nos grupos A (95,9%), HE (96,8%) e HO (99,7%), como mostram as Figuras 3 e 4.

Conclusão

Concluiu-se que o PRP, independente da fonte, melhora e acelera o processo de cicatrização, comprovando seu potencial terapêutico sobre as lesões cutâneas. O PRP homólogo e heterólogo podem ser utilizados onde a obtenção do sangue autólogo não é viável.

Referências

- 1 Hilmi ABM, Halim AS, Jaafar H, Asiah AB, Hassan A. Chitosan dermal substitute and chitosan skin substitute contribute to accelerated full-thickness wound healing in irradiated rats. *BioMed Research International* 2013; **2013**: doi:10.1155/2013/795458.
- 2 Rebolla A, Arisawa EALS, Barja PR, Posso MBS, Carvalho CS. Effect of *Brassica Oleracea* in rats skin wound healing. *Acta Cir Bras* 2013; **28**(9):664-9.
- 3 Waidman MAP, Rocha SC, Correa JL, Brischiliari A, Marcon SS. O Cotidiano do indivíduo com ferida crônica e sua saúde mental. *Texto contexto enferm* 2011; **20**(4):691-9.
- 4 Donatti C, Brandão CVS, Ranzani JJT, Perches CS, Padovani CR, Pellizzon CH, Sereno MG. Uso do plasma rico em plaquetas no reparo de úlceras de córnea profundas induzidas em coelhos. Avaliação clínica e histomorfométrica. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; **65**(3):809-18.
- 5 Carvalho, LR, Silva, MF, Uetanabara, R. Plasma rico em plaqueta (PRP): alternativa para regeneração de defeitos ósseos periodontais? *Rev ABO Nac* 2009; **16**(6):359-63.
- 6 Eurides D, Mantovani MM, Menezes GF, Silva LAF, Souza LA, Oliveira BJNA, Baungarten LB, Delben AFPA. Efeito de concentrado de plaquetas xenólogo na cicatrização da córnea em coelhos. *RPCV* 2010; **105** (573-576):39-43.
- 7 Vendruscolo CP, Carvalho AM, Moraes LF, Maia L, Queiroz DL, Watanabe MJ, Yamada ALM, Alves ALG. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pesq Vet Bras* 2012; **32**(12):106-10.

- 8 Sánchez-González DJ, Méndez-Bolaina E, Trejo-Bahena NJ. Platelet-rich plasma peptides: key of regeneration. *Int J Pept* 2012; **2012**:532519. doi: 10.1155/2012/532519.
- 9 Vanat N, Medeiros TNS, Balarin MRS, Pereira PM, Biasi F. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. *Semina: Ciências Agrárias* 2012; **33**(1):313-22.
- 10 Shan GQ, Zhang YN, Ma J, Li YH, Zuo DM, Qiu JL, Cheng B, Chen ZL. Evaluation of the effects of homologous platelet gel on healing lower extremity wounds in patients with diabetes. *Int J Low Extrem Wounds* 2013; **12**(1):22-9.
- 11 Marck RE, Middelkoop E, Breederveld RS. Considerations on the use of platelet-rich plasma, specifically for burn treatment. *J Burn Care Res* 2014; **35**(3):219-27.
- 12 Kaffashi ER, Mousavi GH, Mohajeri D. Effects of topical heterologous blood serum and bovine thrombin activated platelet rich plasma on experimental corneal stromal ulcers in rabbit. *Adv Environ Biol* 2012; **6**(1):95-9.
- 13 Kanashiro GP, Cassu RN. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade SF. *Manual de terapêutica veterinária*. 3rd ed. São Paulo: Roca, 2008, pp.728-45.
- 14 Camargo MC, Nogueira RMB, Sanches OC, Saab MG, Batista A, Vasconcelos D, Luvisotto LY, Lucio MAA. Applicability of crystalline cellulose membrane in the treatment of skin wounds induced in Wistar rats. *Acta Cir Bras* 2014; **29**(7):429-37. doi: 10.1590/S0102-86502014000700004.
- 15 Bauer, JA, Correa L, Lima FLM, Lima LAPA, Pustiglioni, FE. Efeito do plasma rico em plaquetas no processo de reparação de feridas dérmicas padronizadas em ratos. *R Periodontia*, 2009; **19**(3): 98-108.
- 16 Vendramin FS, Franco D, Shamall RF, Franco TR. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. *Rev Bras Cir Plást* 2010; **25**(1):4-10.
- 17 Oliveira-Filho MA, Almeida LF, Pereira JA, Nassif PAN, Czezczko NG, Kume MH, Silva MBG. Platelet-rich plasma of rabbits: introduction of experimental animal model. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2008; **21**(4):175-79.

- 18 Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 2008, p.908.
- 19 Prata MB, Haddad CM, Goldenberg S, Simões MJ, Moura LAR, Trabulsi LR. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em rato. *Acta Cir Bras* 1988; **3**(2):43-8.
- 20 Schirato GV, Monteiro FMF, Silva FO, Lima Filho JL, Leão AMAC, Porto ALF. O polissacarídeo do *Anarcadium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Cienc Rural* 2006; **36**(1):149-54.
- 21 Ribeiro G, Martins CB, Lacerda Neto JC, Silva MAG, Borges VP. Uso tópico de Ketanserina na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; **61**(1):144-48.
- 22 Michalany J. *Técnica histológica em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*. 3 ed. Michalany, São Paulo, 1998, p. 134.
- 23 Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, Freitas Neto AG. *Manual de Técnicas para histologia normal e patológica*. 2 ed. Editora Manole, São Paulo, 2003, p.331.
- 24 Klauman PR, Wouk AFP, Silas T. Patofisiologia da dor. *Arch Vet Sci* 2008;**13**(1):1-12.
- 25 Decalzi F, Ulivi V, Cancedda R, Piscitelli F, Luongo L, Gueda F, Gatta L, Maione S, Di Marzo V. Platelet-rich plasma exerts antinociceptive activity by a peripheral endocannabioide-related mechanism. *Tissue Eng Part A* 2013; **19**(19-20):2120-9.
- 26 Porth CM, Sommer C. Inflamação, reparo tecidual e cura de feridas. In:Porth CM, Matfin G. *Fisiopatologia*. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, pp.389-411.
- 27 Rezende UM, Silva RBB, Bassit ACF, Tatsui NH, Sadigursky D, Bolliger Neto R. Efeito do plasma rico em plaquetas na apoptose pós-traumática de condrócitos. *Acta Ortop Bras* 2011; **19**(2):102-5.
- 28 Chung SW, Song BW, Kim YH, Park KU, On JH. Effect of platelet-rich plasma and porcine dermal collagen graft augmentation for rotator cuff healing in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2013; **41**(12):2909-18.



Figura 1 Fotografia mostrando a evolução cicatricial ao final do 17^o dia, evidenciando o aspecto macroscópico das lesões. As letras a, b, c correspondem ao lado controle dos grupos A,HE,HO. As letras d, e, f evidenciam o lado tratado dos respectivos grupos de PRPs.

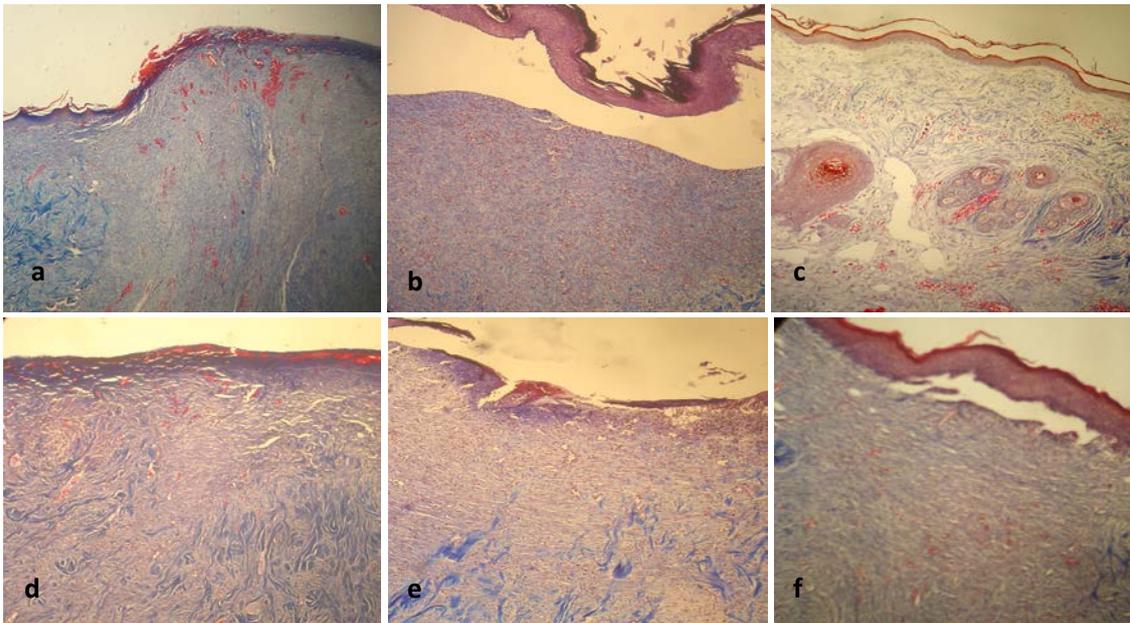


Figura 2 Fotomicroscopia do 17º dia mostrando: (a) (c) Pequena quantidade de fibras colágenas (b) (e) Moderada quantidade de fibras colágenas. (d) (f) Grande quantidade de fibras colágenas. As letras a, b, c correspondem ao lado A dos grupos A, HE e HO. As letras d, e, f evidenciam o lado B dos respectivos grupos de PRPs (Tricrômio de Masson, aumento de 100x).

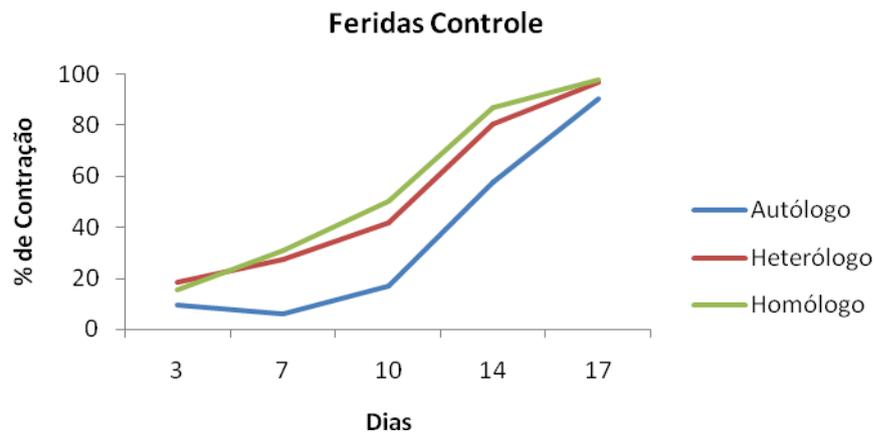


Figura 3 Porcentagem de contração das feridas A dos grupos autólogo, heterólogo e homólogo.

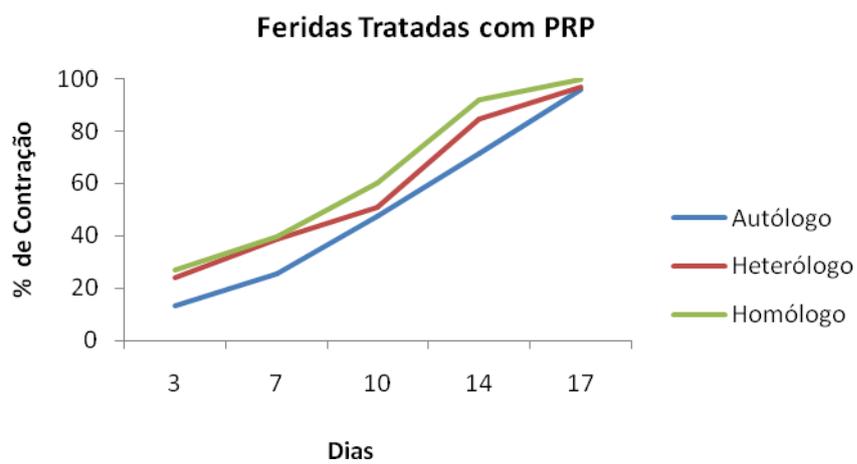


Figura 4 Porcentagem de contração das feridas B tratadas com PRP autólogo, heterólogo e homólogo.

Tabela 1 Médias e desvios-padrão dos percentuais de contração (%) das feridas A e B induzidas experimentalmente em coelhos com as três fontes de plasma rico em plaquetas (PRP).

Dias	Fontes de PRP					
	Autólogo		Heterólogo		Homólogo	
	A	B	A	B	A	B
3	9,3±17,4	13,5±55,8	18,2±14,0	23,9±13,1	15,2±25,8	26,9±4,7
7	5,9±26,9	25,3±10,4	27,1±19,2	38,6±14,0	30,7±26,7	39,7±11,1
10	17,1±33,4	47,6±25,8	41,5±29,0	51,1±10,9	50,2±9,1	60,0±15,8
14	57,7±43,6	71,5±23,5	80,6±28,6	84,4±12,2	86,6±11,1	91,7±12,4
17	90,3±6,7	95,9±3,0	96,5±7,8	96,8±4,7	97,8±2,2	99,7±0,5