

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
ÁREA DE CLÍNICA MÉDICA E CIRURGIA VETERINÁRIA**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO  
CUTÂNEA DE GATOS: PADRONIZAÇÃO DE  
TÉCNICA E APLICAÇÃO CLÍNICA**

**TESE DE DOUTORADO**

**BIANCA BERTOLETTI**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO  
CUTÂNEA DE GATOS: PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA E  
APLICAÇÃO CLÍNICA**

**Bianca Bertoletti**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica e Cirurgia, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção de grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**Orientador: Dr. Alceu Gaspar Raiser**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

---

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bertoletti, Bianca

Plasma rico em plaquetas na cicatrização cutânea de gatos: padronização de técnica e aplicação clínica / Bianca Bertoletti.-2015.

93 p.; 30cm

Orientador: Alceu Gaspar Raiser

Coorientadora: Anne Santos do Amaral

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. Cicatrização 2. Feridas cutâneas 3. Felinos 4. Adjuvante da cicatrização 5. Terapia Celular I. Raiser, Alceu Gaspar II. Santos do Amaral, Anne III. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Bianca Bertoletti. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.  
E-mail: bibertoletti@yahoo.com.br

---

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**  
**Área de Clínica Médica e Cirurgia Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO**  
**CUTÂNEA DE GATOS: PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA E**  
**APLICAÇÃO CLÍNICA**

elaborada por  
**Bianca Bertoletti**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Alceu Gaspar Raiser, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Daniel Curvello de Mendonça Müller, Dr. (UNIJUÍ)**

---

**Emerson Antônio Contesini, Dr. (UFRGS)**

---

**Anne Santos do Amaral, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**João Eduardo Wallau Schossler, Dr. (UFSM)**

**Santa Maria, março de 2015.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alceu Gaspar Raiser, pelas oportunidades, pela liberdade na escolha do tema do experimento, por todas as correções e ideias. Obrigada, principalmente, por todos os ensinamentos transmitidos desde a graduação até aqui, e exemplo de ética, profissionalismo e gentileza.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado e por financiar parte deste estudo.

À minha co-orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Anne Santos do Amaral, pela amizade, pela análise estatística, pelas correções e por, apesar das inúmeras tarefas que acumula, estar sempre disponível nos momentos em que mais precisei.

Aos amigos Fabíola Dalmolin e Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, que ao mesmo tempo em que realizavam seus experimentos, se desdobraram para me ajudar. Obrigada pelo esforço, amizade e dedicação!

À minha amiga, estagiária e “braço direito”, Mirian Denise Schalemborg. Obrigada pelo auxílio em todas as etapas desse trabalho, mas principalmente pelo amor e dedicação no tratamento com os animais. Você foi essencial para que tudo desse certo!

À minha amiga do coração, Clarice Bachinski Pozzer, pela participação e manutenção da ordem durante o período experimental, por me ajudar a manter o foco e sempre me incentivar.

À amiga Sabrinne Peglow, obrigada pela amizade e por aceitar ser avaliadora durante todo o período experimental.

À colega Cássia Bagolin, pela árdua contagem de plaquetas de todas as mostras do experimento e pela realização dos demais exames laboratoriais.

Aos anestesistas Prof. Dr. André Vasconcelos Soares, Sabrina Bäumer, Virgínia Heinze Pohl. Em especial à Franciele Naidon, responsável por todos os procedimentos anestésicos nas cirurgias e biopsias dos animais. Obrigada por toda a ajuda!

À querida Maria Moro da Rosa, secretária do PPGMV, obrigada pela disponibilidade, esforço e eficiência para solucionar todos os problemas. Também pela amizade e incentivo nas horas difíceis.

Ao Prof. Dr. Alexandre Krause, pela execução dos protocolos de produção do PRP, que fez com que conseguíssemos excelentes resultados. Obrigada por todos os ensinamentos e excelentes ideias.

A todos os docentes do PPGMV com que contribuíram para o meu aprendizado, em especial aos professores Dr<sup>a</sup> Claudete Schmidt, Dr<sup>a</sup>. Cíntia Melazzo, Dr. João Eduardo Wallau Schossler e Dr. Maurício Veloso Brun.

À colega e amiga Hellen Hartmann, pela amizade, companheirismo, pelas risadas e pela colaboração nas castrações dos animais do experimento.

À técnica em enfermagem Mairi Marchesan, por todo o apoio logístico durante a realização do experimento, pelas conversas, amizade e café.

À amiga Luciana Castro, pelo esforço e ajuda para conseguir que os animais participassem do experimento, e também pela torcida.

Aos tutores: Bia, Carmem, Félix e José. Obrigada por confiarem em mim e permitirem que seus animais fizessem parte deste estudo.

Aos funcionários: Evinha, Giovane, Joni, João, Cris, Clemar, Cleusa, Beloni e Alexandre. Obrigada por serem sempre prestativos!

Aos meus pais Irene Leite Bertoletti e Alberto Bertoletti, pela ajuda para a transformação do gatil, por me acompanharem nas madrugadas de cuidados com os animais e pela torcida. Também às minhas irmãs Dardane e Roberta, e respectivos cunhados Ramiro e Lucas.

Ao meu namorado Fabrício Freitas da Silva, pelo companheirismo, apoio e por sempre me fazer acreditar que tudo daria certo!

A Ana Rita Lancini Stumpf, uma das melhores amigas que a pós-graduação me deu, e que tenho certeza que permanecerá por toda a vida.

Às minhas companheiras de estudo Pítica e Abacaxi, que tornaram essa fase da minha vida mais leve.

Em especial, aos gatos: Theo, Leonardo, Pretinho, Batman, Dexter, Meaw, Salém, Paco, Zulu e Bob. Vocês moram no meu coração! Obrigada também a todos os outros gatos que participaram desse estudo e aos que contribuíram com meu aprendizado durante o período de doutorado.

E a todos que, de alguma maneira, cooperaram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

## **RESUMO**

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE GATOS: PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA E APLICAÇÃO CLÍNICA**

AUTORA: BIANCA BERTOLETTI  
ORIENTADOR: ALCEU GASPAR RAISER  
Santa Maria, 09 de março de 2015.

A cicatrização cutânea em gatos possui diferenças qualitativas e quantitativas quando comparada à de outras espécies, fato que parece predispor a problemas. Feridas que cicatrizam por primeira intenção apresentam menor resistência, taxa de contração e epitelização. Já na cicatrização por segunda intenção, a fase inflamatória é branda e a fase proliferativa apresenta surgimento e progressão lenta. Tendo em vista esses aspectos, torna-se importante a busca de meios que ajudem a favorecer e conduzir o reparo de feridas cutâneas em gatos. Este estudo objetivou a padronização de uma técnica para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em gatos e a avaliação de sua ação sobre a cicatrização de feridas cutâneas produzidas experimentalmente nessa espécie. Ele desenvolveu-se em duas etapas distintas: na primeira foram comparados três protocolos manuais para produção de PRP em gatos. Utilizaram-se 15 animais adultos hígidos e domiciliados, divididos aleatoriamente em três grupos. Cinco amostras de 4,5ml de sangue foram colhidas da jugular de cada animal, por sistema a vácuo, sequencialmente, em tubos com citrato de sódio. As amostras de cada grupo foram processadas por meio de protocolos de dupla centrifugação: P1 (113g – 10 minutos; 652g – 5 minutos); P2 (400g – 10 minutos; 800g – 10 minutos); P3 (400g – 10 minutos; 600g – 10 minutos). As concentrações plaquetárias obtidas no PRP dos diferentes protocolos e a relação entre o PRP e contagem de plaquetas foram comparadas por teste-t. A viabilidade do modo de coleta a vácuo para a espécie e a facilidade de execução das técnicas também foram avaliadas. Na segunda etapa, foram utilizados dez gatos adultos hígidos, domiciliados. Em cada animal foram produzidos, cirurgicamente, quatro defeitos circulares, pareados, com diâmetro de 1 cm, na pele, nas laterais esquerda e direita da linha média dorsal do tronco. As lesões de um lado foram tratadas com PRP líquido, obtido do próprio animal, de acordo com o melhor protocolo definido na primeira etapa do experimento. Os defeitos do lado oposto, considerados controle, foram preenchidos com solução de NaCl 0,9% estéril. As feridas foram avaliadas por três observadores, a cada três dias, por 28 dias. Considerou-se a presença de crostas, dor, edema, exsudato, tecido de granulação e a coloração. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney em ranks. A área de cada lesão foi analisada por morfometria a cada sete dias e os dados comparados pelo teste-t. Também, semanalmente, foram obtidos fragmentos de pele contendo tecido normal e cicatricial a partir das duas lesões (tratada e controle) mais craniais. Os fragmentos foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson, e avaliados qualitativamente quanto a presença de crosta, úlcera, acantose, fibroplasia, colagenização e neovascularização. Esses dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney em ranks. O sistema de coleta de sangue a vácuo mostrou-se satisfatório e simplificou o procedimento. Duas das técnicas (P2 e P3) mostraram-se factíveis para a produção do PRP, proporcionando

concentrações superiores a  $1 \times 10^6$  plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$ . O protocolo P3 mostrou-se estatisticamente superior na capacidade de incremento, e foi selecionado para uso nas feridas experimentais. Na segunda etapa, a técnica para coleta de sangue e o protocolo selecionado, mostraram-se satisfatórios. A utilização do PRP na forma líquida, depositado diretamente sob a lesão, tornou fácil sua utilização. Clinicamente, houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,025$ ) e maior exsudação nas feridas tratadas no dia três. Na análise morfométrica, notou-se maior contração nas feridas tratadas com PRP, principalmente nos primeiros sete dias ( $p=<0,001$ ). Na avaliação histopatológica semi-quantitativa não houve significância em nenhum dos parâmetros comparados. Logo, conclui-se que o método de coleta é eficiente, e podem-se considerar exequíveis as técnicas para obtenção do PRP em gatos, a partir dos protocolos P2 e P3. O protocolo P3 demonstra superior eficiência na capacidade de concentrar plaquetas, gerando um PRP de melhor qualidade. É possível a ativação do PRP líquido por meio da lesão tecidual. O aumento da exsudação sugere intensificação do processo inflamatório nas feridas tratadas. O uso terapêutico do PRP na forma líquida melhora a capacidade de contração em feridas produzidas experimentalmente em gatos, apesar da ausência de evidências histopatológicas pela avaliação adotada.

Palavras-chave: felinos, feridas cutâneas, adjuvante da cicatrização.



## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PLATELET-RICH PLASMA IN CUTANEOUS HEALING IN CATS: STANDARDIZATION TECHNIQUE AND CLINICAL APPLICATION**

AUTHOR: BIANCA BERTOLETTI  
ADVISER: ALCEU GASPAR RAISER  
Santa Maria, March 09<sup>th</sup>, 2015.

In cats, cutaneous healing presents qualitative and quantitative differences in comparison with another species, that seems predispose them to healing problems. Wounds that heal by first intention present less resistance, rate of contraction and epithelization. In the second intention healing, the inflammatory phase is bland and the proliferative phase has slow appearing and progression. Considering these aspects, it becomes important to search ways to promote and conduce cutaneous wound healing in cats. The aims of this study were standardize a technique to obtain autologous platelet-rich plasma (PRP) in cats and evaluate your effect on cutaneous healing of experimentally produced wounds in this species. The experiment was developed in two stages: three manual protocols to produce autologous platelet-rich plasma in cats were compared in the first stage. Fifteen adult healthy indoor cats, randomly divided into three groups, were utilized. Five samples of 4.5 ml of jugular blood were collect, with a vacuum system, sequentially in citrated tubes from each cat. The samples were processed using double centrifugation protocols (P): P1 (113g – 10 minutes; 652g – 5 minutes); P2 (400g – 10 minutes; 800g – 10 minutes); P3 (400g – 10 minutes; 600g – 10 minutes). Platelet concentration obtained in PRP obtained in different protocols and the ratio of PRP and platelet counts were compared by t-test. The feasibility of the collect method to the species and ease of execution of techniques was evaluated too. In the second stage, ten healthy adult indoor cats were used. In each animal were surgically produced four circular skin defects, with a diameter of 1 cm, on left and right sides of trunk dorsal midline. The lesions on one side were treated with fluid PRP, obtained of animal itself, according to the best protocol defined in the first stage of the experiment. The control defects in the opposite side were filled with NaCl 0,9% sterile solution. Three observers evaluated the wounds, every three days, for 28 days. The presence of crusts, pain, swelling, exudate, granulation tissue and the color were considered. The results were statistically evaluated by Mann-Whitney rank test. The area of each lesion was analyzed by morphometry every seven days and the data compared by t-test. Skin fragments with normal and scar tissue, from two more cranial lesions (treated and control), were obtained weekly. The fragments were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson's trichrome, and qualitatively evaluated for the presence of crust, ulcer, acanthosis, fibroplasia, collagen deposition and neovascularization. These data were analyzed using the Mann-Whitney rank test. The collect method was satisfactory and simplified the procedure. Two techniques (P2 and P3) were effective to produce PRP, yielding concentrations higher than  $1 \times 10^6$  platelets. $\mu\text{L}^{-1}$ . The P3 protocol was statistically higher in capacity increase, and was selected for use in experimental wounds. In the second stage, the techniques for blood collection, and the selected protocol, were satisfactory. The use of PRP in liquid form, deposited directly on the lesion, made it easy to use. Clinically, there was a statistically significant difference ( $p = 0.025$ ) and higher exudation in wounds treated to three days. In

morphometric analysis we noticed a greater contraction in wounds treated with PRP, especially of the first seven days ( $p = <0.001$ ). Histopathological evaluation was not significant in any compared parameters. Therefore, it is concluded that the sampling method is efficient and P2 and P3 protocols can be considered feasible to obtain PRP from cats. The protocol P3 was superior in the platelet concentration ability, producing a better quality PRP. Activation of PRP liquid by tissue injury is possible. The increased exudation suggests enhancement of the inflammatory process in treated wounds. Therapeutic use of liquid PRP improves contraction capacity on experimental wounds in cats, despite the absence of histological evidence by way the evaluation adopted.

Keywords: cats, skin wounds, healing adjuvant.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fluxograma ilustrando a primeira etapa do procedimento experimental, no qual foram utilizados 15 gatos doadores de sangue e foram testados três protocolos de separação do PRP. O protocolo mais eficiente foi selecionado para uso na segunda etapa..... 34
- Figura 2** – Fluxograma das atividades realizadas na segunda etapa do estudo, para determinar a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) na reparação de feridas cutâneas produzidas experimentalmente em gatos..... 35
- Figura 3** – Processamento do sangue. Separação após a primeira centrifugação: A - em P2; B - em P3. Botão plaquetário formado após a segunda centrifugação: C - em P2; D - em P3..... 37
- Figura 4** – Modelo utilizado por Bohling et al. (2006), no estudo em que compararam a cicatrização cutânea de cães e gatos. B – Modelo de lesões cutâneas circulares, pareadas, utilizado no presente estudo..... 39
- Figura 5** – Etapas do procedimento cirúrgico. A – Marcação dos pontos a serem excisados; B – Incisão inicial com *punch* para biopsia; C – Finalização da excisão cirúrgica, com auxílio de pinça auxiliar e tesoura de Mayo; D – Vista final das quatro lesões pareadas, produzidas experimentalmente, na região dorsal do tronco de um felino..... 40
- Figura 6** – Realização dos tratamentos. A – Aplicação do PRP (círculo) nas feridas tratadas; B – aplicação da solução de NaCl 0,9% (círculo) nas feridas controle..... 41
- Figura 7** – Feridas cobertas, individualmente, pelos adesivos de poliuretano, após os tratamentos. Observar aspecto brilhante dos curativos..... 42
- Figura 8** – Ilustração das coletas de tecido para biopsia. Em cada uma dos intervalos de tempo (sete, 14, 21 e 28 dias), foi removido um fragmento de pele do lado tratado (vermelho) e do controle (verde)..... 44
- Figura 9** – Gráficos demonstrando a dispersão da concentração plaquetária nas cinco repetições para cada animal de acordo com os protocolos utilizados..... 49

- Figura 10** – Gráfico ilustrando a redução da área das feridas tratadas e controle no intervalo de 14 dias. Os pontos representam a média dos grupos, e as linhas verticais o desvio padrão..... 56
- Figura 11** – Evolução cicatricial no período de 21 dias. No lado direito feridas tratadas com PRP, no esquerdo controle. A - Aos sete dias; B – Aos 14 dias; C – Aos 21 dias..... 56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Protocolos (P1, P2, P3) de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) em felinos.....	36
<b>Tabela 2</b> –	Dados de contagem plaquetária dos grupos P2 e P3 com suas respectivas médias e desvios padrões.....	48
<b>Tabela 3</b> –	Dados de contagem plaquetária dos 10 animais utilizados na segunda fase do experimento, com suas respectivas médias e desvios padrões.....	51
<b>Tabela 4</b> –	Avaliação clínica das feridas quanto à presença de exsudato, comparando-se feridas tratadas com PRP (T) com feridas controle (C). Na tabela são apresentados os valores de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney em <i>ranks</i> .....	53
<b>Tabela 5</b> –	Avaliação clínica quanto a presença de crostas, dor, exsudato e tecido de granulação, nas feridas tratadas com PRP (T), de acordo com o tempo de evolução. Na tabela são apresentados os valores dos quartis de 75%, obtidos pelo teste Mann-Whitney em <i>Ranks</i> com múltipla comparação pareada pelo método de Dunn.....	54
<b>Tabela 6</b> –	Avaliação clínica quanto a presença de crostas, dor, exsudato e tecido de granulação, nas feridas controle (C), de acordo com o tempo de evolução. Na tabela são apresentados os quartis de 75% obtidos pelo teste Mann-Whitney em <i>Ranks</i> , com múltipla comparação pareada pelo método de Dunn.....	55
<b>Tabela 7</b> –	Avaliação morfométrica das áreas das feridas em cada grupo, tratado e controle, em função do tempo. Na tabela são apresentados os valores dos quartis de 75% e o valor de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney em <i>Ranks</i> , e comparados pelo método de Dunn.....	57
<b>Tabela 8</b> –	Avaliação morfométrica das áreas das feridas tratadas com PRP em comparação ao controle. Na tabela são apresentadas as médias das áreas em cada grupo em cm <sup>2</sup> , e o valor de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney Rank Sum Test.....	57
<b>Tabela 9</b> –	Disposição das feridas de cada animal, nos dias da análise morfométrica.	58

- Tabela 10** – Avaliação histológica quanto a presença de crostas, úlcera, acantose, fibroplasia, colagenização e neovascularização, comparando-se os tempos das biopsias nas feridas tratadas com PRP (T). Na tabela são apresentados os valores de p, obtidos pelo teste Mann-Whitney em *Ranks*..... 59
- Tabela 11** – Avaliação histológica quanto a presença de crostas, úlcera, acantose, fibroplasia, fibrose e neovascularização, comparando-se os tempos das biopsias nas feridas controle (C). Na tabela são apresentados os valores de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney em *Ranks*..... 59

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A –	Aprovação para experimentação pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA).....	85
Anexo B –	Termo de consentimento livre esclarecido para participação em pesquisa.....	86
Anexo C –	Dados estatísticos.....	87

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 A cicatrização cutânea</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Diferenças na cicatrização de gatos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3 As Plaquetas</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4 O Plasma rico em plaquetas (PRP)</b> .....	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 Comissão de ética no uso dos animais</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2 Locais</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3 Animais</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4 Grupos experimentais</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5 Procedimentos experimentais</b> .....	<b>33</b>
3.5.1 Preparo dos animais .....	34
3.5.2 Coleta de sangue .....	35
3.5.3 Processamento do plasma rico em plaquetas (PRP) .....	36
3.5.4 Avaliações laboratoriais.....	38
3.5.5 Procedimento cirúrgico .....	38
3.5.6 Tratamentos .....	40
3.5.7 Uso de antibiótico .....	42
3.5.8 Analgesia .....	42
3.5.9 Pós-operatório .....	42
3.5.10 Coleta de fragmentos de pele para biopsia .....	43
<b>3.6 Parâmetros avaliados</b> .....	<b>44</b>
3.6.1 Primeira fase do experimento: protocolo para obtenção do PRP .....	44
3.6.2 Segunda fase do experimento: uso do PRP como adjuvante da cicatrização .....	44
3.6.2.1 Avaliação macroscópica .....	45
3.6.2.1.1 Avaliação clínica .....	45
3.6.2.1.2 Análise morfométrica .....	45
3.6.2.2 Avaliação microscópica .....	45
<b>3.7 Análise estatística</b> .....	<b>46</b>
<b>3.8 Destino dos animais</b> .....	<b>46</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 Protocolos para obtenção do PRP</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2 Uso do PRP como adjuvante da cicatrização</b> .....	<b>50</b>



4.2.1 Coleta de sangue e processamento do PRP .....	50
4.2.2 Procedimento cirúrgico .....	51
4.2.3 Avaliação macroscópica .....	52
4.2.3.1 Avaliação clínica .....	52
4.2.3.2 Avaliação morfométrica .....	55
4.2.4 Avaliação microscópica .....	58
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Protocolos para obtenção do PRP .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2 Uso do PRP como adjuvante da cicatrização .....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A perda da continuidade celular e anatômica da pele é caracterizada como ferida e as feridas cutâneas estão entre as lesões mais comumente tratadas em medicina veterinária. Elas podem ser desencadeadas por causas diversas, tais como acidentes automobilísticos, mordidas, lacerações, por objetos penetrantes, projéteis, injúrias térmicas, ou ainda, pela ressecção cirúrgica da pele lesada (PAVLETIC, 2010).

A cicatrização é um processo complexo que inicia imediatamente após a lesão, acontece de forma ordenada, podendo ser dividido nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação ou maturação (WITTE; BARBUL, 1997). O objetivo final desses eventos é a formação de um tecido que tenha semelhança com a estrutura e função da pele íntegra (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

Apesar de haver diferenças anatômicas e na circulação sanguínea da pele, descritas e reconhecidas entre os mamíferos, que são motivos para variações quanto à cicatrização cutânea (PAVLETIC, 2010), a maior parte dos estudos tem seu foco voltado para as semelhanças entre as espécies (BOHLING; HENDERSON, 2006).

Em estudos onde se comparou a cicatrização cutânea de cães e gatos, foram encontradas significativas diferenças quantitativas e qualitativas entre estas espécies. Diferenças quanto a resistência à ruptura, em feridas cicatrizadas por primeira intenção, e intensidade da resposta inflamatória e formação do tecido de granulação, naquelas por segunda intenção, parecem predispor os gatos a maiores problemas na cicatrização (BOHLING et al., 2004; BOHLING et al., 2006; BOHLING; HENDERSON, 2006).

Ao se conhecer as características da cicatrização cutânea de felinos, torna-se coerente a busca de meios diferentes de favorecê-la, como a instituição do uso de adjuvantes da cicatrização. Dentre estes, destacam-se os produtos derivados de plaquetas, principalmente o plasma rico em plaquetas (PRP), que de acordo com Lieberman et al.(2002) é uma fonte autógena e pouco onerosa de fatores de crescimento (FC), preparada a partir da centrifugação do sangue total. Garcez (2012) refere que diversos estudos têm demonstrado que a aplicação do PRP pode melhorar a hemostasia e acelerar o processo de reparação tecidual, tanto em lesões acidentais, quanto em cirúrgicas.

Até o presente, não existem protocolos estabelecidos, nem dados sobre o seu uso como adjuvante da cicatrização em gatos. Logo, este estudo teve como objetivos gerais padronizar

uma técnica para a obtenção de PRP, a partir do sangue de gatos, e avaliar sua ação como adjuvante da cicatrização em feridas cutâneas, produzidas experimentalmente, nessa espécie. Como objetivos específicos buscou-se: 1) Avaliar a viabilidade do método de coleta de sangue, por sistema a vácuo, para obtenção do PRP na espécie em questão; 2) Testar três protocolos manuais de dupla centrifugação, com variação na força g e/ou tempo de centrifugação, previamente selecionados, para a separação do PRP do sangue de gatos; 3) Selecionar, dentre os protocolos testados, o que atingir maior concentração de plaquetas, para uso como adjuvante da cicatrização em feridas cutâneas experimentais em gatos, e comparar a um tratamento controle; 4) Avaliar e comparar os grupos tratado e controle quanto às características clínicas das feridas, morfometria e exame histopatológico de biopsia, durante um período de 28 dias. E verificar se, com bases nessas avaliações, há evidências de melhora na qualidade e tempo de cicatrização com o uso do PRP, em gatos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A cicatrização cutânea**

A pele é o maior e mais visível órgão do corpo, a qual se constitui como barreira anatômica e fisiológica entre o animal e o ambiente. Ela fornece proteção contra lesões físicas, químicas e microbiológicas, sendo que a perda da sua integridade pode levar ao desequilíbrio fisiológico (SCOTT, 2000). Sua espessura varia de acordo com a espécie animal, raça e localização no corpo. Nos gatos, a espessura da pele varia de 0,2 a 2 mm, sendo mais espessa na região dorsal e no pescoço, tornando-se mais fina em direção ao abdômen. Nas regiões inguinal e axilar a pele torna-se mais fina ainda, e considera-se que sua espessura decresce de regiões proximais para extremidades distais (SCOTT, 1980).

Derme, epiderme e anexos compõem a pele. A epiderme é a fina camada mais externa, com função de proteção. Ela é avascular e nutrida a partir dos capilares da derme, e também é sustentada por essa camada. Nas áreas cobertas por pelos a epiderme é delgada, torna-se espessa onde os pelos são reduzidos, e é queratinizada nos coxins plantares e focinho, onde é ainda mais espessa. Profundamente em relação à epiderme está situada a derme, camada vascularizada, que além de vasos sanguíneos contém folículos pilosos, glândulas, nervos, fibras musculares lisas e vasos linfáticos. Ela é formada por fibras colágenas reticulares e elásticas circundadas por mucopolissacarídeo, substância fundamental. Ademais, fibroblastos, macrófagos, plasmócitos e mastócitos são achados na derme. O tecido subcutâneo localiza-se imediatamente abaixo da derme (HEDLUND, 2007).

A ruptura da continuidade normal da estrutura corpórea denomina-se ferida (WALDRON; ZIMMERMANN-POPE, 2007). As feridas podem decorrer de fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os intrínsecos são resultado de alterações vasculares, metabólicas, neoplasmas, infecções, entre outras. Já os extrínsecos compreendem lesões acidentais e feridas cirúrgicas (KNUTSON et al.,1981). Considera-se que as feridas estão entre as principais lesões tratadas pelos médicos veterinários (PAVLETIC, 2010).

A cicatrização é o processo que inicia imediatamente após a lesão ou incisão de pele, combinando uma série de eventos físicos, químicos e celulares, que resulta na reparação do tecido ferido ou substituição do mesmo por colágeno (HEDLUND, 2007). Esse processo pode ser conceitualmente dividido nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação ou

maturação (WITTE; BARBUL, 1997), as quais são sequenciais e sobrepostas. Devido à identificação clínica dessas fases em diversas espécies animais, há um pressuposto de que a cicatrização de feridas é um processo relativamente homogêneo em todas elas (SCOTT, 2000). Todas as feridas ou incisões de pele passam pela mesma sequência de eventos químicos e celulares, sejam elas ocluídas com suturas, ou cicatrizadas como feridas abertas (POPE, 1996).

As fases da cicatrização baseiam-se em complexos eventos microscópicos que são iniciados, intercedidos e mantidos por mediadores bioquímicos. Citocinas e fatores de crescimento (FC) liberados pelas plaquetas iniciam o reparo da lesão. Macrófagos, células endoteliais e fibroblastos ampliam e mantêm os eventos da cicatrização (HOSGOOD, 2006).

O aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células circulatórias, liberação de citocinas e fatores de crescimento, e a ativação de células, caracterizam a fase inflamatória (HEDLUND, 2007). Inicialmente, o processo de reparo está voltado para o tamponamento dos vasos sanguíneos (LEV KOVITZ et al., 1995). A hemorragia, em decorrência do dano aos vasos sanguíneos e linfáticos, é responsável pela limpeza da superfície da ferida e preenchimento da mesma (HOSGOOD, 2006) com plasma, elementos celulares e principalmente plaquetas.

Quase simultaneamente à lesão, ocorre a vasoconstrição, em resposta a descargas adrenérgicas e desgranulação de mastócitos, minimizando a perda de sangue (LEV KOVITZ et al., 1995). A vasoconstrição dura apenas, em média, 10 minutos. Após, dá-se a vasodilatação, acompanhada do aumento da permeabilidade capilar, permitindo a passagem de células e líquido intravascular para o espaço extravascular (HOSGOOD, 2006).

A agregação plaquetária, ativação e posteriormente o recrutamento de mais plaquetas, tem como resultado a formação de um trombo que provisoriamente tampona a ferida (LEV KOVITZ et al., 1995). Fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e substâncias quimiotáticas são liberados pelas plaquetas ativadas (HEDLUND, 2007). Proteínas sanguíneas e moléculas que facilitam a entrada de células no local da ferida são incorporadas pelo coágulo sanguíneo, sendo a fibronectina o componente mais importante para a formação de uma matriz extracelular provisória (HOSGOOD, 2007).

A matriz extracelular apresenta muitos locais para a ligação de moléculas de adesão, presentes na superfície de neutrófilos, macrófagos e células do tecido conjuntivo. Essa formação de coágulo faz a estabilização das bordas da ferida, atribuindo a ela força limitada, promove uma barreira contra infecções e perda de líquido e, ademais, fornece substrato para

que se inicie a reorganização da ferida (HOSGOOD, 2006). Fatores de crescimento e citocinas que serão liberados nas fases seguintes do processo cicatricial também têm origem na matriz extracelular (BALBINO et al., 2005). Quando o coágulo seca, forma-se uma crosta que impede novas hemorragias e permite que o reparo tecidual prossiga sob sua superfície (HOSGOOD, 2006; HEDLUND, 2007)

Intimamente ligada à coagulação, a inflamação depende de diversos mediadores químicos, leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos (MENDELBAUM et al., 2003). Ao se difundirem pela matriz provisória, mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, tais como TGF- $\beta$ , PDGF, tromboxanos e fator ativador de plaquetas (PAF), formam um gradiente quimiotático que orienta a migração das células envolvidas na instalação do processo inflamatório (BALBINO et al., 2005). Os PMN chegam no momento da lesão tissular e ficam por um período que varia de três a cinco dias (MANDELBAUM et al., 2003).

Quando ocorre o dano tecidual, os sinais enviados para fora do endotélio íntegro promovem a adesão, marginação e diapedese dos neutrófilos para a ferida (HOSGOOD, 2007). O estímulo para a migração dos neutrófilos é dado pelo aumento da permeabilidade vascular e liberação de prostaglandinas, em conjunto com o gradiente quimiotático (WITTE; BARBUL, 1997). Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a atingir a região inflamada, e são o tipo celular predominante entre o primeiro e segundo dias (BALBINO et al., 2005). Eles são responsáveis pela fagocitose de bactérias e restos extracelulares. Ao liberarem radicais superóxido, os neutrófilos causam a morte de bactérias, fazem a degradação de macromoléculas bacterianas, matriz extracelular desnaturada e células danificadas (HOSGOOD, 2007), além de estimularem monócitos (HEDLUND, 2007). Quando não há infecção, os neutrófilos não são essenciais ao processo de cicatrização (PAVLETIC, 2010). O exsudato referido como pus é formado pela combinação entre o líquido da ferida, neutrófilos mortos e tecido desnaturado (HOSGOOD, 2006).

Apesar do predomínio de neutrófilos no início da inflamação, também há migração de monócitos do sangue para a lesão, ao mesmo tempo e na mesma proporção. O recrutamento dos monócitos é feito por citocinas liberadas por neutrófilos ativados, proteínas inflamatórias e produtos da degradação da matriz extracelular (HOSGOOD, 2007).

Estando nas feridas, monócitos transformam-se em macrófagos dentro de 24 a 48 horas. Os macrófagos são considerados o componente mais relevante na indução do processo de reparo. Eles removem tecido necrosado, bactérias e material estranho por meio da secreção de collagenase, e também podem coalescer, dando origem a células gigantes e multinucleadas com funções fagocíticas. Além disso, secretam o fator de crescimento transformador  $\alpha$  (TGF-

$\alpha$ ), TGF- $\beta$ , PDGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e interleucina-1, que podem dar início, manter e coordenar formação do tecido de granulação (HEDLUND, 2007).

Os fatores de crescimento provenientes dos macrófagos são considerados essenciais para a fibroplasia e angiogênese, para a iniciação e propagação da formação do novo tecido. Ademais, o estímulo para fibroplasia, com subsequente produção de colágeno também é dado por meio do lactato produzido pelos macrófagos na ferida. A fase inflamatória dura aproximadamente cinco dias, em feridas produzidas experimentalmente e, em lesões não complicadas, à medida que a fase inflamatória diminui, a população de macrófagos decresce (PAVLETIC, 2010).

A invasão de fibroblastos e aumento no acúmulo de colágeno na ferida marcam a passagem da fase inflamatória para a proliferativa (HOSGOOD, 2006), na qual acontecem a fibroplasia, angiogênese, reepitelização (MANDELBAUM et al., 2003; HOSGOOD, 2006; HOSGOOD, 2007; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009) e contração da ferida (HOSGOOD, 2006). Logo, essa é a fase onde ocorre o fechamento da lesão, propriamente dito (MANDELBAUM et al., 2003; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009), e ela compreende o período de cerca de 20 dias após a lesão tecidual (PAVLETIC, 2010).

Aproximadamente 24 a 36 horas após a lesão, células endoteliais e fibroblastos, adjacentes a borda da ferida, começam a se multiplicar. Plaquetas e macrófagos ativados liberam fatores de crescimento e citocinas, que são responsáveis pela proliferação dessas células (GREGORY, 1999). Os fibroblastos são as principais células que compõem o tecido de granulação e, após sua ativação, migram das margens da ferida, por meio da matriz provisória, para o centro. Eles liberam enzimas proteolíticas que facilitam sua migração pela rede de fibrina e, após sua migração, gradualmente iniciam a síntese de proteínas. Inicialmente, secretam grandes quantidades de fibronectina, visando formar a matriz extracelular perdida (PAVLETIC, 2010). Com um maior número de fibroblastos ativados para a síntese de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser trocada por tecido conjuntivo mais forte e elástico. A esse evento é dado o nome de fibroplasia, e seu sucesso está intimamente relacionado à neovascularização (KNIGHTON et al., 1981).

A formação de novos vasos é tida como evento fundamental para o processo de cicatrização, pois sem adequada circulação os fibroblastos não conseguem sobreviver no ambiente da ferida, e se não houver fibroblastos, não haverá colágeno. A epitelização também é dependente de uma matriz extracelular vascularizada. (PAVLETIC, 2010).

A angiogênese é considerada um evento complexo, dependente da interação da matriz extracelular e citocinas que estimulam a migração e multiplicação de células endoteliais. Ela é

induzida pela ação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a partir dos macrófagos, células endoteliais e células epiteliais ativadas (HOSGOOD, 2006; HEDLUND, 2007; HOSGOOD, 2007), somando-se à baixa tensão de oxigênio presente no centro da ferida (BALBINO et al., 2005). O FGF está relacionado à angiogênese nos primeiros três dias após a lesão, ao passo que o VEGF é considerado crítico para a formação de tecido de granulação do quarto ao sétimo dia (HOSGOOD, 2007).

Por volta do terceiro dia após a lesão, células endoteliais da parede dos vasos lesados proliferam e servem como origem de células durante a angiogênese. Ramos capilares estendem-se na matriz extracelular e suas pontas ramificam-se, conectam-se e formam alças capilares. Os plexos capilares são formados quando novos ramos se espalham pelas alças (PAVLETIC, 2010). Com a formação de novos capilares, ocorre a elevação da tensão de oxigênio, resultando no aumento da fibroplasia (HEDLUND, 2007).

A morfologia e função das células endoteliais sofre forte influência da matriz extracelular. A matriz de fibronectina, que circunda os ramos endoteliais, suporta e orienta o movimento das células. A nova vasculatura deposita proteoglicanos e fibronectina, formando sua própria membrana basal (PAVLETIC, 2010).

Com a angiogênese e fibroplasia inicia a formação do tecido de granulação, composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, sustentados pela matriz extracelular. Devido a imaturidade dos vasos, o tecido é edematoso, exsudativo e sangra com facilidade (HANATAKA; CURI, 2007). Ele tem por característica a coloração vermelha e preenche a ferida, geralmente abaixo da crosta ou sob a bandagem. Esse tecido é essencial para o reparo da ferida, pois completa o defeito tecidual, confere proteção, impede infecções e fornece uma superfície para a epitelização. Fibroblastos diferenciados, chamados miofibroblastos, também estão presentes no tecido de granulação, e são importantes para a contração da ferida (HOSGOOD, 2007).

De acordo com Balbino et al. (2005), quando ocorre a lesão, é proporcionado um estímulo para a migração e proliferação de fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos, a partir das margens da ferida. Além disso, células basais que perderam a interação com células adjacentes são ativadas, adquirem propriedades mitóticas, e proliferam direcionadas ao centro da ferida. Os estímulos para a migração e proliferação das células da epiderme são dados pela ação de EGF, TGF- $\alpha$  e fator de crescimento de queratinócitos (KGF), produzidos pelas células epiteliais, fibroblastos e macrófagos da ferida. Mandelbaum et al. (2003) citaram que, em feridas de espessura parcial, a reepitelização se dá a partir da migração de queratinócitos



não lesados das bordas das feridas e dos anexos epiteliais. Já nas de espessura total, é descrito por Hosgood (2006), que o processo só pode acontecer a partir das bordas depois da formação do tecido de granulação adequado, e o epitélio não é visível até o quarto ou quinto dia (MENDELBAUM et al., 2003).

Para facilitar sua movimentação, as células epiteliais tornam-se maiores e achatadas, liberam colagenase para que possam migrar sobre qualquer crosta presente na superfície da ferida. Inicialmente, feridas epitelizadas têm a superfície coberta por uma frágil e fina camada única de células, a qual gradualmente se torna mais espessa, à medida que são formadas camadas adicionais de células. Em feridas suturadas, onde a lacuna é pequena, as células epiteliais podem fazer o preenchimento da área em 48 horas. Já em médias ou grandes feridas, a migração epitelial pode levar semanas, ou ainda nunca se completar, se estendendo à fase de maturação, em feridas problemáticas (PAVLETIC, 2010).

A redução no tamanho da ferida, devido a alterações na sua tensão e no tecido circundante, é denominada contração. Tal fenômeno torna-se visível a partir do quinto dia após a lesão, pois seu início depende da presença de fibroblastos. O processo de contração envolve uma complexa interação entre células, matriz extracelular e fatores de crescimento, tais como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e PDGF (HOSGOOD, 2006; HOSGOOD, 2007). Depois de migrarem pela matriz extracelular, os fibroblastos mudam para um fenótipo pró-fibrótico, no qual o colágeno é depositado (PAVLETIC, 2010). Por volta da segunda semana do reparo, os fibroblastos assumem um fenótipo de miofibroblastos, com microfilamentos de actina dispostos em sua membrana citoplasmática, o qual é responsável pela contração da ferida (HOSGOOD, 2006; HOSGOOD, 2007). Uma vez iniciada a contração da ferida, esse processo é continuado até que as margens se encontrem, e ocorra a inibição por contato entre as células. Ela também cessa se a tensão da pele circundante for maior ou igual a força de contração da ferida (HOSGOOD, 2007), ou pelo acúmulo e maturação do colágeno e redução no número de miofibroblastos (POPPE, 1996). Pavletic (2010) citou que a contração pode se desenvolver em um período entre três e 42 dias, em feridas experimentais em coelhos. Já em cães, essa fase leva entre cinco a nove dias.

A fase de maturação ou remodelamento compreende a transição do tecido de granulação para uma cicatriz (HOSGOOD, 2007; PAVLETIC, 2010). Essa fase inicia após a adequada deposição de colágeno, aproximadamente 17 a 20 dias após a lesão, e pode estender-se por meses ou anos (GREGORY, 1999; HEDLUND, 2007). Depois do tecido de granulação preencher a ferida, há uma gradual diminuição no número de fibroblastos sintetizados, regressão da rede de capilares e a taxa de síntese de colágeno declina. A taxa de

síntese é balanceada pela taxa de degradação do colágeno (GREGORY, 1999). As fibras colágenas alteram sua orientação, ao longo das linhas de estresse, e tornam-se mais espessas (HEDLUND, 2007). A quantidade de colágeno tipo III diminui gradativamente, ao passo que o tipo I aumenta (HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010). Fibras colágenas não orientadas ou não funcionais são degradadas por enzimas proteolíticas da matriz extracelular (HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010).

Nessa fase da cicatrização, a deposição de colágeno está diretamente relacionada à força tênsil da ferida. Nas três primeiras semanas após a lesão, a ferida possui apenas 20% de sua resistência final (HEDLUND 2007, PAVLETIC 2010). Nesse período, o ganho de força se deve ao rápido acúmulo de colágeno. Depois disso, pelo vagaroso acúmulo de colágeno e remodelamento, o ganho na força tênsil também se torna mais lento. Ao final do processo, as feridas adquirem apenas 70 a 80 % da força de um tecido normal (HOSGOOD, 2007).

## **2.2 Diferenças na cicatrização de felinos**

O conhecimento histórico da cicatrização de feridas cutâneas deriva principalmente de estudos realizados em roedores, suínos, cães, equinos e humanos. Considera-se que variações quanto à cicatrização entre espécies animais dependem não só da localização e tamanho da ferida, mas também se relacionam à mobilidade da pele, tecido subcutâneo características da espécie em questão (LASCELLES et al., 1998).

O estudo da cicatrização de feridas cutâneas em cães e gatos, bem como seu tratamento, possui grande importância em medicina veterinária devido à elevada casuística de animais acometidos por lesões de diferentes tipos e origens (SIMAS, 2010). Em trabalhos realizados por Bohling et al. (2004); Bohling et al. (2006); Bohling e Henderson (2006), foram encontradas significativas diferenças quantitativas e qualitativas entre a cicatrização de cães e gatos, sendo que tais diferenças parecem predispor os gatos a problemas de cicatrização.

Nas feridas cicatrizadas por primeira intenção, nota-se uma resistência à ruptura inferior na espécie felina, quando comparada à canina. Hipoteticamente, propõe-se que essa menor resistência se deva a uma produção reduzida de colágeno em gatos. Já nas feridas cicatrizadas por segunda intenção, as diferenças começam no início da fase inflamatória. Em cães, as feridas são mais exsudativas, edematosas e eritematosas. A formação do tecido de granulação nos felinos é retardada e difere visualmente. Em gatos, o tecido forma-se

lentamente, em menor quantidade, é mais pálido e se origina das bordas em direção ao centro (BOHLING et al., 2004).

Para Bohling et al. (2006), o tecido subcutâneo é a maior fonte para precursores do tecido de granulação em gatos, e um contribuinte importante para a cicatrização cutânea por segunda intenção. Logo, quando grandes áreas desse tecido são removidas ou lesadas há retardamento no processo cicatricial. Esses mesmos autores analisaram o papel do tecido subcutâneo na cicatrização de feridas cutâneas, tanto no gato, quanto no cão. Em um estudo onde se avaliou macroscopicamente feridas criadas experimentalmente no dorso de cães e gatos, foram notadas diferenças macroscópicas na formação de tecido de granulação, contração, epitelização e força da ferida. Esses achados revelam que feridas cutâneas em gatos curam mais lentamente do que no cão, estando o reparo associada a uma reação inflamatória persistente e uma fase proliferativa menos ativa nessa espécie.

Acredita-se que, em parte, as diferenças na cicatrização estejam relacionadas à menor perfusão sanguínea da pele de gatos, já que existe uma relação bem estabelecida entre a perfusão e reparo. Essas diferenças ocorrem principalmente no suprimento sanguíneo do tronco (BOHLING; HENDERSON, 2006). Cães possuem um grande número de veias cutâneas bem distribuídas, enquanto que gatos possuem um número muito menor com distribuição em duas linhas maiores ao longo do tronco (TAYLOR; MINABE, 1992).

Não raramente, feridas não cicatrizadas levam à eutanásia em gatos. Considera-se para o tratamento de feridas cutâneas em felinos uma regra válida para a cirurgia oncológica, sendo que o primeiro cirurgião a tratá-las é que tem a maior chance de cura. Logo, pode-se até mesmo considerar que ao se prevenir a deiscência em um gato, o cirurgião torna-se o responsável por prevenir a eutanásia (BOHLING; HENDERSON, 2006). Para esses mesmos autores, ao se conhecer as características da cicatrização cutânea de felinos, torna-se coerente a busca de meios diferentes de conduzi-las e favorecê-la, tais como a instituição precoce de cirurgias reconstrutivas, uso de retalhos ou, ainda, por meio de adjuvantes da cicatrização.

### **2.3 A plaquetas**

As plaquetas são pequenos fragmentos subcelulares, formados a partir da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos na medula óssea (JAIN, 1993; HARTWIG, 2003). Citocinas, tais como as interleucinas 1, 3, 6 e 11 e o hormônio trombopoietina, estimulam e regulam a formação das plaquetas (LEVEN, 2000; HARTWIG, 2003). De acordo com Rebar et al. (2003), a trombopoietina, que é responsável pela regulação e

desenvolvimento dos megacariócitos e está envolvida na liberação das plaquetas, tem sua fonte principal ainda incerta; no entanto, acredita-se que seja originária do endotélio vascular, fígado ou fibroblastos.

As plaquetas encontram-se armazenadas no baço ou na corrente sanguínea, podendo mover-se livremente entre esses dois compartimentos. Apenas 20% das plaquetas encontram-se armazenadas no baço e, os 80% restantes estão na corrente sanguínea. Elas apresentam uma meia vida de aproximadamente sete a dez dias, e são removidas da circulação pelo sistema fagocítico mononuclear do baço ao se tornarem senis (ZAGO et al, 2001).

De acordo com Walker (2009), em esfregaços de sangue periférico, as plaquetas de cães e gatos apresentam forma oval, redonda ou de bastonete. Quando parcialmente ativadas, finos filamentos citoplasmáticos se expandem a partir do seu pequeno corpo celular, lembrando a forma de aranhas. O tamanho das plaquetas varia de um a dois terços do diâmetro dos eritrócitos na espécie canina e, no sangue de gatos, podem ser ocasionalmente maiores que as hemácias. Esse mesmo autor citou que, particularmente na espécie felina, as plaquetas podem apresentar-se agregadas ou aglutinadas em uma massa amorfa.

O volume das plaquetas varia de acordo com a espécie, sendo similar em cães, suínos e humanos, com média de 7,6 a 8,3 fl. Já na espécie felina, o volume é maior, com média de 15,1 fl (JAIN, 1993). Os valores de referência para contagem de plaquetas em gatos variam de 300 a  $800 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de sangue, com média de  $450 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de sangue (JAIN, 1993; WALKER, 2009). Porém, Knoll (2000) relatou que, quando utilizados contadores automáticos, essa contagem pode ser subestimada devido à semelhança de tamanho das plaquetas com eritrócitos, principalmente na espécie felina. Para esse mesmo autor, outra causa de falsa diminuição na contagem para essa espécie é a formação de agregados plaquetários, o que ocorre com frequência. A agregação plaquetária no sangue felino pode resultar da difícil punção venosa para coleta de sangue em decorrência do fino calibre dos vasos, ou animais não cooperativos e excitados (WELLES et al., 1994).

Quando ocorre uma lesão, as plaquetas têm a função de minimizar as perdas sanguíneas e fazem isso criando um microambiente que assegura a rápida formação do coágulo (GENTRY, 2000) e são cruciais para a integridade vascular (JAIN, 1993). Além de atuar na hemostasia, também desempenham um importante papel na inflamação e cicatrização de feridas, por meio da interação direta célula a célula e da liberação de mediadores quando ativadas. Tais mediadores modulam a atividade de outras células sanguíneas e do endotélio vascular. Considera-se que, tanto a resposta biológica das plaquetas ao trauma vascular,

quanto sua participação na inflamação e reparação tecidual, são fundamentalmente similares em todos os mamíferos (GENTRY, 2000).

#### **2.4 O Plasma rico em plaquetas (PRP)**

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma fonte autógena e pouco onerosa de fatores de crescimento (FC), que é preparada a partir de sangue total retirado do próprio paciente (MARX, 2001; LIEBERMAN et al., 2002). O PRP é atóxico, não imunogênico e formado por plaquetas, leucócitos e plasma. No plasma, existem diversos fatores de coagulação, os leucócitos atribuem resistência natural contra agentes infecciosos e imunogênicos, e as plaquetas desgranulam nos locais de lesão, liberando fatores de crescimento (FC) (MARX et al., 1998). Por meio da centrifugação do sangue, obtém-se um pequeno volume de plasma contendo alta concentração de plaquetas (MARX et al., 1998, KLEIN et al., 2011). Elas atuam no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização (MARX, 2004).

O PRP vem sendo utilizado na odontologia com o intuito de favorecer a cicatrização desde a década de 1990, a partir de estudos realizados por Marx et al. (1998). Esse autor introduziu o PRP como uma nova biotecnologia com possíveis efeitos terapêuticos e, a partir daí, cresceu o interesse no seu uso como biomaterial na medicina regenerativa, por sua capacidade de conduzir os mais diferentes tecidos ao reparo (KLEIN et al., 2011).

Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas estimulam a angiogênese, favorecendo o crescimento vascular e a proliferação de fibroblastos, os quais promovem o aumento na síntese de colágeno (MARX, 2004). Eles também são responsáveis pelo recrutamento de células-tronco periféricas e indução de mitose (PARDO et al., 2012).

Estudos realizados por Robson (1997), Freymiller e Aghaloon (2004) e Marx (2004) revelam que ao menos sete fatores de crescimento diferentes secretados ativamente pelas plaquetas atuam na fase inicial da cicatrização, tornando-a mais eficiente. A ativação dos fibroblastos para a formação de protocólagenos é feita pelos fatores de crescimento transformadores (TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2), resultando na deposição de colágeno e cicatrização da ferida. Os isômeros do fator de crescimento plaquetário (PDGF $\alpha\alpha$ , PDGF $\beta\beta$  e PDGF $\alpha\beta$ ), atuando ou não juntamente com os TGF, estimulam a proliferação dos fibroblastos, aumentam a vascularização tecidual e quantidade de colágeno, aprimoram a osteogênese e promovem a produção de tecido de granulação. A estimulação da angiogênese, mitogênese e permeabilidade vascular é conferida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Já

o fator de crescimento epitelial (EGF), além de também promover a angiogênese, induz o crescimento do tecido epitelial.

As primeiras técnicas utilizadas para obtenção do PRP eram realizadas por máquinas de plasmaférese, em ambiente hospitalar, por punção venosa profunda, para coleta de grandes volumes de sangue e sua ativação feita pela adição de trombina bovina. Posteriormente foram desenvolvidos protocolos utilizando aparelhos mais simples, dos quais se obtinha cerca de 7 a 10 mL a partir de 50 a 60 mL de sangue, colhidos por punção venosa periférica. O sistema automatizado, que utiliza *kits* para aquisição do PRP, tem tornado o método mais simples, porém dispendioso (VENDRAMIN et al., 2006).

Centrífugas convencionais de mesa podem ser usadas para a produção de pequenos volumes de PRP, a partir de pequenos volumes de sangue (EVERST et al., 2006). Esses protocolos são mais trabalhosos e exigem aprendizagem por parte do executor, mas permitem a preparação do PRP a baixo custo, podendo ser efetuado em ambiente mais simples (VENDRAMIN et al., 2006). Apesar disso, esses métodos estão mais sujeitos aos erros na preparação, prejudicando a qualidade do produto (VENDRAMIN et al., 2009). Para Everst et al. (2006), a escolha do sistema para obtenção do PRP depende do volume necessário a ser utilizado, de acordo com o procedimento cirúrgico.

Vários protocolos para obtenção do PRP têm sido propostos, com o intuito de se concentrar um maior volume de plaquetas em um mínimo volume de plasma (PEREIRA, 2012). Para que o PRP seja considerado terapêutico e tenha potencial de influenciar biologicamente as células de um leito receptor, deve apresentar concentração plaquetária mínima de  $1 \times 10^6$  plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$  (MARX, 2001; MARX, 2004). Desta maneira, um PRP com contagem de plaquetas quatro a cinco vezes superior à do sangue é considerado adequado para alcançar respostas significativas (EVERST et al., 2006). Marx (2001) citou que, para que as plaquetas sejam verdadeiramente concentradas a partir do sangue autólogo, devem ser utilizados protocolos de dupla centrifugação. Este processo deve ser executado com precisão para que se obtenha plasma com altas concentrações de plaquetas íntegras, pois a eficácia terapêutica do PRP pode ser reduzida se houver fragmentação das plaquetas e liberação dos fatores de crescimento precocemente (MARX, 2004).

Além do número de centrifugações, fatores como força aplicada, tempo de centrifugação e redução do volume plasmático também influem na qualidade do PRP (VENDRAMIN et al., 2009). Aumentando-se a força aplicada pode-se garantir o aumento na concentração plaquetária, porém Durgrillon et al. (2002) citaram que o uso de forças mecânicas excessivamente altas podem ativar as plaquetas precocemente, liberando fatores de

crescimento, que se perdem no plasma sobrenadante durante a centrifugação, comprometendo a eficiência terapêutica do PRP. Para Vendramin et al. (2009), o tempo para o preparo do produto deve ser o menor possível, uma vez que é realizado imediatamente antes da intervenção cirúrgica, ou até mesmo enquanto ela se inicia. Essa indicação se deve ao fato de o PRP permanecer estéril e viável por até oito horas após o seu desenvolvimento, quando em um estado não coagulado (MARX, 2004).

São vistos diferentes volumes sanguíneos empregados para a produção do PRP, em estudos distintos, realizados em humanos (MARX et al., 1998; LIEBERMAN et al., 2002; KLEIN et al., 2011), cães (BARBOSA et al., 2008; VANAT et al., 2012; BARBOSA et al., 2013), equinos (PEREIRA, 2012) e coelhos (NAGAE et al., 2007; VENDRAMIN et al., 2010; GARCEZ, 2012). Nesses estudos, o sangue foi colhido em tubos, seringas ou bolsas para transfusão contendo como anticoagulante o citrato de sódio, associado ou não a outros constituintes.

Lacoste et al. (2003) referem que, para que os FC presentes no PRP sejam liberados é necessária a ativação das plaquetas. Para tal, podem ser empregados diferentes métodos que vão desde a adição de trombina bovina ou autóloga, até a exposição direta do colágeno em vivo (WESTERLAINE et al., 2012). Estando as plaquetas ativadas, inicia a liberação dos FC de seus  $\alpha$ -grânulos imediatamente. Dentro de dez minutos 70% do total armazenado é secretado e, aproximadamente 100% é liberado dentro da primeira hora (MARX, 2001).

Apesar dos muitos protocolos para obtenção do PRP descritos na literatura e utilizados nas mais diversas áreas da medicina humana, não há um protocolo padrão para sua produção (ANDRADE et al., 2008). Devido à aplicação deste biomaterial ser bem mais recente na medicina veterinária em comparação à medicina humana, torna-se fundamental a realização de pesquisas para validação, padronização e seu melhor aproveitamento (MAIA; SOUZA, 2009) nas diferentes espécies animais.

Em pequenos animais, o uso do PRP é ainda menos frequente e os resultados obtidos referem-se principalmente à reparação óssea (SILVA et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; BARBOSA, 2013) e cicatrização cutânea (KIM et al., 2009, HERMETO et al., 2012) em cães. Em gatos, protocolos de dupla centrifugação para produção de PRP, visando seu uso como adjuvante da cicatrização, não são do conhecimento dos autores do presente estudo. Molano (2012) propôs uma técnica para obtenção de concentrado autólogo de plaquetas (CAP) de gatos utilizando protocolo de centrifugação única, com força de 85g por seis minutos, mas não foram testados os efeitos desse concentrado *in vivo*. Welles et al. (1994) avaliaram a detecção de plaquetas ativadas por citometria de fluxo e para isso fizeram a

separação do PRP em gatos. A técnica utiliza três centrifugações e são coletadas populações de plaquetas após cada uma delas. Além disso, não foi citada a força aplicada, nem o tempo utilizado, o que torna impossível a reprodução do protocolo.

Um dos principais entraves para a obtenção do PRP em gatos é a grande quantidade de sangue necessária para a execução de algumas metodologias. Gatos possuem um volume relativo e total de sangue consideravelmente pequeno quando comparado às demais espécies animais e pessoas. Além disso, por possuírem veias pequenas e pelo temperamento difícil, gatos não são bons candidatos para a coleta de plaquetas. Logo, métodos ideais para a separação de plaquetas em gatos devem requerer pequena quantidade de sangue e diminuir o risco da ativação plaquetária devido ao procedimento de coleta (WELLES, 1994).

Acredita-se que os benefícios alcançados na cicatrização tecidual a partir do uso do PRP também possam ser obtidos para a espécie felina, principalmente pelos excelentes resultados descritos nas mais diversas áreas da medicina humana e em modelos animais. Porém, até o momento, não existem dados reais sobre seu efeito terapêutico em felinos.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Parte desse experimento foi desenvolvido com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo n. 306474/2011-3.

#### **3.1 Comissão de ética no uso dos animais**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (Anexo A), registro nº 011/2013, e seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Também houve a preocupação com o bem estar dos animais de acordo com a Lei no. 5.517 de 23 de outubro de 1968, artigo 5º; Lei no. 6.638 de 08 de maio de 1979; à resolução no. 592 de 26 de junho de 1992 e Projeto de Lei no. 9.605/1998 e no. 1. 691/2003.

#### **3.2 Locais**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Especificamente no Bloco 5 do LACE, foram realizados os procedimentos anestésicos e cirúrgicos, as coletas de sangue e material para exame histopatológico de biopsia. No Laboratório de Terapia Celular Regenerativa foi feito o processamento do PRP. A contagem plaquetária das amostras de sangue e PRP, os hemogramas e avaliações bioquímicas séricas dos animais, aconteceu no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LacVet). As demais avaliações foram realizadas no gatil pertencente ao LACE.

#### **3.3 Animais**

Na primeira etapa desse estudo foram utilizados 12 gatos machos e três fêmeas, todos adultos jovens (média de idade  $2,2 \pm 0,86$  anos), pesando em média  $4,53 \pm 0,87$ kg, castrados, sem raça definida (s.r.d.), hígdios. Eles permaneceram em ambiente hospitalar apenas pelo tempo necessário para a coleta de sangue e fluidoterapia de manutenção. Para a segunda etapa, foram empregados dez gatos machos, castrados, s.r.d., hígdios, pesando em média

5,09±0,33 kg e com idade média de 2,07 (±1,04) anos. Esses animais foram alocados no gatil do LACE, em boxes individuais, em ambiente climatizado, com enriquecimento ambiental (arranhadores, brinquedos, graminha para gatos, *catnip*, uso de ferormônio felino sintético<sup>1</sup> no ambiente) e liteiras para gatos com areia de sílica. Os animais passaram por um período mínimo de ambientação de 30 dias, e receberam cuidados individuais, água e ração comercial super premium *ad libitum* até o final do experimento.

Todos os animais utilizados eram domiciliados, e participaram com consentimento de seus tutores, por meio de termo de consentimento livre e esclarecido (elaborado para este experimento). Eles foram medicados contra agentes endoparasitas e ectoparasitas, e passaram por avaliação clínica e laboratorial (bioquímica sérica: albumina, ALT, creatinina, FA, GGT, ureia; hemograma e contagem de plaquetas; exame parasitológico de fezes; teste para FIV/FelV), antes de serem incluídos no experimento.

### **3.4 Grupos experimentais**

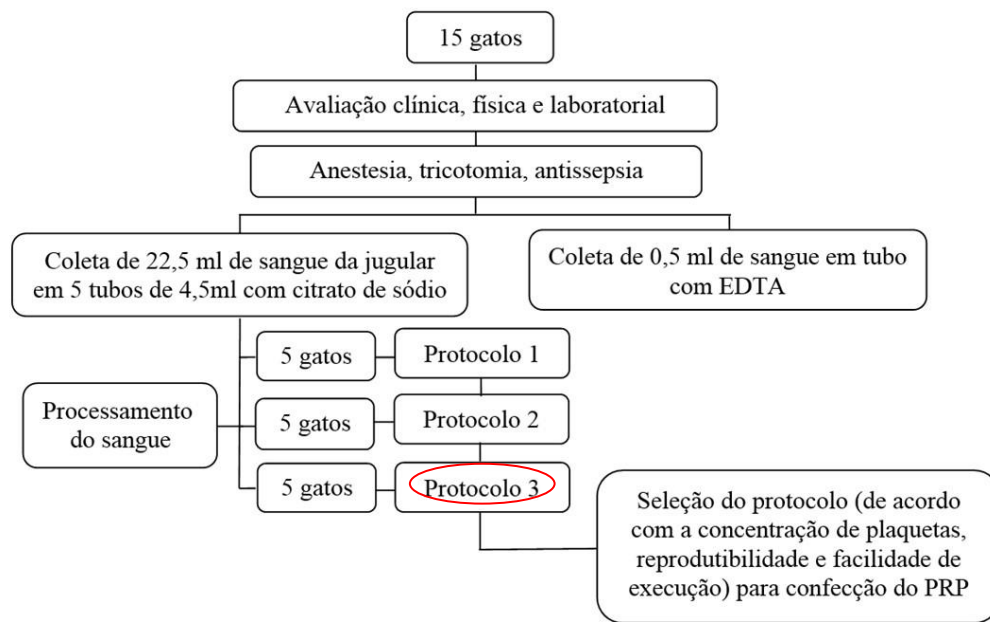
Os 15 gatos foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais, de acordo com o protocolo utilizado para a produção do PRP. Esses grupos foram denominados P1, P2 e P3, e variaram quanto a força “g” e tempo de centrifugação utilizados. Para avaliação da cicatrização, as feridas tratadas e controles foram feitas no mesmo animal.

### **3.5 Procedimentos experimentais**

Este estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira, ilustrada na figura 1, foram testados três protocolos, adaptados de protocolos descritos na literatura, para a separação do PRP. Para isso, foram utilizados 15 gatos doadores de sangue, dos quais, após sedação prévia, foram coletados 22,5mL de sangue venoso da jugular e enviados à avaliação laboratorial. O sangue foi processado de acordo com o protocolo estipulado, sendo que, para cada grupo contendo cinco animais foi utilizado um protocolo diferente. As coletas ocorreram em cinco tubos de 4,5 mL, para cada animal, visando para garantir a repetibilidade e reprodutibilidade. Dentre as técnicas testadas, uma foi selecionada, para a utilização na segunda fase do experimento. Essa seleção considerou a capacidade de incremento (concentração plaquetária) e a facilidade de execução e reprodução da técnica.

---

<sup>1</sup> Feliway® - Ceva Saúde Animal.

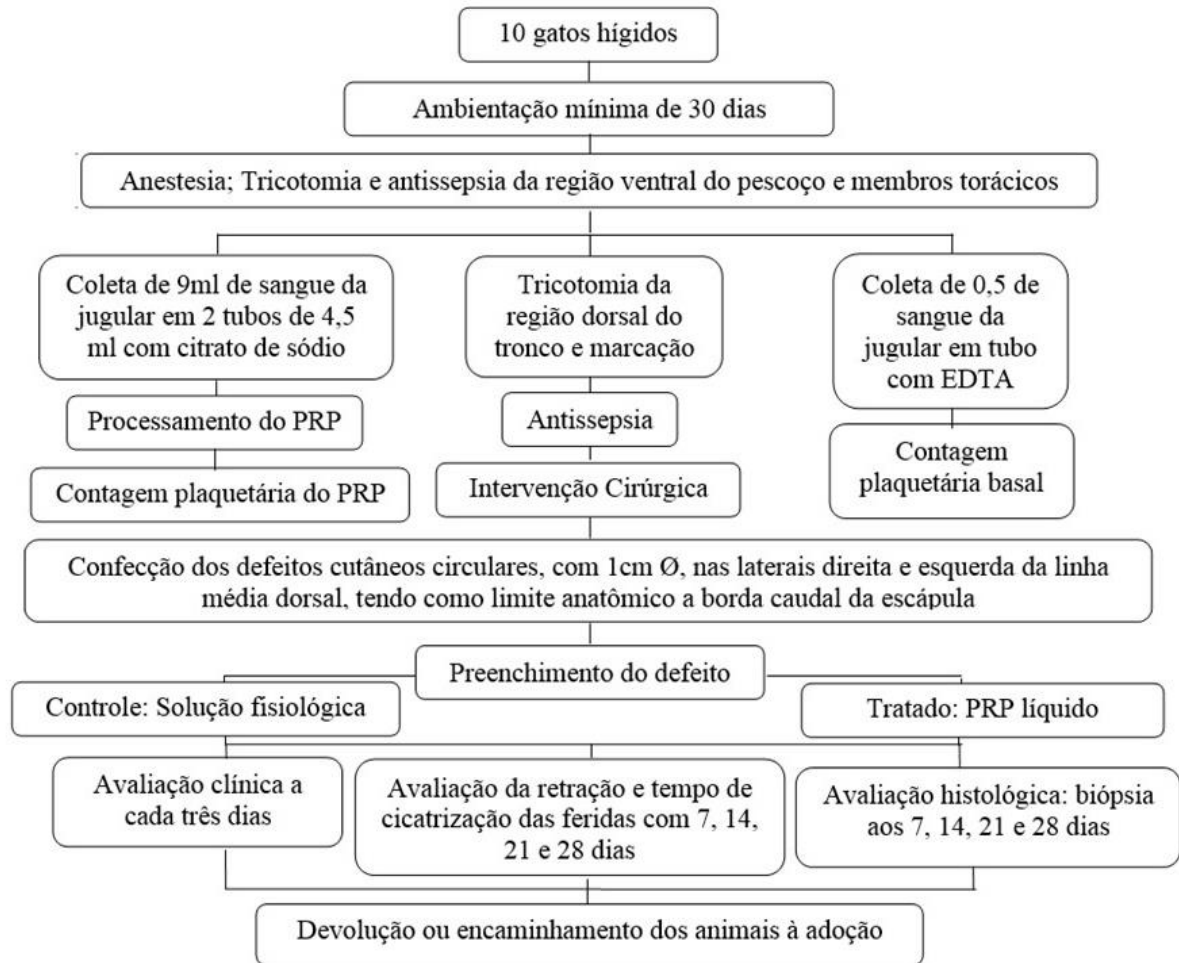


**Figura 1** – Fluxograma ilustrando a primeira etapa do procedimento experimental, no qual foram utilizados 15 gatos doadores de sangue e foram testados três protocolos de separação do PRP. O protocolo mais eficiente foi selecionado para uso na segunda etapa.

Na segunda etapa (Figura 2), dez gatos foram submetidos à coleta de sangue para produção do PRP, de acordo com o protocolo já definido, e procedimento cirúrgico para a criação de oito defeitos cutâneos em cada animal. O PRP foi utilizado na forma líquida, como tratamento de quatro lesões, sendo as outras quatro consideradas controle. Ainda nesta etapa, a cicatrização das feridas foi avaliada macroscopicamente e microscopicamente (exame histopatológico de biopsia), e os resultados obtidos foram comparados.

### 3.5.1 Preparo dos animais

Dois dias antes da intervenção cirúrgica, os gatos foram vestidos com malhas cirúrgicas, para ambientação. Precedendo os procedimentos anestésico e/ou cirúrgico, instituiu-se aos animais jejum sólido de seis horas e hídrico de duas horas.



**Figura 2** – Fluxograma das atividades realizadas na segunda etapa do estudo, para determinar a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) na reparação de feridas cutâneas produzidas experimentalmente em gatos.

### 3.5.2 Coleta de sangue

Os animais foram anestesiados com a associação cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam<sup>2</sup>, na dose de 6mg.kg<sup>-1</sup>, por via intramuscular para as coletas de sangue na primeira e segunda fase do experimento. Fez-se, a seguir, tricotomia ampla da região ventral do pescoço e nos membros torácicos. Instituiu-se fluidoterapia de manutenção (8mL.kg.h<sup>-1</sup>) com RLS através de venóclise da cefálica com cateter nº. 22G. Com os animais anestesiados, posicionados em decúbito dorsal, foi realizada antissepsia com solução de clorexidine 0,5% em meio alcoólico. Em seguida, foi procedida a punção da jugular utilizando sistema de coleta de sangue a vácuo<sup>3</sup>, com agulha 21G e tubos estéreis com citrato de sódio a 3,2%. Dos 15 gatos utilizados na primeira etapa do experimento, foram colhidas cinco amostras de 4,5mL de sangue, sequencialmente, de cada um dos animais, totalizando 22,5mL de volume.

<sup>2</sup> Telazol®, Fort Dodge Saúde Animal Ltda.

<sup>3</sup> BD Vacutainer®.

Já na segunda fase, de cada um dos dez animais, foram coletadas duas amostras de 4,5mL, totalizando 9mL de sangue. Todos os procedimentos de coleta de sangue foram realizados, de forma asséptica, pelo mesmo operador. O sangue foi homogeneizado, mantido refrigerado durante o transporte e as amostras processadas.

Para a contagem plaquetária basal, imediatamente após a coleta, foi coletado 0,5 mL de sangue da veia jugular, de cada um dos animais, para a separação do PRP. Este foi acondicionado em tubos contendo EDTA e homogeneizado e enviado ao laboratório.

### 3.5.3 Processamento do PRP

A manipulação do sangue para obtenção do PRP ocorreu em sala com temperatura controlada (22°C), em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultravioleta durante 30min e com material autoclavado. Todas as etapas de manipulação das amostras até a produção do PRP foram realizadas pelo mesmo operador.

Na primeira fase do experimento, foram testados três diferentes protocolos para obtenção do PRP, referidos como P1, P2 e P3. Para os protocolos P1 e P2, foram utilizadas forças e tempos já descritos previamente na literatura por Barbosa (2013) e Vendramin et al. (2009), respectivamente. Porém, neste estudo, modificaram-se algumas variáveis como o método de coleta, os tipos de tubos utilizados, tipo de anticoagulante e centrífugas.

Em linhas gerais, para cada um dos protocolos adotados, as amostras de sangue em citrato foram homogeneizadas e centrifugadas (centrífuga CentribioTDL80-2B), em forças e tempos pré-estabelecidos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Protocolos (P1, P2, P3) de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) em felinos.

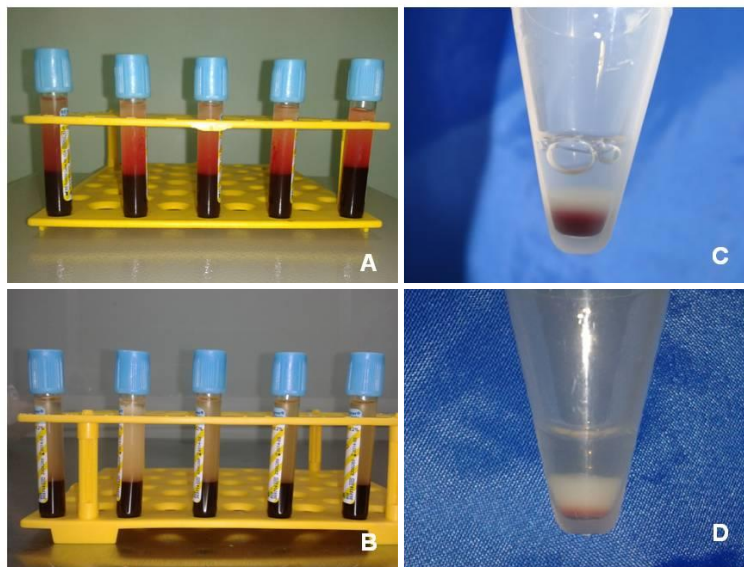
<b>Protocolo</b>	<b>1ª centrifugação</b>	<b>2ª centrifugação</b>
<b>P1</b>	113G – 10min	652G – 5min
<b>P2</b>	400G – 10min	800G – 10min
<b>P3</b>	400G – 10min	600G – 10min

Após a primeira centrifugação do sangue total, foi esperada a separação dos constituintes em três frações, de acordo com seu gradiente de densidade: a fase inferior, constituída pelos eritrócitos, a intermediária, formada pela zona da névoa (ZN), onde estão as

plaquetas maiores e os leucócitos, e a superior, representada pelo plasma e as plaquetas (Figura 3 A e B).

As frações correspondentes à ZN e ao plasma foram aspiradas com o auxílio de pipeta automática e transferidas para um tubo Falcon de 15mL estéril. O volume restante, correspondente aos eritrócitos, foi desprezado. A seguir, os tubos Falcon foram centrifugados (centrífuga microprocessadora Quimis Q222TM204) no tempo e com a força especificados para cada um dos protocolos (Tabela 1).

A partir da segunda centrifugação foi obtido o plasma pobre em plaquetas (PPP), localizado na região superior do tubo e, ao fundo, um botão com o concentrado de plaquetas junto com leucócitos e alguns eritrócitos. Parte do PPP foi retirado e desprezado, mantendo-se o volume restante para diluir as células do botão (Figura 3 C e D) e, após descanso de 1h, foram homogeneizadas cuidadosamente, formando o PRP. O volume final obtido de PRP correspondeu a aproximadamente 10% do volume de sangue total coletado.



**Figura 3** – Processamento do sangue. Separação após a primeira centrifugação: A - em P2; B - em P3. Botão plaquetário formado após a segunda centrifugação: C - em P2; D - em P3.

Na segunda etapa do experimento, adotou-se a mesma metodologia utilizada, sendo que a força e tempo de centrifugação selecionados foram as de P3.

#### 3.5.4 Avaliações laboratoriais

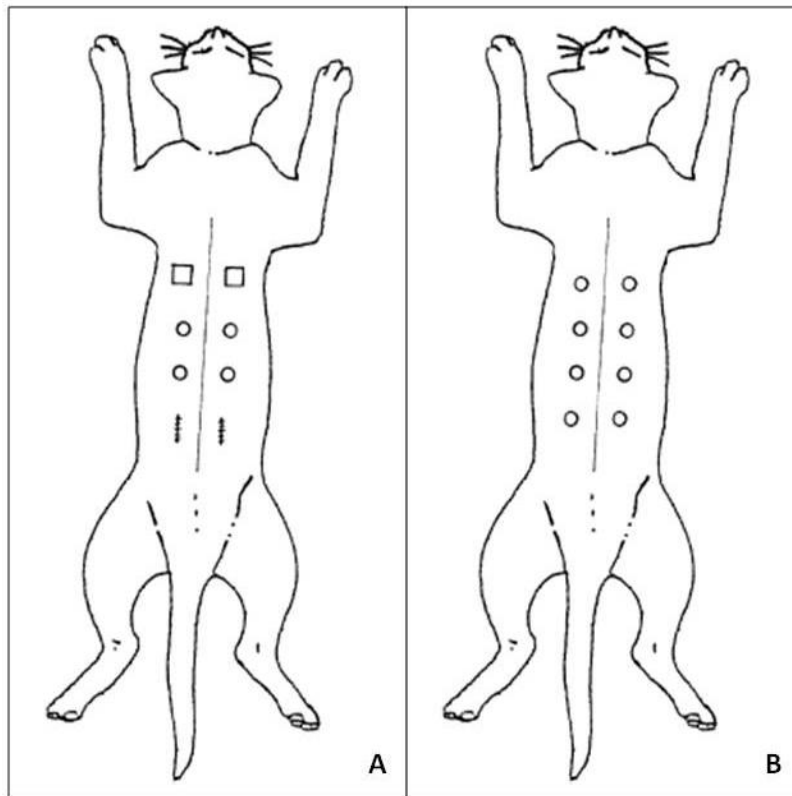
Foram empregados 50  $\mu\text{L}$  do PRP para determinar a quantidade de plaquetas. As contagens de plaquetas basal e do PRP foram realizadas manualmente em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico binocular com aumento de 400x. Cada amostra foi previamente diluída e homogeneizada em líquido de Brecher (oxalato de amônia a 1%). Ao dividir o número de plaquetas obtido no PRP pelo número de plaquetas no sangue total, foi obtido o seu índice de concentração. Considerou-se, no PRP, contagem de plaquetas mínima de  $1 \times 10^6$  plaquetas. $\mu^{-1}$ , de acordo com a citação de Marx (2004). As avaliações laboratoriais do sangue e PRP foram realizadas sempre pelo mesmo operador.

Para garantir que o PRP aplicado como tratamento das feridas não estivesse contaminado, uma alíquota do plasma pobre retirado antes de se ressuspender o botão plaquetário foi encaminhado para exame de cultura bacteriológica, na segunda fase do experimento.

#### 3.5.5 Procedimento cirúrgico

Na segunda fase do experimento, logo após a coleta de sangue, fez-se tricotomia ampla na região dorsal do tronco para o procedimento cirúrgico. Durante o processamento do PRP, ocorreu, em parte, recuperação anestésica. Então, próximo ao final do processamento do PRP, a indução anestésica ocorreu por via inalatória, com auxílio de máscara, com vaporização de isoflurano ao efeito, em oxigênio a 100%. Para intubação utilizou-se *spray* à base de lidocaína a 10% e sonda endotraqueal compatível com o tamanho do animal. Em sequência, inflou-se o *cuff*, e a sonda foi conectada a um sistema sem reinalação de Baraka, e os animais mantidos em anestesia geral inalatória com isoflurano em vaporizador em oxigênio a 100%.

Com os animais posicionados em decúbito esternal, foram marcados os locais para a criação de quatro feridas de um lado da linha média dorsal do tronco, tendo como limite anatômico a borda cranial da escápula. No lado oposto, foram delimitados os locais para mais quatro feridas correspondentes. Esta foi uma adaptação do modelo utilizado por Bohling et al. (2006) (Figura 4).



**Figura 4** – A – Modelo utilizado por Bohling et al. (2006), no estudo em que compararam a cicatrização cutânea de cães e gatos. B – Modelo de lesões cutâneas circulares, pareadas, utilizado no presente estudo.

As áreas a serem incisadas foram medidas com paquímetro e marcadas com caneta dermatográfica, deixando-se 2cm de distância da escápula e 4cm entre elas e em relação às feridas do lado oposto (Figura 5 A). Após a marcação, fez-se antissepsia com digluconato de clorexidine 0,5% em meio alcoólico, foram colocados campos estéreis, e oito retalhos cutâneos (epiderme, derme e tecido subcutâneo) foram excisados. Os fragmentos foram removidos cirurgicamente, com o auxílio de *punch* para biopsia de 1cm de diâmetro (Figura 5 B), associado ao uso de pinça auxiliar e tesoura de Mayo (Figura 5 C), pois devido a espessura da pele, não foi possível a remoção completa apenas com o *punch*. De um dos lados da linha média as lesões foram denominadas controle, e as do outro lado, tratadas (Figura 5 D).



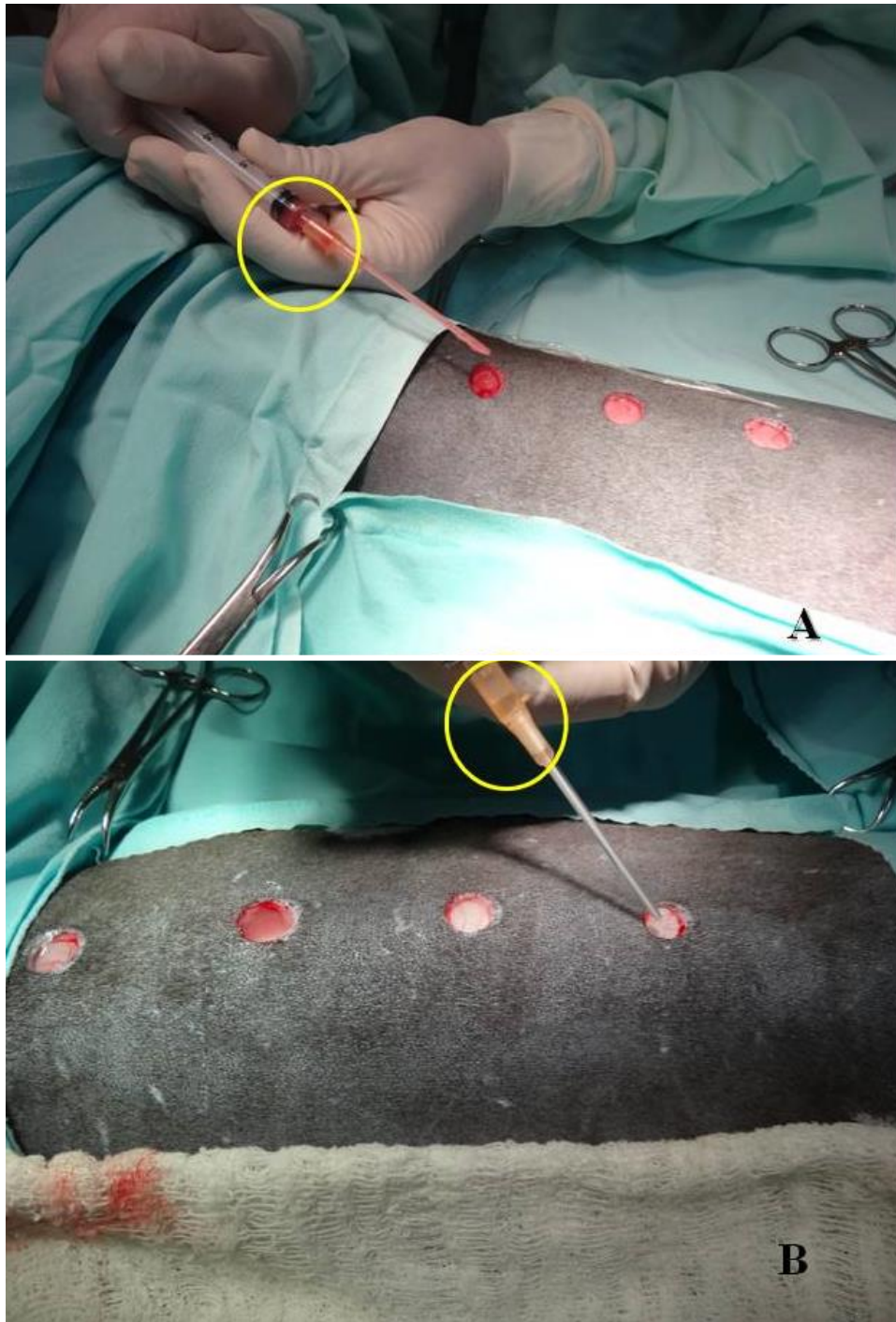


**Figura 5** – Etapas do procedimento cirúrgico. A – Marcação dos pontos a serem excisados; B – Incisão inicial com *punch* para biopsia; C – Finalização da excisão cirúrgica, com auxílio de pinça auxiliar e tesoura de Mayo; D – Vista final das quatro lesões pareadas, produzidas experimentalmente, na região dorsal do tronco de um felino.

### 3.5.6 Tratamentos

O PRP líquido foi recebido no bloco cirúrgico, refrigerado, em tubos Falcon. Ele foi aspirado lentamente por meio de seringa de 3mL acoplada a um cateter 14G. Os animais foram lateralizados, mantendo-se a assepsia e, nas lesões do lado oposto ao controle, grupo tratado, foram preenchidas com o volume de 0,1mL de PRP por ferida (Figura 6 - A). Eles foram mantidos por 15 minutos na posição lateralizada. Cada uma das lesões controle foi preenchida com 0,1mL de solução de NaCl 0,9% estéril (Figura 6 - B). Após a instituição dos tratamentos, adesivos transparentes de poliuretano<sup>4</sup> cobriram, individualmente, cada uma das lesões (Figura 7), foram sobrepostas ataduras de crepom de 12 cm e os animais foram vestidos com malhas cirúrgicas.

<sup>4</sup> Tegaderm™ Film® - 3M Health Care, St Paul, MN, EUA.



**Figura 6** – Realização dos tratamentos. A – Aplicação do PRP (círculo) nas feridas tratadas; B – aplicação da solução de NaCl 0,9% (círculo) nas feridas controle.

Durante o período em que estiveram sob anestesia, os animais foram mantidos em sala cirúrgica com temperatura controlada, sobre colchão térmico e as funções vitais foram monitorados com monitor multiparamétrico.

### 3.5.7 Uso de antibiótico

Foi utilizada cefalotina sódica ( $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), por via intravenosa (IV), como antibiótico profilático no período pré-operatório. No terceiro dia de pós-operatório, foi iniciada antibioticoterapia com azitromicina ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), a cada 24 horas (SID), mantida por cinco dias.



**Figura 7** – Feridas cobertas, individualmente, pelos adesivos de poliuretano após os tratamentos. Observar o aspecto brilhante dos curativos.

### 3.5.8 Analgesia

Para analgesia, utilizou-se cloridrato de tramadol, na dose de  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$ , por via subcutânea, no período pré-operatório tanto para a produção das feridas quanto para as biopsias. Foi mantida a mesma dose, aplicada a cada oito horas (TID), durante cinco dias após a criação das feridas e, por três dias, após as biopsias de pele.

### 3.5.9 Pós-operatório

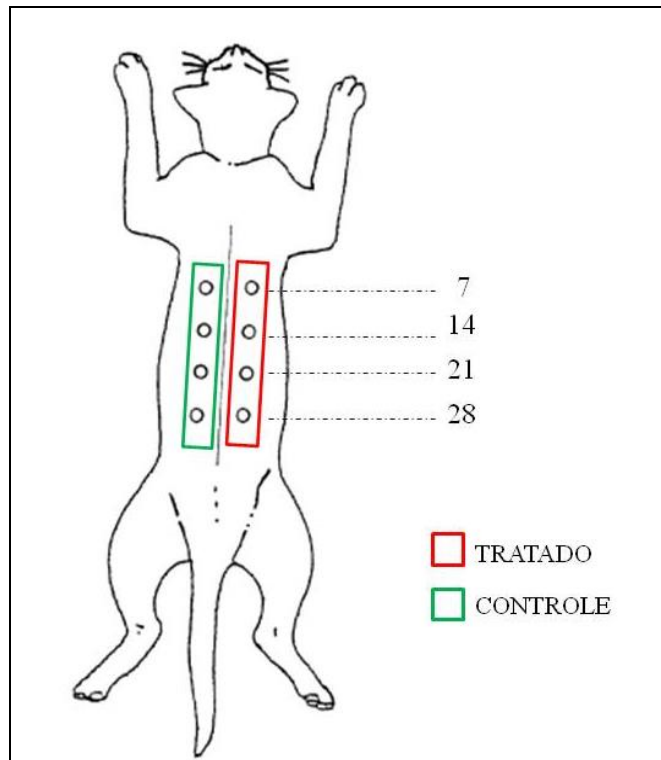
No período pós-operatório imediato, os animais foram mantidos no bloco cirúrgico, sob monitoração, até a recuperação anestésica completa. Posteriormente, aqueles utilizados na primeira etapa receberam alta. Os gatos que participaram da segunda fase foram transferidos

ao gatil, mantidos nos boxes acolchoados, e receberam cuidados individuais três vezes ao dia (TID).

Os curativos de poliuretano que não tiveram queda espontânea foram retirados 72 horas após o procedimento cirúrgico e, depois de ser feita a limpeza das feridas com solução de NaCl 0,9%, foram substituídos por gaze vaselinada estéril e não aderente, seguida de atadura de crepom. A limpeza das feridas aconteceu diariamente, com solução de NaCl 0,9% e troca de curativos. Os gatos foram vestidos com malha cirúrgica, sempre, após a troca dos curativos. Esses procedimentos foram repetidos até a última biopsia, aos 28 dias.

#### 3.5.10 Coleta dos fragmentos de pele para biopsia

Aos sete, 14, 21 e 28 dias após a criação das lesões, os animais foram preparados e anestesiados como descrito nos itens 3.5.1 e 3.5.2. Em seguida fez-se antissepsia com digluconato de clorexidine 0,05% em meio aquoso, e as feridas tratadas e controles foram coletadas com o auxílio de bisturi com lâmina número 10, e armazenadas em frasco contendo formol tamponado a 10%. A cada sete dias, foram removidas duas feridas pareadas (tratada e controle) de cada animal (Figura 8). Após a coleta, o leito foi lavado exaustivamente com a mesma solução usada para antissepsia, fez-se redução do espaço morto com sutura contínua simples, com fio ácido poliglicólico 3-0, e dermorrafia com fio mononáilon 4-0, em padrão de Wolff.



**Figura 8** – Ilustração das coletas de tecido para biópsia. Em cada um dos intervalos de tempo (sete, 14, 21 e 28 dias), foi removido um fragmento de pele do lado tratado (vermelho) e do controle (verde).

### 3.6 Parâmetros avaliados

#### 3.6.1 Primeira fase do experimento: protocolo para obtenção do PRP

Nesta fase, avaliou-se o sistema utilizado para a coleta de sangue, quanto sua facilidade e eficiência, para o objetivo proposto.

Os três protocolos P1, P2 e P3 foram primeiramente avaliados quanto à possibilidade e facilidade de execução de todas as etapas para a produção do PRP. Posteriormente, avaliou-se a concentração plaquetária (capacidade de incremento) obtida no PRP, e sua relação com a concentração de plaquetas basal. Todos esses parâmetros foram considerados na escolha do protocolo utilizado na segunda fase do experimento.

#### 3.6.2 Segunda fase do experimento: uso do PRP como adjuvante da cicatrização

Nesta etapa avaliou-se a metodologia utilizada para a realização dos tratamentos, quanto à facilidade de execução e eficiência da mesma, e a cicatrização das feridas com o uso do PRP, em comparação ao controle. Todas as avaliações referentes à cicatrização foram

feitas de maneira cega, sem que os avaliadores e o patologista soubessem quais eram as feridas tratadas.

### 3.6.2.1 Avaliação macroscópica

#### 3.6.2.1.1 Avaliação clínica

Diariamente, três avaliadores fizeram a análise clínica das feridas de cada um dos animais. Foram considerados para os resultados obtidos a cada três dias, intervalo no qual foi possível visualizar alteração. Os seguintes parâmetros foram avaliados de maneira qualitativa: presença de crostas, dor, edema, exsudato, coloração e presença de tecido de granulação. As alterações observadas foram graduadas como: mínima (+), leve (++); moderado (+++); acentuado (++++); ausente (-). As características e localização de cada item foram analisadas de forma descritiva.

#### 3.6.2.1.2 Análise morfométrica

Semanalmente (aos sete, 14, 21 e 28 dias após a intervenção cirúrgica), as feridas foram fotografadas, medidas com auxílio de um paquímetro e as suas áreas mensuradas. Para tal mensuração, o contorno das lesões cutâneas foi desenhado em um papel vegetal diretamente sobre o animal, a partir de sua criação, sendo posteriormente digitalizadas com escâner, gerando uma imagem em formato BMP. Em seguida realizou-se a etapa de pré-processamento da imagem digitalizada com o programa PAINT, o que garantiu homogeneidade de cor no interior da imagem e definição de contornos precisos. Após, os desenhos das feridas foram analisados com o programa Image J<sup>5</sup>, sendo a área medida em *pixels* transformada em cm<sup>2</sup>. As medidas das áreas das feridas possibilitaram analisar a contração das mesmas (análise morfométrica). Para o cálculo da área de contração da ferida, da medida de área inicial, obtida no dia zero, foram subtraídas as medidas subsequentes, aos sete, 14, 21 e 28 dias.

#### 3.6.2.2. Avaliação microscópica

Os fragmentos de pele contendo tecido normal e tecido cicatricial fixados em formol tamponado a 10% foram emblocados em parafina e posteriormente corados. As lâminas foram avaliadas pelo método semi-quantitativo nas colorações hematoxilina-eosina (HE), e o grau

---

<sup>5</sup> National Institutes of Health. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij>>.

de fibrose por meio da coloração de tricrômico de Masson. Foram analisadas imagens de cinco a dez campos não sobrepostos em objetiva de 40x de cada amostra. Considerou-se a presença de crosta, úlcera, acantose (espessamento da camada espinhosa da epiderme), fibroplasia (acúmulo de fibroblastos), fibrose (presença de tecido fibrovascular, com produção de colágeno) neovascularização (canais vasculares formados). As alterações observadas foram graduadas como: leve (+); moderada (++); acentuada (+++); ausente (-).

### 3.7. Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o *software* SigmaPlot<sup>®6</sup> versão 12.0. Os dados obtidos na primeira fase do experimento, nos grupos P2 e P3 foram analisados pelo teste-t, para a determinação daquele estatisticamente mais eficiente em concentrar plaquetas. Para a verificação da existência de variação individual quanto à concentração plaquetária, a dispersão das cinco repetições de cada animal foi analisada por estatística descritiva.

Na segunda etapa, as áreas das feridas foram analisadas por comparação de médias, entre controle e tratamento, pelo teste-t para dados paramétricos (dia 7), ou pelo teste de Mann-Whitney em *ranks*, quando os dados não tiveram distribuição paramétrica (dias zero e 14). Os dados não paramétricos obtidos na avaliação clínica das feridas e nas análises histopatológicas foram analisadas pelo teste de comparação em *ranks* de Mann-Whitney.

Para as comparações entre os tempos de avaliação dentro do mesmo grupo foi utilizado o teste de análise de variância em *ranks* de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey para identificação da origem das diferenças quando  $p \leq 0,05$ , na avaliação das áreas das feridas, ou pelo teste de Dunn nas demais avaliações.

Para todas as avaliações, considerou-se nível de significância de 5%.

### 3.8. Destino dos animais

Todos os animais utilizados na primeira fase do experimento foram devolvidos aos seus tutores após a recuperação anestésica. Quatro dos dez utilizados na segunda fase retornaram ao seu tutor, porém, por restrição financeira de seus tutores, seis animais foram encaminhados à adoção, com o consentimento dos mesmos.

---

<sup>6</sup> Systat Software Inc. San Jose, California, USA.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Protocolos para obtenção e padronização do PRP

O método de coleta a vácuo, em tubos com citrato de sódio como anticoagulante, mostrou-se eficiente para o objetivo proposto, sendo possível obter plaquetas íntegras visualmente, isto é, supostamente não ativadas no PRP. Porém, não foi possível o preenchimento dos cinco tubos com citrato com apenas uma punção venosa para nenhum dos animais. Para todos os 15 animais utilizados, o protocolo anestésico foi eficiente, a coleta deu-se de forma rápida e não houve nenhuma intercorrência. Os gatos tiveram uma adequada recuperação e receberam alta após a recuperação anestésica.

No processamento das amostras, ao utilizar a força de 113g por dez minutos, na primeira centrifugação (protocolo P1), não houve separação do sangue em três fases em nenhuma das 25 amostras de sangue (cinco amostras coletadas de cada um dos cinco gatos). Optou-se por homogeneizar o sangue e centrifugá-lo novamente, com a força de 400g pelo mesmo tempo, que seria utilizada nos outros dois protocolos, apenas para teste. Nesta nova centrifugação obteve-se a separação esperada, porém esse resultado não foi utilizado.

Tanto no P2 como em P3 foi possível realizar a separação do PRP, conforme o esperado, com protocolo de dupla centrifugação. Em ambos obtiveram-se concentrações superiores a 1.000.000 de plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ .

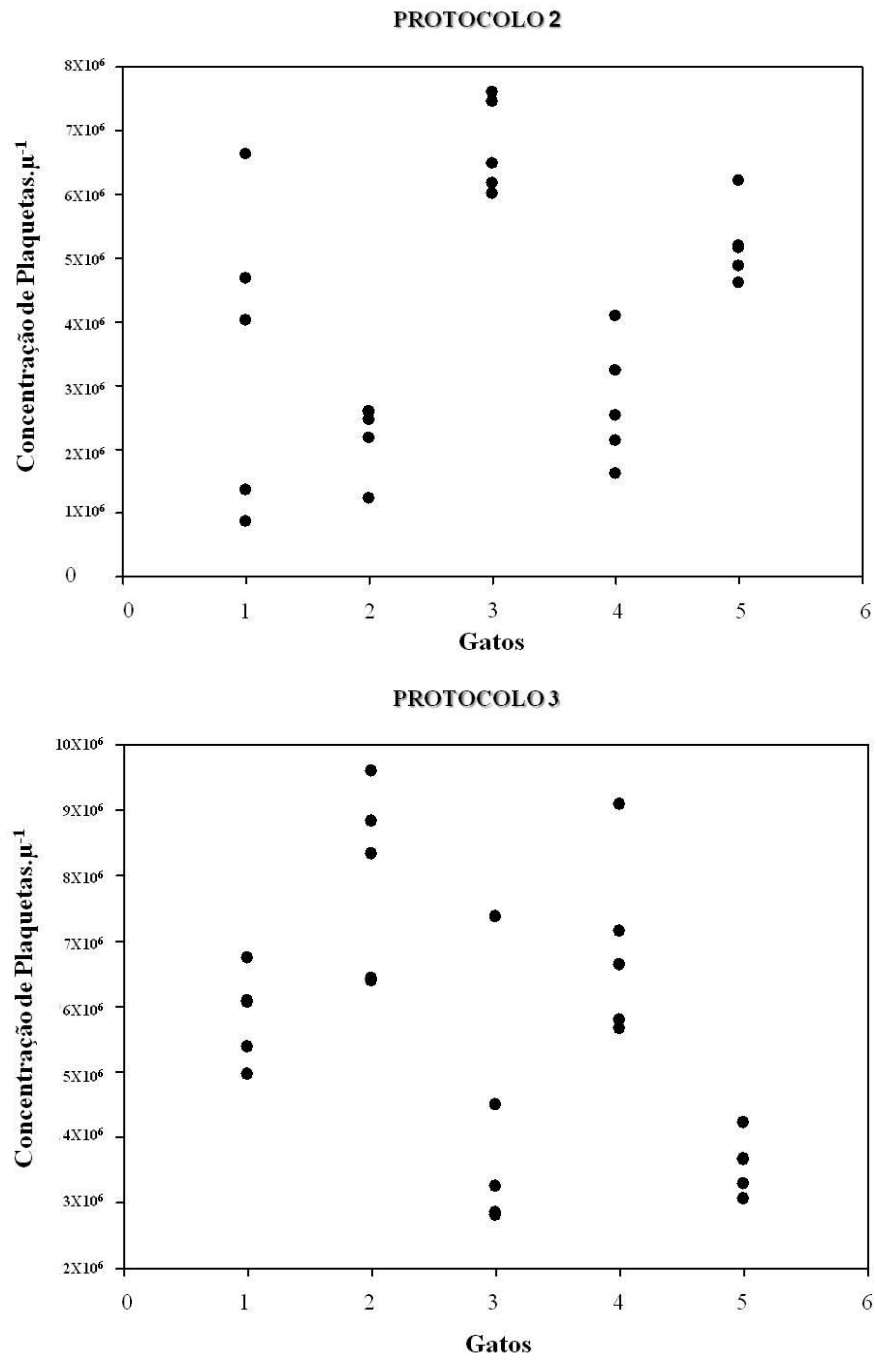
A contagem média de plaquetas obtida no PRP em P2 foi de 4.074.600 ( $\pm 2.061.574$ ) plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , o que corresponde a concentração 9,83 vezes superior à contagem basal, que foi de 414.600 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ . Já com PRP produzido em P3, em que se obteve a média de 5.668.934 ( $\pm 2.034.957$ ) plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , atingiu-se a concentração média de plaquetas 16,88 vezes superior à encontrada no sangue (335.900 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ ) (Tabela 2). Ao se comparar ambos os protocolos, houve diferença estatisticamente significativa ( $P=0,007$ ), sendo o protocolo P3 mais eficiente em concentrar grande número de plaquetas em um pequeno volume de plasma. Esse protocolo (P3), pela maior capacidade de incremento, foi o selecionado para o processamento do PRP com finalidade terapêutica, usado em feridas experimentalmente produzidas, na segunda etapa desse estudo.

A análise de dispersão, que visava avaliar a distribuição da concentração plaquetária obtida nas cinco amostras coletadas de cada um dos cinco animais de cada grupo, demonstrou variação na concentração de plaquetas obtidas tanto em P2 quanto em P3 (Figura 12).



**Tabela 2** – Dados de contagem plaquetária dos grupos P2 e P3 com suas respectivas médias e desvios padrões.

<b>Grupo (Protocolo)</b>	<b>Animal</b>	<b>Sangue total (plaquetas.<math>\mu^{-1}</math>)</b>	<b>PRP (plaquetas.<math>\mu^{-1}</math>)</b>	<b>Relação PRP/sangue total</b>
P2	1	601.500	3.507.000	5,83
P2	2	196.500	2.203.000	11,21
P2	3	531.000	6.741.000	12,69
P2	4	186.000	2.716.000	14,60
P2	5	558.000	5.206.000	9,33
Média		414.600	4.074.600	9,83
Desvio Padrão		205.468	2.061.574	
P3	1	360.000	5.842.850	16,23
P3	2	349.000	7.912.220	22,67
P3	3	321.000	4.150.710	12,93
P3	4	361.000	6.862.100	19
P3	5	288.000	3.776.790	13
Média		335.900	5.668.934	16,88
Desvio Padrão		31.383	2.034.957	



**Figura 9** – Gráficos demonstrando a dispersão da concentração plaquetária nas cinco repetições para cada animal de acordo com os protocolos utilizados.

## **4.2 Uso do PRP como adjuvante da cicatrização**

### **4.2.1. Coleta de sangue e processamento do PRP**

Para os dez animais utilizados nessa fase do experimento, o protocolo selecionado e a técnica para coleta de sangue mostraram-se satisfatórios, sendo possível realizar a coleta em todos os animais com uma única punção na jugular.

O protocolo de dupla centrifugação, denominado P3, já descrito anteriormente, foi eficiente para a separação do PRP, e para todos os animais foi obtida concentração maior ou igual a  $1 \times 10^6$  plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , conforme a descrição de Marx (2004), com um aumento que variou de 3,82 a 11,72 vezes em comparação à concentração plaquetária basal (Tabela 3). Por meio da contagem manual das plaquetas no PRP, em câmara de Neubauer, foi possível a análise morfológica das plaquetas, não sendo visualizados agregados plaquetários em nenhuma das amostras analisadas. Não houve crescimento bacteriano nas amostras de PPP enviadas para exame bacteriológico, em 72h de incubação.

O processamento do PRP se deu simultaneamente à realização do processo cirúrgico, e seu uso ocorreu logo após a criação das lesões. Por essa razão, utilizou-se trauma criado pela lesão para a ativação plaquetária.

**Tabela 3** – Dados de contagem plaquetária dos 10 animais utilizados na segunda fase do experimento, com suas respectivas médias e desvios padrões.

<b>Animal</b>	<b>Sangue total (plaquetas.<math>\mu^{-1}</math>)</b>	<b>PRP (plaquetas.<math>\mu^{-1}</math>)</b>	<b>Relação PRP/sangue total</b>
GATO 1	210.000	1.039.500	4,950
GATO 2	303.000	3.256.000	10,746
GATO 3	397.000	3.437.100	8,658
GATO 4	238.000	1.085.000	3,827
GATO 5	408.000	1.340.000	3,284
GATO 6	411.000	4.260.000	10,365
GATO 7	510.000	4.890.000	9,588
GATO 8	225.000	1.585.000	7,044
GATO 9	273.000	3.200.000	11,722
GATO 10	381.000	3.915.000	10,276
Média	340.150	2.800.760	8,046
Desvio Padrão	95.841	1.420.687	

#### 4.2.2 Procedimento Cirúrgico

O uso do *punch* para a produção das lesões não foi eficiente. Devido à resistente pele dos gatos, este fez apenas a marcação e início da incisão para a produção da ferida. Para a retirada de fragmentos de espessura total (derme, epiderme e tecido subcutâneo) precisou-se do auxílio de pinça de dissecação auxiliar e tesoura de Mayo. Após a confecção das feridas, as que obtiveram área superior a 1 cm de diâmetro, sofreram a ação das linhas de tensão da pele. Isso, coincidentemente, foi mais frequente nas feridas tratadas.

A execução do modelo cirúrgico proposto, que é uma adaptação do modelo criado por Bohling et al. (2006), foi considerada simples e se deu de forma rápida. Durante sua realização, alguns animais apresentaram um pequeno sangramento, que foi contido mediante compressão manual. Em apenas uma ferida de um dos animais (D1 do gato 7) houve sangramento no período pós-operatório imediato, formando um coágulo que preencheu a ferida.

A utilização do PRP na forma líquida, depositado diretamente sobre a lesão, tornou fácil sua utilização. Os animais foram lateralizados antes da aplicação, evitando que o mesmo

escorresse durante o procedimento. Foi necessário manter os animais nessa posição por um período de 15 minutos. Repetiu-se o mesmo procedimento para o lado controle, permanecendo a solução NaCl 0,9% pelo mesmo tempo.

A aplicação das películas aderentes de poliuretano, individualmente sobre cada uma das lesões, após a aplicação dos tratamentos, fez com que os líquidos permanecessem sobre as feridas no período pós-operatório. Apenas um animal (gato 6) removeu todos os adesivos em um período inferior a 24 horas, mas ele não foi excluído do estudo. No intervalo de 24 horas após a intervenção cirúrgica, em cinco animais houve o descolamento do adesivo em ambas as feridas mais craniais e, nesses mesmos, em 48 horas todos foram substituídos por gaze vaselinada estéril. Nos demais, a remoção e substituição dos curativos de poliuretano ocorreu 72 horas após o ato operatório.

Não houve qualquer complicação durante os procedimentos cirúrgicos ou anestésicos realizados. Todos os animais tiveram boa recuperação, com pouca excitação. Os gatos não demonstraram sinais de dor, alimentaram-se e beberam água normalmente após a recuperação anestésica, mostrando-se apenas bastante incomodados com as malhas cirúrgicas.

#### 4.2.3 Avaliação macroscópica

Os animais foram avaliados e tratados diariamente após a confecção das feridas. Notou-se que, para todos eles, a presença da malha cirúrgica e a bandagem, por dificultar a higiene diária, foi a maior fonte de incômodo durante todo o período de avaliação. As duas feridas mais craniais, tratada e controle, devido ao deslocamento da bandagem caudalmente, pela movimentação e flexibilidade dos animais, frequentemente ficaram expostas em todos os animais.

Os gatos mantiveram-se ativos, alimentando-se, bebendo água e interagindo entre si e com o ambiente enriquecido, durante todo o período experimental.

##### 4.2.3.1 Avaliação clínica

Nas avaliações clínicas a cada três dias (nos dias três, seis, nove, 12, 15, 18, 21, 24 e 27), realizadas em triplicata, não houve resultado estatisticamente significativo quando comparadas as feridas tratadas com as controle, para os itens: dor, edema, coloração, tecido de granulação e presença de crostas (Anexo B). Já no quesito exsudato, na avaliação aos três dias, houve diferença significativa ( $p=0,025$ ), e as feridas tratadas mostraram-se mais exsudativas que as controle (Tabela 4). Do terceiro ao sexto dia, o exsudato serosanguinolento esteve presente, e em alguns animais (5/10) persistiu até o nono dia. Apenas um animal (gato

quatro) apresentou exsudato até o 15º dia. A antibioticoterapia, mesmo sem exame de cultura bacteriana, foi instituída a partir do terceiro dia de pós-operatório. A coloração das feridas foi representada pela hiperemia, já que não foram constatadas outras colorações nas feridas avaliadas. Mesmo assim, nesse quesito, não houve diferença na comparação entre os grupos, nem quanto ao tempo, e em todos os dias avaliados a média de pontuação foi igual a zero, logo esse dado não é ilustrado.

**Tabela 4** – Avaliação clínica das feridas quanto à presença de exsudato, comparando-se feridas tratadas com PRP (T) com feridas controle (C). Na tabela são apresentados os valores de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney em *ranks*.

<b>Dias</b>	<b>Grupo</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
3	T	1	1	2	0,025*
	C	1	1	1,75	
6	T	1	0	1	0,569
	C	1	0	1	
9	T	0	0	0	0,389
	C	0	0	0	
12	T	0	0	0	0,044*
	C	0	0	0	
15	T	0	0	0	0,082
	C	0	0	0	

\* estatisticamente significativo

Quando comparados os mesmos itens, para cada grupo separadamente, considerando-se a variável tempo, houve diferença estatisticamente significativa para os itens: crostas, dor, exsudato e tecido de granulação para ambos os grupos. Os fatores, a comparação entre os dias e respectivos valores de p estão dispostos nas tabelas 5 e 6. O item edema não aparece ilustrado na tabela, pois não houve significância na sua variação em decorrência do tempo, sendo que todas as médias de valores, tanto para feridas tratadas, quanto controle, foram zero. No quesito edema, tanto para as feridas tratadas (p=0,347), quanto no controle (p=0,165) não houve diferença significativa.

**Tabela 5** – Avaliação clínica quanto a presença de crostas, dor, exsudato e tecido de granulação, nas feridas tratadas com PRP (T), de acordo com o tempo de evolução. Na tabela são apresentados os valores dos quartis de 75%, obtidos pelo teste Mann-Whitney em *Ranks* com múltipla comparação pareada pelo método de Dunn.

<b>Dias</b>	<b>Crostas</b>	<b>Dor</b>	<b>Exsudato</b>	<b>Tecido de granulação</b>
3	0 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
6	0 <sup>ab</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
9	0 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>
12	1 <sup>b</sup>	-	0 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>
15	2 <sup>ab</sup>	-	0 <sup>c</sup>	3 <sup>bc</sup>
18	1 <sup>ab</sup>	-	-	-
21	0 <sup>ab</sup>	-	-	-
24	0 <sup>ab</sup>	-	-	-
27	0 <sup>a</sup>	-	-	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 6** – Avaliação clínica quanto a presença de crostas, dor, exsudato e tecido de granulação, nas feridas controle (C), de acordo com o tempo de evolução. Na tabela são apresentados os quartis de 75% obtidos pelo teste Mann-Whitney em *Ranks*, com múltipla comparação pareada pelo método de Dunn.

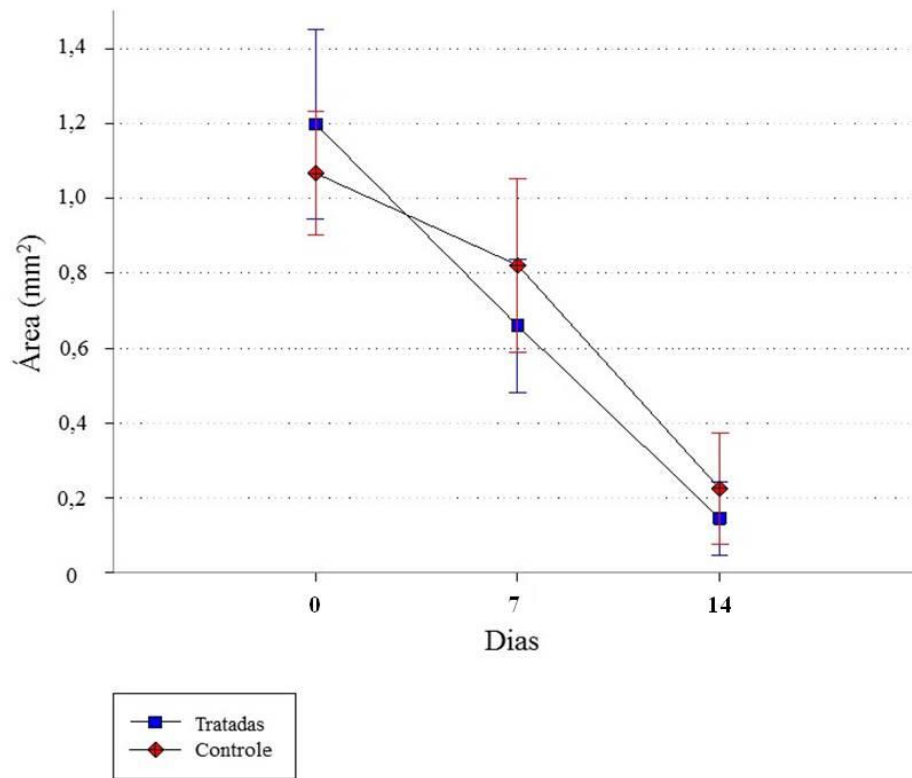
<b>Dias</b>	<b>Crostas</b>	<b>Dor</b>	<b>Exsudato</b>	<b>Tecido de granulação</b>
3	0 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1,75 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
6	1 <sup>ab</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
9	1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>
12	1 <sup>b</sup>	-	0 <sup>c</sup>	3,25 <sup>c</sup>
15	1 <sup>b</sup>	-	0 <sup>c</sup>	3 <sup>bc</sup>
18	2 <sup>b</sup>	-	-	0 <sup>a</sup>
21	0,75 <sup>ab</sup>	-	-	0 <sup>a</sup>
24	1 <sup>ab</sup>	-	-	-
27	0 <sup>ab</sup>	-	-	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa

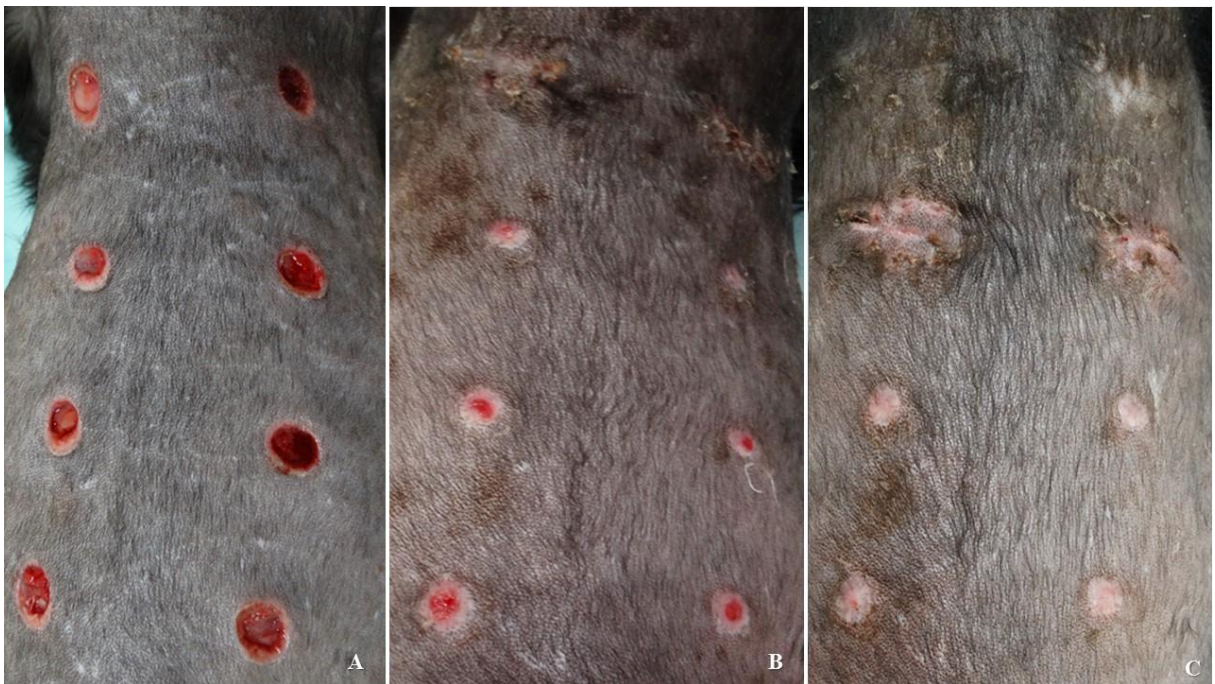
#### 4.2.3.2 Análise morfométrica

Avaliando-se as médias das áreas das feridas, foi possível identificar uma retração mais acentuada e, conseqüente, diminuição no tamanho das feridas, no grupo tratado com o PRP. Aos sete e 14 dias, as médias de diminuição da área foram estatisticamente significativas em relação ao controle (Figuras 9 e 10). Em média, quase todos os animais apresentaram cicatrização completa das lesões tratadas até os 21 dias (Tabela 7), por isso, constam na tabela 8 os valores das médias de áreas de feridas, e respectivos valores de p até os 14 dias. Foi verificada significância desde o dia zero, comparando-se controle com tratado, em decorrência da ampliação espontânea das áreas de algumas feridas do grupo tratado logo após o procedimento cirúrgico. Em três animais (gatos de número seis, sete, nove e dez), uma das feridas tratadas cicatrizou completamente, antes do seu controle (Tabela 9).





**Figura 10** – Gráfico ilustrando a redução da área das feridas tratadas e controle, no intervalo de 14 dias. Os pontos representam a média dos grupos, e as linhas verticais o desvio padrão.



**Figura 11** – Evolução cicatricial no período de 21 dias. No lado direito feridas tratadas com PRP, no esquerdo controle. A – Aos sete dias; B – Aos 14 dias; C – Aos 21 dias.

**Tabela 7** – Avaliação morfométrica das áreas das feridas em cada grupo, tratado e controle, em função do tempo. Na tabela são apresentados os valores dos quartis de 75% e o valor de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney em *Ranks*, e comparados pelo método de Dunn.

<b>Dias</b>	<b>Tratado (PRP)</b>	<b>Controle</b>
0	1,325 <sup>a</sup>	1,150 <sup>a</sup>
7	0,784 <sup>b</sup>	0,976 <sup>b</sup>
14	0,192 <sup>c</sup>	0,362 <sup>c</sup>
p	<0,001	<0,001

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa

**Tabela 8** – Avaliação morfométrica das áreas das feridas tratadas com PRP em comparação ao controle. Na tabela são apresentadas as médias das áreas em cada grupo em cm<sup>2</sup>, e o valor de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney Rank Sum Test.

<b>Dias</b>	<b>Tratado (PRP)</b>	<b>Controle</b>	<b>p</b>
0	1,151	1,024	0,012*
7	0,660	0,821	<0,001*
14	0,118	0,212	0,045*

\* estatisticamente significativo

**Tabela 9** – Disposição das feridas de cada animal, nos dias da análise morfométrica.

Animais	Feridas	7 DIAS				14 DIAS				21 DIAS				28 DIAS			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
GATO 1	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
GATO 2	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
GATO 3	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
GATO 4	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
GATO 5	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
GATO 6	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	S	-	-	-	S
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	S	-	-	-	N
GATO 7	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	S	S	-	-	-	S
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	S	S	-	-	-	N
GATO 8	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	S*	-	-	-	N
GATO 9	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	N	S	S	-	-	N	N	-	-	-	N
GATO 10	C	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	S	S	-	-	-	N
	T	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	N	S	-	-	-	N

S: Sim, com ferida; N: Não, ferida cicatrizada; -: Ausente, feita biopsia; \*: Por lambedura. Feridas tratadas (T) e controle (C).

#### 4.2.4 Avaliação microscópica

Ao se considerar os itens avaliados no exame histopatológico das biopsias, não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparadas as feridas tratadas com os controles (Anexo B) em nenhum dos tempos (sete, 14, 21 e 28 dias), para nenhum dos itens avaliados (úlceras, crostas, acantose, fibroplasia, colagenização e neovascularização). Comparando-se os tempos de evolução, foram observadas as modificações inerentes ao processo de cicatrização tanto para feridas tratadas (Tabela 10), quanto para o controle (Tabela 11).

**Tabela 10** – Avaliação histológica quanto a presença de crostas, úlcera, acantose, fibroplasia, colagenização e neovascularização, comparando-se os tempos das biopsias nas feridas tratadas com PRP (T). Na tabela são apresentados os valores de p, obtidos pelo teste Mann-Whitney em *Ranks*.

<b>Avaliação histopatológica</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>21 dias</b>	<b>28 dias</b>	<b>p</b>
Crosta	3 <sup>a</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	<0,001
Úlcera	1 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	<0,001
Acantose	0 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	1 <sup>ab</sup>	<0,001
Fibroplasia	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	2,25 <sup>ab</sup>	2 <sup>b</sup>	0,002
Colagenização	0 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup>	2 <sup>bc</sup>	3 <sup>c</sup>	<0,001
Neovascularização	3 <sup>a</sup>	2 <sup>ab</sup>	1 <sup>bc</sup>	0 <sup>c</sup>	0,001

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 11** – Avaliação histológica quanto a presença de crostas, úlcera, acantose, fibroplasia, fibrose e neovascularização, comparando-se os tempos das biopsias nas feridas controle (C). Na tabela são apresentados os valores de p, obtidos pelo teste de Mann-Whitney em *Ranks*.

<b>Avaliação histopatológica</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>21 dias</b>	<b>28 dias</b>	<b>p</b>
Crosta	3 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	<0,001
Úlcera	1 <sup>a</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	<0,001
Acantose	0 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	2 <sup>ab</sup>	0,001
Fibroplasia	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	0,124
Colagenização	0 <sup>a</sup>	1,25 <sup>ab</sup>	2 <sup>bc</sup>	3 <sup>c</sup>	<0,001
Neovascularização	3 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	<0,001

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa.

No exame histopatológico, para todos os animais, visualizou-se nos cortes aos sete dias, independentemente do lado (esquerdo ou direito – devido ao estudo cego), a presença de uma úlcera focalmente extensa recoberta por espessa crosta constituída de soro e fragmentos celulares, principalmente neutrófilos degenerados. Nessas crostas houve grande quantidade de queratina, pelos e bactérias. Logo abaixo dessas áreas foram observadas células fusiformes ou estreladas disposta paralelamente em meio à matriz mixoide. Tais células foram interpretadas como fibroblastos e seu acúmulo nesses locais como fibroplasia. Além dessas células, outras,

semelhantes, mas formando canais vasculares (neovascularização) foram comumente encontradas.

Nos cortes aos 14 dias, foi vista uma organização desse tecido fibrovascular, com produção de pequena quantidade de colágeno, evidenciado pela coloração de Masson. Além disso, havia menos matriz mixoide e vasos sanguíneos neoformados.

Nos cortes aos 21 dias, foi mais evidente a organização do tecido fibrovascular e de colágeno mais denso e abundante, principalmente quando observado por meio da coloração de Masson. Nos cortes aos 28 dias, não mais se observaram vasos neoformados, foram visualizados fibroblastos fusiformes (maduros) e as fibras de colágeno mais espessas e bem definidas. Visualmente também não houve nenhuma diferença qualitativa nem entre as amostras controle e tratadas no quesito colagenização.

Notou-se que o infiltrado inflamatório em todos os cortes foi supurativo aos sete dias e piogranulomatoso aos dias 14, 21 e 28. Esse infiltrado foi inicialmente decorrente da úlcera focalmente extensa formada pela agressão. Entretanto, posteriormente, tal infiltrado inflamatório tornou-se piogranulomatoso, ou seja, formado por neutrófilos degenerados e por grande quantidade de macrófagos epitelioides. Ele ocorreu como uma reação do tipo corpo estranho (reação de hipersensibilidade do tipo IV) aos fragmentos de pelos presentes nas lesões. Também não foram visualizadas diferenças qualitativas entre as amostras controle e tratadas no quesito inflamação.

## **5 DISCUSSÃO**

A busca por um meio de adiantar e melhorar a cicatrização de feridas cutâneas de gatos surgiu pela observação do longo período de internação desses animais, para o tratamento de extensas lesões cutâneas, no Hospital Veterinário da UFSM, somando-se ao interesse do autor por dados publicados por Bohling et al. (2004) e Bohling et al. (2006), que ilustram as reais diferenças na cicatrização cutânea de gatos, e ressaltam a importância da busca por terapias que auxiliem na resolução desse processo.

Poucos estudos experimentais para avaliação da cicatrização cutânea utilizando gatos são encontrados na literatura (COURT; BELLENGER, 1989; BOHLING et al., 2004; BOHLING et al., 2006), muito provavelmente devido às dificuldades de manejo dessa espécie em um ambiente de experimentação. Na fase de padronização do protocolo para produção do PRP, os animais domiciliados permaneceram em ambiente hospitalar apenas o tempo necessário para indução anestésica, coleta de sangue e recuperação, período que não ultrapassou oito horas. Já para a realização das feridas e tratamentos, os animais permaneceram no gatil de experimentação durante 60 a 90 dias.

Considerou-se fundamental para a realização desse estudo um período para ambientação superior a 30 dias, pois, inicialmente, alguns animais demonstraram sinais de estresse e agressividade. Com o passar do tempo, pelos cuidados individuais realizados três vezes ao dia, manipulação carinhosa e artifícios de enriquecimento ambiental, todos eles tornaram-se dóceis. O tratamento e manipulação, desde o período de ambientação até o final das avaliações também foi feito sempre pela mesma equipe. Garcez (2012) refere que, para estudos onde se avalia cicatrização, é imprescindível que os animais sejam dóceis e tranquilos o suficiente, para que, aliados à terapia analgésica adequada, não ocorram intercorrências no processo cicatricial, devido à automutilação.

### **5.1 Protocolos para obtenção e padronização do PRP**

Apesar das dificuldades inerentes a coleta de sangue de gatos, tais como o fino calibre dos vasos salientado por Welles et al. (1994) e a fácil ativação das plaquetas citado por Knoll (2000), o método utilizado para coleta do sangue mostrou-se satisfatório para a espécie. O uso da coleta a vácuo tornou o procedimento mais fácil, haja vista que houve refluxo de sangue

para os tubos imediatamente após a punção, minimizando o risco de transfixação do vaso e ativação das plaquetas pelo dano causado pela punção. Esse mesmo sistema também foi utilizado para produção de PRP por Barbosa et al. (2008), Vanat et al. (2012) em estudos utilizando cães. Pazzini (2014) considerou como principal vantagem no uso do sistema a vácuo, a possibilidade de se adquirir comercialmente tubos já contendo o anticoagulante e que são estéreis, minimizando assim o risco de contaminação do PRP.

Embora Everst et al. (2006) recomendem o uso de agulhas com numerações superiores a 17G ( $\varnothing=1,33\text{mm}$ ), para evitar possíveis danos às plaquetas, no atual estudo utilizaram-se agulhas com menor calibre. Com agulhas 21G (25X0,8mm) foi possível realizar a coleta e não foram visualizados agregados plaquetários, que indicariam ativação das plaquetas, durante a contagem manual.

Observou-se grande variação, tanto no número de punções necessárias, quanto na velocidade em que os tubos foram preenchidos em todos os animais de P1, P2 e P3. Como todas as punções foram realizadas pelo mesmo operador, e os tubos eram todos iguais, do mesmo fabricante, acredita-se que essa alteração esteja relacionada ao fino calibre dos vasos. Para todos os animais, o garroteamento da veia jugular, caudal à punção, foi desfeito sempre que se realizava a troca de tubo, com o intuito de favorecer seu preenchimento.

A escolha das forças e tempos para o processamento do PRP em P1 e P2, que são adaptações de protocolos descritos por Barbosa (2013) e Vendramin et al (2009), respectivamente, basearam-se na boa descrição da metodologia por esses autores. Também por ambos os protocolos terem sido executados com sucesso em no mínimo duas espécies.

A não separação do sangue em três fases, com a utilização do protocolo P1 foi considerada importante, apesar de não poder se descartar variação individual, já que neste estudo foram utilizados apenas cinco animais para cada protocolo (25 amostras de sangue). As mesmas forças testadas em P1 já haviam sido utilizadas com êxito por Pereira (2012) em um estudo que utilizou sangue equino e por Barbosa (2013) que testou em sangue de cães e coelhos.

Para a padronização de técnicas de preparo do PRP em humanos, devido à possibilidade de se utilizar bolsas de sangue para os testes, Vendramin et al. (2006) utilizaram 20 repetições com o mesmo sangue, para o mesmo protocolo, e mais dez para garantir a reprodutibilidade, depois da padronização. Porém, devido ao pequeno volume sanguíneo dos gatos em relação a humanos, isso se torna inviável. Para Knottenbelt et al. (2014), gatos saudáveis e conscientes podem perder até 20% de seu volume sanguíneo ( $13\text{mL.kg}^{-1}$ ), se houver reposição de duas a três vezes o volume coletado, com soluções cristaloides, em um

intervalo de 45 a 60 minutos. Quando anestesiados, perdas superiores a 10% podem resultar em risco de vida.

Optou-se pela utilização de técnicas com dupla centrifugação, pois o objetivo foi a obtenção de PRP. Quando utilizada uma única centrifugação, a concentração total de plaquetas é mais baixa, por se tratar de uma mistura de plasma pobre em plaquetas (PPP) e PRP (MARX, 2001). O uso de uma técnica de centrifugação única foi descrito por Molano (2012) para a separação de concentrado de plaquetas em gatos.

Diferente dos dados obtidos por Vendramin et al. (2009) e Pereira (2012), não se conseguiu maior concentração de plaquetas com o aumento da força g. Ao ser utilizada uma força menor na segunda centrifugação em P3 (600g) houve maior concentração de plaquetas. Não se sabe ao certo porque isso aconteceu, já que não foram utilizadas forças excessivamente altas em P2 (800g). Durgrillon et al. (2002) ao utilizarem forças superiores a 800g na segunda centrifugação, relataram a liberação precoce dos FC e agregação plaquetária. Não foram mensurados os FC nesse estudo, mas como já mencionado anteriormente, não houve visualização de agregados plaquetários durante a contagem manual em nenhuma das amostras de P2 e P3.

Tanto no P2 como em P3 foi possível realizar a separação do PRP, conforme o esperado, com protocolo de dupla centrifugação. Em ambos obtiveram-se concentrações superiores a 1.000.000 de plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , ou mais de quatro a cinco vezes o valor da contagem de plaquetas basal, para todas as cinco repetições, favorecendo seu potencial terapêutico, conforme descreveram Marx (2001), Marx (2004), Everst et al. (2006).

A contagem média de plaquetas obtida no PRP em P2 foi de 4.074.600 ( $\pm 2.061.574$ ) plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , o que correspondeu à concentração 9,83 vezes superior à contagem basal, que foi de 414.600 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ . Já com PRP produzido em P3, em que se obteve a média de 5.668.934 ( $\pm 2.034.957$ ) plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , atingiu-se a concentração média de plaquetas 16,78 vezes superior à encontrada no sangue (335.900 plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ ). Ao se comparar ambos os protocolos, houve diferença estatisticamente significativa ( $P=0,007$ ), sendo o protocolo P3 mais eficiente em concentrar grande número de plaquetas em um pequeno volume de plasma.

A análise de dispersão, que visava avaliar a distribuição da concentração plaquetária obtida nas cinco amostras coletadas de cada um dos cinco animais de cada grupo, demonstrou variação na concentração de plaquetas obtidas tanto em P2 quanto em P3. Devido à inexistência de estudos comparativos com PRP em gatos, acredita-se que essa observação esteja relacionada às características da espécie em questão, ou ainda associada à variação



individual, haja vista que nesse estudo foi utilizado o número mínimo possível de animais por grupo.

Estudos de Marx (2001), Marx (2004) e Everst et al. (2006) consideraram que, para alcançar respostas significativas, o PRP deve atingir a concentração plaquetária de  $1 \times 10^6$  plaquetas. $\mu\text{l}^{-1}$  (MARX, 2001; MARX, 2004) o que corresponderia ao aumento de quatro a cinco vezes superior a contagem de plaquetas do sangue (EVERST et al., 2006). Ainda existem divergências quanto ao fator dose-resposta. Relata-se que, quando os receptores específicos para FC da superfície da célula estão completamente ocupados, concentrações crescentes desses fatores parecem não ter qualquer efeito benéfico adicional. Ou, por outro lado, alguns FC poderiam exercer um efeito inibitório sobre as funções das células, quando em altas concentrações (RANLY et al., 2005).

A concentração final de plaquetas de qualquer PRP é determinada pelo volume inicial de sangue coletado, pela eficiência na recuperação de plaquetas pela técnica utilizada e volume final de plasma utilizado para ressuspender as plaquetas concentradas. A alteração de qualquer uma das três variáveis irá alterar proporcionalmente a concentração final do PRP (ARNOCZKY et al., 2011). Tendo em vista esses dados, acredita-se que as altas concentrações de plaquetas alcançadas na primeira etapa desse experimento ilustram a real eficiência de recuperação de plaquetas pelos protocolos executados, principalmente em P3 ( $5.668.934 \pm 2.034.957$ ). Para evitar possíveis efeitos inibitórios devido às altas concentrações obtidas, sugere-se que a redução do PPP na etapa final seja menor, pois no presente estudo optou-se por manter um volume que correspondesse a 10% do total de sangue coletado. Como resultado, haverá maior volume de PRP, para utilização em áreas mais extensas, ainda mantendo concentração que o torna terapêutico.

Apesar dos protocolos realizados utilizarem um volume de sangue total de 22,5 mL, que pode ser considerado relativamente elevado para gatos, correspondendo em média a  $5,11 \text{ mL.kg}^{-1}$  por animal, em cada uma das repetições empregou-se apenas 4,5 mL. Essas repetições ocorreram para garantir a repetibilidade da técnica. Logo, se for considerado cada tubo individualmente, é possível obter excelente concentração de plaquetas em P2 e P3, com pequeno volume de sangue em gatos, o que torna ambos os protocolos adequados para uso na clínica e cirurgia de felinos.

Optou-se por não realizar a ativação do PRP devido às possibilidades de seu uso na forma líquida parecerem mais vantajosas para os autores do presente estudo. Quando o PRP é injetado diretamente na ferida, a ativação das plaquetas, para liberação dos FC, pode ocorrer por meio de substâncias geradas pelo traumatismo provocado pela agulha no tecido e,

principalmente pelo colágeno tecidual (VENDRAMIN et al., 2010). Westerlaine et al. (2012) alegam que essa ativação tem como vantagens a possibilidade de aplicação do PRP através de agulhas pequenas, porque o coágulo ainda não foi formado, eliminação de riscos de reação imunológica, como na ativação exógena, e leva a liberação de FC de forma mais lenta e continuada, em comparação à trombina. Vendramin et al. (2010), em um estudo que objetivou buscar a melhor forma de aplicação do PRP em enxertias cutâneas em coelhos, concluíram que a forma líquida, além de demonstrar melhores resultados, tem preparação mais rápida e a aplicação direta sob a ferida mostrou-se mais fácil, uniforme e com menor desperdício, em comparação ao gel. Por dispensar a preparação da trombina autóloga, houve economia de tempo e diminuição nos custos de sua execução.

A simplificação no preparo, por meio de técnicas manuais, permitiu a difusão de pesquisas sobre o PRP. Contudo, essas técnicas são mais trabalhosas (VENDRAMIN et al., 2006) e sua execução por pessoa treinada é enfatizada, por estarem mais sujeitos a erros durante a preparação, prejudicando a qualidade do produto (VENDRAMIN et al., 2009; VENDRAMIN et al., 2010). O processamento manual do PRP, nesse estudo, foi feito por profissional com experiência em práticas laboratoriais, que realizou manipulação cuidadosa, principalmente quando utilizadas as pipetas automáticas, para evitar danos às plaquetas. Logo, os protocolos foram considerados exequíveis, mas por conterem várias etapas, também foram trabalhosos, sendo necessária a utilização de equipe treinada para sua execução.

## **5.2 Uso do PRP como adjuvante da cicatrização**

Para todos os animais utilizados na segunda fase do experimento, a técnica e o anticoagulante utilizados para a coleta, e o protocolo desenvolvido na etapa anterior, mostraram-se satisfatórios. A retirada de um menor volume de sangue (9 mL), em apenas dois tubos contendo citrato de sódio 3,2%, facilitou o processo. Ao contrário da fase de padronização do protocolo, nessa fase foi possível realizar a coleta, em todos os animais, com uma única punção na jugular. Esse resultado pode ser atribuído ao aprimoramento da técnica e ao menor volume coletado.

Para Marx (2001), apenas duas combinações contendo citrato conseguem dar o suporte metabólico necessário às plaquetas, o ácido citrato dextrose (ACD), ou o citrato fosfato dextrose (CPD). Essas soluções são utilizadas para o armazenamento de plaquetas viáveis em bancos de sangue. Utilizou-se o citrato de sódio a 3,2%, principalmente pela facilidade de aquisição, e bons resultados obtidos por Barbosa et al. (2008), Vanat et al. (2012) e Pazzini

(2014). Como o uso do PRP deu-se imediatamente após seu processamento, acredita-se que a qualidade do PRP não foi influenciada pela ausência de substâncias nutritivas às plaquetas.

O protocolo de dupla centrifugação (P3), já descrito anteriormente, foi eficiente para a separação do PRP, e obteve-se, para todos os animais, concentração maior ou igual a  $1 \times 10^6$  plaquetas. $\mu\text{L}^{-1}$ , conforme a indicação de Marx (2004). Por meio da contagem manual das plaquetas no PRP, em câmara de Neubauer, foi possível a análise morfológica, não sendo visualizados agregados plaquetários em nenhuma das amostras analisadas. Com essa técnica, houve um aumento médio no número de plaquetas de 8,046 vezes, variando entre 3,82 a 11,72 vezes em comparação à concentração plaquetária basal. Esses valores são superiores aos encontrados por Vendramin et al. (2009), em seu estudo onde foi padronizada uma técnica para a obtenção de gel de PRP para uso em humanos. Esses autores conseguiram uma concentração média de plaquetas 6,7 vezes maior à do sangue, sendo semelhante à obtida por máquinas automatizadas.

Diferente da primeira fase do experimento, a redução do volume de PPP após a segunda centrifugação foi maior, mantendo-se o suficiente para se obter um volume total de 0,4ml de PRP, para a utilização de 0,1 mL por lesão tratada. Logo, o volume mantido correspondeu a apenas 5% do volume sanguíneo coletado inicialmente.

Apesar de neste estudo não ter sido mensurado exatamente o tempo necessário para o processamento do PRP, sabe-se que levou, em média, o dobro do tempo utilizado para a confecção das lesões experimentais. Após a coleta do sangue, houve um período de recuperação parcial da anestesia (associação de tiletamina e zolazepam, aplicada por via IM), e posteriormente, foi necessária indução anestésica com isoflurano por via inalatória, em máscara, para a intubação e o procedimento cirúrgico.

Ao se produzir as feridas cutâneas, tentou-se simular um modelo experimental com lesões de difícil cicatrização. Foram considerados fatores como a localização das lesões na região dorsal do tronco, onde a irrigação sanguínea, em gatos, é descrita como mais deficiente (BOHLING et al., 2004); a criação de feridas que envolveram a espessura total da pele, pois sabe-se que o tecido subcutâneo é uma importante fonte de células precursoras para a formação do tecido de granulação, o qual é o maior responsável pela cicatrização por segunda intenção (BOHLING, 2014); e a criação de lesões circulares, que contraem de maneira menos eficiente que lesões retangulares (PAVLETIC, 2010).

O modelo cirúrgico, com quatro lesões pareadas na região dorsal do tronco, tendo feridas tratadas e controles no mesmo animal, apesar de ter sido inspirado no modelo criado por Bohling et al. (2004), não foi encontrado em outros estudos. Nessa adaptação, cada duas

lesões pareadas corresponderam a um período de avaliação histopatológica, porém, clinicamente, avaliaram-se todas as lesões, nos tempos pré-determinados, exceto quando já removidas em biopsias anteriores. Considerou-se positiva a realização de tratamento e controle no mesmo animal, pois essa prática diminui o número de animais utilizados, e excluiu possíveis falhas na cicatrização relacionadas a fatores individuais (nutricionais, por estresse, por enfermidades não identificadas), ou anatômicos (PAVLETIC, 2010; GARCEZ, 2012).

A aplicação dos tratamentos ocorreu imediatamente após a produção das feridas. Utilizou-se o dano tecidual provocado pela criação da lesão como fator ativador do PRP, apesar de não ter sido encontrada na literatura consultada a mesma metodologia, ou seja, a aplicação na forma líquida colocada diretamente sobre o defeito, sem ser injetada nas bordas. Vendramin et al. (2009) e Garcez (2012) referiram-se que, quando o PRP é utilizado na forma líquida, o trauma tecidual gerado pela confecção da ferida pode ativar as plaquetas, tal qual o trauma provocado pela agulha, quando for injetado o PRP. Esses mesmos autores consideram a utilização na forma líquida mais rápida e menos dispendiosa.

Para Marx (2001), após a ativação das plaquetas, os fatores de crescimento presentes em seus  $\alpha$ -grânulos são imediatamente secretados, dentro dos primeiros dez minutos 70% deles são liberados, atingindo 100% na primeira hora. Com base nessas informações, preconizou-se manter os animais lateralizados durante 15 minutos, para que após a aplicação, o PRP se mantivesse em contato com a lesão, sem risco de escorrer e ser perdido. Por esse mesmo motivo, não se excluiu do estudo, o animal que removeu os curativos no período pós-operatório (inferior a 24 horas).

A utilização do PRP na forma líquida, injetado nas bordas da lesão, foi descrita por Vendramin et al. (2010), Vendramin et al. (2010a), Garcez (2012); Camargo (2013). Porém, nos estudos onde ele foi utilizado sozinho, sem a associação de enxertos, ou sobre o tecido de granulação, não foram encontrados benefício no seu uso.

Desconsiderou-se o uso do PRP na forma de gel para esse estudo, devido à necessidade de se ativar e aplicar o PRP em quatro feridas simultaneamente e, também, pelo pequeno volume de PRP produzido em decorrência do pequeno volume de sangue coletado. Além disso, Vendramin et al. (2010) descrevem que após a ativação, até que ocorra a gelação, o PRP gel também pode escorrer pela ferida, gerando desperdício.

Logo depois da aplicação dos tratamentos, foram aplicadas películas adesivas de poliuretano, seguidas de ataduras de crepom e malhas cirúrgicas específicas para gatos. As películas foram dispostas individualmente sobre cada uma das lesões, evitando que os

tratamentos se misturassem. Além disso, serviram para manter o PRP em contato com a lesão, como proteção e para permitir a avaliação da ferida mesmo sem sua remoção, por serem transparentes. O mesmo material foi utilizado com sucesso por Camargo (2013), para a proteção de lesões cutâneas tratadas com PRP e PRF em ratos.

Inicialmente, os adesivos de poliuretano seriam mantidos sobre os ferimentos pelo maior tempo possível, até que se descolassem sozinhos, pois por permitirem a evaporação de líquido e formarem uma barreira contra sujidades e patógenos, manteriam as feridas limpas protegidas. Porém, devido ao descolamento do adesivo nas feridas craniais (E1 e D1), em cinco animais, 24 horas após a cirurgia, e a remoção completa de todos eles no gato de número seis, esses animais tiveram o curativo substituído por gazes vaselinadas estéreis, seguidas de atadura e malha cirúrgica. Para todos os outros animais, a substituição dos curativos se deu no terceiro dia de pós-operatório.

Apesar do modelo experimental de feridas e tratamentos terem sido facilmente executados, o local e disposição dos ferimentos tornaram o manejo e as avaliações no período pós-operatório complicados. Devido a flexibilidade dos animais e a alta mobilidade cutânea na região do tronco, as ataduras se deslocaram caudalmente, deixando as feridas mais craniais expostas. As gazes vaselinadas não aderentes, que serviam para a proteção e absorção do exsudato, também se movimentaram facilmente. Inicialmente, não houve manipulação das feridas por parte dos animais. Devido à movimentação dos curativos, ocorreu tração sobre as feridas e transferência de pelos soltos para o leito das mesmas. Apesar da limpeza diária com solução de NaCl 0,9%, esses artefatos tiveram influência sobre os achados histopatológicos.

Com a evolução do processo cicatricial, principalmente quando se iniciou a contração das feridas, foi mais difícil manter os animais com curativos e vestidos com as malhas. No período entre o 14º e 21º dias, em um dos animais, por lambedura, uma das feridas cicatrizadas voltou a apresentar crostas.

Nos poucos estudos onde se avaliou a cicatrização cutânea de gatos (Bohling et al., 2004; Bohling et al., 2006), em comparação à de cães, a maior parte dos achados significantes foram provenientes da avaliação clínica e análise morfométrica. Para Garcez (2012), boa parte dos estudos sobre cicatrização restringem-se a avaliação da área e característica microscópicas. No presente estudo, as feridas foram avaliadas quanto a dor, exsudato, crostas, coloração, edema, tecido de granulação (Anexo B). Quando comparadas feridas tratadas com feridas controle, houve diferença estatisticamente significativa apenas no fator exsudato ( $p=0,025$ ), na primeira avaliação, no terceiro dia de pós-operatório. Nos itens dor, crostas e tecido de granulação, observou-se diferença apenas entre os tempos avaliados, mas não entre os

grupos, e edema e hiperemia foram considerados ausentes. Apesar da grande importância da avaliação clínica, que no trabalho em questão foi feita em triplicata, a variação na interpretação individual dos fatores pode ter prejudicado seu resultado, e dados podem ter sido sub ou superestimados.

Acredita-se que o procedimento cirúrgico, associado à analgesia com cloridrato de tramadol, resultou em mínima (+) dor aos animais, detectada apenas por meio da palpação das feridas, até o sexto dia. Esse achado coincidiu com o período onde a fase inflamatória foi mais intensa. Para Pavletic (2010), a dor acontece como resultado da pressão pelo edema local, estimulação química e alongamento das terminações nervosas. Foi descrito por Man et al. (2001), em um estudo direcionado às cirurgias cosméticas, e por Croveti et al. (2004), que tratou úlceras cutâneas de diversas etiopatogênias com PRP em gel, ambos os estudos realizados em humanos, que o uso do PRP está relacionado à diminuição nas complicações e na dor no período pós-operatório. No presente estudo essa diferença não foi visualizada, não havendo significância na comparação do parâmetro dor entre as feridas tratadas e controle. Excluindo-se o momento da avaliação, não foram notados sinais de dor, que seriam demonstrados nos gatos por apatia, anorexia, mudança na postura corporal e facial. Os mesmos mantiveram-se ativos, alimentando-se, bebendo água e interagindo entre si, com os avaliadores e o ambiente enriquecido.

A produção de exsudato na ferida ocorre como um resultado da vasodilatação durante a fase inflamatória da cicatrização, sob influência de mediadores inflamatórios. Ele apresenta-se como fluido no leito da ferida, sendo um componente normal de feridas agudas em cicatrização. Nessas feridas, o exsudato contém moléculas e células que são vitais para apoiar o processo de cicatrização, tais como proteínas, eletrólitos, glicose, citocinas, leucócitos, metaloproteinases, macrófagos e microrganismos. A presença desses últimos não significa necessariamente que há infecção, e sempre se deve avaliar a sua presença em associação com as características da ferida (CUTTING, 2003). Na cicatrização de feridas, ele apoia a cura por manter o ambiente úmido, facilitar a difusão de fatores de crescimento, por favorecer a migração de células através do leito da ferida. Além disso, promove a proliferação celular, provê nutrientes para o metabolismo celular, e auxilia autólise do tecido necrosado ou danificado (ROMANELLI et al., 2010).

Em gatos, experimentalmente, feridas que cicatrizam por segunda intenção apresentam uma fase inflamatória menos intensa, com menor formação de edema e pouca produção de exsudato, quando comparados aos cães (BOHLING et al., 2004). Apesar da ausência de fatores como edema e hiperemia, que também indicariam uma maior inflamação, nesse

estudo, foi observada uma maior produção de exsudato nas feridas tratadas com PRP. Nas avaliações aos três dias de pós-operatório houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,025$ ), quando comparadas feridas tratadas e controles. Acredita-se que a maior exsudação esteja relacionada a um aumento na resposta inflamatória nessas lesões. Do terceiro ao sexto dia de avaliação, o exsudato encontrado caracterizava-se como serossanguinolento para todas as feridas. Em cinco animais, o exsudato persistiu nas feridas tratadas até o nono dia, e em apenas um animal, esteve presente até o 15º dia. Nenhum animal apresentou exsudação excessiva, nem feridas com aspecto macerado ou tecido necrótico.

Em contrapartida, apesar da ausência de significância na comparação entre os tratamentos, notou-se a formação mais precoce e persistência de crostas por mais tempo nas feridas controle (Tabelas 5 e 6). Nessas feridas as crostas foram vistas a partir do sexto dia e mantiveram-se até o 24º. Já nas tratadas, as crostas estiveram presentes a partir do 12º dia, e mantiveram-se até o 18º, havendo um aumento na quantidade de crostas aos 15 dias. Segundo Conceição; Santos (2010), as crostas caracterizam-se por uma massa ressecada, formada pela combinação de queratina, soro, restos celulares e micro-organismos, e sua presença indica um processo exsudativo anterior a sua instauração. Para Hedlund (2007), ao contrário de um leito de ferida úmido, que permite uma ótima cicatrização, a presença de crostas parece prolongar o processo de epitelização.

Na avaliação clínica da presença e formação do tecido de granulação (Tabelas 5 e 6), notou-se um comportamento semelhante na sua evolução, com a progressão das avaliações, tanto no grupo controle quanto nas feridas tratadas com o PRP. O tecido foi percebido, em ambos, a partir do sexto dia de avaliação, houve aumento na sua formação no nono dia, o qual se manteve até o 15º dia. Não houve significância na comparação entre os grupos, em nenhuma das avaliações, porém a distribuição desse tecido na área das feridas diferiu sutilmente em alguns animais. No sexto dia, em ambos os grupos, o tecido de granulação formou uma fina borda nas margens da ferida. Aos nove dias, em cinco animais (5/10), notou-se a progressão generalizada desse tecido, cobrindo não só as margens, como também o centro da lesão, nas feridas tratadas. Nas feridas controle, apesar do aumento proporcional da quantidade de tecido, ele não preencheu o centro da ferida. Já aos 12 dias, em ambos os grupos, o tecido encontrou-se localizado na região central da lesão, com as bordas inicialmente epitelizadas.

No estudo realizado por Bohling et al. (2004), foi observada uma lenta formação de tecido de granulação a partir das bordas da lesão, com coloração pálida nas feridas cutâneas de gatos. A média para o recobrimento da ferida por esse tecido foi de 19 dias, em

comparação com cães, que preencheram a ferida em 7,5 dias. Em frente a esses resultados, observou-se uma tendência a um melhor preenchimento das lesões, mais precocemente nas feridas tratadas, no presente estudo. É relatado por Man et al. (2001), Henderson et al. (2003) e Vendramin et al. (2010), que o uso do PRP é capaz de influenciar na cicatrização de feridas pela estimulação do processo inflamatório, levando a um aumento na produção de matriz extracelular e tecido de granulação. O PRP acelera o crescimento vascular, a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno.

Os resultados obtidos na análise morfométrica (Tabela 7 e Figura 8), onde se evidenciou considerável diferença na diminuição das áreas das feridas no grupo tratado com o PRP, em comparação ao controle, foram os dados mais relevantes encontrados nesse estudo. No geral, feridas tratadas e controles apresentaram diminuição significativa da área, permitindo a contração e o fechamento das mesmas em um período médio de 21 dias. Porém, nos primeiros sete dias, observou-se uma cicatrização geral mais lenta no grupo controle, com menor redução de área, ao passo nas feridas com PRP houve uma regressão linear mais brusca nas áreas das feridas, diferença essa, que foi considerada altamente significativa ( $p < 0,001$ ). Dos sete aos 14 dias, apesar de ainda estatisticamente significativa ( $p = 0,045$ ), essa diferença diminuiu.

Hedlund (2007) referiu que a contração da ferida é um evento subsequente à presença de fibroblastos, quando há reorganização do colágeno no tecido de granulação e a contração de miofibroblastos presentes na borda da lesão faz a redução da área lesionada. Em um estudo em humanos, desenvolvido por Hom et al. (2007), que avaliaram a eficácia do PRP em gel, em feridas criadas experimentalmente, foram observados aumentos gradativos na taxa de contração das feridas tratadas em comparação ao controle. Esses autores acreditam que a contração foi melhorada pela ação do PRP, permitindo o fechamento mais rápido das lesões. Especula-se ainda que, a ação de PDGF e TGF- $\beta$ 1, que são encontrados no PRP, possa ter estimulado maior transformação de fibroblastos em miofibroblastos, favorecendo a contração e cicatrização da ferida mais precocemente. Apesar de no presente estudo, não terem sido avaliados fatores de crescimento, também se acredita que a contração mais rápida esteja relacionada à ação dos fatores de crescimento presentes no PRP, pois não haveria outra explicação para as taxas de contração discrepantes encontradas. Nos estudos de Mendonça (2009), Garcez (2012) e Camargo (2014), onde também se avaliou a ação do PRP em feridas cutâneas em animais, a ausência de resultados positivos nas avaliações morfométricas foram aliadas a achados negativos em outras avaliações, tais como exame histopatológico ou de avaliação clínica.



Na avaliação histopatológica dos fragmentos de pele coletados aos sete, 14, 21 e 28 dias, quando comparadas feridas tratadas com PRP ao controle, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas no processo cicatricial (Anexo B). As biopsias sequenciadas demonstraram a evolução normal do processo de cicatrização no período de 28 dias.

Inicialmente, aos sete dias, foi visualizada uma úlcera, decorrente do processo cirúrgico, coberta por uma crosta espessa, formada por soro, fragmentos celulares, neutrófilos degenerados, queratina, pelos e bactérias. É descrito por Conceição e Santos (2010), que as bactérias são integrantes comuns dos resíduos superficiais, e por estarem restritas à crosta, não indicam infecção nas feridas. Abaixo, foram visualizados acúmulos de fibroblastos em meio a matriz mixoide, e neovascularização. Ainda nesse tempo de avaliação, foi evidenciada a presença de um infiltrado inflamatório supurativo. Aos 14 dias, o tecido de granulação foi mais evidente, houve uma pequena organização do tecido fibrovascular, com pouca deposição de colágeno e vasos neoformados. Esse tecido estava mais organizado e com presença de colágeno denso aos 21 dias. Na última avaliação, aos 28 dias, foram visualizados apenas fibroblastos maduros e fibras colágenas mais espessas. Acredita-se que a constante movimentação e deslocamento dos curativos dos gatos, durante todo o período experimental, tenha contribuído para a deposição de pelos sobre o leito das feridas. Esses fragmentos de pelos foram visualizados nos cortes histológicos aos 14, 21 e 28 dias e levaram à formação de infiltrado piogranulomatoso, por reação de hipersensibilidade do tipo IV. Para Hargis (1998), nessa reação não há participação de anticorpos ou complemento, restringindo-se apenas ao acúmulo perivascular de células mononucleares respondendo a um antígeno específico. Não foram encontradas diferenças qualitativas entre as amostras controle e tratadas nos quesitos inflamação e colagenização.

Supõe-se que a não existência de diferença entre as feridas tratadas e controle, na avaliação histopatológica, evidenciada nesse experimento, possa estar relacionada há dois fatores: a não realização de uma análise histomorfométrica, e aos tempos designados para coleta de material.

Vendramin et al. (2010) estudaram a ação do PRP gel, PRP líquido e controle com solução fisiológica, em feridas experimentais em coelhos associadas às enxertias. Na avaliação histopatológica qualitativa, na qual a intensidade da resposta inflamatória e colagenização foram mensuradas, não houve diferença estatisticamente significativa para a comparação entre os grupos em avaliações aos 14 dias. Porém, na análise histomorfométrica, onde foram contados o número de fibroblastos e macrófagos por campo, foi possível constatar

diferença significativa. Notou-se um maior número de fibroblastos no grupo PRP líquido, e maior quantidade de macrófagos nos grupos PRP gel e líquido, em comparação ao controle. Esses autores obtiveram a diferença média entre o número de células por campo de cinco a seis para fibroblastos, e de duas a quatro macrófagos. A partir desses dados, pode-se afirmar que, para o presente estudo, a realização de análise histomorfométrica também seria importante. Haja vista que significativas diferenças foram encontradas na avaliação de redução das áreas das feridas tratadas, há indícios de que a cicatrização mais rápida e eficiente se deva a ação do PRP, apesar de não terem sido encontrados indícios no exame histopatológico.

A escolha dos tempos de biopsia, para a avaliação da cicatrização foi feita com base nos estudos publicados por Bohling et al. (2004), Bohling et al. (2006). Contudo, os dados de achados histopatológicos desses estudos só foram publicados mais tarde (BOHLING, 2014). Apesar de terem sido encontradas diversas diferenças nas avaliações clínicas (quanto à presença de exsudato, edema e tecido de granulação) e na análise morfológica (quanto à taxa de contração, epitelização e tempo de cicatrização completa das feridas) quando comparada a cicatrização de cães e gatos, esses achados não foram evidenciados no exame histopatológico. Esses tempos também foram vistos em estudos que avaliaram o efeito do PRP em diferentes espécies. Mendonça (2009), ao avaliar a ação do PRP associada ou não ao laser de baixa potência, em feridas cicatrizadas por primeira intenção em ratos, coletou fragmentos de tecido para biopsia aos sete, 14 e 21 dias. Vendramin et al. (2010), no estudo já citado, obteve as amostras apenas aos 14 dias. Garcez (2012), avaliando a cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, com o uso de PRP líquido ou gel, associado ou não a células-tronco mesenquimais e Camargo (2013), ao comparar a ação do PRP em comparação ao plasma rico em fibrina (PRF) em ratos, colheram fragmentos de pele para avaliação histopatológica aos sete e 14 dias. Excluindo-se os resultados positivos obtidos por Vendramin et al. (2010), em todos os outros estudos, não foram encontradas diferenças nos processos cicatriciais com e sem a utilização do PRP. É descrito por Everst et al. (2006) que, devido ao emprego de diferentes espécies animais e metodologias para produção, ativação e uso do PRP, os dados obtidos em estudos experimentais podem ser conflitantes. Apesar disso, acredita-se que os eventos mais importantes para a cicatrização de feridas agudas, relacionados às fases inflamatória e proliferativa, talvez pudessem ser visualizados em tempos mais precoces, corroborando com os achados de Garcez (2012).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram uma tendência do PRP na melhora e precocidade da cicatrização em gatos. A indisponibilidade de estudos semelhantes na mesma

espécie tornou mais difícil a avaliação dos dados obtidos. Espera-se que, a partir desse estudo, surjam mais pesquisas e que o uso do PRP como adjuvante da cicatrização em gatos evolua, como naturalmente evoluiu em outras espécies.

## 6 CONCLUSÕES

Apesar da obtenção de adequadas concentrações de plaquetas em P2, e da não separação do sangue em P1, considera-se fundamental a realização de mais testes utilizando a mesma metodologia. A existência de variação individual não pode ser excluída em nenhuma das técnicas testadas, mesmo com o uso de cinco repetições, para cada um dos cinco animais.

O método de coleta mostra-se eficiente para o objetivo proposto e pode-se considerar relativamente fácil a execução das técnicas para obtenção do plasma rico em plaquetas em gatos, a partir dos protocolos P2 e P3.

Apesar de ambos os protocolos estarem aptos para a utilização, considera-se o protocolo P3 como superior, pela maior concentração de plaquetas obtida na primeira etapa do experimento. Essa capacidade de incremento gera um plasma rico em plaquetas de melhor qualidade, com sangue de gatos.

É possível a ativação do plasma rico em plaquetas líquido por meio da lesão tecidual, sem que seja injetado nas bordas da lesão em feridas de pele.

O aumento da exsudação, visualizada nos primeiros três dias de avaliação, sugere intensificação do processo inflamatório, nas feridas tratadas com plasma rico em plaquetas líquido, em gatos.

O uso terapêutico do plasma rico em plaquetas na forma líquida melhora a capacidade de contração e conseqüentemente leva à cicatrização mais precoce, em feridas produzidas experimentalmente em gatos, apesar da ausência de evidências histopatológicas pela avaliação adotada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. G. et al. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.105, n.1, p.5-12, 2008.

ARNOCZKY, S.; DELOS, D.; RODEO S. What is platelet-rich plasma? **Operative Techniques in Sports Medicine**, v.19, n.3, p. 142-148, 2011.

BALBINO, C.; PEREIRA, L.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARBOSA, A.L.T. et al. Plasma rico em plaquetas para a reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1335-1340, 2008.

BARBOSA, A.L.T. **Células-tronco mononucleares associadas ao plasma rico em plaquetas na cicatrização da falha óssea no cão**. 198f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – UFSM). Santa Maria, 2013. Disponível em: <[http://w3.ufsm.br/ppgmvm/images/teses% 202013% 202/Anna%20Laeticia%20Barbosa.pdf](http://w3.ufsm.br/ppgmvm/images/teses%202013%202/Anna%20Laeticia%20Barbosa.pdf)>. Acesso em: 08/10/2013.

BOHLING, M. W. et al. Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. **Veterinary Surgery**, v.33, n.6, p.579-587, 2004.

BOHLING, M. W. et al. Comparison of the role of the subcutaneous tissue in cutaneous wound healing in the dog and cat. **Veterinary Surgery**, v.35, n.1, p.3-14, 2006.

BOHLING, M. W; HENDERSON, R. A. Differences in cutaneous wound healing between dogs and cats. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.36, n.4, p.687-692, 2006.

BOHLING, M. W. Wound healing. **Feline soft tissue and general surgery**. Saunders, 2014. Cap. 17, (E-book).

CAMARGO, F. F. **Efeito do plasma rico em plaquetas e da fibrina rica em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas em ratos**. 184f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde – PUC/RS) Porto Alegre, 2013. Disponível em:<<http://repositorio.pucrs.br/dspace/bitstream/10923/5547/1/000452038-Texto%2BCompleto-0.pdf>>. Acesso em: 08/02/2014.

CONCEIÇÃO, L. G.; SANTOS, R. L. Sistema tegumentar. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. Cap 7, p. 423-442.

CROVETTI, G. et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfusion and Apheresis Science**, v.30, n.2, p.145-151, 2004.

COURT, M. H.; BELLENGER, C. R. Comparison of adhesive polyurethane membrane and polypropylene sutures for closure of skin incisions in cats. **Veterinary Surgery**, v.18, n.3, p.211-215, 1989.

CUTTING, K. Wound exudate: composition and functions. **British Journal of Community Nursing**, v.8, n.9 (supplement), p.4-9, 2003.

DURGRILLON, A. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**.v.31, n.6, p.615-619, 2002.

EVERTS, P.A. et al. Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel: A Review. **The Journal of Extra-corporeal Technology**, v.38, n.2, p. 174-178, 2006.

FREYMILLER, E. G.; AGHALOO, T. L. Platelet-rich plasma: ready or not? **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.4, p.484-488, 2004.

GARCEZ, T. N. A. **Células–tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvante da cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos Nova Zelândia**.114f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinárias – UFRGS) Porto Alegre, 2012. Disponível em:< <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/60993/000863977.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 08/10/2013.

GENTRY, P. A. Platelets biology. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. L. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p.459-466. 2000.

GREGORY, C.R. Wound healing and influencing factors. In: FOWLER, D.; WILLIAMS, J.M. **BASVA Manual of canine and feline wound management and reconstruction**. 1 ed. Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association, 1999. Cap 3, p. 13-23.

HANATA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e a cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Dermatologia**, v. 88, n.2, p.55-58, 2007.

HARGIS, A. M. Sistema tegumentar. In: CARLTON, W. W.; MC GAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thompson**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. Cap.11, p.486-523.  
HARTWIG, J. The birth of the platelet. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v.1, p.1580-1586, 2003.

HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Cap. 15, p.159-161.

HENDERSON, J. L. et al. The effects of autologous platelet gel on wound healing. **Ear, Nose e Throat Journal**, v.82, n.8, p598-602, 2003.

HERMETO, L. C. et al. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.27, n.11, p.789-794, 2012.

HOM, D. B. et al. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v.9, n.3, p.174-183, 2007.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v.36, n.4, p.667-685, 2006.

HOSGOOD, G. Reparo de feridas e resposta tecidual específica à lesão. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3.ed.São Paulo: Manole, 2007. Cap. 4, p.66-86.

JAIN, C.N. The platelets. In: \_\_\_\_\_. **Essentials of veterinary hematology**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap.13, p.152.

KIM, J.H.; PARK, C.; PARK, H. M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. **Veterinary Dermatology**, v.20, n.2, p.123-126, 2009.

KLEIN, C. P. et al. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.4, p.509-513, 2011.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentrations. **Surgery**, v.90, n.2, p. 262-270, 1981.

KNOLL, J. S. Clinical automated hematology system. In: Feldman B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2000. Cap.1, p.3-11.

KNOTTENBELT, C.; O'BRIEN, M.; JACKSON, M.W. Blood transfusion in cats. In: LANGLEY-HOBBS, S.J.; DEMETRIOU, J.L.; LADLOW, J.F. **Feline soft tissue and general surgery**. 1ed. Saunders, 2014. Cap 5. (E-book).

KNUTSON et al. Na overview of the topical management of wound. **Australian Veterinary Journal**, v.74, n.11, p.1329-1335, 1981.

LACOSTE, E.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. **Journal of Periodontology**, v.74, n.10, p.1498-507, 2003.

LASCELLES, B. D. X. Use of omental pedicle grafts in the management of nonhealing axillary wounds in 10 cats. **Journal of Small Animal Practice**, v.39, p.475-480, 1998.

LAUREANO, A.; RODRIGUES A. M. Cicatrização de ferida. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v.69, n.3, p.355-365, 2011.

LEVEN, E. R. Megakaryocytes. In: Feldman B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2000. p.443-447.

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

LIEBERMAN, J.R. et al. The role of growth factors in the repair bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.84, n.6, p.1032-1042, 2002.

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

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, n.85, p.638-646, 1998.



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.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, n.62, p.489-496, 2004.

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, n.1 p.229-237, 2001.

MENDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MENDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.4, n.78, p.393-410, 2003.

MENDONÇA, J. P. **Estudo histológico da ação do plasma rico em plaquetas, associado ou não ao laser de baixa potência, na cicatrização por primeira intenção, em ratos Wistar**. 82f. Dissertação (Mestrado em Saúde e desenvolvimento na Região Centro-Oeste – UFMS). Campo Grande, 2009. Disponível em: < <http://repositorio.cbc.ufms.br:8080/jspui/bitstream/123456789/355/1/Juliana%20Pedroso%20de%20Mendon%20c3%a7a.pdf>>. Acesso em: 08/10/2013

MENDONÇA, R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos Celulares da Cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v., n.3, p.257-262, 2009.

MOLANO, R. **Caracterizações celular e ultra-estrutural do concentrado de plaquetas em cães e gatos e avaliação do seu efeito na ortartrose em cães**. 88f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – UFMG). Belo Horizonte, 2012. Disponível em:< <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-8YAN2D> >. Acesso em: 08.10.2013.

NAGAE, M. et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. **Tissue Engineering**, v.13, n.1, p.147-158, 2007.

PARDO et al. Principais usos do plasma rico em plaquetas na medicina veterinária **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.18, 2012. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria18/revisao/RV12.pdf>.

PAVLETIC, M. M. Basic principles of wound healing. In: **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery**. 3ed. Ames: Wiley-Bleckwell, 2010. Cap.2, p.18-29.

PAZZINI, J. M. Plasma rico em plaquetas empregado na cirurgia reconstrutiva em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*): avaliação da exequibilidade da técnica, achados macroscópicos e histopatológicos. 104f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP). Jaboticabal, 2014. Disponível em: < <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/110437/000790824.pdf?sequence=1>>. Acesso em :03/01/2015.

PEREIRA, R.C.F **Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP)**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária– UFSM) Santa Maria, 2012. Disponível em: < <http://w3.ufsm.br/ppgmv/images/dissertacoes2012/Dissertao%20Roberta%20III.pdf>>. Acesso em 08/10/2013.

POPPE, E. R. Cicatrização de pele. In BOJRAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia de pequenos animais**. 1ed. São Paulo: Manole, 1996. Cap. 24, p.178-183.

RANLY, D. M. et al. Platelet-derived growth factor inhibits mineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immune-compromised mice. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v.87, n.9, p.2052-2064, 2005.

REBAR, A. H. et al. **Guia de hematologia para cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003, p. 133-156.

ROBSON, M. C. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v.5, n.1, p. 12-7, 1997.

ROMANELLI, M.; VOWDEN, K.; WEIR D. Exudate management made easy. **Wounds International**, v.2, n.1, p.1-6, 2010.

SCOTT, D .W. et al. Structure and function of the skin. In: \_\_\_\_\_ **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 2000. Cap.1, p.1-70.

SCOTT, D. W. Feline dermatology 1900- 1978: A monograph. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.16, p.331-339, 1980.

SIMAS, S. M. **Tratamento de feridas cutâneas em cães e gatos**. 112f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária – UFRGS). Porto Alegre, 2010. Disponível em:< <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/39023/000793034.pdf?sequence=1>. Acesso em: 08/10/2013.

SILVA, S. B. et al. 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.

TAYLOR, G. I.; MINABE, T. The angiosomes of the mammals and other vertebrates. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.89, n.2, p.181–215, 1992.

VANAT, N. et al. Modificação de técnica de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. **Semina-Ciências Agrárias**, v.33, n.1, p.313-321, 2012.

VENDRAMIN, F. S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.

VENDRAMIN, F. S. et. al. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.24, n.2, p. 212-218, 2009.

VENDRAMIN, F. S. et. al. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.25, n.1, p. 4-10, 2010.

VENDRAMIN, F. S. et al. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.25, n.4, p.589-594, 2010a.

ZAGO, M. A. et al. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2001, 1081p.

WASTERLAIN, A.; BRAUN, H. J.; DRAGOO, J. L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. **Operative Techniques in Orthopedics**, v.22, n.1, p.33–42, 2012.

WALDRON, D. R.; ZIMMERMANN-POPE, N. Ferimentos cutâneos superficiais. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2007. v. 1, cap.21, p. 259-273.

WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. In: COWELL, L. R. et al. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3. ed. São Paulo: Med Vet Ltda, 2009. Cap.26, p. 297.

WELLES, E. G. et al. Detection of Activated Feline Platelets in Platelet-rich plasma by use of fluorescein-labeled antibodies and flow cytometry. **Veterinary Pathology**, v.31, p.553-560, 1994.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v.77, p.509–523, 1997.

## **ANEXOS**

**Anexo A – Aprovação para experimentação pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** Plasma rico em plaquetas na cicatrização cutânea de gatos  
**Número do Parecer:** 011/2013

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Alceu Gaspar Raiser

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**2. Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.**

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:** 05/09/2013

Santa Maria, 05 de setembro de 2013

Atenciosamente,

Prof. Dr. Alexandre Krause  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA - UFSM

**Anexo B – Termo de consentimento livre esclarecido para participação em pesquisa****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO DE  
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_  
permito a participação do meu animal no projeto de pesquisa intitulado “PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE GATOS”, o qual foi aprovado pela  
Comissão de Ética no Uso dos Animais da UFSM, com registro nº 011/2013. Confirmo que  
fui informado a respeito do projeto acima citado e que estou consciente e perfeitamente  
esclarecido quanto aos riscos que o procedimento pode trazer ao felino abaixo identificado, de  
minha responsabilidade. Ao término do estudo, o animal retornará ao seu tutor.

Nome do animal: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Santa Maria, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /201\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Anexo C – Dados estatísticos

### Avaliação clínica

Crostatas – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
3	Tratadas	108	0,00	0,00	0,00	0,801
	Controle	120	0,00	0,00	0,00	
6	Tratadas	108	0,00	0,00	0,00	0,538
	Controle	120	0,00	0,00	1,00	
9	Tratadas	81	0,00	0,00	0,00	0,093
	Controle	93	0,00	0,00	1,00	
12	Tratadas	81	0,00	0,00	1,00	0,560
	Controle	81	1,00	0,00	1,00	
15	Tratadas	54	0,00	0,00	2,00	0,510
	Controle	60	0,00	0,00	1,00	
18	Tratadas	54	0,00	0,00	1,00	0,398
	Controle	60	0,00	0,00	2,00	
21	Tratadas	54	0,00	0,00	0,00	0,558
	Controle	60	0,00	0,00	0,75	
24	Tratadas	27	0,00	0,00	0,00	0,072
	Controle	30	0,00	0,00	1,00	
27	Tratadas	27	0,00	0,00	0,00	0,016
	Controle	30	0,00	0,00	0,00	



Dor – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b><i>p</i></b>
3	Tratadas	120	0,00	0,00	1,00	1,000
	Controle	120	0,00	0,00	1,00	
6	Tratadas	120	0,00	0,00	1,00	0,772
	Controle	120	0,00	0,00	1,00	
9	Tratadas	90	0,00	0,00	0,00	1,000
	Controle	90	0,00	0,00	0,00	

Edema – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b><i>p</i></b>
3	Tratadas	120	0,00	0,00	0,00	0,989
	Controle	120	0,00	0,00	0,00	
6	Tratadas	120	0,00	0,00	0,00	0,458
	Controle	120	0,00	0,00	0,00	
9	Tratadas	90	0,00	0,00	0,00	0,158
	Controle	90	0,00	0,00	0,00	
12	Tratadas	90	0,00	0,00	0,00	0,624
	Controle	90	1,00	0,00	0,00	

Hiperemia – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
3	Tratadas	120	0,00	0,00	0,00	0,166
	Controle	120	0,00	0,00	0,00	
6	Tratadas	120	0,00	0,00	0,00	0,549
	Controle	120	0,00	0,00	0,00	
9	Tratadas	90	0,00	0,00	0,00	0,884
	Controle	90	0,00	0,00	0,00	
12	Tratadas	90	0,00	0,00	0,00	0,175
	Controle	90	0,00	0,00	0,00	

Tecido de Granulação – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
3	Tratadas	120	0,00	0,00	0,00	0,834
	Controle	120	0,00	0,00	0,00	
6	Tratadas	120	1,00	0,00	1,00	0,315
	Controle	120	1,00	0,00	1,00	
9	Tratadas	90	2,00	1,00	3,00	0,768
	Controle	90	2,00	1,00	3,00	
12	Tratadas	90	2,00	0,00	3,00	0,346
	Controle	90	3,00	1,00	3,25	
15	Tratadas	60	1,00	0,00	3,00	0,512
	Controle	60	1,00	0,00	3,00	
18	Tratadas	60	0,00	0,00	0,75	0,796
	Controle	60	0,00	0,00	0,00	
21	Tratadas	60	0,00	0,00	0,00	0,417
	Controle	60	0,00	0,00	0,00	

Exsudato – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
3	Tratadas	120	1,00	1,00	2,00	0,025
	Controle	120	1,00	1,00	1,75	
6	Tratadas	120	1,00	0,00	1,00	0,569
	Controle	120	1,00	0,00	1,00	
9	Tratadas	90	0,00	0,00	0,00	0,389
	Controle	90	0,00	0,00	0,00	
12	Tratadas	90	0,00	0,00	0,00	0,044
	Controle	90	0,00	0,00	0,00	
15	Tratadas	60	0,00	0,00	0,00	0,082
	Controle	60	0,00	0,00	0,00	

**Análise histopatológica**Crostras – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
7	Tratadas	10	3,00	3,00	3,00	0,368
	Controle	10	3,00	3,00	3,00	
14	Tratadas	10	0,00	0,00	0,25	0,654
	Controle	10	0,00	0,00	1,00	
21	Tratadas	10	0,00	0,00	0,00	1,000
	Controle	10	0,00	0,00	0,00	
28	Tratadas	10	0,00	0,00	0,00	0,583
	Controle	10	0,00	0,00	0,25	

Úlceras – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
7	Tratadas	10	1,00	1,00	1,00	0,368
	Controle	10	1,00	1,00	1,00	
14	Tratadas	10	0,00	0,00	1,00	0,651
	Controle	10	0,00	0,00	0,25	
21	Tratadas	10	0,00	0,00	0,00	1,000
	Controle	10	0,00	0,00	0,00	
28	Tratadas	10	0,00	0,00	0,00	1,000
	Controle	10	0,00	0,00	0,00	

Acantose – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
7	Tratadas	10	0,00	0,00	0,00	1,000
	Controle	10	0,00	0,00	0,00	
14	Tratadas	10	1,50	1,00	2,00	0,257
	Controle	10	1,00	0,00	2,00	
21	Tratadas	10	1,00	0,75	2,00	1,000
	Controle	10	1,00	0,75	2,00	
28	Tratadas	10	0,50	0,00	1,00	0,576
	Controle	10	0,00	0,00	1,00	

Fibroplasia – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
7	Tratadas	10	3,00	2,00	3,00	0,623
	Controle	10	3,00	1,75	3,00	
14	Tratadas	10	3,00	2,00	3,00	0,470
	Controle	10	2,50	1,75	3,00	
21	Tratadas	10	2,00	1,00	2,25	0,808
	Controle	10	2,00	1,00	3,00	
28	Tratadas	10	1,00	1,00	2,00	0,460
	Controle	10	1,50	1,00	2,00	

Colagenização – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b>p</b>
7	Tratadas	10	0,00	0,00	0,00	0,368
	Controle	10	0,00	0,00	0,00	
14	Tratadas	10	1,00	1,00	1,00	0,727
	Controle	10	1,00	0,75	1,25	
21	Tratadas	10	2,00	2,00	2,00	1,000
	Controle	10	2,00	2,00	2,00	
28	Tratadas	10	3,00	2,00	3,00	0,357
	Controle	10	3,00	3,00	3,00	

Neovascularização – teste de Mann-Whitney em *ranks*

<b>Dia</b>	<b>Feridas</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	<b><i>p</i></b>
7	Tratadas	10	2,50	1,00	3,00	0,900
	Controle	10	3,00	1,00	3,00	
14	Tratadas	10	1,00	0,75	2,00	0,403
	Controle	10	1,00	0,00	1,00	
21	Tratadas	10	1,00	0,00	1,00	0,083
	Controle	10	0,00	0,00	0,25	
28	Tratadas	10	0,00	0,00	0,00	1,000
	Controle	10	0,00	0,00	0,00	