

PLASMA RICO EM PLAQUETAS COMO CURATIVO EM QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL EM COELHOS*

Sheila Nogueira Ribeiro¹⁺, Fabiane Azeredo Atallah¹, Marilda Onghero Taffarel², Ana Elisa Pato Salgado², Edson Vilela de Melo Filho², Marcelo Emílio Beletti³, Patrícia Maria Coletto Freitas⁴ e André Lacerda de Abreu Oliveira⁵

ABSTRACT. Ribeiro S.R., Atallah F.A., Taffarel M.O., Salgado A.E.P., Melo Filho E.V., Beletti M.E., Freitas P.M.C. & Oliveira A.L.A. [**Plated-rich plasma as bandaging in total thick burn in rabbits**]. Plasma rico em plaquetas como curativo em queimaduras de espessura total em coelhos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl. 1):79-83, 2013. Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 567, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270901, Brasil. E-mail: sheilanribeiro@hotmail.com

The platelet-rich plasma (PRP) is used to release growth factors in high concentrations to achieve a repair in tissue damage. The objective was to evaluate macroscopically and histologically using PRP associated with wet bandages on wounds caused by burns, produced experimentally in rabbits. Two total thick burns of 2.5cm in diameter were produced in the dorsal region, in 16 young rabbits. The left antimer served as control (CG), receiving distilled water, and the right antimer (TG) PRP. The injuries were analyzed at three, seven, 14 and 21 days postoperatively (PO). No significant differences were found macroscopically and histologically for three, seven and 21 days postoperatively, when compared GC and GT. Only at 14 days PO, it was observed increased presence of collagen fibers in the GT. There was no significant difference at the level of 5%, in the contraction of wounds when compared between CG and TG on the same period of time. Concluding that the PRP associated with wet bandage on total thick burns produced experimentally in rabbits, did not help in the healing process.

KEY WORDS. Burn, bandage, treatment, animals.

RESUMO. O plasma rico em plaquetas (PRP) é utilizado para liberar fatores de crescimento em altas concentrações no local onde se pretende reparar uma lesão tecidual. Objetivou-se avaliar macroscopicamente e histologicamente o uso do PRP associado à bandagem úmida em feridas causadas por queimaduras, produzidas experimentalmente em

coelhos. Duas queimaduras cutâneas de espessura total, de 2,5cm de diâmetro, foram produzidas na região dorsal, em 16 coelhos jovens. A ferida do antímero esquerdo serviu como grupo controle (GC), recebendo apenas água destilada e a do antímero direito (GT) foi embebida com PRP. Analisaram-se as feridas aos três, sete, 14 e 21 dias de pós-operatório

* Recebido em 13 de Abril de 2013.

Aceito para publicação em 2 de outubro de 2013.

¹Médica-veterinária. MSc. Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, CCTA, Sala 207-A, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, 28013-602, Brasil. +Autora para correspondência. E-mail:sheilanribeiro@hotmail.com, E-mail:fabiane-vet@hotmail.com

²Médico-veterinário. MSc. Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/nº, Cx. Postal 16, Guararema, Alegre, ES 29500-000, Brasil. E-mail: mtafarel@yahoo.com.br, anaelisapato@hotmail.com, evmfilho@gmail.com

³Médico-veterinário. DSc. Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Histologia, Rua Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. E-mail: mebeletti@ufu.br

⁴Médica-veterinária. DSc. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Caixa Postal 567, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: pcoletto@yahoo.com.br

⁵Médico-veterinário. DSc. UENF, CCTA, Sala 207-A, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-602. E-mail: andrevet@uenf.br

(PO). Não se encontraram diferenças macroscópicas e histológicas significativas aos três, sete e 21 dias de PO, quando comparados GC e GT. Apenas aos 14 dias de PO, pôde-se observar maior presença de fibras colágenas no GT. Não houve diferença significativa, ao nível de 5%, na contração das feridas quando comparadas dentro do mesmo período de tempo e entre GC e GT. Concluindo que o plasma rico em plaquetas associado à bandagem úmida em feridas por queimaduras de espessura total, produzidas experimentalmente em coelhos, não auxiliou no processo cicatricial.

PALAVRAS-CHAVE. Queimadura, bandagem, tratamento, animais.

INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo e representa aproximadamente 15% do peso corporal. Exibe espessura irregular que varia de uma região para outra, com certo grau de impermeabilidade. Das múltiplas funções da pele, pode-se citar a termorregulação, controle hemodinâmico, excreção de metabólitos, defesas física, química e imunológica, além de possuir a capacidade de reparação e renovação (Avelar et al. 2003).

Ao se estabelecer uma solução de continuidade na pele do animal, como em queimaduras, abre-se uma porta para agentes nocivos, que retardam o período cicatrização e podem acometer o organismo do animal. Estima-se que cerca de um milhão de pessoas por ano sofra algum grau de queimadura no Brasil, sendo que destes, cerca de dois mil morrem decorrente de complicações das lesões (Lopes et al. 2004).

A prioridade no tratamento de queimaduras é minimizar a perda tecidual e evitar o choque. Para isso, a área deve ser lavada com água fria e aplicada compressas frias no ferimento. Monitorar os sinais vitais, estado mental do paciente, hematócrito, proteínas totais, produção urinária, pressão venosa central, eletrólitos, gases sanguíneos e o peso corporal diário são essenciais para se tratar o choque. Também se devem administrar analgésicos para aliviar a dor. Além disso, o tratamento das feridas é importante, pois complicações como infecção e septicemia podem aumentar a morbidade do paciente (Fossum 2005).

O plasma rico em plaquetas (PRP) apresenta entre 1.000.000 e 1.500.000 plaquetas por microlitro, sendo utilizado para liberar fatores de crescimento em altas concentrações no local onde se pretende

reparar uma lesão tecidual, levando assim à aceleração do processo cicatricial (Almeida et al. 2008). Os fatores de crescimento estimulam principalmente a reepitelização, mitose celular, síntese de colágeno, quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, e a produção de linfócitos com liberação de interleucina. O PRP ainda estimula o desenvolvimento da neovascularização, reduzindo assim complicações como hematomas e seromas (Wilson et al. 2006).

Objetivou-se com este estudo avaliar macroscopicamente e microscopicamente o efeito do PRP associado à bandagem úmida em queimaduras produzidas experimentalmente em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. O trabalho seguiu as normas segundo o Comitê de Ética experimental para a utilização de animais da UFES e foi submetido à avaliação pelo mesmo, constando no processo de número: 23068.065891/2008-26.

Foram utilizados 16 coelhos, machos e fêmeas, adultos, mestiços, com peso variando entre 2 a 3 Kg. Realizou-se avaliações clínicas como termometria, aferição de frequências respiratória e cardíaca, e somente os considerados hígidos participaram do experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas, com ração comercial e água à disposição.

Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de igual número, os quais foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente aos três (GI), sete (GII), 14 (GIII) e 21 dias (GIV) após as queimaduras.

Para a preparação do PRP os animais foram contidos manualmente, quando então se colheu uma amostra de 4,5 mL de sangue por meio de uma punção da veia jugular externa, com auxílio de agulha (25 x 0,7 mm) e seringa descartável de 5 mL.

Transferia-se a amostra para um tubo de ensaio apropriado e a centrifugava por 15 minutos a 1800 rotações por minuto (rpm). Ao final da centrifugação, do fundo para o topo do tubo, formaram-se quatro camadas plasmáticas. A primeira camada plasmática (cerca de 100 microlitros (μ l)), incluindo uma camada ainda contendo hemácias, foi denominada plasma muito rico em plaquetas (PMRP); a segunda, indivisível da primeira (cerca de 500 μ l), o plasma rico em plaquetas (PRP), enquanto a terceira, igualmente indivisível da segunda (cerca de 500 μ l), o plasma de conteúdo médio em plaquetas (PMP). Uma quarta camada foi denominada de conteúdo pobre em plaquetas (PPP). A primeira e a segunda camadas foram aspiradas juntas, com auxílio de uma pipeta, constituindo, então, o PRP, o qual foi depositado num segundo tubo e adicionado de 10 μ l de uma solução de cloreto de cálcio a 10 por cento (%), que é um acelerador da formação do gel de PRP, necessário para melhor adesão ao local da ferida (Wilson et al. 2006).

Para a realização das queimaduras, posicionou-se os animais em decúbito esternal, sobre uma mesa, realizando-se posteriormente uma ampla tricotomia na região dorsal do tór-

rax. Administrou-se xilazina na dose de 5,0 miligramas por quilo (mg/kg) e cloridrato de cetamina na dose de 30mg/Kg, ambos por via intramuscular. A manutenção anestésica foi realizada pelo halotano, em circuito sem reinalação de gases, por meio de uma máscara naso-oral vedada, em fluxo diluente de oxigênio de 200 mililitro por quilo por minuto (mL/kg/min). Foi administrado 15 minutos anterior ao início do procedimento cirúrgico o antibiótico enrofloxacin (10mg/Kg) e o analgésico tramadol (2,0mg/Kg), ambos por via intramuscular. O tramadol foi também utilizado nos dias decorrentes após a queimadura, sendo administrado de 12 em 12 horas, durante três dias. Ato contínuo, realizou-se anti-sepsia com polivinil-pirrolidona iodo, e com o auxílio de um molde circular de filme radiográfico, com diâmetro de 2,5 centímetros (cm), delimitou-se duas áreas na região dorsal do tórax, equidistantes 4 cm lateralmente. Posteriormente, removeram-se dois segmentos circulares de pele, expondo-se as fâscias musculares. Em seguida, as feridas cirúrgicas foram cauterizadas com o auxílio de um bisturi elétrico (Figura 1).



Figura 1. Aspecto macroscópico das feridas. Ferida esquerda após remoção de segmento circular de pele, expondo-se a fâscia muscular. Ferida direita já cauterizada com bisturi elétrico.

O local escolhido para as feridas foi o dorso, de acordo com as observações de Kashyap et al. (1995), que consideraram o local como o melhor sítio para a incisão, pois evita irritação por contato e autocanibalismo.

As lesões do antímero esquerdo receberam água destilada, compondo o grupo controle (GC) e as do antímero direito foram embebidas com PRP, formando o grupo tratado (GT). Posteriormente, realizou-se em ambas as feridas uma bandagem úmida-úmida com atadura de Rayon, algodão hidrofílico embebido em água destilada (30mL), atadura crepom e esparadrapo. Durante os três primeiros dias, os animais foram mantidos com a bandagem, e após o quarto dia do procedimento da queimadura foi realizado curativo diário, com o mesmo tipo de bandagem, porém ambas feridas passaram a receber apenas água destilada.

As feridas foram avaliadas macroscopicamente nos períodos preestabelecidos (três, sete, 14 e 21 dias) com relação à dimensão da ferida (mensuradas com o auxílio de um paquímetro, para obtenção de sua área, utilizando-se a equação $A =$

$\pi \times R \times r$, onde A representa a área, “R” corresponde ao raio maior da ferida e “r” o menor); presença de secreções; regularidade das bordas; presença de crostas e coloração. Para análise estatística foi utilizado o teste de t de Student e de Tukey, fixando 5% como nível de rejeição de hipótese de nulidade.

Decorridos os períodos preestabelecidos e utilizando-se o mesmo protocolo anestésico previamente citado, realizou-se biópsia das lesões. No pós-operatório os animais receberam o anti-inflamatório flunixinina meglumina (1,1 mg/kg) por via subcutânea, durante três dias, e o curativo com sulfadiazina de prata por 10 dias.

Os fragmentos coletados foram fixados em formol a 10% e submetidos à inclusão em parafina. Obtiveram-se cortes histológicos que foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE), para observação em microscópio de luz, nos quais se verificou a reparação tecidual das feridas, considerando a presença de fibras colágenas, presença de células mononucleares, polimorfonucleares, neovascularização e reepitelização da ferida. Os achados histológicos foram agrupados qualitativamente utilizando-se escalas de 0 a 3 símbolos “+”, sendo 0, ausência de alterações; “+”, alterações leves; “++”, alterações moderadas e “+++”, alterações intensas. Para avaliação estatística utilizou-se o teste de Wilcoxon a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos três dias após queimadura (Grupo I), observou-se que as feridas tratadas com PRP (GT) e água destilada (GC) apresentaram hiperemia, secreção serosa, presença de fibrina e contorno irregular das bordas. Não foi observada presença de PRP sobre a ferida, indicando absorção deste pela mesma. Coincidindo com os achados de Ribeiro et al. (2009), os quais verificaram características clínicas semelhantes para lesões cutâneas em equinos tratadas com ketanserina nos primeiros dias. Isto ocorreu devido à fase do processo de cicatrização (fase inflamatória), na qual se observa rubor e tumor, liberação de mediadores celulares que estimulam a produção de substâncias como histamina, bradicinina e prostaglandinas. Na avaliação histológica (Tabela 1), não foram encontradas diferenças nos parâmetros avaliados das feridas cutâneas GT e GC, estavam caracteristicamente no estágio inicial da cicatrização, onde no tecido queimado, inclui o início da reepitelização, pois segundo Ghahary (1993) ocorre uma produção excessiva de matriz extracelular pelos fibroblastos presentes nas feridas, provavelmente sob a ação de altos níveis de citocinas fibrogênicas.

Aos sete dias (Grupo II), as feridas GT e GC apresentavam uma camada espessa e aderida de fibrina com presença de crostas nas bordas. Observou-se também presença de secreção com coloração amarelada no GC e avermelhada no GT. Esses achados são decorrentes da fase final do processo

Tabela 1. Aspectos microscópicos das feridas tratadas com Plasma Rico em Proteínas (GT) e Água destilada (GC) aos três, sete, 14 e 21 dias após queimadura de pele de espessura total em coelhos.

Aspectos Microscópicos	GT				GC			
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Reepitelização	+	+	++	+++	+	+	++	+++
Células mononucleadas	-	-	+	+	-	-	+	+
Células Polimorfonucleares	++	++	+	-	++	++	+	-
Fibras colágenas	+	+	++	+++	++	++	+	+++
Neovascularização	-	+	+	+	-	+	+	+
Hiperplasia Fibrocítica	-	+	++	+	-	+	++	+

inflamatório da ferida, pois segundo Dealey (2001), nessa fase se observa esfacelo típico de cor amarela e aumento da circulação local, sendo, portanto algo comum ao processo de cicatrização. Além disso, verificou-se na microscopia presença moderada de polimorfonucleares e hiperplasia fibrocítica. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença entre os tratamentos (Tabela 1). Isso explica essa fase da cicatrização, pois de acordo com Nitz (2005), o exsudato inflamatório, o sangue e o tecido necrótico sofrem ação de enzimas secretadas por polimorfonucleares (neutrófilos), promovendo a liquefação e posterior remoção através de vasos, justificando a presença destas células neste estágio cicatricial.

Aos 14 dias, nas feridas GT e GC observaram-se discreta secreção serosa, presença de crosta e aspecto pardo-avermelhado. As feridas GT encontravam-se mais proeminentes, este aspecto é condizente com a fase proliferativa da cicatrização, onde segundo Mandelbaum et al. (2003) fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio. Assim, possivelmente a causa da maior proeminência nas feridas GT deveu-se a presença desses fatores no PRP, comprovada pela avaliação histológica, com a observação de maior presença de fibras colágenas nas feridas tratadas. Ainda, segundo Almeida et al. (2008), o PRP estimula a reepitelização, mitose celular e síntese de colágeno em feridas.

Aos 21 dias (grupo IV), nas feridas GT e GC observaram-se crostas recobridas as feridas, que poderia ser considerado um fator negativo, porém, segundo Eurides et al. (1996), este fato favorece o processo de cicatrização, pois auxilia a proteger o ferimento de contaminações externas. Observando-se microscopicamente (Tabela 1) que ambas as feridas já se encontravam reepitelizadas, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos.

A área das feridas teve considerável redução, quando se comparou os tempos de avaliação (Tabela 2), isto era esperado, por ser uma reação natural

Tabela 2. Área relativa (%) das feridas tratadas com Plasma Rico em Plaquetas (GT) e Água Destilada (GC), ao zero (dia da queimadura), três, sete, 14 e 21 dias após queimadura de pele de espessura total em coelhos.

Grupos	Área Relativa (%)	
	GC	GT
0	100,0Aa	100,0Aa
I (3 dias)	87,6Aab	91,8Ab
II (7 dias)	94,7Aab	81,2Ab
III (14 dias)	62,0Abc	62,1Ab
IV (21 dias)	41,2Ac	47,8Ab

* Valores seguidos por pelo menos uma mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelos testes t e de Tukey, respectivamente.

do processo cicatricial, no qual, segundo Lawrence (1986), nas cicatrizações por segunda intenção, ocorre redução de 62% da área de superfície da ferida cutânea na fase de contração da ferida, o que foi observado neste estudo aos 14 dias após queimadura.

CONCLUSÃO

O plasma rico em plaquetas demonstrou potencial para acelerar a deposição de fibras colágenas nas feridas, porém quando aplicado em feridas causadas por queimaduras de espessura total produzidas experimentalmente em coelhos, não auxiliou no processo cicatricial, talvez pela proximidade das feridas do grupo tratado e controle, associada à característica da pele dos coelhos, sendo esta menos aderida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida A.R.H. de, Menezes J.A.D.E., Araújo G.K.M. de & Mafra A.V.C. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. *Rev. Bras. Cir. Plast.*, 23:82-88, 2008.
- Avelar K.E., Otsuki K., Vicente A.C., Vieira J.M., De Paula G.R., Domingues R.M. & Ferreira M.C. Presença do gene *cfxA* em distonias Bacteroides. *Res. Microb.*, 154:369-74, 2003.
- Dealey C. *Cuidando de Feridas: um guia para enfermeiras*. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 2001, 61p.

- Eurides D., Mazzanti A., Belleti M.E., Silva L.A.F. da, Fioravante M.C.S., Neto N.S.T., Campos V.A. de, Lemos R.C. & Junior P.L.S. Morfologia e Morfometria da Reparação Tecidual de Feridas Cutâneas de Camundongos Tratadas com Solução Aquosa de Barbatimão (*Stryphnodendron Barbatiman Martius*). *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agr.*, 3:30-40, 1996.
- Fossum T.W. *Cirurgia de pequenos animais*. 2ª ed. Roca, São Paulo, 1390p.
- Ghahary A., Shen Y.J., Scott P.G., Gong Y. & Tredget E.E. Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor β , type I and type III collagen in post-burn hypertrophic scar tissue. *J. Lab. Clin. Med.*, 122:465-73, 1993.
- Kashyap A., Beezhold D., Wiseman J. & Beck W.C. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on wound healing. *Am. Surg.*, 61:486-491, 1995.
- Kleiman I., Simões M.J. & Goldenberg S. Aspectos atuais do processo de reparação tecidual. *Acta Cir. Bras.*, 10:2-8, 1995.
- Lawrence C.M., Comaish H.S. & Dahl M.G.C. Excision of skin tumors without wound closure. *Brit. J. Derm.*, 115:563, 1986.
- Lopes L.G.F., Mendes J.E.C.S., Sanches J.A., Vidal M.A., Bussolaro R.A. & Rocha A.B. Epidemiologia do grande queimado de 2001 a 2003 atendidos na U.T.Q. da Faculdade de Medicina de Catanduva-SP. *Klinikos*, 19:83-88, 2004.
- Mandelbaum S.H., Santis E.P. di & Mandelbaum M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Bras. Dermatol.*, 78:393-410, 2003.
- Nitz A.C. *Estudo Morfométrico na Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos, Utilizando *Coronopus didymus* e *Calendula Officinalis**. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. 63p. (Disponível em: <www.docstoc.com/docs/48538120/ANTONIO-CARLOS-NITZ>)
- Ribeiro G., Martins C.B., Silva M.A.G., Borges V.P. & Lacerda N.J.C. Uso tópico de ketanserina na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em eqüinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:144-148, 2009.
- Wilson E.M.K., Barbieri C.H. & Mazzer N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas: estudo experimental em coelhos. *Acta Ortop. Bras.*, 14:208-212, 2006.