

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

EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA GEL ON GRAFT SKIN HEALING IN EQUINES

Aline Fabrine Bonfá¹
Roberto Harutomi Corrêa Nomura^{2*}
Antonia Maria Binder do Prado¹
Andressa Batista da Silveira¹
Lilian Pamela Tapia Carreno Dornbusch²
Peterson Triches Dornbusch²

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

²Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

*Autor para correspondência - nomura_roberto@hotmail.com

Resumo

O gel de plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de plaquetas em um pequeno volume de plasma com potencial de melhorar a integração dos enxertos. Foram utilizados oito equinos adultos, realizando-se enxertos de pele com largura de 2,5 x 2,5 centímetros em cada lado do pescoço, sendo um lado o tratamento, com o uso do gel de PRP e do outro lado o controle. Os animais foram avaliados nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após a cirurgia por meio de avaliação clínica, histológica, morfométrica e cultura bacteriana dos enxertos. As avaliações clínicas, morfométricas e bacteriológicas dos tecidos enxertados não revelaram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratamento com PRP. A avaliação histológica revelou um aumento da inflamação aguda no momento 7 e de concentração de colágeno no momento 14 no grupo tratamento, decorrente da liberação de fatores de crescimento pelas plaquetas presentes no gel, que não diferiu nos demais momentos. De acordo com as condições experimentais utilizadas neste estudo, pode-se concluir que não houve diferenças significativas entre o lado tratado com PRP e o lado controle em enxertos cutâneos em equinos.

Palavras-chave: autólogo; fatores de crescimento; integração do enxerto; tempo de cicatrização.

Abstract

The platelet-rich plasma (PRP) gel is an autologous platelet concentration in a small plasma volume with the potential to improve the integration of the grafts. Eight adult equines were used, performing skin grafts, with 2.5x2.5 centimeters, on both sides of the neck, in which one was the treatment side, using the PRP gel, and the other side was the control. The animals were assessed after the surgery on days 0, 7, 14, 21, and 28, by clinical, histological, morphometric, and culture analysis of the grafts. The clinical, morphological, and biological analysis of tissue grafts revealed

no significant differences between the control group and the treatment group with PRP. Histologic evaluation revealed an increase in acute inflammation on day 7 and collagen concentration on day 14, resulting from the release of growth factors by the platelets present in the gel, which did not differ in further moments. According to the experimental conditions used in this study, we concluded there were no significant differences between the side treated with PRP and the control side in skin grafts in horses.

Keywords: autologous; growth factors; integration of graft; time of healing.

Recebido em: 15 outubro de 2014

Aceito em: 09 maio de 2017

Introdução

O plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma, com a presença de fatores de crescimento (FC), além de proteínas osteocondutoras, que também servem de matriz para migração epitelial, formação óssea, assim como de tecido conectivo⁽¹⁾.

O PRP é um hemocomponente autógeno utilizado para liberar fatores de crescimento em altas concentrações no local onde se pretende reparar um defeito ou uma lesão tecidual, levando à aceleração do processo cicatricial. Os fatores de crescimento estimulam principalmente a reepitelização, a angiogênese, a mitose celular, a síntese de colágeno e a quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e linfócitos com a produção de interleucina⁽²⁾. No PRP, o quociente entre hemácias e plaquetas é de 5% e 95%, respectivamente⁽³⁾.

As propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial de melhorar a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou de gordura, bem como estimular a cicatrização de feridas⁽¹⁾.

Há alguns anos, o PRP tem sido estudado, pois o crescimento tecidual interessa à engenharia de tecidos e à terapia celular, atuando na cicatrização e capacitando as células às mitoses e angiogênese⁽⁴⁻⁵⁾.

O enxerto cutâneo é uma técnica terapêutica indicada para o tratamento de feridas lacerantes, geralmente muito extensas e com grande perda de tecido, resultando em lesões com quantidade insuficiente de tecido cutâneo para a cicatrização por primeira intenção, em feridas nas quais o tecido de granulação exuberante impede sua contração e ainda em ferimentos em que a contração da ferida no processo de cicatrização pode resultar em uma contratura indesejada para o local⁽⁶⁾. Devido à rápida cicatrização de uma ferida que recebeu um enxerto, faz deste a escolha mais econômica para o manejo de feridas que não podem ser suturadas. Um enxerto cutâneo cicatrizado contém porções da epiderme, da derme e alguns anexos, incluindo folículos pilosos, sendo preferida por apresentar melhores resultados⁽⁷⁾.

As aplicações mais comuns dos enxertos cutâneos em equinos são em ferimentos muito extensos em que não se consegue a cicatrização por outros meios, porém a presença de qualquer ferida aberta que não pode ser suturada tem indicação para o uso de enxertos⁽⁷⁾. O equino é uma das espécies domésticas mais propensas a desenvolver feridas cutâneas de origem traumática, principalmente devido a condições inadequadas de manejo e instalações⁽⁸⁾.

O objetivo deste estudo foi verificar, em equinos, se a utilização do PRP na enxertia de pele pode melhorar o resultado final e se afeta a inflamação tecidual.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em oito equinos, fêmeas, com idades entre 3 e 15 anos, com peso médio de 350 kg, pertencentes à Unidade Hospitalar para Animais de Fazenda (UHAF) da PUCPR. Uma semana antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose de Ivermectina (200 mcg/kg) e foram submetidos a exame clínico e laboratorial, para constatar sua higidez orgânica. Durante o experimento, os animais ficaram alojados em baias individuais com água, feno e ração próprias para equinos.

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

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido pelo protocolo de dupla centrifugação em tubos descrito por Argüeles et al.⁽⁹⁾. Foram realizadas análises laboratoriais da amostra sanguínea inicial e do gel de PRP preparado para garantir uma concentração plaquetária com uma média de quatro a seis vezes superior ao sangue total.

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

As tricotomias foram realizadas com área de aproximadamente 20 cm², em ambas as laterais do pescoço, e as crinas foram aparadas para não entrarem em contacto com a área estudada. Realizou-se a antisepsia da pele com solução de álcool iodado e solução de PVPI degermante. Foram demarcados dois quadriláteros de cada lado dos animais, o primeiro mais cranial e proximal de 2,5 cm², preconizado como sendo o local receptor de pele e o segundo mais caudal e distal, na região média do pescoço, com 3,5 cm², sendo o local doador de pele para confecção do enxerto.

Realizou-se a dessensibilização dos locais demarcados por meio de anestesia infiltrativa local com o uso de 10 mL Lidocaína 2%, sem vasoconstritor, ao redor das áreas demarcadas. Utilizando-se uma lâmina de bisturi nº 24 estéril, a pele foi excisada, obtendo-se as feridas cutâneas experimentais. Os tecidos cutâneos retirados dos quadriláteros caudais foram dissecados para a retirada das fáscias e tecido subcutâneo. Após o preparo, os enxertos foram suturados nas feridas experimentais, procedimento este realizado em ambos os lados. Foram realizados pontos isolados simples com fio de Nylon nº 0, permitindo, dessa forma, boa coaptação entre as bordas do tecido enxertado e da ferida experimental. O gel de PRP foi aplicado entre o leito receptor e o tecido enxertado, antes de finalizar a sutura da porção superior, somente em um dos lados do animal. No outro lado, o gel de PRP não foi utilizado, sendo este considerado o lado controle.

Nos primeiros quinze dias, foi realizada a aplicação de sulfato de Neomicina e Bacitracina pomada, duas vezes ao dia, sobre os tecidos enxertados em ambos os lados, para evitar contaminação pós-operatória dos enxertos. As feridas doadoras de pele também foram tratadas de forma similar, até sua completa cicatrização por segunda intenção.

Para o pós-operatório destes animais foi realizada a analgesia com o uso de Flunixin Meglumine (1,1 mg/ kg/ IV/ SID), por um período de cinco dias e antibioticoterapia com uso de Sulfadiazina e Trimetoprim em pasta (30g/VO/SID), durante de cinco dias.

Foram realizadas avaliações clínicas, histológicas, bacteriológicas e morfológicas da cicatrização dos enxertos. Para a avaliação clínica acompanhou-se a evolução do exudato, edema, coloração e aspecto cosmético (Tabela 1).

Tabela 1. Matriz de análise para classificação clínica dos enxertos

Análises	0	1	2	3
Exudato	Sem	Pouco	Moderado	Muito
Coloração	Branca	Rosada	Roxa	Preta
Edema	Sem	Leve	Muito	--
Aspecto Cosmético	Excelente	Bom	Regular	Ruim

A avaliação histológica (Tabela 2) foi realizada recolhendo uma amostra de tecido no momento da biopsia; em seguida, a amostra foi fixada em formol tamponado por pelo menos 24 horas e encaminhada para o Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para análise. Após a fixação, o fragmento foi embebido em parafina e preparado em cortes transversais de 4 x 6 µm, e as lâminas foram coradas pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas obtidas após as colorações foram avaliadas por um mesmo observador, sem que soubesse qual era o lado do controle e o lado do tratamento, ou seja, em estudo cego.

Para a análise bacteriológica, foi utilizado um *swab* estéril para recolher possíveis amostras microbiológicas de fragmentos dos enxertos, sendo realizado depois da antissepsia da pele e a biopsia do tecido enxertado. O material foi enviado em frasco estéril ao Laboratório de Microbiologia da PUCPR para posterior cultura em meios de Ágar McConkey e Ágar Sangue de Carneiro.

Na avaliação morfológica, os enxertos eram avaliados por meio de mensuração da área. Todos os parâmetros foram avaliados no dia da cirurgia (dia 0), sendo repetidos nos momentos 7, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório.

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

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

¹ HE – hematoxilina-eosina

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

Resultados

O procedimento cirúrgico ocorreu sem complicações em todos os animais. No lado controle, ocorreram três perdas de enxertos, sendo uma aos 14 dias, uma aos 21 dias e uma aos 28 dias. No lado dos enxertos tratados com PRP ocorreram duas perdas, sendo uma aos 14 dias e uma aos 28 dias.

A análise das avaliações clínicas pelo teste de Kruskal-wallis revelou que não houve diferenças significativas nos parâmetros exudato, coloração, aspecto cosmético e edema entre os grupos. Os parâmetros exudato, coloração e aspecto cosmético não apresentaram diferenças significativas entre os momentos; entretanto, o parâmetro edema diferiu entre 0 e 14 dias no grupo PRP e entre 0 e 7 e entre 0 e 14 dias no grupo controle.

As avaliações histológicas revelaram diferenças significativas entre os momentos e os grupos. A análise estatística demonstrou um aumento da inflamação no grupo PRP no sétimo dia, em comparação com o grupo controle (Figura 1). No grupo PRP houve diferenças significativas na inflamação, com diferença entre o momento 7 e 28, apresentando uma diminuição na inflamação no momento 28 (Figura 2).

No parâmetro colágeno, não foram encontradas diferenças significativas entre os momentos dentro de cada grupo; entretanto, foi encontrada diferença entre os grupos no momento 14, quando houve um aumento em sua concentração no grupo PRP (Figura 3).

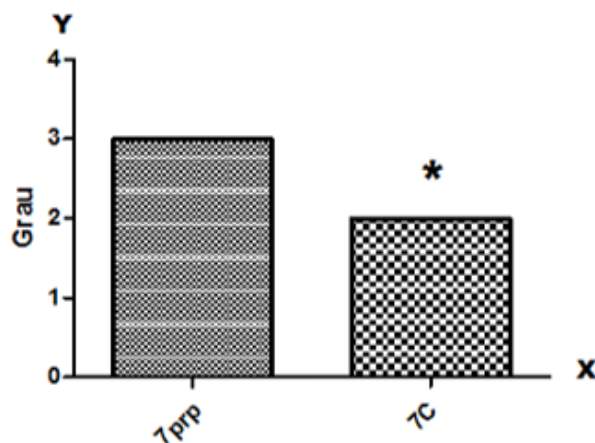


Figura 1. Mediana do parâmetro inflamação demonstrando diferença estatística entre os grupos C (controle) e PRP (plasma rico em plaquetas) no 7º dia, em que (*) equivale a $P < 0,05$. Eixo (Y) grau de inflamação e (X) grupos.

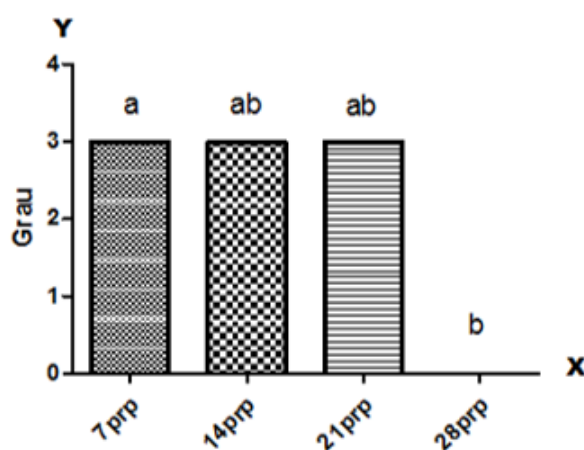


Figura 2. Mediana dos parâmetros da inflamação entre os momentos no grupo PRP (plasma rico em plaquetas), em que letras diferentes demonstram uma diferença estatística entre o 7º e 28º dias, valor de $P < 0,05$. Eixo (Y) grau de inflamação e (X) momentos no grupo PRP.

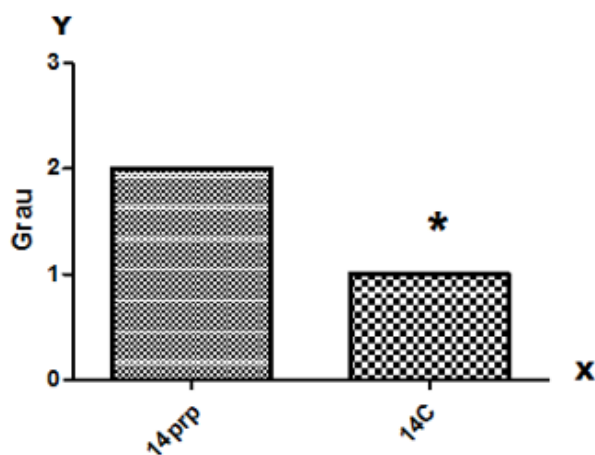


Figura 3. Mediana da concentração de colágeno demonstrando diferença estatística entre os grupos C (controle) e PRP (plasma rico em plaquetas) no 14º dia, em que (*) equivale a valor de $P < 0,05$. Eixo (Y) grau de concentração de colágeno e (X) grupos.

O parâmetro granulação não apresentou diferença entre os grupos em nenhum momento, mas dentro do grupo controle diferiu entre o 7° e 14° dia e entre 7° e 28° dia (Figura 4). A mesma tendência de evolução do tecido de granulação foi vista no grupo PRP.

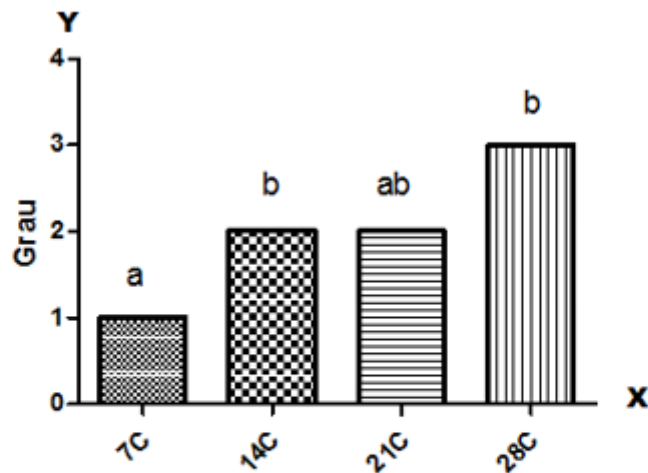


Figura 4. Mediana do parâmetro granulação no grupo C (controle) demonstrando uma evolução crescente, em que letras diferentes indicam uma diferença estatística nos momentos 7, 14 e 28, valor de $P < 0,05$. Eixo (Y) grau de granulação e (X) momentos no grupo C.

O parâmetro fibroblasto não diferiu entre os grupos; contudo, variou entre os momentos dentro de cada grupo, controle (Figura 5) e PRP (Figura 6), apresentando um padrão crescente, assim como a granulação.

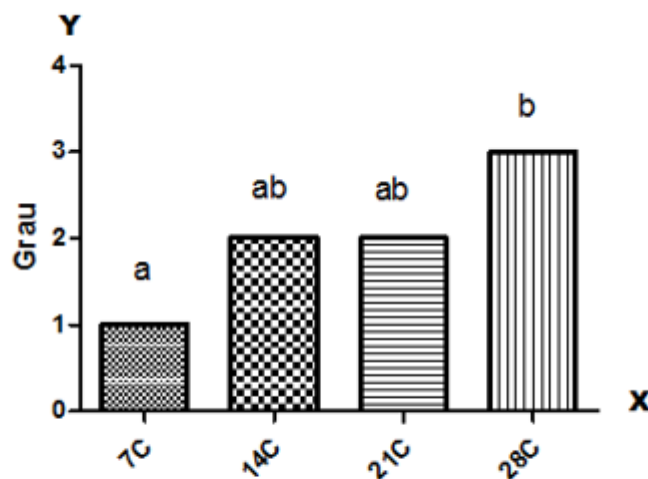


Figura 5. Mediana do parâmetro fibroblasto no grupo C (controle), em que letras diferentes demonstram diferença estatística nos momentos 7 e 28, valor de $P < 0,05$. Eixo (Y) grau de fibroblasto e (X) momentos no grupo C.

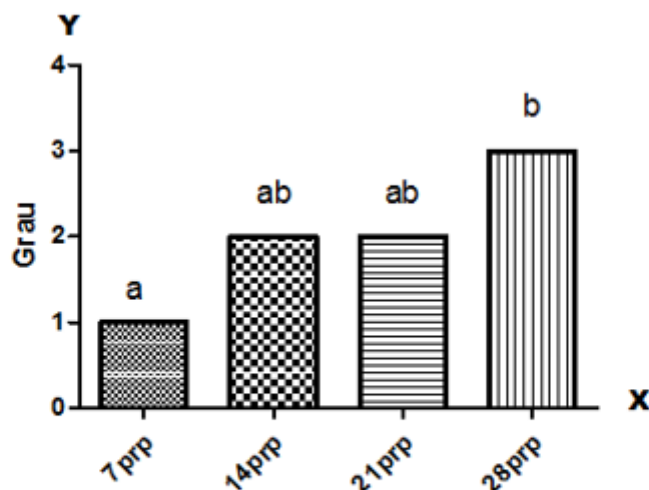


Figura 6. Mediana do parâmetro fibroblasto no grupo PRP (plasma rico em plaquetas), em que letras diferentes demonstram diferença estatística nos momentos 7 e 28, valor de $P < 0,05$. Eixo (Y) grau de fibroblasto e (X) momentos no grupo PRP.

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

No lado tratamento com PRP, um dos animais apresentou crescimento de *Escherichia coli* no tecido enxertado nos momentos 14 e 21, porém não ocorreu perda do enxerto e não houve crescimento bacteriano no momento 28. Outros três animais apresentaram crescimento bacteriano de *Escherichia coli* no mesmo lado, apenas no dia 28, porém sem perda dos enxertos (Tabela 3).

Tabela 3. Número de enxertos que apresentaram contaminação em cada momento, nos diferentes tratamentos, sendo que os números entre parênteses representam perdas de enxertos em cada momento

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

¹ PRP – Plasma rico em plaquetas.

² (*) – Perda de enxertos sem contaminação bacteriana.

³ (**) – Perda de enxerto com contaminação bacteriana por *Escherichia coli*.

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

Somente um dos equinos deste experimento apresentou crescimento de outros tipos de bactérias,

sendo *Bacilo sp.* no décimo quarto dia e *Staphylococcus intermédius* nos dias 21 e 28, do lado do enxerto tratado com PRP, e crescimento de *Cândida sp.* no dia 21 e *Staphylococcus intermédius* no dia 28 do lado controle, porém não houve perda de enxerto em nenhum dos lados.

Os valores obtidos da mensuração da área dos enxertos para avaliação morfométrica da contração dos enxertos durante o processo de cicatrização foram submetidos ao teste de Kruskal-wallis, que não revelou diferenças significativas entre os lados controle e tratamento com gel de plasma.

Discussão

Neste estudo, a adição do gel de PRP aos enxertos cutâneos não demonstrou aceleração de sua incorporação e cicatrização, pois não houve diferenças significativas entre o lado controle e o lado tratamento com PRP. O mesmo resultado foi descrito por Monteiro et al.⁽¹⁰⁾, que avaliou o tempo de cicatrização de feridas cirúrgicas com o uso do gel de PRP em equinos, e por DeRossi et al.⁽¹¹⁾, que avaliou a cicatrização de feridas distais em membros de equinos com uso de PRP. Em ambos os casos, não houve diferenças significativas no processo de cicatrização com o uso do gel de plasma rico em plaquetas. Segundo DeRossi et al.⁽¹¹⁾, não foi comprovada a hipótese de que a adição de PRP para o aumento da presença de mediadores inflamatórios no local melhore a qualidade da reparação e acelere a cicatrização de feridas em membros de equinos. Resultado semelhante também foi descrito por Hermeto⁽¹²⁾, que, em estudo comparativo entre a cola de fibrina e o PRP em enxertos cutâneos em cães, observou que o grupo cola de fibrina foi superior ao grupo PRP e que o grupo PRP quando comparado com o grupo controle apresentou resultados inferiores na cicatrização de enxertos cutâneos.

O índice de falhas na enxertia foi de 37,5% no lado controle e de 25% no lado tratado com o gel, sendo esses índices semelhantes aos encontrados em literatura. Segundo French & Fretz⁽¹³⁾, enxertos em membros de equinos apresentaram falha em 30% dos casos sendo o estudo realizado em feridas distais. Índices semelhantes também foram encontrados em cães. Pavletic⁽¹⁴⁾ e Hermeto⁽¹²⁾ relataram que o sucesso da enxertia foi de 50 a 60%.

A maioria dos casos de contaminação dos enxertos foi ocasionada por *Escherichia coli*, indicando uma contaminação ambiental dos enxertos, semelhante ao resultado encontrado por Monteiro⁽¹⁰⁾, que avaliou a contaminação de feridas em diversas espécies, relatando 25% de contaminação por *E. coli* em feridas. Segundo Souza e Scarcelli⁽¹⁵⁾, o isolamento bacteriano era esperado, uma vez que a *E. coli* faz parte da flora normal dos mamíferos.

Razões que levam a uma falha no processo de enxertia incluem o acúmulo de fluído sob o enxerto, movimentação excessiva e infecção. Enxertos aplicados em cavalos falham mais frequentemente devido a causas infecciosas^(16,6).

De acordo com Pope⁽¹⁷⁾, o uso de curativos com bandagens compressivas sobre os locais enxertados reduz a mobilidade e o uso de antibiótico tópico reduz a contaminação bacteriana no local. Neste experimento, não foi possível usar bandagens, porém foram realizados dois curativos diários para a assepsia do local com o uso de pomada de Bacitracina e Neomicina. Observou-se a contaminação de alguns enxertos, porém nem sempre relacionada à perda dos mesmos. Segundo Livingston et al.⁽¹⁸⁾, a utilização da associação de Neomicina com Bacitracina reduziu significativamente o número de infecções, levando a uma menor perda de enxertos de pele em casos de queimaduras em humanos. A associação de Bacitracina com Neomicina atinge os critérios de uma antibioticoterapia

tópica ideal, uma vez que apresenta atividade bactericida com amplo espectro de ação e essas substâncias são raramente utilizadas por outras vias de administração, reduzindo a probabilidade de resistência bacteriana.

As biópsias para análise histológica foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias, observando-se posterior necrose ao redor dos locais da biópsia, o que pode ter interferido nos índices de falhas na enxertia. A inflamação aguda do lado tratamento com PRP apresentou-se superior ao grupo controle na avaliação histológica do sétimo dia, corroborando os achados de Henderson et al.⁽¹⁹⁾ e Chandra et al.⁽²⁰⁾. Esse fato pode ser explicado pela intensa liberação de fatores de crescimento no local devido à degranulação das plaquetas. Segundo Marx⁽⁴⁾, a liberação dos fatores de crescimento pode ocorrer durante até dez dias após a degranulação das plaquetas, o que explicaria porque não ocorreu diferença significativa de índices de inflamação aguda entre lado controle e tratamento nos demais momentos do experimento.

O parâmetro colágeno do lado PRP também se apresentou superior ao controle apenas no momento 14. De acordo com DeRossi⁽¹¹⁾, os fatores de crescimento do PRP ativam os fibroblastos para a formação de pré-colágeno, induzindo e aumentando a deposição de colágeno na ferida.

Scartezini⁽²¹⁾ observou que os benefícios dos fatores de crescimento presentes no PRP relatados em literatura pareciam trazer uma grande evolução na melhora da cicatrização de tecidos moles, o que não foi observado em estudos *in vivo* pelo autor. Hermeto⁽¹²⁾ relatou que os resultados encontrados em enxertos de espessura completa em cães com uso de PRP não foram os esperados, resultando em uma cicatrização mais lenta quando comparado ao grupo controle. DeRossi⁽¹¹⁾ relatou resultados semelhantes aos deste experimento, pois a cicatrização de feridas cutâneas em equinos não demonstrou diferença quando comparada ao grupo controle.

Conclusão

De acordo com as condições experimentais utilizadas neste estudo, pode-se concluir que a taxa de sobrevivência dos enxertos foi boa, entre 63 a 75%. No entanto, não houve diferenças significativas entre o lado tratado com gel de plasma rico em plaquetas e o lado controle, sob o ponto de vista clínico e histológico, nos enxertos cutâneos livres localizados na região lateral do pescoço de equinos.

Referências

1. Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco TR. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia, 2006; 1(33): 24-28. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rcbc/v33n1/v33n1a06.pdf>
2. Almeida ARH, Menezes JA, Araújo GKM, Mafra AVC. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. Revista Brasileira de Cirurgia Plástica, 2008; 2(23): 82-88. Disponível em: <http://www.prpbelem.com.br/pdf/PRP-RITIDOPLASTIAS.pdf>
3. Wilson EMK, Barbieri CH, Mazzer N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. Acta Ortopédica Brasileira, 2006; 4(14): 208-212, 2006. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/aob/v14n4/a06v14n4.pdf>

4. Marx RE. Platelet rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Journal of Oral Implantology*. 2001; 4(10): 225 – 228.
5. Villela DL. Terapia tópica de úlceras crônicas de pernas com plasma rico em plaquetas – PRP: revisão sistemática da Literatura [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/7139/tde-23012008-121950/en.php>
6. Bristol DV. Skin grafts and skin flaps in the horse. *Veterinary Clinic Equine*. North Carolina: Elsevier Saunders, 2005; (21): 125-144. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2004.11.007>
7. Schumacher J. Skin grafting. In: Auer JA, Stick JA, editores. *Equine Surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. 3 ed, p. 269-287.
8. Souza AE. O efeito de diferentes agentes sobre a cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção no cavalo: estudo Bacteriológico, histológico, histoquímico e morfométrico. [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 1989.
9. Argüeles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Research in Veterinary Science*. 2006, (81): 237-245. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.12.008>
10. Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2009; 2(70): 277-282. Disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdfplus/10.2460/ajvr.70.2.277>
11. DeRossi R, Coelho ACAO, Mello GS, Frazílio FO, Leal CRB, Faco GG, Brum KB. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2009; 4(24): 276-281. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v24n4/06.pdf>
12. Hermeto LC. Estudo comparativo entre a cola de fibrina e o plasma rico em plaquetas em enxertos cutâneos em cães [dissertação]. Campo Grande (MS): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2010. Disponível em: <http://200.129.202.51:8080/jspui/handle/123456789/373>
13. French DA, Fretz PB. Treatment of equine leg wounds using skin grafts: Thirty-five cases, 1975-1988. *Canadian Veterinary Journal*. 1990; (31): 761-765. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1480880/pdf/canvetj00084-0031.pdf>
14. Pavletic MM. Técnicas de enxertadura cutânea. In: Bojrab, editores. *Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais*. São Paulo: Roca; 1996. p. 443-445.
15. Souza CAI, Scarcelli E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. *Arquivo do Instituto Biológico*. 2000; 2(67): p. 275-281. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/V67_2/26.pdf
16. Booth L. Equine wound reconstruction using free skin grafting. *California Veterinary*. 1991; 13(45).
17. Pope ER. Mesh skin grafting. *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice*. 1990; (20): p. 177-187.
18. Livingston DH, Crier HG, Miller FB, Malangoni MA, Polk HC Jr, Weiner LJ. A Randomized Prospective Study of Topical Antimicrobial Agents on Skin Grafts After Thermal Injury. *Plastic Reconstructive Surgery*. 1990; 6(86): 1059-1064. Disponível em: http://journals.lww.com/plasreconsurg/abstract/1990/12000/a_randomized_prospective_study_of_topical.1.a.spx
19. Henderson JL; Cupp CL, Ross EV, Shick PC, Keefe MA, Wester DC, et al. The effects of the autologous platelet gel on wound healing. *Ear, Nose e Throat Journal*. 2003, 8(82): p. 598-602. Disponível em:

<http://europepmc.org/abstract/MED/14503096>

20. Chandra RK, Handorf C, West M, Kruger EA, Jackson S. Histologic effects of autologous platelet gel in skin flap healing. Archives of Facial Plastic Surgery. 2007; 4(9): p. 260-263. Disponível em: <http://archfaci.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=481135>

21. Scartezini GR. Reparo em osso irradiado utilizando enxerto ósseo autógeno associado ao plasma rico em plaquetas. Análise histomorfométrica em coelhos [dissertação]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5140/tde-16082007-160750/en.php>