

Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos

Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in skin grafts in rabbits

FABIEL SPANI VENDRAMIN¹
 DIOGO FRANCO²
 RAGNAR FRANCO SCHAMALL³
 TALITA ROMERO FRANCO⁴

RESUMO

Introdução: A boa integração de enxertos é fundamental em diversas cirurgias plásticas e o plasma rico em plaquetas (PRP), que é um produto utilizado para estimular a cicatrização, pode ajudar nesta integração. **Objetivo:** Nesse estudo, objetivou-se determinar a melhor forma de aplicar o produto nas cirurgias de enxerto cutâneo e avaliar seus resultados. **Método:** Realizaram-se estudos histológicos em enxertos de pele com PRP na forma líquida, com gel de PRP e sem PRP, em coelhos, avaliando-se a integração dos enxertos, intensidade de colagenização e de resposta inflamatória e a quantificação de fibroblastos e macrófagos. **Resultados:** Houve aumento de 31,6% de fibroblastos ($p = 0,045$) e de 57% de macrófagos ($p = 0,046$) e maior produção de colágeno e resposta inflamatória com a utilização do PRP. Os enxertos que utilizaram o PRP na forma líquida demonstraram melhores resultados que os demais grupos. **Conclusão:** O PRP melhora a cicatrização dos enxertos cutâneos e sua utilização na forma líquida, injetado sob a ferida, é mais fácil e obteve melhores resultados que na forma gel.

Descritores: Plasma rico em plaquetas. Cicatrização de feridas. Transplante de pele.

SUMMARY

Background: The successful healing of grafts is crucial in several plastic surgeries and platelet-rich plasma (PRP), which is a product used to stimulate wound healing, can help in grafts surgery. **Objective:** This study aimed to determine how best to apply the product in surgeries for skin grafts and evaluate their results. **Methods:** There were histological studies on skin grafts with PRP liquid, PRP gel and without PRP in rabbits, to evaluate the healing of grafts, severity of collagen and inflammatory response and the quantification of fibroblasts and macrophages. **Results:** There was an increase of 31.6% of fibroblasts ($p = 0.045$) and 57% macrophages ($p = 0.046$) and increased production of collagen and inflammatory response with the use of PRP. The grafts that used PRP in the liquid form showed better results than the other groups. **Conclusion:** PRP enhances the healing of skin grafts and their use in the liquid form, injected under the wound, is easier and gets better results than in gel form.

Descriptors: Platelet-rich plasma. Wound healing. Skin transplantation.

Trabalho realizado na
 Universidade Federal do Rio de
 Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Artigo submetido no SGP
 (Sistema de Gestão de
 Publicações) da RBCP.

Artigo recebido: 28/11/2009
 Artigo aceito: 18/1/2010

1. Doutorado em Cirurgia Plástica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); Professor de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da UFPA; Cirurgião Plástico do HMUE.
2. Doutorado em Cirurgia Plástica pela UFRJ; Professor Adjunto de Cirurgia Plástica da UFRJ.
3. Mestrado em Medicina pela UFRJ; Professor da PUC – Betim.
4. Doutorado pela UFRJ; Professora Titular de Cirurgia Plástica da UFRJ.

INTRODUÇÃO

O gel de plasma rico em plaquetas (PRP) é apontado como a mais recente linha de colas teciduais com a vantagem adicional, em relação à cola de fibrina, da presença dos fatores de crescimento e citocinas, que lhe confere um grande benefício na cicatrização¹⁻³. Dessa forma, sua utilização poderia melhorar a integração dos enxertos teciduais, pois, além de suas propriedades pró-cicatrização, também possui a propriedade física de adesão, ajudando na imobilização do enxerto.

Após um estudo do método de obtenção do PRP, decidimos estudar sua ação nos enxertos cutâneos, mas algumas questões deixavam dúvidas. Uma delas seria a possibilidade de, colocado entre o leito da ferida e o enxerto de pele, o gel atrapalhar os fenômenos de inosculação e revascularização do enxerto. Além disto, a preparação do gel é mais complexa e demorada se comparada a sua utilização na forma líquida. O método de aplicação na forma de gel sobre a ferida também é mais difícil, pois geralmente necessita de adaptadores para misturar a trombina ao PRP no mesmo instante em que está sendo borrifado no local. Após a mistura, ele ainda demora alguns segundos para se tornar gel, o que dificulta a distribuição homogênea, uma vez que, enquanto ainda está na forma líquida, escorre e se acumula nas áreas mais deprimidas da ferida.

Assim, propôs-se a idéia de estudar também o uso do PRP na forma líquida, injetado sob a ferida. Isto facilitaria sua preparação e possivelmente seu modo de aplicação, além de evitar a necessidade de deixar um gel entre o enxerto de pele e o leito da ferida. No entanto, não haveria a certeza de que o PRP sem a trombina conseguiria ser ativado no local, promovendo a liberação de seus fatores de crescimento.

Os objetivos deste estudo foram: determinar a melhor forma de aplicar o produto nos enxertos de pele e observar alterações histológicas nos enxertos de pele, em coelhos, com o uso do PRP, comparando-os aos enxertos sem o uso do produto.

MÉTODO

A etapa experimental foi autorizada pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais da instituição e registrada com o número 14431. Participaram do desenvolvimento o Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - UFRJ, a Clínica Veterinária Petrópolis, onde as cirurgias foram realizadas, e o Serviço de Patologia do Hospital Universitário João de Barros Barreto - UFPA, onde se procedeu à avaliação histopatológica.

O estudo foi realizado em sete coelhos albinos, machos, adultos, da raça Nova Zelândia, em perfeito estado de saúde, sem lesões dermatológicas visíveis e com pelagem perfeita.

Os animais foram anestesiados com quetamina (30 mg/kg) e xilazina (3 mg/kg) intramuscular, para estabelecimento

de um acesso venoso e coleta do sangue para preparar o PRP. A manutenção da anestesia durante o procedimento cirúrgico foi realizada com propofol, a efeito.

Para marcação da pele a ser removida, utilizou-se um gabarito com três quadrados de 1 cm², para marcação das feridas a serem realizadas em uma linha coronal na região superior do dorso dos coelhos e na região posterior da orelha direita. A pele da orelha do coelho serviu de enxerto para as feridas na região superior do dorso, cuja distância entre si foi de 1,5 cm, a fim de evitar interações biológicas entre elas (Figura 1). As feridas na região superior do dorso receberam o tratamento da seguinte forma: a ferida 1 (grupo simulação) recebeu somente o enxerto cutâneo; a ferida 2 (grupo 2), o enxerto cutâneo e PRP líquido injetado sob a ferida em um volume de 0,25 ml; e a ferida 3 (grupo 3) recebeu o enxerto cutâneo e 0,25 ml de gel de PRP sobre o leito da ferida (entre a ferida e o enxerto de pele) (Figura 1). O PRP e o gel de PRP foram produzidos por meio de protocolo preconizado por Vendramin et al.⁴, com a primeira centrifugação a 400g por 10 minutos e a segunda centrifugação a 800g por 10 minutos, com a utilização de trombina autóloga para a obtenção do gel. Todos os enxertos foram suturados com fio mononylon 4,0.

O primeiro curativo foi realizado no quinto dia pós-operatório e, após este período, em dias alternados, utilizando-se solução fisiológica, gaze com creme à base de ácidos graxos essenciais (AGE), gaze seca e atadura de crepom. Para a avaliação da influência do produto na integração dos enxertos cutâneos, foi feito um estudo histopatológico do material (regiões enxertadas) colhido no 14º dia pós-operatório. Todas as áreas enxertadas foram retiradas por meio de cirurgia e colocadas em formol a 10% e posteriormente analisadas no laboratório de histopatologia do Hospital Universitário João de Barros Barreto - UFPA, com a utilização do corante hematoxilina-eosina.

Realizou-se a comparação entre as lâminas dos grupos 1, 2 e 3 provenientes do mesmo coelho, avaliando-se:

- Intensidade de colagenização: avaliada pela quantidade de fibras colágenas;
- Intensidade da resposta inflamatória: avaliada pela quantidade de células de defesa (macrófagos e neutrófilos) no local e pela presença de vasodilatação;
- Número de fibroblastos por campo (microscópio óptico 1000x);
- Número de macrófagos por campo (microscópio óptico 1000x).

O exame de todas as preparações histológicas foi realizado pelo mesmo patologista. No estudo da intensidade de colagenização e da resposta inflamatória, utilizamos variáveis categóricas, classificando em intenso, moderado e fraco, de acordo com os critérios acima. A avaliação histomorfométrica (fibroblastos e macrófagos) foi realizada em três pontos aleatórios na porção mais central do enxerto, com a

contagem das células por campo num aumento de 1000 vezes, utilizando-se a ocular de 10x e a objetiva de 100x e sendo a média destas contagens utilizada na avaliação dos resultados.

A comparação entre os grupos em relação às variáveis categóricas (referentes à intensidade de colagenização e à reação inflamatória) foi feita pelo teste qui-quadrado de partição, enquanto a comparação em relação às variáveis numéricas foi feita através do teste t de Student.

RESULTADOS

A utilização do PRP na forma de gel, colocado na interface entre o leito da ferida e o enxerto de pele (grupo 3), obteve o pior resultado, pois em dois (28,6%) dos sete casos ocorreu perda do enxerto. Isto não ocorreu em nenhum dos casos simulação, tampouco nos casos onde o PRP foi injetado na ferida (Tabela 1). A correlação entre a incidência de não integração do enxerto por meio do teste binomial para duas proporções não alcançou um valor estatisticamente significativo ($p = 0,0633$).

A avaliação histológica da intensidade de colagenização não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos (Figura 2). O teste qui-quadrado de partição evidenciou $p = 0,6759$, quando comparados os três grupos entre si. Em relação à reação inflamatória, a célula predominante foi o macrófago, sendo encontrados poucos neutrófilos. Os grupos também foram semelhantes em intensidade de reação inflamatória (Figura 3), com $p = 0,7423$ pelo teste qui-quadrado de partição. Embora tenha sido observada melhora na colagenização e na resposta inflamatória, as avaliações estatísticas das variáveis categóricas não contemplaram satisfatoriamente a ação do PRP e do gel de PRP.

A contagem de células por campo no aumento de 1000 vezes demonstrou uma média de 20 fibroblastos/campo no grupo em que se utilizou o gel de PRP, 25 fibroblastos/campo no que foi injetado o PRP e 19 fibroblastos/campo no grupo simulação (Figura 4). A análise pelo teste t de Student revelou que o aumento do número de fibroblastos no grupo em que o PRP foi injetado é estatisticamente significativo em relação à simulação ($p = 0,0458$), o que não foi alcançado no que se utilizou o gel ($p = 0,324$), embora também neste grupo ocorra aumento dos fibroblastos (Figura 4).

Em relação aos macrófagos, observou-se a média de 11 macrófagos/campo no grupo que utilizou o gel de PRP, 9 macrófagos/campo no que foi injetado o PRP e 7 macrófagos/campo no grupo simulação (Figura 5). O estudo pelo teste t de Student comprovou que o número de macrófagos é significativamente maior no grupo em que foi utilizado o gel de PRP em relação ao grupo simulação ($p = 0,046$). No grupo em que foi injetado o PRP, o número de macrófagos também aumentou em relação ao grupo simulação ($p = 0,0554$) (Figura 5).

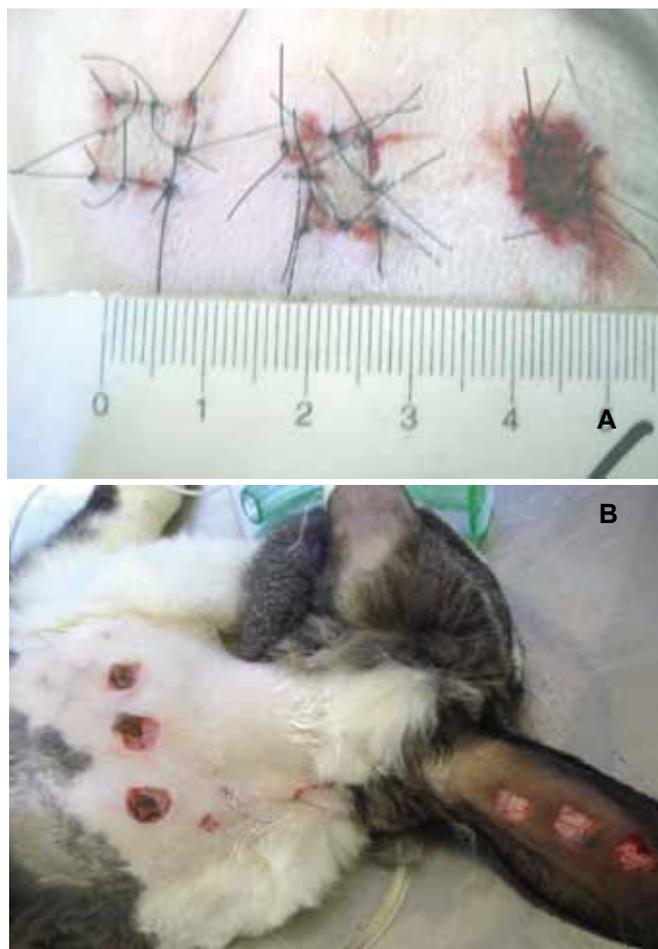


Figura 1 – Fotografias demonstrando os enxertos de pele que foram retirados da orelha e fixados nas feridas da região superior do dorso do coelho. Na figura B, o enxerto da esquerda é sem PRP (grupo 1), o do meio é com PRP líquido injetado na ferida (grupo 2) e o enxerto da direita é o que utilizou o gel de PRP (grupo 3).

Tabela 1. Evolução dos enxertos de pele em cada grupo de feridas.

Coelho	Gel de PRP	Injeção de PRP líquido	Simulação
I	Ruim [~]	Boa*	Boa*
II	Boa*	Boa*	Boa*
III	Boa*	Boa*	Boa*
IV	Boa*	Boa*	Boa*
V	Boa*	Boa*	Boa*
VI	Ruim [~]	Boa*	Boa*
VII	Boa*	Boa*	Boa*

*Boa: Houve integração do enxerto, sem intercorrências.

[~]Ruim: Houve perda do enxerto.

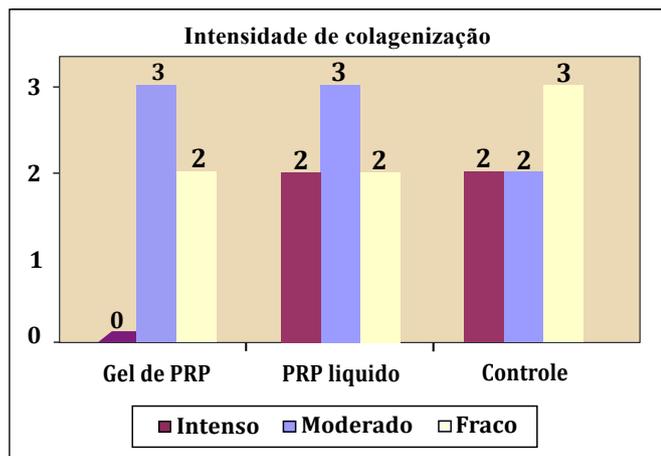


Figura 2 – Intensidade de colagenização nos cortes histológicos dos enxertos de pele, que foi maior no grupo que utilizou o PRP líquido.

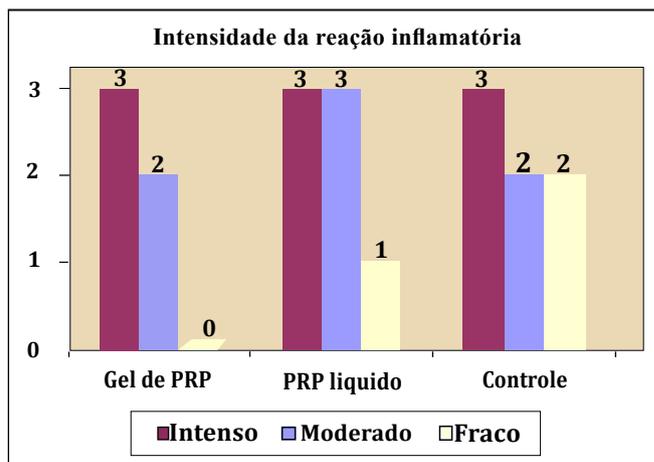


Figura 3 – Intensidade da reação inflamatória nos cortes histológicos dos enxertos de pele, também maior no grupo que utilizou o PRP líquido.

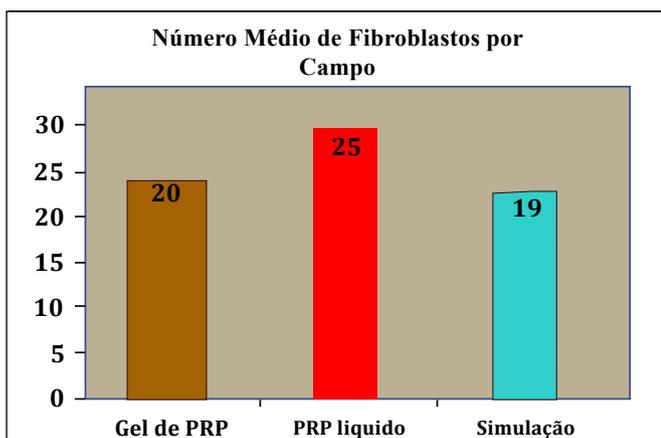


Figura 4 – Média de fibroblastos por campo do microscópio óptico (MO 1000x) presentes nos cortes histológicos dos enxertos de pele, que foi maior no grupo que utilizou o PRP líquido.

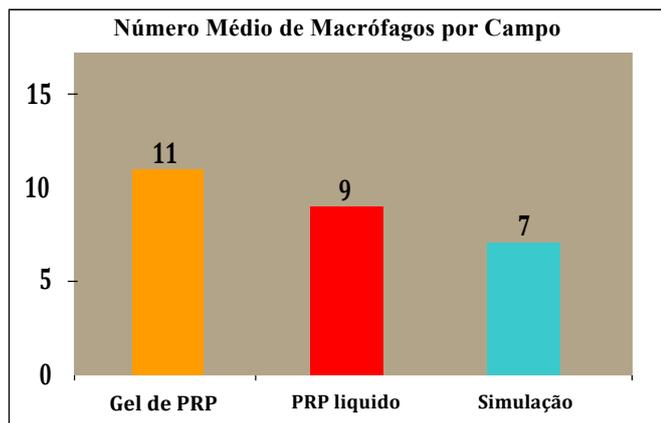


Figura 5 – Média de macrófagos por campo do microscópio óptico (MO 1000x) presentes nos cortes histológicos dos enxertos de pele, que foi maior no grupo que utilizou o gel de PRP.

DISCUSSÃO

O gel de PRP foi apontado por Green e Klink⁵ como uma alternativa à cola de fibrina. Por isto, no início desses estudos com o gel de PRP, tínhamos a intenção que ele pudesse servir também como cola, dispensando a utilização de suturas, o que facilitaria a cirurgia e diminuiria o tempo cirúrgico.

Os seguintes questionamentos estavam presentes nesta fase do trabalho: será que o gel de PRP conseguiria fixar o enxerto sobre a ferida? O gel, colocado na interface entre o leito da ferida e o enxerto, não poderia atrapalhar a integração do enxerto ao invés de ajudar? Devido a este último questionamento, estudamos também a utilização do PRP injetado diretamente na ferida. Esta forma de aplicação do PRP, por não necessitar do processo de gelação, tem a vantagem de dispensar a preparação da trombina autóloga, economizando tempo e diminuindo ainda mais os custos. Assim, o PRP poderia ser injetado diretamente na ferida e exercer seu efeito local. A ativação das plaquetas, necessária para que liberem os fatores de crescimento, teoricamente poderia ocorrer por meio das substâncias geradas pelo traumatismo da agulha de injeção no tecido e principalmente pelo colágeno tecidual. Mas será que estes fatores seriam suficientes para ativar as plaquetas?

Observou-se que o gel de PRP não foi capaz de fixar o enxerto de pele de espessura total no leito da ferida, sendo necessárias suturas com fio mononylon. A força tênsil e as propriedades adesivas dos selantes biológicos são proporcionais à concentração de fibrinogênio⁶. Entretanto, quanto maior a densidade da malha de fibrina, maior a possibilidade dela interferir negativamente na cicatrização, impedindo a chegada de plaquetas e seus fatores de crescimento, ou seja, o excesso de fibrina é prejudicial. Croveti et al.⁷ demonstraram que a quantidade de fibrinogênio no gel de PRP é

menor do que na cola de fibrina. Isto poderia explicar porque seu poder de adesão é menor. Por outro lado, havendo menor concentração de fibrinogênio e formando menor densidade de fibrina, o gel de PRP não atrapalharia, mas sim ajudaria o processo de cicatrização.

Apesar destas suposições teóricas, a utilização na forma de gel resultou em maior incidência de perda do enxerto ($p = 0,063$). Dentre os sete casos do grupo 3, em dois (28,6%) o enxerto não integrou. Em nenhum dos outros grupos ocorreu perda do enxerto. Acreditamos na possibilidade de contaminação do gel no pós-operatório, durante tentativas do coelho de retirar o curativo,

porém não foram realizados exames laboratoriais para comprovar a hipótese de infecção.

A comparação dos achados histológicos em relação à intensidade da reação inflamatória nos três grupos por meio de variáveis categóricas não demonstrou diferença estatisticamente significativa. O grupo 3 registrou proporcionalmente maior reação inflamatória, pois em 60% dos casos foi classificado como intenso o infiltrado inflamatório, seguido do grupo 2 e, por último, do grupo 1. Ao aplicarmos o teste qui-quadrado de partição, encontramos, porém, o $p = 0,7423$, não alcançando um valor estatisticamente significativo para estes achados.

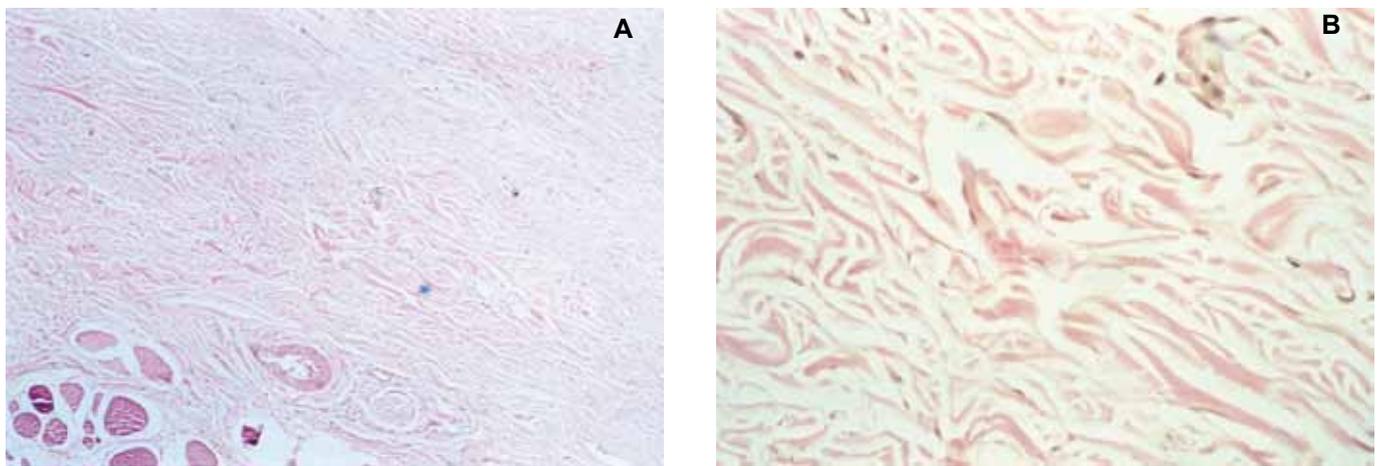


Figura 6 – Fotomicrografia óptica da preparação histológica do enxerto de pele no coelho em que não foi utilizado o PRP (grupo 1). Notar a pequena quantidade de fibroblastos e fibras colágenas (MO aumento original 100x na figura A e 400x na figura B, HE).

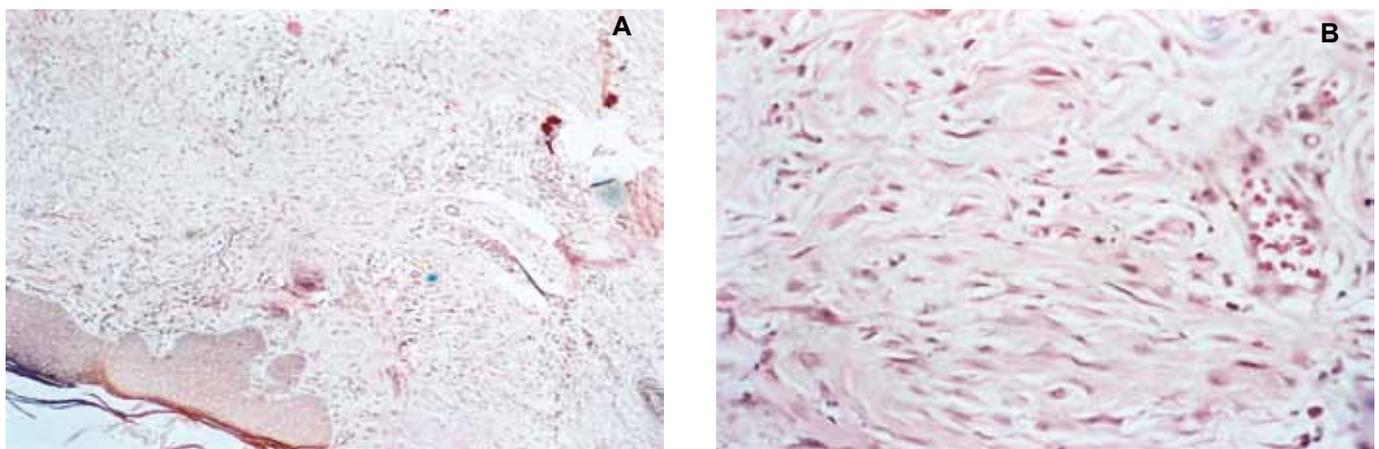


Figura 7 – Fotomicrografia óptica da preparação histológica do enxerto de pele no coelho em que foi injetado PRP subcutâneo (grupo 2). Notar a grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas (MO aumento original 100x na figura A e 400x na figura B, HE).

Quando se compararam os achados histológicos em relação à intensidade de colagenização, percebeu-se que no grupo 2 houve maior formação de colágeno, porém também sem alcançar um valor estatisticamente significativo ($p = 0,6759$; teste qui-quadrado de partição).

A avaliação estatística das variáveis categóricas não comprovou a ação do PRP, porém as fotografias evidenciaram claramente a diferença que ele produziu, aumentando o número de células, com destaque aos fibroblastos e macrófagos (Figuras 6 a 8).

As variáveis numéricas geradas ao se comparar o número de células conseguiram comprovar estatisticamente uma concentração maior de fibroblastos e macrófagos quando se utilizou o PRP.

O estudo histológico comprovou, então, maior reação inflamatória com o uso do PRP, o que potencializa a cicatrização, que é um fenômeno fundamentalmente inflamatório. O aumento no número de macrófagos e fibroblastos já era esperado pelo efeito de quimiotaxia dos fatores de crescimento. A maior quantidade de colágeno (colágeno jovem) também observada foi devida ao estímulo dos fibroblastos pelos fatores de crescimento. Nossos achados são concordantes com o trabalho de Liu et al.⁸, que demonstraram aumento da proliferação de fibroblastos e da produção de colágeno proporcional ao aumento da concentração plaquetária no PRP. Bhanot e Alex¹, e Man et al.⁹ também relataram que o PRP aumenta a taxa de produção de colágeno, a angiogênese, a proliferação de fibroblastos e a síntese de matriz extracelular, melhorando a cicatrização de um modo geral.

Em trabalhos encontrados na literatura, a utilização do PRP sempre foi na forma gel. Nosso estudo demonstrou que sua utilização na forma líquida, por meio de sua injeção na ferida, melhora a cicatrização. Mesmo sem adição de trombina, consegue ser ativado no local aplicado, seja pelo traumatismo provocado pelo ato da injeção, seja pelo colágeno tecidual, ou ambos.

A preparação do PRP na forma líquida foi mais simples e mais rápida que o gel, pois não necessitou da preparação da trombina autóloga. A aplicação do PRP líquido, injetado sob a ferida foi mais fácil, uniforme e com menos desperdício do que a utilização do gel, pois este, até sofrer o efeito de gelação, escorre pela ferida e se acumula nas áreas mais baixas de seu relevo.

Assim, comprovamos as informações encontradas na literatura de que os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas podem ser capazes de tornar a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de enxertos, sejam eles cutâneos, como em nosso trabalho, ou ósseos, cartilagosos ou células de gordura^{5,8-11}.

Estudos explorando o potencial do PRP em auxiliar a cicatrização devem ser estimulados, pois a possibilidade

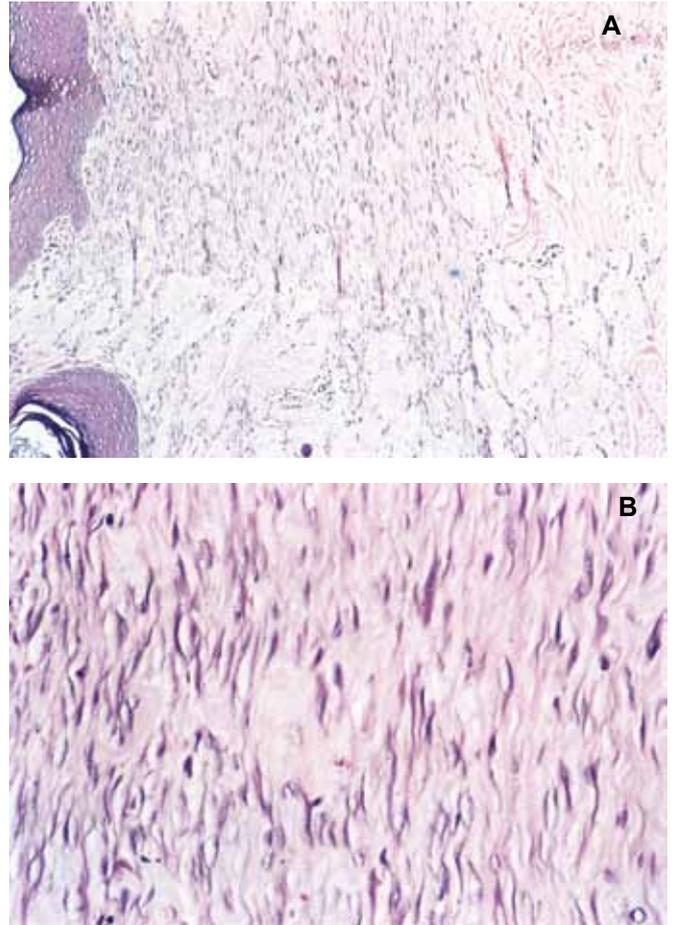


Figura 8 – Fotomicrografia óptica da preparação histológica do enxerto de pele no coelho em que foi colocado gel de PRP sob o enxerto (grupo 3). Também notar a grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas (MO aumento original 100x na figura A e 400x na figura B, HE).

de preparação com baixos custos permite sua aplicação em hospitais da rede pública, desde que se possa dispor de uma pessoa treinada para prepará-lo, ajudando muitos pacientes.

CONCLUSÃO

A utilização do PRP, seja na forma líquida injetada sob a ferida, seja na forma gel sobre a ferida, em enxertias cutâneas, evidenciou aumento na resposta inflamatória e na intensidade de colagenização, com aumento do número de fibroblastos e macrófagos no local enxertado. A forma líquida foi de mais fácil aplicação e obteve melhores resultados que a forma gel em enxertias de pele.

REFERÊNCIAS

1. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002;18(1):27-33.
2. Brown SA, Appelt EA, Lipschitz A, Sorokin ES, Rohrich RJ. Platelet gel sealant use in rhytidectomy. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(4):1019-25.
3. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):489-96.
4. Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cir Plást.* 2009;24(2):212-8.
5. Green DM, Klink B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(4):1161-2.
6. Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion.* 2004;44(7):1013-8.
7. Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci.* 2004;30(2):145-51.
8. Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.* 2002;10(5):336-40.
9. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(1):229-37.
10. Almeida ARH, Menezes JA, Araújo GKM, Mafra AVC. Utilização do plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. *Rev Bras Cir Plást.* 2008;23(2):82-8.
11. Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 1997;5(1):12-7.

Correspondência para:

Fabiel Spani Vendramin
Praça Justo Chermont, 86, apto. 501 – Nazaré – Belém, PA – CEP 66035-140
E-mail: fabiel@doctor.com