

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**DISSERTAÇÃO**

**Comparação entre protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas em  
cães: estudo celular**

**André William Masseaux Vidal Júnior**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**COMPARAÇÃO ENTRE PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DE PLASMA  
RICO EM PLAQUETAS EM CÃES: ESTUDO CELULAR**

**ANDRÉ WILLIAM MASSEAU VIDAL JÚNIOR**

*Sob a orientação da professora*  
**Heloísa Justen Moreira De Souza**

*Sob a co-orientação da professora*  
**Ana Paula Lopes Marques**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V648c Vidal Júnior, André William Masseur, 1992-  
Comparação entre protocolos para obtenção de plasma  
rico em plaquetas em cães: estudo celular / André  
William Masseur Vidal Júnior. - 2017.  
67 f.: il.

Orientadora: Heloisa Justen Moreira de Souza.  
Coorientadora: Ana Paula Lopes Marques.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA VETERINÁRIA, 2017.

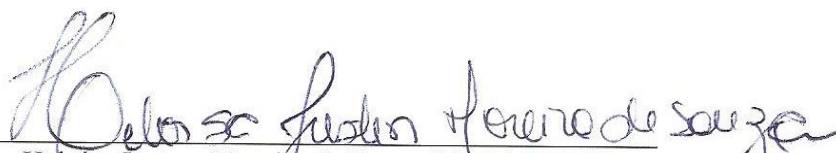
1. fatores de crescimento. 2. concentrado de  
plaquetas. 3. terapia celular. 4. caninos. I. Souza,  
Heloisa Justen Moreira de, 1962-, orient. II.  
Marques, Ana Paula Lopes, 1977-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA .  
IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**


**ANDRÉ WILLIAM MASSEAU VIDAL JUNIOR**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 15/02/2017

  
\_\_\_\_\_  
Heloísa Justem Moreira de Souza (Ph. D) UFRRJ  
(orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Márcia de Souza Xavier (Ph. D) UFF

  
\_\_\_\_\_  
Ricardo Siqueira da Silva (Ph. D) UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me dado força para superar cada dificuldade e me presenteado com meus pais.

Aos meus pais André e Flaviana e irmã Giovanna pelo apoio incondicional e imprescindível para a realização de tudo, antes mesmo deste projeto.

À minha namorada Natália, por ser também minha melhor amiga.

À minha orientadora Heloísa Justen, por toda orientação, ensinamentos, por ter sempre acreditado em mim e ser meu exemplo.

À minha co-orientadora Ana Paula, por ter me ajudado de forma imprescindível na realização deste projeto e por ser uma amiga tão dedicada e fiel.

Aos residentes e pós-graduandos do Hospital Veterinário, principalmente aos setores de medicina felina e cirurgia, pelo apoio em diversas ocasiões e pela amizade.

À equipe do LPC, pelo apoio no processamento do plasma rico em plaquetas.

À equipe do projeto castração, especialmente às professoras Marta Albuquerque e Cássia Coelho, pelo apoio na realização do estudo.

À toda equipe do LQEPV, principalmente ao professor Fábio Scott, pelo apoio na realização dos hemogramas.

À Agener União- Saúde Animal, pelo apoio financeiro na aquisição de materiais.

## RESUMO

VIDAL JUNIOR, André William Masseaux. **Comparação entre protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas em cães: estudo celular.** 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Foi proposto por esse estudo avaliar dois protocolos (PA e PB) para obtenção de PRP canino autólogo, de fácil execução em ambulatório (método semiautomático) e de boa qualidade (capacidade de concentração de plaquetas, avaliação qualitativa da morfologia das plaquetas e reduzida contaminação com eritrócitos), para posteriormente propor diferentes indicações terapêuticas desses PRP como agentes moduladores de recuperação tecidual, de acordo com o padrão celular leucocitário observado. Para isso foram utilizados 20 cães (*Canis lupus familiaris*) atendidos no Hospital Veterinário da UFRRJ (HV), machos e fêmeas, com idade variando entre 1 e 7 anos (média 4 anos), considerados saudáveis clínica e hematologicamente que se destinavam para cirurgias eletivas e/ou consultas de rotina. Após tricotomia e antisepsia adequadas, eram coletados 8 mL de sangue por venopunção da jugular sendo imediatamente acondicionados em dois frascos de 4 mL, do tipo vacuntainer, contendo citrato de sódio a 3,2%. O protocolo A utilizando centrifugação dupla com 210 xG e 370 xG e protocolo B utilizando centrifugação dupla com 140 xG e 330 xG. Amostras de PRP obtidas a partir de cada protocolo foram destinadas a contagem de plaquetas, hemácias e leucócitos em câmara de Neubauer, contagem diferencial dos leucócitos e observação da morfologia das plaquetas em esfregaços. Analisou-se os dados (médias e desvios padrão) pelo Teste t com 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) utilizando-se correlação de *Pearson* para testar a relação entre a contagem de plaquetas e hemácias, plaquetas e leucócitos e leucócitos em relação as hemácias. Houve correlação negativa muito fraca entre plaquetas e leucócitos ( $\rho = -0,03$ ), negativa fraca entre plaquetas e hemácias ( $\rho = -0,3$ ) e correlação positiva forte entre leucócitos e hemácias ( $\rho = 0,75$ ). Embora o protocolo B não tenha alcançado a média um milhão de plaquetas desejado ( $979300 \pm 79631$  células/ $\mu\text{L}$ ), ambos os protocolos, A e B ( $4,42 \pm 1,61$  e  $3,85 \pm 1,55$  vezes mais plaquetas que o sangue total, respectivamente) ( $p < 0,05$ ) foram eficientes em concentrar plaquetas. Os prolongamentos citoplasmáticos evidenciando ativação plaquetária estiveram presentes em  $26,55 \pm 6,72$  % das plaquetas do protocolo A e  $26,25 \pm 7,03$  % nas do protocolo B ( $p > 0,05$ ). PA e PB apresentaram reduzido número de hemácias ( $p > 0,05$ ) consideradas contaminantes das amostras e, quanto a quantidade de leucócitos, o protocolo A apresentou mais glóbulos brancos ( $p < 0,05$ ) que o protocolo B com maiores concentrações de basófilos, segmentados e linfócitos.

**Palavras-chave:** fatores de crescimento, concentrado de plaquetas, terapia celular, caninos.

## ABSTRACT

VIDAL JUNIOR, André William Masseaux. **Comparison between protocols for obtaining platelet-rich plasma in dogs: a cellular study.** 2017. 67p. Dissertation (Master degree in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

It was proposed by this study to evaluate two protocols (PA and PB) to obtain autologous canine PRP, which is easy to perform in an ambulatory (semiautomatic method) and of good quality (platelet concentration, qualitative evaluation of platelet morphology and low contamination with Erythrocytes), to later propose different therapeutic indications of these PRPs as tissue modulating agents, according to the observed cellular leukocyte pattern. For this purpose, 20 dogs (*Canis lupus familiaris*) were used at the UFRRJ (HV) Veterinary Hospital, males and females, aged between 1 and 7 years (mean 4 years), considered clinically and hematologically healthy for elective surgeries and / or routine consultations. After adequate trichotomy and antisepsis, 8 mL of blood were collected by venipuncture of the jugular, being immediately packed in two 4 mL flasks, vacuntainer type, containing sodium citrate 3,2%. Protocol A using double centrifugation with 210 xG and 370 xG and protocol B using double centrifugation with 140 x G and 330 x G. PRP samples obtained from each protocol were used to count platelets, erythrocytes and leukocytes in the Neubauer chamber, differential leukocyte counting and observation of platelet morphology in smears. Data (mean and standard deviations) were analyzed by the 95% probability t test ( $p < 0,05$ ) using Pearson's correlation to test the relationship between platelet and erythrocyte counts, platelets and leukocytes and leukocytes in Relation to red blood cells. There was a very weak negative correlation between platelets and leukocytes ( $\rho = -0,03$ ), weak negative between platelets and erythrocytes ( $\rho = -0,3$ ) and strong positive correlation between leukocytes and erythrocytes ( $\rho = 0,75$ ). Although Protocol B did not reach the desired one million platelets average ( $979300 \pm 79631$  cells /  $\mu\text{L}$ ), both protocols, A and B ( $4,42 \pm 1,61$  and  $3,85 \pm 1,55$  times more platelets than Total blood, respectively) ( $p < 0,05$ ) were efficient in concentrating platelets. The cytoplasmic prolongations evidencing platelet activation were present in  $26,55 \pm 6,72\%$  of platelets of protocol A and  $26,25 \pm 7,03\%$  in those of protocol B ( $p > 0,05$ ). A and B presented a small number of red blood cells ( $p > 0,05$ ), which were considered to be contaminants of the samples and, for the quantity of leukocytes, protocol A presented more white blood cells ( $p < 0,05$ ) than protocol B with higher concentrations of basophils , and lymphocytes.

**Keywords:** growth factors, platelet concentrate, cell therapy, canines.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

μL- microlitro  
μm- micrometro  
ADP- adenosina difosfato  
CP- concentrado de plaquetas  
CTGF- fator de crescimento do tecido conjuntivo  
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético  
EGF- fator de crescimento epidérmico  
FC- fator de crescimento  
FGF- fator de crescimento fibroblástico  
fL- fentolitro  
Força G- força gravitacional  
HV- hospital veterinário  
IFN- interferon  
IGF- fator de crescimento semelhante à insulina  
IL- interleucina  
kDa- quilodalton  
LPC- Laboratório de Pesquisas Clínicas  
L-PRP- plasma rico em plaquetas leucocitário  
LQEPV- Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária  
MKs- megacariócitos  
mL- mililitro  
mm- milímetro  
MPM- metaloproteinase da matriz  
MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente à metilciclina  
MSSA- *Staphylococcus aureus* suscetível à metilciclina  
PA- protocolo A  
PB- protocolo B  
PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas  
PPP- plasma pobre em plaquetas  
P-PRP- plasma rico em plaquetas puro  
PRFC- plasma rico em fatores de crescimento  
PRP- plasma rico em plaquetas  
SFM- sistema fagocítico mononuclear  
TGF-β- fator de transformação beta  
TNF- fator de necrose tumoral  
tPA- ativador de plasminogênio tecidual  
VEGF- fator de crescimento vascular endotelial



## LISTAS DE FIGURAS

Figura 01: Plaquetas visualizadas em microscopia eletrônica. ....	04
Figura 2: Representação didática da ativação plaquetária pela trombina (estímulo agonista) com emissão de pseudópodos e liberação dos fatores de crescimento. ....	10
Figura 3: Representação esquemática dos conteúdos dos tubos após as centrifugações até obtenção do plasma rico em plaquetas. ....	20
Figura 4: Fluxograma para obtenção dos protocolos A e B a partir de sangue canino. ....	21
Figura 5: Grupo de cinco plaquetas ativadas (seta negra) e não ativada (seta vermelha) observadas em microscopia ótica de imersão, com objetiva de 100x. ....	23
Figura 6: Concentração de plaquetas nos diferentes protocolos (PA e PB, vermelho e verde respectivamente) para obtenção de plasma rico em plaquetas em comparação com sangue total (colunas azuis) de cães. ....	20 27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios de plaquetas, eritrócitos e leucócitos encontrados no sangue total e em dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães. ....	26
Tabela 2: Resumo estatístico da contagem de plaquetas em protocolos diferenciados para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães. ....	28
Tabela 3: Porcentagem média de plaquetas ativadas em dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães. ....	30
Tabela 4: Resumo estatístico da contagem de eritrócitos em protocolos diferenciados para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães. ....	31
Tabela 5: Resumo estatístico da contagem de leucócitos totais em protocolos diferenciados para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães. ....	32
Tabela 6: Valores médios da leucometria específica absoluta em dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães. ....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Plaquetas .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Plasma Rico em Plaquetas .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Uso do plasma rico em plaquetas .....	5
2.2.2 Obtenção de plasma rico em plaquetas .....	7
2.2.3 Ativação plaquetária.....	9
2.2.4 Fatores de crescimento e citocinas .....	11
2.2.5 Presença de leucócitos e hemácias .....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Local e Animais.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Avaliação hematológica.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Obtenção de Plasma Rico em Plaquetas.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Celularidade do plasma rico em plaquetas .....</b>	<b>21</b>
<b>3.5 Análise Estatística.....</b>	<b>23</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo é um hemocomponente do próprio paciente consistindo em grande concentração de plaquetas em pequeno volume de plasma. A principal importância terapêutica das plaquetas neste preparado é a presença de alfa-grânulos que sintetizam e liberam fatores de crescimento (FC) e citocinas (MARX, 2004). Os FC são peptídeos capazes de modular diversos processos celulares de ativação, diferenciação, mitogênese e angiogênese, tendo efeitos positivos na reparação de diversos tecidos orgânicos (SÁNCHEZ et al., 2003).

O uso de PRP tem bons resultados para reparação tecidual na medicina veterinária, odontologia e medicina humana, sendo utilizado em procedimentos de enxertia óssea na região alveolar para posteriormente realizar a fixação de implantes dentários, em cirurgias periodontais e maxilofaciais de seres humanos (ANITUA, 2001; WHITMAN; BERRY, 1998), procedimentos ortopédicos, neurocirúrgicos e de cirurgia reconstrutiva tanto em animais quanto em humanos (BHANOT; ALEX, 2002; MAZZUCCO et al., 2004).

O PRP é obtido a partir do sangue total, através de uma ou duas centrifugações, resultando em um pequeno volume de plasma com elevado número de plaquetas e FC que agem na recuperação de tecidos, estimulam a maturação celular e a migração fibroblástica e induzem a síntese de matriz extracelular.

Está sob interesse crescente a contribuição das terapias celulares estimulando regenerações teciduais e atuando como imunomoduladores ao influenciar a mobilização celular. A utilização do PRP devido à sua origem autóloga criou novas perspectivas na prática clínica e laboratorial. Os FC e citocinas com suas propriedades antibacterianas, regenerativas, anti e pró inflamatórias atuam no estímulo dos mecanismos de defesa contra infecções e na recuperação de diversos tecidos, além de ser um produto de fácil aquisição e baixo custo, o que o torna uma opção muito viável no tratamento de várias afecções na medicina veterinária.

A teoria que embasa o uso do PRP é coerente. Com base na ideia de que um determinado número de plaquetas já teria capacidade suficiente para interagir entre si e com outras células modulando e estimulando diversas respostas orgânicas, o aumento no número dessas, conseqüentemente, levaria a uma melhor e maior atividade do processo de recuperação tecidual.

A centrifugação é precisa e diferenciada para obtenção do PRP em cada espécie,

preservando as plaquetas e as deixando aptas a liberar os FC, e mesmo na mesma espécie, a variação no tempo e força G utilizados na centrifugação geram produtos com características celulares diferentes. Acredita-se que esses produtos de qualidade reconhecida mas com padrão celular diferente, podem ser indicados para procedimentos distintos, considerando-se os aspectos inflamatórios, vasculares e cicatriciais de cada caso da clínica e cirurgia veterinárias.

Nesse contexto, é proposto por esse estudo avaliar dois protocolos para obtenção de PRP canino autólogo, de fácil execução em ambulatório (método semiautomático) e de boa qualidade (capacidade de concentração de plaquetas, avaliação qualitativa da morfologia das plaquetas, caracterização qualitativa e quantitativa leucocitária e reduzida contaminação com eritrócitos).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Plaquetas

Os megacariócitos (MKs), células multinucleadas maiores presentes na medula óssea originam fragmentos que são as plaquetas. Se desenvolvem a partir de células mielóides progenitoras pluripotentes CD34+ que residem no tecido hematopoiético e na corrente sanguínea. As plaquetas surgem da fragmentação do citoplasma dos MKs, sendo liberadas diretamente na corrente sanguínea, ao redor do espaço hematopoiético medular. A produção de plaquetas é estimulada e regulada por citocinas, principalmente as interleucinas 1, 3, 6 e 11 e pelo hormônio trombopoietina (LEVEN, 2000; HARTWIG, 2003) que regula o desenvolvimento dos megacariócitos e a liberação das plaquetas (REBAR et al., 2003).

A concentração de plaquetas no sangue total dos cães pode variar entre 200.000 e 500.000 plaquetas por  $\mu\text{L}$  que permanecem viáveis por aproximadamente cinco a nove dias na circulação sanguínea e quando senis, são retiradas da circulação pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM). Oitenta por cento das plaquetas se encontram na circulação e 20% armazenadas no baço, podendo se mover livremente entre estes dois compartimentos (WEISS; WARDROP, 2010).

As plaquetas de mamíferos possuem em seu citoplasma três tipos de grânulos. Os grânulos alfa que contêm os FC, fatores de coagulação, citocinas e proteínas de adesão; os grânulos densos que são importantes na liberação de serotonina, cálcio, fósforo e ADP e os grânulos lisossomais que possuem ácido hidrolases, guanina, fosfolipases e cinases, enzimas com ações hidrolíticas e proteolíticas. Quando a plaqueta é ativada, emite pseudópodes (Figura 1) fazendo a comunicação com o meio externo, liberando todas as suas organelas e componentes para o tecido (WEISS; WARDROP, 2010).

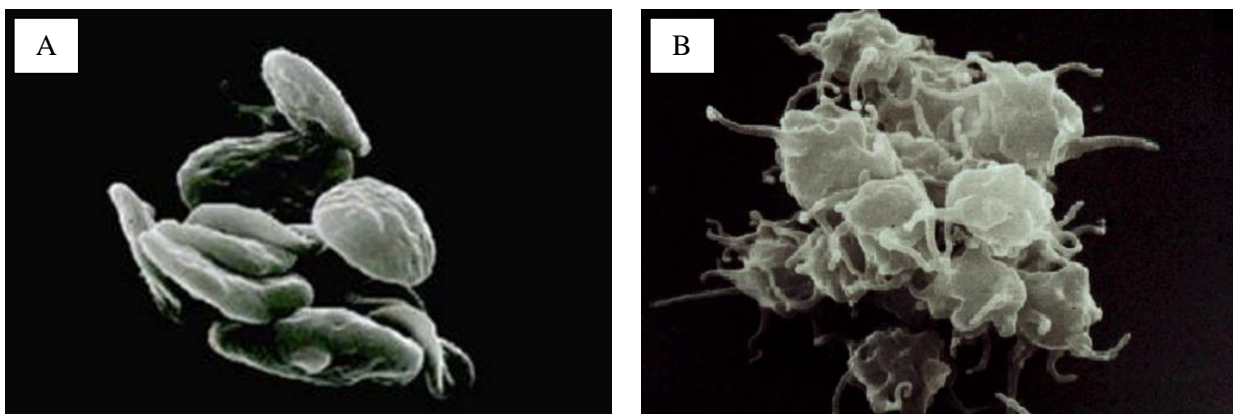


Figura 01: Plaquetas visualizadas em microscopia eletrônica. A) Agregação de plaquetas próximas a eritrócitos. B) Formação de pseudópodos. Fonte: *Department of Biostatistics & Epidemiology, College of Public Health, OUHSC*, [<https://www.ouhsc.edu/platelets/platelets/platelets%20intro.html>]. Acesso em 12 de dezembro de 2016.

O ADP induz a migração plaquetária e a serotonina produz contração de artérias lesionadas. Albumina, fibrinogênio, fibronectina, fator V, fator Va e fator Von Willebrand também estão contidos nos grânulos alfa, porém não são específicos das plaquetas (ANITUA, 1999). Esses e outros componentes são importantes às funções das plaquetas desde a formação de trombos e síntese da matriz extracelular durante a cicatrização até a modulação da inflamação (WEISS; WARDROP, 2010).

Além de atuar no processo de hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização, as plaquetas liberam diversos FC que estimulam a angiogênese com crescimento vascular e proliferação de fibroblastos, que por sua vez proporcionam um aumento na síntese de colágeno. Estas propriedades das plaquetas tornam o PRP um produto com grande potencial de estimular a recuperação tecidual (MARX, 2004).

## 2.2 Plasma Rico em Plaquetas

O PRP de maneira geral é autólogo, sendo constituído por um pequeno volume de plasma com grande concentração de plaquetas, FC e citocinas para migração epitelial, formação óssea e de tecido conjuntivo (MARX, 2004; CROVETTI et al., 2004; HENDERSON et al., 2003). O plasma rico em fatores de crescimento (PRFC) ou PRP tem uma concentração de plaquetas maior em comparação com o sangue periférico e devido as forças centrífugas no processo de preparação,

apresenta uma proporção maior de plaquetas e alta densidade quando comparado ao sangue total. As plaquetas mais densas são mais jovens, estando a poucos dias na corrente sanguínea e não apresentam grandes desgastes nem ativação, sendo assim, secretam uma concentração maior de FC em comparação com plaquetas de menor densidade, mais antigas (ANITUA et al., 2004).

O PRP é constituído basicamente por plasma, onde estão os fatores de coagulação (GOLDBERG, 1997), plaquetas, que degranulam liberando os FC e demais compostos, leucócitos, que agem contra infecção e poucas hemácias (MARX; GARG, 1999). O momento ideal para a coleta sanguínea é antes do estabelecimento da fluidoterapia e do procedimento cirúrgico iniciar, pois a administração de fluidos durante o ato anestesiológico dilui a concentração plaquetária e a contagem de plaquetas diminui durante a cirurgia, devido ao direcionamento para o local da intervenção para que ocorra coagulação (MARX, 2001).

A qualidade do PRP é mensurada principalmente pela capacidade de concentração de plaquetas. O PRP deve apresentar três a cinco vezes mais plaquetas que o sangue total (WHITLOW et al., 2008), no entanto, outros estudos indicam ser necessária uma concentração superior a 1 milhão de plaquetas/ $\mu\text{L}$  (MARX et al., 1998; LEMOS, 2002).

Diversos protocolos para obtenção de PRP foram propostos, obtendo produtos com diferentes características e conseqüentemente com diferentes indicações de uso. Nos últimos anos, diversos protocolos de PRP foram desenvolvidos principalmente para equinos, classificados de acordo com algumas peculiaridades. Os PRP líquidos são obtidos mediante adição de anticoagulantes para sua elaboração, podendo ser puros (P-PRP), concentrando quantidades pequenas de plaquetas (1,3 a 4 vezes a concentração basal) e apresentando concentrações leucocitárias menores ou similares ao sangue total ou podem ser leucocitários (L-PRP), concentrando plaquetas mais eficientemente (em torno de 5 vezes a concentração basal) e concentrando leucócitos 3 vezes ou mais em relação a concentração basal (CARMONA; LOPEZ; SANDOVAL, 2012).

### 2.2.1 Uso do plasma rico em plaquetas

Foi descrito o uso de cola de fibrina pela primeira vez em 1982, sendo demonstrado seu valor hemostático, ação adesiva e cicatrizante tecidual em cirurgia oral e bucomaxilofacial (MATRAS, 1982). Em 1994 empregou-se adesivo autólogo de fibrina para reconstrução mandibular associada à



enxertia óssea em 33 pacientes humanos. Tal adesivo demonstrou ter propriedades hemostáticas e acelerou em 50 % a formação óssea, sendo observado por radiografias incorporação e remodelamento ósseo na quarta semana no grupo que foi empregado a fibrina em comparação a detecção de tais sinais apenas na oitava semana no grupo controle, que utilizou somente a enxertia óssea. Tal benefício na reparação, foi atribuído a otimização da migração de fibroblastos e osteoblastos e retardar a proliferação bacterina. Tais resultados serviram de embasamento para os primeiros trabalhos utilizando PRP (TAYAPONGSAK et al., 1994).

O PRP aparece como opção em 1997, sendo empregado em cirurgia bucomaxilofacial e apresentando vantagens sobre a utilização da cola de fibrina, por ser um método mais prático ao se empregar sangue autólogo coletado no período pré-operatório imediato, não sendo necessário o processamento em bancos de sangue e torna maior o número de pacientes elegíveis ao processo de preparo do PRP, por não necessitar dos critérios de doação de sangue, além de as plaquetas presentes no PRP fornecerem fatores de crescimento que contribuem ao processo de reparação tecidual (WHITMAN et al., 1997).

No final da década de 1990, foi publicado estudo que utilizou sangue autólogo de pacientes humanos, que após processamento foram alcançadas concentrações plaquetárias 338% superiores aos níveis fisiológicos, sendo identificado na preparação fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de transformação. Tal hemocomponente, foi utilizado em falhas mandibulares humanas associados à enxertia óssea. Através de avaliações radiográficas, constatou-se que o uso do PRP propiciou maturidade óssea 1,62 a 2,16 vezes mais rápido em comparação com a enxertia apenas. Na avaliação histomorfométrica, a densidade óssea no grupo PRP foi de 74 % em relação aos 55,1% do grupo sem associação do PRP (MARX et al., 1998).

O uso de PRP foi basicamente caracterizado na medicina veterinária na clínica médica e cirúrgica de equinos, sendo as principais aplicações em afecções musculoesqueléticas (BOSCH et al., 2011) e feridas na pele de membros, devido a maior dificuldade de cicatrização desta região (MONTEIRO et al., 2009).

Nos cães, ocorreram benefícios do PRP associado ou não com outros biomateriais, como enxertos ósseos, na regeneração do tecido ósseo e integração em casos de fraturas experimentais (YOU et al., 2007; CASATI et al., 2007).

Existem modelos animais utilizados na caracterização dos benefícios do PRP na regeneração

tecidual, principalmente óssea. Em estudo anterior envolvendo osteotomias mandibulares para remoção de tumores em seres humanos, foi comparada radiograficamente a utilização de enxertos esponjosos autólogos com e sem associação ao PRP. O grupo que utilizou PRP, obteve formação de tecido ósseo 2,16 vezes mais maduro no período de dois meses, 1,88 vezes mais maduro no período de quatro meses e uma quantidade maior de osso formado em comparação com o grupo controle (MARX et al., 1998).

Outro estudo onde osteotomias eram realizadas em mandíbulas de cabras, após a fixação da placa ortopédica, sucedeu-se a enxertia autóloga com e sem associação ao PRP, demonstrou radiograficamente aumento considerável de formação óssea do grupo que fez uso de PRP em relação ao controle em análises histológicas e histomorfométricas demonstrou calo ósseo maior em três e seis semanas (FENNIS, et al., 2002; FENNIS et al., 2004).

A análise com microscopia de fluorescência em alvéolos dentários de coelhos submetidos a aplicação de PRP, demonstrou aceleração da formação óssea (TAMAE, 2005). Avaliações na consolidação óssea de cães tratados com enxertia associada ao PRP demonstraram resultados promissores, inclusive tendo uma cicatrização da ferida cirúrgica melhor e menos edema em até quinze dias em relação ao grupo que não utilizou associação ao PRP (BARBOSA et al., 2008).

Os caninos e felinos estão sujeitos à diversas enfermidades musculoesqueléticas e traumatismos (CHANDLER; BEALE, 2002) e o uso do PRP pode estimular a regeneração óssea (INTINI, 2009) destas espécies, como ocorre em humanos (GREPPI et al., 2011; SÁNCHEZ et al., 2003), cavalos (ARGUELLES et al., 2008) e cães em fraturas experimentais (BARBOSA et al., 2008; YOU et al., 2007).

### 2.2.2 Obtenção de plasma rico em plaquetas

Os métodos para obtenção do PRP, podem ser classificados em três tipos: método automático (aférese), semiautomático (centrifugação) e manual (coagulação em tubo) (VENDRUSCOLO et al., 2012). Existem vantagens e desvantagens em relação a cada técnica de preparo, no entanto, não se reconhece nenhum método sendo superior devido à falta de consenso sobre a concentração ideal de plaquetas no PRP (FOSTER et al., 2009).

O método automático é mais dispendioso, devido ao alto custo para aquisição do maquinário

e necessitando também de grandes volumes sanguíneos (> 450 ml). As vantagens estão na eficiente concentração de plaquetas, maior volume de PRP obtido e menor contaminação bacteriana (PEREIRA, 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012).

O método por centrifugação necessita de aquisição de maquinário próprio, no entanto, apresenta menor custo em relação ao método automático. Proporciona concentração plaquetária adequada a partir de pequenos volumes sanguíneos e menor chance de contaminação bacteriana em relação ao método manual (PEREIRA, 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012). É importante o treinamento de pessoal no processamento do material, pois é um método trabalhoso e passível de erro pelo operador (VENDRAMIN et al., 2009).

O método manual é o mais simples, não necessitando adquirir equipamentos específicos e podendo ser realizado em ambiente ambulatorial. Como desvantagem é o método mais passível de contaminação bacteriana e não permite concentração plaquetária tão eficiente como os métodos automático e semiautomático (PEREIRA, 2012).

O uso de força centrífuga é um processo crucial na separação das fases sanguíneas e consequente concentração plaquetária e alguns estudos sugerem que a obtenção do PRP pelo método de duas centrifugações é capaz de concentrar até sete vezes mais plaquetas na segunda centrifugação em relação a primeira (ARAKI et al., 2012; NAGATA et al., 2010). Protocolos de dupla centrifugação são indicados para cães (ALEIXO et al., 2011; BARBOSA et al., 2008), cavalos (ARGÜELLES et al., 2006), humanos (ANITUA et al., 2005) e coelhos (KANTHAN et al., 2011), no entanto, devido a características morfológicas plaquetárias dos gatos, como maior diâmetro (2-6  $\mu\text{m}$ ) (BOUDREAUX et al., 2010) e volume médio (8,6-14,1 fL) (BOUDREAUX; EBBE, 1998) e devido ao pequeno volume de amostra obtido, devem ser utilizadas forças rotacionais mais leves e centrifugação única, pois protocolo de dupla centrifugação nessa espécie leva a maior manipulação, risco de contaminação e redução na contagem final de plaquetas (SILVA et al., 2012; TEIXEIRA, 2014).

O método semiautomático por centrifugação única é indicado para felinos. Foi utilizado rotação branda de 85 xG por 6 minutos e concentrou uma quantidade significativa de plaquetas em felinos (26,16%) em relação a concentração basal, levando a um incremento de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-BB após 3 horas da ativação plaquetária (23,97 ng/mL e 1571,56 pg/mL respectivamente) e após 12 horas da ativação plaquetária (24,79 ng/mL e 1420,32 pg/mL respectivamente), em relação a concentração basal de tais fatores de crescimento (7,99 ng/mL e 365,89 pg/mL respectivamente) (SILVA et al.,

2012). O PRP obtido é classificado como P-PRP e tem potencial para uso clínico e experimental na medicina regenerativa em felinos, visto que trabalho anterior não caracterizou níveis de TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB e concentração de diversos tipos leucocitários (HAYWARD, 1999).

Protocolos para obtenção de PRP em espécies animais têm sido propostos com o objetivo de concentrar um maior número de plaquetas viáveis em um menor volume de plasma (ALEIXO et al., 2011; BARBOSA et al., 2008; ARGÜELLES et al., 2006; ANITUA et al., 2005; KANTHAN et al., 2011; SILVA et al., 2012). A possibilidade de preparar um PRP utilizando uma centrífuga convencional em ambiente laboratorial ou ambulatorial, permite a obtenção do PRP com menor custo (VENDRAMIN et al., 2006) e maior aplicabilidade em medicina veterinária.

Independentemente do protocolo utilizado, este deve aumentar a contagem plaquetária em uma concentração bem acima da encontrada no sangue total, preservando a estrutura e a função das plaquetas, pois se as plaquetas se romperem liberando os FC antecipadamente, a ação terapêutica do PRP estará prejudicada (LÓPEZ et al., 2012).

### 2.2.3 Ativação plaquetária

Os concentrados de plaquetas são utilizados na forma líquida ou imediatamente após a ativação plaquetária, com a finalidade de formar um agregado coagulado para melhorar a incorporação do preparado dependendo do local de aplicação. A ativação plaquetária geralmente é realizada mediante uso de sais de cálcio ou por trombina, podendo ter origem autóloga ou bovina.

A ação dos sais de cálcio ocorre devido ao íon cálcio ser um segundo mensageiro da cascata de ativação plaquetária, desencadeando diversas alterações em forma, secreção de grânulos e agregação (ROBERTS et al., 2004), que acarretam a ativação de integrinas, liberação de mediadores, ADP, tromboxano A<sub>2</sub> e atividade pró-coagulante pela formação de trombina (BERGMEIER; STEFANINI, 2009). A ativação pela trombina (Figura 2) ocorre devido a formação de fibrina a partir do fibrinogênio, formando um tampão hemostático (JENNINGS, 2009).

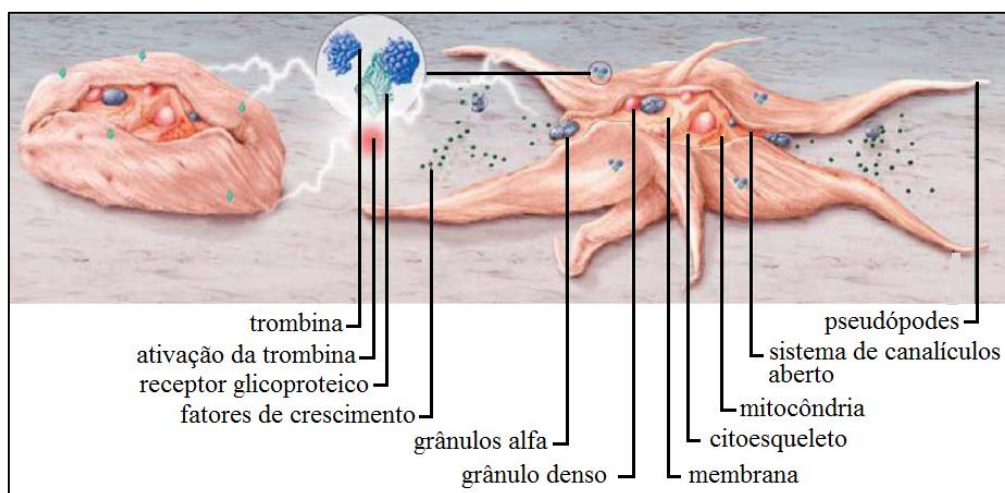


Figura 2: Representação didática da ativação plaquetária pela trombina (estímulo agonista) com emissão de pseudópodos e liberação dos fatores de crescimento. Adaptado de Everts et al. (2006).

São conhecidas diversas substâncias anticoagulantes, no entanto, o citrato de sódio é uma das com menor efeito na morfologia plaquetária, sendo um dos anticoagulantes de escolha na maioria dos protocolos para obtenção de PRP nos animais (TEIXEIRA, 2014).

Foi demonstrado que a ativação do coágulo por sais de cálcio ou por trombina, obtiveram resultados semelhantes, não havendo diferenças hematológicas significativas no PRP obtido por ambos os métodos (SILVA et al., 2012), visto que diversos compostos podem ser usados para a ativação, como o cloreto de cálcio (CARMONA et al., 2007), batroxobina (MAZZUCCO et al., 2008), trombina (MAZZUCCO et al., 2009) e colágeno tipo I (FUFA et al., 2008). No entanto, é conhecido que a utilização de trombina bovina em humanos pode acarretar na formação de anticorpos contra fatores de coagulação (ORTEL et al., 2001), assim como em ratos, que podem desenvolver inclusive anticorpos anti nucleares (SCHOENECKER et al., 2001), sendo portanto mais aconselhado o uso de sais de cálcio para a ativação do PRP.

Em estudo utilizando microscopia eletrônica para observação da morfologia plaquetária do PRP, foi demonstrado que a ativação apenas com cloreto de cálcio 10% resultou em 54% das plaquetas com ativação incerta, 24% ativadas, 20% em repouso e 2% danificadas, enquanto que o PRP sem ativação apresentou 49% das plaquetas com ativação incerta, 41% em repouso, 9% ativadas e 1% danificadas. Desta forma o cloreto de cálcio 10% demonstrou ser um ativador adequado e que

se o PRP for requerido na forma mais liquefeita, poderá ser utilizado sem prévia ativação, visto que apresenta expressiva quantidade de plaquetas ativadas e também em repouso, que são ativadas quando em contato com o tecido lesionado do paciente (ZANDIM et al., 2012).

#### 2.2.4 Fatores de crescimento e citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa (quilodaltons) que regulam reações imunológicas e inflamatórias. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteínases ativadas por mitógenos (OLIVEIRA et al., 2011). Citocinas são responsáveis pela produção, estimulação e diferenciação de múltiplos tipos celulares bem como pela produção de outras citocinas capazes de estimular ou de inibir a síntese de proteínas ou os efeitos biológicos de determinados tipos celulares ou de outras proteínas (CURFS et al., 1997).

As citocinas são armazenadas como moléculas pré-formadas e como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas são agrupadas em interleucinas (IL), numeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35, fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e Fatores de Crescimento (RAEBURN et al., 2002).

Citocinas se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória, reconhecidas como pró-inflamatórias (IL-1 alfa e beta, IL-6, IL-8 e o TNF) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e o fator transformador de crescimento  $\beta$ ) (CURFS et al., 1997).

O termo fator de crescimento (FC) que define a função do PRP denomina então um grupo de citocinas (BRAGA-SILVA et al., 2006) que podem ser secretados por várias moléculas e células reguladoras do nosso organismo. Estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular, morfogênese de tecidos e órgãos desde a embriogênese até a fase adulta, podendo atuar como agentes mitogênicos, melhorando a proliferação de certos tipos de células, ou morfogênicos, alterando o fenótipo celular (EVERTS et al., 2006). A síntese de DNA, quimiotaxia,

citodiferenciação e síntese de matriz extracelular são funções desses polipeptídeos. Essas moléculas são os iniciadores universais atuando como mediadores biológicos naturais de quase todos os processos de reparo e regeneração tecidual (SCHLIEPHAKE, 2002).

Quando as plaquetas são ativadas liberam, além dos fatores de coagulação, os FC. Esta secreção é mais intensa na primeira hora e as plaquetas continuam a sintetizar citocinas adicionais e FC por um mínimo de sete dias (SENZEL et al., 2009). Além de plaquetas ativadas os FC são secretados por leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, todas envolvidas no processo de coagulação e de cicatrização. Muitos FC com diferentes propriedades foram caracterizados, sendo produzidos por diferentes tipos celulares, como adipócitos, células sanguíneas, esqueléticas, dentre outras (GRAGEDA, 2004). As plaquetas além de exercerem funções hemostáticas, devido a agregação, geração de trombina a partir da protrombina e da formação de coágulos de fibrina, secretam também os FC responsáveis pela reparação tecidual e reativação da vascularização em processos inflamatórios e de angiogênese (ANITUA et al., 2004).

Os fatores de crescimento são polipeptídeos solúveis com atuação autócrina e/ou parácrina que orquestram grandes eventos biológicos de reparação tecidual, como a regulação de crescimento e diferenciação fenotípica de numerosos tipos celulares (VEGA; SUÁREZ; ALMAGRO, 2000). Como resposta aos sinais liberados pelos FC, as células locais e infiltradas sofrem mudanças na proliferação, diferenciação e produção de proteínas biológicas com diferentes efeitos, levando ao fenômeno de ativação celular (REED et al., 2000).

Foram caracterizados sete principais fatores de crescimento secretados ativamente pelas plaquetas e que atuam na fase inicial da cicatrização. São eles: três isômeros do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) – PDGF $\alpha\alpha$ , PDGF $\beta\beta$  e PDGF $\alpha\beta$  – dois fatores de crescimento transformadores beta (TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (MARX, 2004; FREYMILLER; AGHALOO, 2004; GREEN; KLINK, 1998). Os TGF atuam ativando os fibroblastos para formação de protocógeno levando a deposição de colágeno e cicatrização da ferida. Os PDGF, associados ou não com os TGF, aumentam a vascularização tecidual, estimulam a proliferação de fibroblastos, aumentam a quantidade de colágeno, estimulam produção de tecido de granulação e favorecem a osteogênese. O VEGF estimula a angiogênese, a mitogênese e a permeabilidade vascular e o EGF induz o crescimento de tecido epitelial e estimula a angiogênese (LOZADA et al., 2001; GREEN; KLINK, 1998; KNOX et al.,

1986).

O fator de crescimento derivado de plaqueta (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) é o primeiro a estar presente na ferida e guiar a neovascularização, a síntese de colágeno e a neoformação óssea. No sítio da ferida, ele tenta atingir as células-alvo, aderindo-se aos receptores da membrana celular e estabelecendo ligações de proteína tirosina-quinase. O aumento de suas concentrações nesses sítios parece acelerar os processos de reparo por estimular a quimiotaxia de fibroblastos, macrófagos e neutrófilos e regular a síntese de colágeno (PONTUAL; MAGINI, 2003). É sintetizado primariamente nos grânulos  $\alpha$ -plaquetários, podendo ser produzido e secretado também por macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e matriz óssea (PIERCE et al., 1991). Tem ação mitogênica sobre as células do tecido conjuntivo e fibroblastos, é um importante regulador na proliferação e quimiotaxia de células mesenquimais e estimula a reepitelização da pele quando na presença de lesões e perdas de tecidos (PONTUAL; MAGINI, 2003).

O fator de transformação beta (*Transforming growth factor*  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) constitui uma família de mediadores locais que regulam a proliferação e as funções da maioria das células. Este fator é liberado por macrófagos e fibroblastos, mas é nas plaquetas plasmáticas que se encontra sua maior concentração. Exerce ação reparadora e antiinflamatória de lesões e tecidos. Seus efeitos são variados, dependendo do tipo de célula afetada. Podem suprimir a proliferação celular, estimular a síntese da matriz extracelular, estimular a formação óssea ou atrair células por quimiotaxia (MARSOLAIS; FRENETTE, 2005) sendo a quimiotaxia e a mitogênese as funções principais dos TGF- $\beta$ . Os TGF- $\beta$  mais comuns no PRP são os TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2, que são ligados à cicatrização do tecido conjuntivo e à regeneração do tecido ósseo. O  $\beta$ 1 é encontrado nas plaquetas, linfócitos e neutrófilos, o  $\beta$ 2 nos extratos ósseos, plaquetas e neutrófilos (VILELLA, 2007). O TGF- $\beta$ 1 é o mais importante sendo responsável pela maturação celular, migração fibroblástica e síntese de matriz extracelular. Existe um leve antagonismo entre o TGF- $\beta$  e o PDGF (MARSOLAIS; FRENETTE, 2005) e em certas concentrações, a ação inibitória de TGF- $\beta$  é maior do que a ação proliferativa do PDGF (VILELLA, 2007).

O fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) age na proliferação e migração das células endoteliais, adaptação das integrinas aos receptores de VEGF e na diapedese das células endoteliais. É um potente indutor na formação do vaso sanguíneo atuando na neovascularização por aumentar a angiogênese e permeabilidade vascular (MARSOLAIS;



FRENETTE 2005). Atrai os fibroblastos para produção de tecido conjuntivo e participa também da produção de fibrina a partir do fibrinogênio e em cuja malha ocorre o crescimento das células endoteliais e fibroblastos (PONTUAL; MAGINI, 2003).

O fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth fator*, IGF) é secretado durante a formação óssea pelos osteoblastos aumentando a osteogênese e acelerando a deposição óssea. Existem dois tipos, IGF-I e IGF-II, que se aderem a um receptor de membrana celular específico que estimula a atividade da quinase, resultando na mitose de células precursoras do osso. A atividade quimiotática para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos são outras funções importantes (GIANNOBILE, 1999).

O fator de crescimento fibroblástico (*Fibroblast growth fator*, FGF) é um potente fator mitogênico para endotélio, condrócitos, fibroblastos e músculo liso, atua sobre a hematopoiese e é considerado um potente agente quimiotaxiador. É excessivamente liberado durante a injúria tecidual nas cirurgias ou traumatismos. Participa na angiogênese e, o FGF-2 em particular, tem a habilidade de induzir os estágios necessários à neovascularização. Outras funções incluem participação na migração de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais em tecidos danificados e migração do epitélio para formar a nova epiderme. Também desempenha uma função no desenvolvimento muscular esquelético (ROSIER et al., 1998).

O fator de crescimento epidermal (*Epidermal growth fator*, EGF), amplamente distribuído nas secreções e nos líquidos teciduais, é mitogênico para uma variedade de células epiteliais, hepatócitos e fibroblastos. É produzido por queratinócitos, macrófagos e outras células inflamatórias que migram para áreas onde está ocorrendo cicatrizações de feridas (STEENFOS, 1994).

O fator de crescimento do tecido conjuntivo (*Connective tissue growth fator*, CTGF) promove angiogênese; regeneração da cartilagem; fibrose e adesão plaquetária (KUBOTA et al., 2004).

#### 2.2.5 Presença de leucócitos e hemácias

O termo leucócito foi originado do grego, onde Leukos=branco e Kytos=célula, sendo conhecidos como as células brancas do sangue. Tal linhagem sanguínea deriva das células tronco

hematopoiéticas encontradas principalmente na medula óssea de adultos e em menor quantidade no sangue (KIEL et al., 2009; CLUITMANS et al., 1997). As células tronco hematopoiéticas podem ser diferenciadas em mieloblastos, em seguida em pró-granulócitos, para só então, se tornarem a linhagem granulocítica. Para formar linfócitos, as células indiferenciadas deverão gerar linfoblastos e para formação de monócitos, formarão monoblastos (KOEFFLER et al., 1985).

Os leucócitos com numerosos grânulos citoplasmáticos são denominados granulócitos, compreendendo os neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Os leucócitos sem marcação por grânulos no citoplasma são denominados agranulócitos, compreendendo os linfócitos e monócitos. Com o corante histológico hematoxilina e eosina, os neutrófilos apresentam coloração rósea neutra, os eosinófilos apresentam coloração avermelhada brilhante, enquanto os basófilos ficam caracterizados por citoplasma azul escuro (KOEFFLER et al., 1985; LEVY, 2000).

Os neutrófilos (polimorfonucleares) são essenciais na resposta imune inata, apresentando grânulos primários e secundários que secretam e armazenam proteínas antimicrobianas, enzimas e demais peptídeos ativos (LEVY, 2000). Os eosinófilos apresentam geralmente núcleo bilobulado e grânulos primários e secundários, estando proteínas citotóxicas nos grânulos secundários (LEVY, 2000). Os basófilos apresentam núcleo com 2 à 3 lobos e os grânulos são menos numerosos em comparação com os eosinófilos (KOEFFLER et al., 1985; LEVY, 2000).

Os linfócitos podem ser tipo B ou T, e podem variar de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, estando os pequenos linfócitos mais comumente na circulação e apresentando núcleos maiores em relação ao tamanho celular em comparação com linfócitos maiores (KOEFFLER et al., 1985; TRAVLOS, 2006). Os monócitos podem ter de 12 à 18  $\mu\text{m}$  de diâmetro e não apresentam estruturas citoplasmáticas facilmente identificáveis no microscópio óptico (KOEFFLER et al., 1985; TRAVLOS, 2006).

Em estudo envolvendo ratos trombocitopênicos, foi observado aumento na concentração de linfócitos T e monócitos na lesão em relação ao grupo controle e a reparação tecidual e expressão de fatores de crescimento TGF  $\beta$ 1 e VEGF eram iguais em comparação com ratos sem trombocitopenia, demonstrando que os leucócitos, são importantes moduladores da reparação tecidual também liberando citocinas e FC responsáveis pela regeneração de tecidos (SZPADERSKA et al., 2003).

Nos cães os neutrófilos são os leucócitos mais comumente encontrados no sangue de cães saudáveis, os linfócitos são menos numerosos que os neutrófilos, monócitos e neutrófilos são vistos menos frequentemente e os basófilos são visualizados raramente (WEISS; WARDROP, 2010).

Os neutrófilos fornecem a primeira linha de defesa contra organismos invasores, trauma tecidual ou qualquer sinal inflamatório indutor. Quando encontram um microrganismo, o fagocitam e tentam eliminar o patógeno, mas os mecanismos utilizados para eliminação do agente possuem a capacidade de lesionar o tecido do hospedeiro (WEISS; WARDROP, 2010). Os eosinófilos, embora possam de certa forma danificar o tecido do hospedeiro, são importantes na imunidade inata, adquirida e adaptativa e remodelamento tecidual a partir de liberação de citocinas (WEISS; WARDROP, 2010).

Alguns linfócitos desempenham papel na resposta imune inata (Células *Natural Killer* e células T), mas a maioria é responsável por mediar a imunidade adaptativa, regulando a produção de anticorpo, citotoxicidade e hipersensibilidade tardia (WEISS; WARDROP, 2010).

A presença de leucócitos no PRP é controversa (BIELECKI et al., 2007). Alguns autores alegam que a presença de células brancas confere a essa substância resistência natural aos processos infecciosos e/ou alérgicos, melhorando as expectativas dos tratamentos, uma vez que a principal função do sistema de defesa do organismo é a proteção contra microrganismos e substâncias estranhas (RUGGERI, 1997; MARX; GARG, 1999).

Altas concentrações leucocitárias no PRP podem retardar o processo cicatricial em tendão e articulação devido à maior expressão de citocinas inflamatórias (McCARREL et al., 2012; SCHNABEL et al., 2007; CARMONA et al., 2007), no entanto, em lesões de pele ou ósseas contaminadas decorrentes de trauma ou fratura experimental obtém benefícios com o uso de PRP com altos níveis leucocitários (MARX; GARG, 1999; BIELECKI et al., 2007; BARBOSA et al., 2008).

O L-PRP apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* semelhante ao da gentamicina e da oxacilina contra *Staphylococcus aureus* suscetível à metilciclina (MSSA), inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilciclina (MRSA) e *Escherichia coli*, mas não inibiu o crescimento de *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (BIELICKI et al., 2007). Outro estudo que avaliou a ação bactericida do PRP com leucócitos sobre *Staphylococcus aureus*, comprovou maior atividade antimicrobiana durante as primeiras horas,

sendo uma boa estratégia na profilaxia de infecções e como adjuvante após o debridamento cirúrgico de lesões contaminadas, mas não tendo grande efeito como tratamento de infecção já estabelecida (MOOJEN et al., 2008).

A função principal das hemácias é carrear oxigênio aos tecidos (WEISS; WARDROP, 2010). As hemácias no PRP podem aumentar a viscosidade do gel após ativação plaquetária (ROSSI, 2001), no entanto, o grupamento heme pode aumentar a percepção de dor após a aplicação devido à irritação local (HALPERN et al. 2012).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local e Animais

Estudo submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-IV, UFRRJ), sob o protocolo n°. 1827171016, com termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos responsáveis dos animais.

Vinte cães (*Canis lupus familiaris*) atendidos no Hospital Veterinário da UFRRJ (HV), machos e fêmeas, com idade variando entre 1 e 7 anos (média 4 anos), considerados saudáveis clínica e hematologicamente mediante histórico, anamnese, exame físico e hemograma e bioquímica sérica (alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, uréia e creatinina) foram submetidos a coleta de sangue em ambiente calmo e sem a presença de outros animais. Os cães desse estudo se destinavam no HV para cirurgias eletivas como orquiectomia ou ovariosalpingohisterectomia, tendo a confirmação de bom estado de saúde mediante realização de exames pré-operatórios. Parte dos cães foram trazidos por seus tutores para consultas de rotina, vacinações e demais procedimentos clínicos e, durante os exames realizados, não apresentavam alterações clínicas, hematólogicas e/ou sistêmicas que pudessem impedir de serem inseridos neste estudo.

Os hemogramas e demais exames complementares para atestar saúde dos animais foram realizados no HV e no do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) da UFRRJ, a confecção do PRP aconteceu no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária também na UFRRJ.

### 3.2 Avaliação hematológica

A avaliação hematológica foi de extrema importância pois evidenciava a celularidade em sangue total a ser utilizada na comparação com o PRP posteriormente obtido. Amostras de sangue foram colhidas, após antissepsia, por punção da veia cefálica com agulha 22G, em frascos de 4 ml contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), mantidas em uma caixa isotérmica com gelo e transportadas até o LQEPV onde foram processadas em até duas horas após

a coleta. Os hemogramas foram realizados em analisador hematológico por impedância<sup>1</sup> e foram realizados uma semana antes da obtenção de sangue para o preparo do PRP. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em microscópio ótico em imersão com objetiva de 100x a partir de esfregaços do sangue total em superfície de lâminas coradas com coloração do tipo instantânea (Panótico Rápido®) (JAIN, 1993). Do plasma foram mensuradas as concentrações de proteínas totais por refratometria (COLES, 1987).

### **3.3 Obtenção de Plasma Rico em Plaquetas**

Nos cães encaminhados para cirurgias eletivas colhia-se o sangue após a aplicação de medicação pré-anestésica com morfina 0,3 mg/kg via intramuscular, para redução de estresse, com todos os cuidados de antisepsia. Após tricotomia e antisepsia adequadas, eram coletados 8 mL de sangue por venopunção da jugular externa com uso de agulha 22G e seringa de 10 mL, sendo imediatamente acondicionado em dois frascos de 4 mL, do tipo vacuntainer, contendo citrato de sódio a 3,2%.

As amostras eram mantidas em caixa isotérmica contendo gelo e transportadas até o Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária também na UFRRJ, onde foi processado para confecção do PRP para serem submetidas a dois diferentes protocolos de obtenção do concentrado de plaquetas pelo método semi-automático de dupla centrifugação<sup>2</sup> em até duas horas após a coleta. Para o protocolo A (PA) (ALEIXO et al., 2011, modificado), o sangue era centrifugado a 210 xG durante 10 minutos. Após a separação do plasma sobrenadante, capa leucocitária e fração de hemácias, o plasma sobrenadante era arbitrariamente dividido em duas frações, com micropipetador automático era descartado 50% do plasma sobrenadante (metade superior) e a metade inferior do plasma e capa leucocitária eram acondicionadas em frasco do tipo vacuntainer sem aditivo para a segunda centrifugação à 370 xG por 10 minutos, sendo ao final visualizado o plasma sobrenadante e um botão de hemácias. Com o micropipetador automático, descartava-se 2/3 do plasma sobrenadante, sendo o restante considerado o PRP oriundo do protocolo A (Figura 3). No protocolo B (PB) (KIM et al., 2002

---

<sup>1</sup> Analisador hematológico POCH-100iV Diff, Sysmex®

<sup>2</sup> Centrifuga Daiki 80-2B, Centribio®

adaptado), repetiu-se os procedimentos porém com velocidades diferentes. A primeira centrifugação era a 140 xG durante 10 minutos e todo o plasma sobrenadante era submetido à segunda centrifugação à 330 xG também por 10 min. Ao final, restando o plasma e o botão de hemácias, sendo o PRP oriundo do protocolo B (Figura 4).

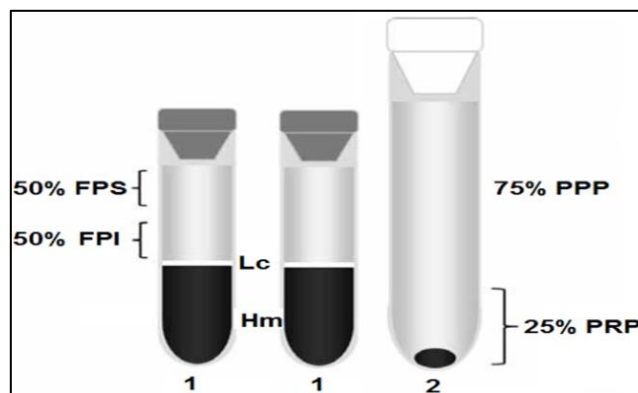


Figura 3: Representação esquemática dos conteúdos dos tubos após as centrifugações até obtenção do plasma rico em plaquetas, de 20 cães saudáveis. Os tubos de número 1 representam a primeira fração de plasma (FPS e FPI) obtida durante a 1ª centrifugação. O tubo de número 2 representa as frações de PRP e PPP obtidas após centrifugação das FPIs dos tubos iniciais.

FPS: fração plasmática superior; FPI: fração plasmática inferior; Lc: Capa leucocitária; Hm: Eritrócitos; PPP: plasma pobre em plaquetas; PRP: plasma rico em plaquetas. Adaptado de López et al, 2012.

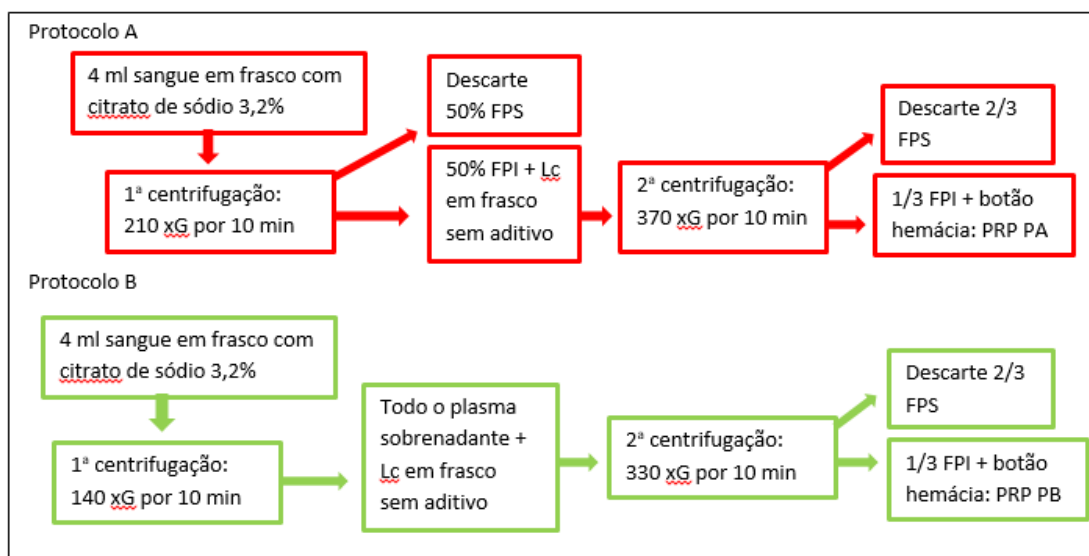


Figura 4: Fluxograma para obtenção dos protocolos A e B para obtenção de plasma rico em plaquetas a partir de sangue de 20 caninos.

FPS: fração plasmática superior; FPI: fração plasmática inferior; G: Força gravitacional; Lc: capa leucocitária; min: minuto; PA: protocolo A; PB: protocolo B; PRP: plasma rico em plaquetas.

### 3.4 Celularidade do plasma rico em plaquetas

Amostras de PRP obtidas a partir de cada protocolo eram diluídas e homogêneas para contagem de plaquetas, hemácias e leucócitos em câmara de Neubauer, após repouso em câmara úmida por 5 minutos. Realizava-se as contagens em duplicata, utilizando-se as médias dos valores obtidos para cada amostra. Para determinação do número de plaquetas, diluía-se o PRP a 1/200 (10 µl de PRP em 1990 µl de Líquido de Brecher com oxalato de amônia a 1%), a câmara de Neubauer era preenchida com tubo capilar e após 20 minutos se realizava a contagem em microscópio óptico com objetiva de 40x no retículo central (25 quadrados médios centrais = área de 1 mm<sup>2</sup>). As plaquetas se apresentavam como fragmentos celulares escuras e refringentes. Devido às propriedades intrínsecas das plaquetas (alta capacidade de agregação e facilidade de rompimento), cuidados como uso de material apenas de plástico foram tomados para se obter resultados exatos e reprodutíveis.



Para determinação do número de hemácias, diluía-se o PRP a 1/200 (10 µl de PRP em 1990 µl de solução fisiológica 0,9 %), a câmara de Neubauer era preenchida com tubo capilar e após 5 minutos se realizava a contagem em microscópio óptico com objetiva de 40x no retículo central (25 quadrados médios centrais). Para leucócitos, o PRP era diluído a 1/20 (20 µl de PRP em 380 µl de Líquido de Thoma), a câmara de Neubauer era preenchida com tubo capilar e após 5 minutos se realizava a contagem em microscópio óptico com objetiva de 40x nos quatro quadrados laterais maiores (área de 4 mm<sup>2</sup>).

A fórmula utilizada para obtenção do total de células, plaquetas, hemácias e leucócitos por µl de PRP era número de células contadas x diluição x 10 (altura de 0,1 mm) x área, conforme descrito por Coles (1984).

Fez-se a contagem diferencial dos leucócitos a partir de esfregaços delgados e uniformes dos PRPs em superfícies de lâminas, estas coradas com coloração instantânea (Panótico Rápido®) e observadas em microscópio ótico em imersão com objetiva de 100x. A contagem iniciava-se da região média do esfregaço e se estendia em direção a cauda percorrendo a lâmina em ziguezague. Contava-se 100 leucócitos tendo o resultado em % (leucometria relativa). Fazia-se ao final a relação com a leucometria global e a leucometria específica relativa para determinação da leucometria específica absoluta de cada PRP. A partir dos esfregaços em lâminas observou-se a morfologia das plaquetas (Figura 5), contava-se 100 plaquetas, observando-se a conformação destas através da formação de pseudópodes quando ativados e tendo o resultado em %.

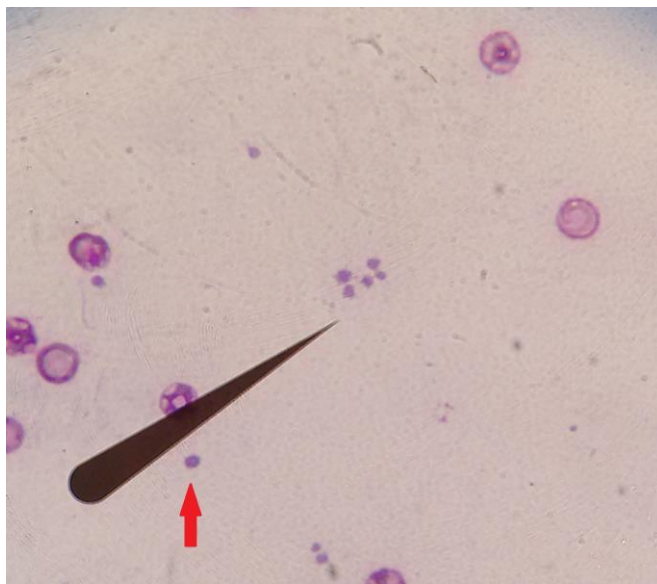


Figura 5: Grupo de cinco plaquetas ativadas (seta negra) e não ativada (seta vermelha) observadas em microscopia ótica de imersão, com objetiva de 100x em esfregaço de plasma rico em plaqueta obtido de cão saudável.

### 3.5 Análise Estatística

O cálculo da amostra foi para análises estatísticas em que seriam utilizados os testes de hipóteses paramétricos com duas amostras independentes, levando em consideração nível de confiança de 95%, erro máximo de 5% e desvio padrão da população em teste piloto que não ultrapassasse 10 pontos. O cálculo da amostra foi 16 animais, utilizamos 20 como forma de aumentar a confiabilidade.

Os resultados se apresentam como média, desvio padrão, valores mínimos e máximos. Analisou-se os dados pelo Teste t com 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). A correlação de *Pearson* foi usada para testar a relação entre a contagem de plaquetas e hemácias, plaquetas e leucócitos e leucócitos em relação as hemácias. As análises foram realizadas usando os programa Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, Califórnia, EUA) e Microsoft Excel 2010.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PRP apresenta diversas definições, concentrado de plaquetas (CP), plasma rico em FC, plasma enriquecido em plaquetas ou gel de plaquetas (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998). O PRP seria obtido a partir de uma centrifugação leve do sangue total, este plasma quando novamente centrifugado, desta vez em alta rotação, originaria o CP (BRASIL, 2010) enquanto que o gel de plaquetas seria obtido após a adição de trombina ou gluconato de cálcio ao PRP ou CP resultando na gelificação destes para facilitar a aplicação (EFEOGLU et al., 2004). Para melhor entendimento, o termo PRP se refere a um hemocomponente autólogo obtido a partir da centrifugação do sangue total contendo um elevado número de plaquetas e FC em um pequeno volume de plasma (VENDRAMIN et al., 2006).

A função de plaquetas é altamente vulnerável a um grande número de variáveis pré-analíticas, que vão desde a preparação do paciente até a análise final do sangue para confecção de resultados. Em particular, permanece muita controvérsia sobre a influência da aspiração manual ou a vácuo do sangue em tubos primários de coleta para testes da função plaquetária. Analisando fatores plaquetários em sangues colhidos por vácuo e aspiração manual, foi sugerido que o menor estresse celular gerado pela aspiração manual de sangue para o tubo primário de coleta impediria a ativação precoce das plaquetas, preservando assim a integridade de sua função, no entanto, tal trabalho indica a necessidade de definir ou validar, dentre outras variáveis, o tipo de tubo e colheita utilizado para cada objetivo (LIPPI et al., 2013).

O calibre da agulha também influencia diretamente a qualidade do PRP obtido devendo-se utilizar cateteres ou agulhas de maior calibre possível, com a finalidade de evitar ativação ou mesmo trauma às plaquetas que se encontram em estágio de repouso (TAYLOR et al., 2011) por esse motivo optou-se pelo uso de agulha 22G, sendo compatível com o porte dos cães e seringa de 10 mL e sem o uso de coleta à vácuo já que o objetivo de obtenção do PRP é um plasma com grande quantidade de plaquetas que devem sofrer ativação apenas no momento que antecede a aplicação ou durante esta.

O sangue dos animais encaminhados para cirurgia eram colhidos após aplicação de medicação pré-anestésica, para redução do estresse e menor interferência sobre as plaquetas, como estudo anterior demonstrou redução da atividade do ativador do plasminogênio tecidual (tPA),

aumento do tempo de lise do coágulo e do inibidor do plasminogênio tecidual em ratos submetidos a estresse agudo e intenso, demonstrado pelo aumento nos níveis séricos de serotonina (MALYSZKO et al., 1994). O estresse mental pode, portanto, levar a um aumento da ativação plaquetária, aumento da viscosidade sanguínea e reduções agudas do volume circulante plasmático (TOFLER et al., 1987)

Quanto a quantidade de sangue coletado, neste estudo o volume de 8 ml por animal de no mínimo 10 kg não representa problema algum em relação a sua saúde mesmo levando em consideração outras coletas para exames laboratoriais de rotina já que em cães doadores, pode ser doado 15 a 20% do volume sanguíneo e, calcula-se o volume sanguíneo estimado com a seguinte fórmula: Volume sanguíneo estimado (Litros) =  $0,08 - 0,09 \times \text{peso (kg)}$  (GONZÁLEZ; CERONI, 2008). Quando doador de sangue, cada cão pode doar até 22mL/kg a cada 10 a 21 dias se estiverem em boas condições de saúde, vacinados, desparasitados e bem suplementados, sendo o mais indicado intervalos de três a quatro meses quando em grandes quantidades (ANDRADE, 2008). O local de punção, veia jugular, se justifica pois outras vias de coleta não são adequadas para o preparo de PRP, pois em vasos de menor calibre aumenta o turbilhonamento e mais plaquetas são ativadas durante o procedimento (LIPPI et al., 2013) reduzindo a qualidade do produto final.

A escolha de um anticoagulante capaz de preservar a melhor funcionalidade, integridade e morfologia das plaquetas também deve ser avaliada. EDTA e citrato de sódio se ligam ao cálcio impedindo a coagulação (WEISS; WARDROP, 2010), entretanto, não é o mais indicado usar EDTA, pois embora seja o anticoagulante de escolha para a quantificação hematológica em sangue total nas espécies domésticas (SINK; FELDMAN, 2006), pode causar uma pseudoplaquetopenia (KOLENKIN, 2002) devido a uma aglutinação ou satelitismo plaquetário (rosetas de plaquetas em torno dos neutrófilos) (RODAK et al., 2011) o que poderia danificar a membrana plaquetária. O citrato de sódio é capaz de preservar a melhor funcionalidade, integridade e morfologia das plaquetas, além de ser capaz de reverter a ação anticoagulante com a adição de cálcio na amostra, viabilizando o seu uso como os géis de PRP (KERR, 2003). Assim, o citrato de sódio foi o anticoagulante de escolha para preparo do PRP.

A obtenção do PRP pelo método semiautomático exige a definição de um melhor protocolo com base na velocidade e tempo de centrifugação. Fatores como anticoagulante, sistema de coleta de sangue, quantidade de sangue a ser utilizado, treinamento pessoal, bem como, o método de

contagem das plaquetas (EFEUGLU et al., 2004; JAMESON, 2007) devem ser considerados na escolha do método. Como protocolos de apenas uma centrifugação resultam em uma mistura de plasma pobre em plaquetas e PRP com baixa concentração total de plaquetas (MACEDO, 2004) neste estudo foram selecionados apenas protocolos de dupla centrifugação.

Na tabela 1 são apresentados os resumos dos dados das variáveis (plaquetas, eritrócitos e leucócitos) no sangue total e em cada protocolo avaliado e na figura 6 é possível observar que em ambos os protocolos de obtenção de PRP avaliados o número de plaquetas diferiu ( $p < 0,05$ ) em relação ao sangue total.

Tabela 1: Valores médios de plaquetas, eritrócitos e leucócitos encontrados no sangue total e em plasma rico em plaquetas de 20 cães obtidos por dois protocolos.

	<b>SANGUE TOTAL</b>	<b>Protocolo A</b>	<b>Protocolo B</b>
	<b>PLAQUETAS (células/<math>\mu</math>l)</b>		
<b>Média</b>	285000	1135300	979300
<b>DP</b>	101359	158779	79631
<b>Mínimo</b>	118000	934000	830000
<b>Máximo</b>	609000	1536000	1162000
	<b>ERITRÓCITOS (células/<math>\mu</math>l)</b>		
<b>Média</b>	6577000	67800	59600
<b>DP</b>	906480	38437	48300
<b>Mínimo</b>	5040000	20000	10000
<b>Máximo</b>	8970000	148000	188000
	<b>LEUCÓCITOS (células/<math>\mu</math>l)</b>		
<b>Média</b>	12360	2740	1665
<b>DP</b>	6080	1056	1154
<b>Mínimo</b>	6100	1250	550
<b>Máximo</b>	33100	4850	4350

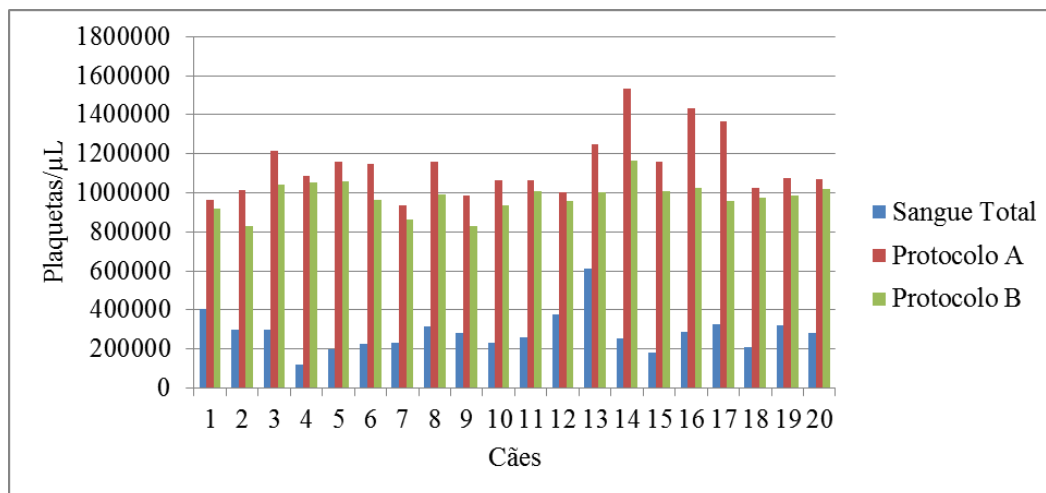


Figura 6: Concentração de plaquetas nos diferentes protocolos (PA e PB, vermelho e verde respectivamente) para obtenção de plasma rico em plaquetas em comparação com sangue total (colunas azuis) de 20 cães.

Os protocolos foram selecionados por serem simples, de baixo custo e concentraram plaquetas de forma eficiente (ALEIXO et al., 2011; KIM et al., 2002), no entanto, não foi realizada avaliação de leucócitos e hemácias em estudos anteriores. Foi realizada modificação do método de Aleixo et al. (2011) acrescentando a segunda centrifugação da metade inferior do plasma sobrenadante como tentativa de concentrar mais leucócitos e plaquetas e adaptação do método de Kim et al. (2002), sendo considerados protocolos A e B respectivamente.

A segunda centrifugação é mais forte em relação a primeira com intuito de permitir uma separação mais eficiente do que ao final é considerado plasma pobre em plaquetas (fração superior) do plasma rico em plaquetas (fração inferior) (BARROSO et al., 2007; AGHALLO et al., 2002). Velocidades de centrifugação excessivamente altas podem concentrar mais plaquetas, no entanto, geram produtos de qualidade inferior devido as lesões nas plaquetas e ativação precoce destas (ADLER; KENT, 2002; FERRAZ et al., 2007).

Houve correlação negativa fraca entre plaquetas e leucócitos ( $\rho = -0,03$ ), negativa fraca entre plaquetas e hemácias ( $\rho = -0,3$ ) e correlação positiva forte entre leucócitos e hemácias ( $\rho = 0,75$ ), resultados diferentes de estudo anterior, que evidenciou correlações positivas entre leucócitos e plaquetas (LÓPEZ et al., 2012).

A concentração plaquetária no PRP deve ser três a cinco vezes superior à presente no sangue

total (WHITLOW et al., 2008), sendo assim, ambos os protocolos, PA e PB ( $4,42 \pm 1,61$  e  $3,85 \pm 1,55$  vezes mais plaquetas que o sangue total, respectivamente) foram eficientes em concentrar plaquetas, e diferindo ( $p < 0,05$ ) entre si (Tabela 2), no entanto, outros estudos consideram ser necessária uma concentração superior a 1 milhão de plaquetas/ $\mu\text{L}$  (MARX et al., 1998; LEMOS, 2002), segundo esses autores o protocolo B não seria considerado de qualidade pois apresentou média de  $979300 \pm 79631$  células/ $\mu\text{L}$  (Tabela 1).

Tabela 2: Resumo estatístico da porcentagem de plaquetas em protocolos diferenciados para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães.

<b>Plaquetas (% médias em relação ao sangue total*)</b>		
	<b>Protocolo A</b>	<b>Protocolo B</b>
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	$442,13 \pm 161,93^a$	$385,70 \pm 155,05^b$
<b>Mínimo</b>	205,25	164,53
<b>Máximo</b>	918,64	893,22
<b>Valor de p</b>	0,0003	

Dados na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de confiança.

\*Valores médios encontrados após correlacionar individualmente o valor no sangue total em relação aos protocolos A e B para cada animal.

A média de plaquetas encontrada nos dois protocolos (PA e PB) foi superior aos observados utilizando método manual concentrando 250.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (CARMONA et al., 2007), utilizando métodos automáticos concentrando 490.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (MÉCARTER et al., 2003) e 3,77 vezes mais plaquetas em relação ao sangue total (SCHNABEL et al., 2007) e utilizando método semiautomático concentrando 855.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (SUTTER et al., 2004).

O L-PRP concentra cinco vezes mais plaquetas em relação ao sangue total e três vezes ou mais leucócitos e o P-PRP concentra menos plaquetas (1,3 à 4 vezes em relação ao sangue total) e menos leucócitos, estando em concentração menor ou igual ao sangue total (CARMONA et al., 2012). O PRP do protocolo A concentrou aproximadamente uma média de 4,4 vezes mais plaquetas e o Protocolo B uma média aproximada de 3,8 vezes mais plaquetas em relação ao sangue total, sendo ambos com menor concentração de leucócitos em relação ao sangue total. Ambos os protocolos produziram P-PRP, no entanto, o protocolo A, produziu um PRP mais enriquecido em

leucócitos que o protocolo B.

Os protocolos de dupla centrifugação são indicados para atingirem uma concentração de plaquetas adequadas em cães (ALEIXO et al., 2011; BARBOSA et al., 2008), como foi confirmado pelo presente estudo, como tendo um incremento entre 3 e 5 vezes a concentração no sangue total, como indicado por estudo anterior (WHITLOW et al., 2008), mas somente o protocolo A atingiu concentração média superior a 1 milhão de plaquetas/ $\mu\text{L}$ , sendo considerado PRP de excelente qualidade (MARX et al., 1998; LEMOS et al., 2002). Em todos os pacientes o protocolo A gerou PRP com maior concentração plaquetária em relação ao protocolo B (Figura 6).

Os protocolos quando realizados pelos autores em seus experimentos originais, ambos concentraram mais plaquetas em comparação ao presente trabalho, pois Aleixo et al. (2011) atingiu concentrações médias de 1.303.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (incremento de 550%) e no PRP obtido pelo protocolo A deste estudo obteve-se uma média de 1.135.300 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (incremento de  $442,13 \pm 161,93\%$ ), mas com ambos sendo superiores a 1 milhão de plaquetas/ $\mu\text{L}$ . Já o protocolo de Kim et al. (2002) concentrou uma média de 1.735.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (incremento de 392%) e no presente estudo o protocolo B concentrou apenas 979.300 plaquetas/ $\mu\text{L}$  porém com incremento de  $385,70 \pm 155,05\%$  em relação ao sangue total dos animais estudados. Trabalho anterior reproduzindo o protocolo de obtenção de Kim et al. (2002) também não atingiu a concentração de plaquetas descrita no artigo original, apresentando incremento de 51,4 à 385,17% da concentração de plaquetas (SILVA et al., 2007).

As plaquetas permanecem no seu estado original, não ativado, quando estão no interior dos vasos com um endotélio intacto e saudável. A ausência de fatores de ativação e a liberação de prostaciclina (prostaglandina I<sub>2</sub>) pelo endotélio saudável mantém este estado. No entanto, quando as plaquetas entram em contato com uma ruptura no endotélio, entram também em contato com moléculas que desencadeiam sua ativação (WEISS; WARDROP, 2010). Há grande importância de se reconhecer se as plaquetas do PRP foram ou não ativadas no processamento, caso um grande número de plaquetas tenha sido ativada e estejam fora de seu estágio de repouso, os FC são liberados precocemente alterando a qualidade do PRP. Na literatura não definiu-se ainda o máximo de plaquetas que possam estar previamente ativadas sem grande interferência na eficácia do PRP. Na Tabela 3 observa-se que nesse estudo a ativação não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os protocolos sendo relativamente baixa.



Tabela 3: Porcentagem média de plaquetas ativadas em dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães.

<b>Plaquetas Ativadas (%)</b>		
	<b>Protocolo A</b>	<b>Protocolo B</b>
<b>Média ± DP</b>	26,55 ± 6,72 <sup>a</sup>	26,25 ± 7,03 <sup>a</sup>
<b>Mínimo</b>	11	13
<b>Máximo</b>	39	57
<b>Valor de p</b>	0,89	

Dados na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de confiança.

É recomendado para avaliar a qualidade do hemocomponente, a visualização morfológica das plaquetas por microscopia em esfregaço do PRP, visto que após ativação são formados pseudópodes (WEISS; WARDROP, 2010) liberando antecipadamente os fatores de crescimento (EPPLEY et al., 2004). Estudo anterior, não houve alterações na morfologia das plaquetas do PRP obtido, empregando-se microscopia direta (ALEIXO et al., 2011), no entanto, estudo utilizando microscopia eletrônica para visualização da morfologia plaquetária em PRP detectou 49% das plaquetas com ativação incerta, 41% em repouso, 9% ativadas e 1% danificadas (ZANDIN et al., 2012). No presente trabalho, foi possível detectar diminutos prolongamentos citoplasmáticos evidenciando ativação plaquetária em 26,55 ± 6,72 % das plaquetas do protocolo A e 26,25 ± 7,03 % nas do protocolo B, não apresentando diferença estatística entre ambas. No entanto, não existe uma quantidade estabelecida de plaquetas que devem estar inativas para ser considerado o ideal.

Sabendo-se que o tamanho e o peso das plaquetas, hemácias e leucócitos determinam o protocolo mais efetivo para concentrar plaquetas em cada espécie (LÓPEZ et al., 2012) e que o processo de centrifugação e separação do plasma deve ser executado com muita precisão para separar as plaquetas dos eritrócitos que são considerados contaminantes das amostras de PRP (MARX, 2004), ambos os protocolos foram considerados de boa qualidade por ter reduzido número de células consideradas contaminantes e sem diferença ( $p > 0,050$ ) entre os PRP avaliados (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo estatístico da porcentagem de eritrócitos em protocolos diferenciados para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães.

<b>Eritrócitos (% em relação ao sangue total)</b>		
	<b>Protocolo A</b>	<b>Protocolo B</b>
<b>Média ± DP</b>	1,04 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,72 <sup>a</sup>
<b>Mínimo</b>	0,30	0,15
<b>Máximo</b>	2,42	3,07
<b>Valor de p</b>	0,48	

Dados na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de confiança.

Anteriormente foi correlacionado menor número de hemácias à menor força gravitacional (PEREIRA, 2012), corroborando com os dados do presente estudo, já que o protocolo B com menores forças gravitacionais (140 xG e 330 xG) em relação ao protocolo A (210 xG e 370 xG), foi o que menos concentrou hemácias. Porém, nos protocolos de menor força gravitacional foi verificado um menor número de plaquetas (PEREIRA, 2012), assim como neste estudo, o que reduziria a qualidade do produto final, diferindo de trabalho utilizando sangue equino, onde foi observado altas contagens de plaquetas associados à menores forças de centrifugação (VENDRUSCOLO et al., 2012).

A presença de eritrócitos no PRP pode ter um efeito irritante devido ao grupo heme, assim, menos hemácias podem permitir menos dor após a aplicação (HALPERN et al. 2012). As hemácias no PRP podem contribuir para a formação de gel após a ativação do PRP (ROSSI, 2001), facilitando sua aplicação dependendo do sítio de inoculação, como maior facilidade de aplicação na forma de gel em falhas ósseas (BARBOSA et al., 2008).

Avaliando-se a quantidade de leucócitos nos PRP obtidos, o protocolo A apresentou mais glóbulos brancos diferindo ( $p < 0,05$ ) do protocolo B (Tabela 5), sendo a presença dessas células motivo de amplo debate em pesquisas.

Tabela 5: Resumo estatístico da porcentagem de leucócitos totais em protocolos diferenciados para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães.

<b>Leucócitos (% em relação ao sangue total)</b>		
	<b>Protocolo A</b>	<b>Protocolo B</b>
<b>Média ± DP</b>	26,41 ± 16,10 <sup>a</sup>	15,25 ± 11,84 <sup>b</sup>
<b>Mínimo</b>	10,27	5,13
<b>Máximo</b>	72,13	45,90
<b>Valor de p</b>	0,01	

Dados na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de confiança.

O aumento do número de leucócitos pode melhorar o reparo tecidual devido às citocinas contidas nos glóbulos brancos, mas também pode aumentar a inflamação local e, portanto, pode impedir a recuperação dos tecidos. O efeito de leucócitos dentro de uma preparação do PRP deve ser específico de acordo com a aplicação e com o tecido que se deseja recuperar (CASTILLO et al., 2010). No entanto, não existe consenso sobre a função dos leucócitos no PRP (BIELECKI et al., 2007)

Foi recomendado minimizar o número de leucócitos no PRP quando se deseja utilizá-lo em articulações de equinos (CARMONA et al., 2007) e em humanos a presença de leucócitos no PRP também não foi considerado um fator positivo, por relacionarem a presença de leucócitos ao aumento do catabolismo e diminuição da síntese de matriz extracelular nos tecidos (McCARREL; FORTIER, 2009). Isto pode interferir na ação regenerativa do PRP em tecidos (uso intra-articular, por exemplo) já que parece haver uma correlação positiva entre as células brancas do sangue e o fator de necrose tumoral e a IL-1 (McCARREL; FORTIER, 2009), pois os leucócitos produzem citocinas inflamatórias, tendo efeitos catabólicos *in vivo* (SCHNABEL et al., 2007).

Em concordância com os efeitos deletérios dos leucócitos, em estudo de proliferação celular em lesões tendíneas utilizando-se plasma rico em plaquetas leucocitário (L-PRP) e plasma rico em plaquetas puro (P-PRP), foi observado que ambos os tratamentos induziram a diferenciação de células progenitoras do tendão em tenócitos ativos. No entanto, o L-PRP induziu predominantemente alterações catabólicas e inflamatórias em tenócitos diferenciados, aumentou a

expressão de genes marcadores catabólicos, metaloproteinases de matriz, interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e produção de prostaglandina E2 (PGE 2). Em contraste, o P-PRP induziu principalmente alterações anabólicas, aumentou a expressão genética de genes anabólicos, da actina de músculo liso e colágeno de tipos I e III (ZHOU et al., 2015). Foi indicado apenas o uso do P-PRP em injeções intra-articulares como forma segura de se evitar o catabolismo e falha na recuperação tecidual (MATTEO et al., 2016).

Concentrações altas da linhagem branca no PRP podem causar maior expressão de citocinas inflamatórias, resultando em reparação tecidual de qualidade inferior em tendão de equinos (McCARREL et al., 2012) e articular em equinos (CARMONA et al., 2007), extrapolando tal resultado para cães, o PRP obtido do protocolo B, devido à menor concentração de leucócitos é mais indicado em lesões tendíneas e articulares em cães, devendo ser realizado estudo para avaliar sua aplicabilidade.

Os leucócitos no PRP podem ainda ter um efeito prejudicial quando em armazenamento, resultando numa queda significativa no pH, no aumento do consumo de glicose, na produção de ácido láctico e na libertação de LDH durante o armazenamento prejudicando a condição das plaquetas e inutilizando-as em até 5 dias de armazenamento (SINGH et al., 2009). Os autores que listam os efeitos prejudiciais dos glóbulos brancos são, na maioria, os que obtém PRP por aférese para armazenamento prolongado em bolsas de transfusão. Ao se optar por preparo de PRP em tubos, pelo método semiautomático, como o proposto por este estudo, pensa-se na aplicação em até 2 horas após a obtenção do mesmo, não tendo o PRP influencia dos efeitos deletérios a longo prazo dos leucócitos no armazenamento de plaquetas.

Foram observadas melhora nos processos de cicatrização óssea e de tecidos moles com o uso de L-PRP (YUAN et al., 2012). O PRP com concentração leucocitária alta associado à fratura experimental em tíbia de cães, resultou em uma reparação mais rápida e eficiente quando comparada ao grupo controle (sem o PRP) (BARBOSA et al., 2008), sendo assim, no caso de fraturas o mais adequado seria o uso do PRP obtido pelo protocolo A. Trabalhos citam o efeito protetor contra infecções no PRP devido aos leucócitos (MARX; GARG, 1999; BIELECKI et al., 2007), mas em determinada concentração (não estabelecida em consenso) podem ter efeitos prejudiciais à reparação tecidual, como descrito principalmente em tendões e lesões articulares (McCARREL et al., 2012; SCHNABEL et al., 2007; CARMONA et al., 2007), no entanto, foi

descrito resultado promissor da ação osteogênica do PRP com concentrações de 3,8 a 5,9 vezes mais leucócitos em relação ao sangue total (BARBOSA et al., 2008), no presente estudo ambos os protocolos obtiveram concentrações leucocitárias inferiores ao do sangue total, reduzindo desta forma possíveis efeitos deletérios de tais tipos celulares sobre a reparação tecidual.

Na ortopedia veterinária, comumente ocorrem fraturas ou lesões articulares. O processo de consolidação de uma fratura é formado por um conjunto de eventos celulares e moleculares sequenciados, onde ocorrerá a o restabelecimento do estado inicial a fim de suportar cargas mecânicas (HULSE; HYMAN, 2007; ROSELLÓ et al., 2013).

O PRP obtido por centrifugação se mostra uma ferramenta de baixo custo e com precocidade na osteogênese em relação ao grupo controle (sem PRP), havendo uniformidade de trabeculado ósseo e incorporação do enxerto no grupo com associação do PRP ao enxerto ósseo autólogo (BARBOSA et al., 2008), no entanto, o uso de PRP associado à hidroxiapatita não acelerou formação de calo óssea em relação ao uso somente da hidroxiapatita (SILVA et al., 2007).

Em modelo experimental com *minipigs*, o uso do PRP não aumentou o formação de calo ósseo quando combinado a enxerto xenogênico, no entanto, quando utilizado de forma única definiu maior produção de osso novo, assim como correlação direta entre maior quantidade de plaquetas e maior formação de osso novo (WILTFANG et al., 2004).

A aplicação de PRP em defeitos ósseos ao redor de implantes dentários caninos, não revelou benefício na formação óssea (CASATI et al., 2007), no entanto, tal resultado pode ser devido a concentração de plaquetas não ter alcançado níveis superiores à 1 milhão/ $\mu$ L, como demonstrado aumento de formação óssea acima deste limite em estudos (MARX et al., 1998; JENSEN et al., 2004).

Os FCs auxiliam também a cura de feridas atraindo células não diferenciadas na matriz recém-formada e desencadeando a divisão celular mas em determinado momento, o PRP pode suprimir a liberação de citocinas e limitar a inflamação, interagindo com macrófagos para melhorar a cicatrização e regeneração do tecido promover novo crescimento capilar e acelerar a epitelização em feridas crônicas. Tipos específicos de leucócitos também fazem quimiotaxia para o foco da lesão e se presentes no PRP podem acelerar a regeneração tecidual ou interferir negativamente na recuperação de determinados tecidos (LACCI; DARDIK, 2010). Quanto à leucometria específica, os valores encontrados estão na tabela 6.

Tabela 6: Valores médios da leucometria específica absoluta em dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas de 20 cães.

<b>LEUCOMETRIA ESPECÍFICA (células/<math>\mu</math>L)</b>			
	<b>Protocolo A</b>		<b>Protocolo B</b>
<b>Basófilo</b>			
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	8,15 $\pm$ 15,04 <sup>a</sup>		0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
<b>Mínimo</b>	0		0
<b>Máximo</b>	45		0
<b>Valor de p</b>		0,02	
<b>Eosinófilo</b>			
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	19,12 $\pm$ 42,74 <sup>a</sup>		18,65 $\pm$ 42,66 <sup>a</sup>
<b>Mínimo</b>	0		0
<b>Máximo</b>	176		168
<b>Valor de p</b>		0,97	
<b>Bastão</b>			
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	79,45 $\pm$ 38,79 <sup>a</sup>		64,15 $\pm$ 69,15 <sup>a</sup>
<b>Mínimo</b>	42		5,5
<b>Máximo</b>	178		300
<b>Valor de p</b>		0,39	
<b>Segmentados</b>			
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	410,25 $\pm$ 143,44 <sup>a</sup>		244,25 $\pm$ 162,83 <sup>b</sup>
<b>Mínimo</b>	196		83
<b>Máximo</b>	780		713
<b>Valor de p</b>		0,001	
<b>Linfócito</b>			
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	2214,72 $\pm$ 922,92 <sup>a</sup>		1340,2 $\pm$ 949,58 <sup>b</sup>
<b>Mínimo</b>	988		451
<b>Máximo</b>	4074		3785
<b>Valor de p</b>		0,005	
<b>Monócito</b>			
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	2,22 $\pm$ 9,95 <sup>a</sup>		0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
<b>Mínimo</b>	0		0

**Máximo**  
**Valor de p**

45

0  
0,32

---

Dados na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística a 95% de confiança.

A função primária dos basófilos é liberar histamina em resposta aos alérgenos. Histamina aumenta o fluxo sanguíneo resultando em aumento da inflamação. Histamina também estimula os neutrófilos e eosinófilos a deixarem a corrente sanguínea para destruir antígenos sendo os neutrófilos os primeiros a iniciarem a defesa celular. Sob sinalização dos basófilos, os neutrófilos respondem imediatamente liberando enzimas que destroem as bactérias e antígenos variados e liberam também citocinas e FC que auxiliam na regeneração. Sem a presença de basófilos, os neutrófilos respondem a sinais de tecidos lesionados ou as proteínas de bactérias invasoras (WEISS; WARDROP, 2010). PRP com alta concentração de basófilos, como o oriundo do protocolo A devem ser evitados em tecidos em que se deseja uma resposta inflamatória reduzida.

Os neutrófilos quando em grande número no PRP liberam MPM que podem levar a um aumento dos danos musculares após a lesão. A concentração de neutrófilos no PRP tem se mostrado positivamente correlacionada com a expressão de MPM-3 e MPM-13 catabólicas em explantes de tendões equinos, apoiando a correlação entre o aumento da concentração não só de plaquetas mas também de leucócitos à níveis elevados de algumas citocinas inflamatórias, o que sugere prejuízo e um possível efeito negativo dos glóbulos brancos sobre a cicatrização de determinados tecidos (SCHNABEL et al., 2007). Os PRP ricos em neutrófilos devem ser evitados em lesões tendíneas e em infiltrações osteoarticulares, levando em consideração o efeito catabólico das MPM, mas apresentam grande funcionalidade na presença de lesões ósseas devido as propriedade antimicrobianas e osteoregenerativas (BARBOSA et al., 2008).

Estudo anterior demonstrou presença de glóbulos brancos particularmente concentrados em PRP, predominantemente linfócitos (UBEZIO et al., 2014), como neste estudo, e demonstrou que o conteúdo total de biomoduladores (como os FC) no plasma autólogo rico em plaquetas não é influenciado pelo status dos linfócitos (UBEZIO et al., 2014). Foi sugerido que períodos de tempo mais longos na centrifugação aumentaram ligeiramente a recuperação plaquetária e diminuíram as concentrações de leucócitos na camada superior. Portanto, o tempo pode ser um parâmetro de controle quando se necessita de níveis baixos de glóbulos brancos, tais como linfócitos, na amostra

de PRP (PEREZ et al., 2014).

A presença de leucócitos no PRP de humanos é benéfica contribuindo como resistência natural a processos infecciosos e/ou alérgicos. Em feridas a aplicabilidade do PRP rico em leucócitos se apresenta como boa alternativa (MARX; GARG, 1999). A cicatrização do tecido conjuntivo começa com uma cascata inflamatória, seguida de fases de proliferação, regeneração e remodelação. O efeito do PRP provavelmente depende um pouco da cascata de cicatrização inflamatória que pode ser inibida por drogas anti-inflamatórias não esteroides (AINEs) (SHEN et al., 2005), sendo a recomendação atual para evitar o uso de AINEs por uma semana antes e duas semanas após a injeção de PRP, embora esta recomendação seja algo arbitrária e seja necessário um estudo mais aprofundado.

A razão para a utilização de PRP em feridas consiste no fornecimento de uma vasta gama de moléculas bioativas derivadas de plaquetas e leucócitos, que promovem a cicatrização, além das propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas de PRP demonstradas contra *Staphylococcus aureus* (BIELECKI et al., 2007; MOOJEN et al., 2008; MARIANI et al., 2014; INTRAVIA et al., 2014, DRAGO et al., 2014) e *Escherichia coli* (BIELECKI et al., 2007) em ensaios clínicos (YUAN et al., 2012) e *in vitro* (BIELECKI et al., 2007; MOOJEN et al., 2008).

Apesar de algumas evidências sugerirem que fragmentos de plaquetas contêm moléculas com efeito microbicida o mecanismo do efeito antibacteriano do PRP não é totalmente compreendido. Uma hipótese sugerida é que as plaquetas são capazes de se ligar, agregar e internalizar microrganismos e tem funções citotóxicas liberando uma variedade de peptídeos com efeito antimicrobiano direto (TANG et al., 2002; TRIER et al., 2008), desta forma tanto as plaquetas quanto os leucócitos apresentam moléculas bioativas e/ou atividade capazes de combater infecções melhorando o processo de cicatrização tecidual, sendo assim, os protocolos A e B apresentam potencial para aplicação em feridas.

Há um entendimento que o PRP quando enriquecido em leucócitos como o protocolo A, se destina a aplicações em cirurgia de trauma com contaminação, incluindo cicatrização óssea, cicatrização aguda de feridas de tecidos moles e reparação de lesões agudas de músculos, tendões, ligamentos e cartilagens causadas por trauma (YUAN et al., 2012).



## 5 CONCLUSÕES

Ambos os protocolos concentraram plaquetas de forma eficiente e sem diferença entre a ativação das plaquetas, no entanto, apenas o protocolo A atingiu média de concentração superior a 1 milhão de plaquetas/  $\mu\text{L}$ .

O protocolo A levou a formação de PRP com concentração de leucócitos mais alta que o protocolo B, sendo que ambos os protocolos concentraram majoritariamente mais linfócitos em relação aos outros tipos leucocitários. O PRP obtido pelo PA obteve uma concentração maior de basófilos, neutrófilos e linfócitos em relação ao do PB.

Não houve diferença na concentração de eritrócitos entre ambos os protocolos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S.C.; KENT, K.J. Enhancing wound healing with growth factors. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 10, n. 2, p. 129-146, 2002.

AGHALLO, T.L; MOY, P.K; FREYMILLER, E.G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects. A pilot Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.60, p.1176-1181, 2002.

AITHAL, H.P.; SINGH, G.R.; BISHT, G.S. Fractures in dogs: A survey of 402 cases. **Indian Journal Veterinary Surgery**, v. 20, n. 15, p. 15-21, 1999.

ALEIXO, G. A. S., COELHO, M. C. O. C.; TEIXEIRA, M. N.; MESQUITA, E. P.; OLIVEIRA, F. F.; ZUBIETA, L. M. V.; ALMEIDA, T. L. C.; GUIMARÃES, A. L. N.; MAIA, F. C.; ZACARIAS, T. F. L.; SANTOS, S. M. L. G.; LIMA, C. P. S. Comparação entre dois protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 567–573, 2011.

ANDRADE, S.F. Manual de terapêutica veterinária. São Paulo: Roca, 2008. 912p. GONZÁLEZ, F.H.D.; CERONI, S. Patologia clínica veterinária: texto introdutório. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 342 p.

ANITUA E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Internal Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, p. 529–535, 1999.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M.; AZOFRA, J.; ZALDUENDO, M. M.; FUENTE, M.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 23, n. 2, p. 281–286, 2005.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.

ANITUA, E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. **Practical procedures e aesthetic dentistry**, vitoria gasteiz, v. 13, n. 6, p. 487-493, 2001.

ARAKI, J.; JONA, M.; ETO, H.; AOI, N.; KATO, H.; SUGA, H.; DOI, K.; YATOMI, Y.; YOSHIMURA, K. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. **Tissue Engineering**. v. 18, n. 3, p. 176–185, 2012.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J.U.; CLIMENT, F.; MUÑOZ, E.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, v. 162, n. 7, p. 208–211, 2008.

ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTINEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 237–245, 2006.

BARBOSA, A. L. T.; CARLO, R. J. D.; GOMES, H. C.; OLIVEIRA, A. C.; MONTEIRO, B. S.; CARLO, B. N. D. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 38, n. 5, p. 1335-1340, 2008.

BARROSO, C.S.T.; BENITO, J.C.; PUIG, A.G. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. **Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial**, v.29, p.240-248, 2007.

BERGMEIER, W.; STEFANINI, L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 7, Suppl 1, p. 187–190, 2009.

BHANOT, S.; ALEX, J. C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. **Facial Plastic Surgery**. v. 18, n. 1, p. 27-33, 2002.

BIELECKI, T.M.; GAZDZIK, T.S.; ARENDT, J.; SZCZEPANSKI, T.; KROL, W.; WIELKOSZYNSKI, T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 89, p. 417–420, 2007.

BOSCH, G.; RENÉ, V. W. P.; BARNEVELD, A.; SCHIE, V. H. T. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. **Veterinary journal**, v. 187, n. 1, p. 92–98, 2011.

BOUDREAUX, M. K.; OSBORNE, C. D.; HERRE, A. C.; RIVERA, E.R.; SPANGLER, E. A. Unique structure of the M loop region of  $\beta$ 1-tubulin may contribute to size variability of platelets in the family Felidae. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 4, p. 417–423, 2010.

BOUDREAUX, M. K.; EBBE, S. Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. **Comparative Haematology International**, v. 8, n. 1, p. 16–20, 1998.

BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.R.; MENTA, C.; ATKINSON, E.A.; MACHADO, D.C.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G.L.; BAES, C.V.W.; SILVA, V.D.; COSTA, J.C. Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do PRPna regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervoso periférico em rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.5, p.273-275, 2006. BUBENIK, L.J.; SMITH, M.M. Infecções ortopédicas. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Barueri, SP. Manole. p. 1862-1875, 2007.

CANDINI, A.L. **Avaliação do efeito do Plasma Rico em Plaquetas fotoestimulado pelo laser de baixa potência no processo de regeneração óssea**. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, Universidade do Vale do Paraíba, 2001.

CARMONA, J. U.; ARGUELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 4, p. 167–170, 2007.

CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C., SANDOVAL, J.: Review of the currently available system to obtain platelet related products to treat equine musculoskeletal injuries. **Recent Patents on Regenerative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 148-159, 2012.

CARTER, C.A.; JOLLYA, D.G.; WORDEN, C.E.; HENDRENA, D.G.; KANE, C.J.M. Platelet rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, n.3, p.244-255, 2003.

CASATI, M. Z.; de VASCONCELOS GURGEL, B. C.; GONÇALVES, P. F.; PIMENTEL, S. P.; da ROCHA NOGUEIRA FILHO, G.; NOCITI, F. H. Jr.; SALLUM, E. A. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects--a pilot study in dogs. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 36, n. 2, p. 132–136, 2007.

CASTILLO, T.N.; POULIOT, M.A.; KIM, H.J.; DRAGOO, J.L. Comparison of Growth Factor and Platelet Concentration From Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems. **The American Journal of Sports Medicine**. v.39, p.266–271, 2010.

CHANDLER, J. C.; BEALE, B. S. Feline orthopedics. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 17, n. 4, p. 190–203, 2002.

CLUITMANS, F.H.; ESENDAM, B.H.; VEENHOF, W.F.; LANDEGENT, J.E.; WILLEMZE, R.; FALKENBURG, J.H. The role of cytokines and hematopoietic growth factors in the autocrine/paracrine regulation of inducible hematopoiesis. **Annals of Hematology**, 1997, v. 75, n. 1, p. 27-31, 1997.

COLES, E.H. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: **Patologia clínica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, Cap. 5, p.144-163, 1984.

COLES, E.H. **Veterinary Clinical Pathology**, 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987, 421p.

CROVETTI, G.; MARTINELLI, G.; ISSI, M.; BARONE, M.; GUIZZARD, M.; CAMPANATI, B.; MORONI, M.; CARABELLI, A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfusion and Apheresis Science**. v. 30, n. 2, p. 145-151, 2004.

CURFS, J.H.A.J.; MEIS, J.F.G.M.; JHOOGKAMP-KORSTANJE, A. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

DALLABRIDA, A. L.; SCHOSSLER, J. E.; de AGUIAR, E. S. V.; AMENDOLA, G. F.; da SILVA, J. H. S.; SOARES, J. M. D. Análise Biomecânica ex vivo de Dois Métodos de Osteossíntese de Fratura Diafisária Transversal em Fêmur de cães. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 116-120, 2005.

DALLABRIDA, A. L. **Osteossíntese femural em cães através de transfixação esquelética interna: proposição de técnica**; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J.; **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. 4. ed. São Paulo. Roca. p. 388, 2006.

DI MATTEO, B.; KON, E.; FILARDO, G. Intra-articular platelet-rich plasma for the treatment of osteoarthritis. **Annals of Translational Medicine**, v.4, n.3, p.63, 2016.

DRAGO, L.; BORTOLIN, M.; VASSENA, C.; ROMANÒ, C.L.; TASCHIERI, S.; FABBRO, M.D. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. **Plos One**, v. 9, n.9, p. 1-5, 2014

EFEOGLU, C.; AKCAY, Y.D.; ERTURK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 1403-1407, 2004.

EPPLEY, B.L.; WOODSELL, J.E.; HIGGINS, J.B.S. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plastic Reconstructive Surgery**, v.114, p.1502-1508, 2004.

EVERTS, P.A.; KNAPE, J.T.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J.P.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, E.P.; BOX, H.A.; VAN ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **Journal of Extracorporeal Technology**, v. 38, n. 2 p. 174-187, 2006.

FENNIS, J. P.M; STOELINGA, P. J. W.; JANSEN, J. A. Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**. v. 31, n. 3, p. 281-286, 2002.

FENNIS, J. P. M.; STOELINGA, P. J. W.; JANSEN, J. A. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goat. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**. v. 33, n. 1, p. 48-55, 2004.

FERRAZ, V.C.M.; FERRIGNO, C.R.A.; SCHMAEDECKE, A. Platelet concentration of platelet rich plasma from dogs, obtained through three centrifugation speeds. **Brazilian Journal of Veterinary Research And Animal Science**, v.44, p.435-440, 2007.

FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, M. B.; RODEO, S. A. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 37, n. 11, p. 2259-2272, 2009.

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

FUFA, D.; SHEALY, B.; JACOBSON, M.; KEVY, S.; MURRAY, M. M. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 66, n. 4, p. 684-690, 2008.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfers. In: **Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. Illinois: Quintessence, p.231-243, 1999.

GIORDANO, P. P.; PADILHA FILHO, J. G.; LOLLI JR, J. Haste intramedular bloqueada modificada aplicada ao fêmur: Estudo clínico e experimental em cães. **Ars Veterinária**. Jaboticabal, SP, v. 22, n. 3, p. 184-191, 2006.

GOLDBERG, S. Descomplicando a fisiologia. In: **Tratado de fisiologia médica**. 8.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p.61-65, 1997.

GREEN, D. M.; KLINK, B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 101, n. 4, p. 1161-1162, 1998.

GREPPI, N.; MAZZUCCO, L.; GALETTI, G.; BONA, F.; PETRILLO, E.; SMACCHIA, C.; RASPOLINI, E.; COSSOVICH, P.; CAPRIOLI, R.; BORZINI, P.; REBULLA, P.; MARCONI, M. Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 39, n. 2, p. 73–80, 2011.

HALPERN, B. C.; CHAUDHURY, S.; RODEO, S. A. The Role of Platelet-Rich Plasma in Inducing Musculoskeletal Tissue Healing. **HSS Journal**, v.8, n.2, p.137–145, 2012.

HARTWIG, J. The birth of the platelet. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v.1, p. 1580-1586, 2003.

HAYWARD, R. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. **Cardiovascular Research**, v. 41, n. 1, p. 65–76, 1999.

HENDERSON, J. L.; CUPP, C. L.; ROSS, E. V.; SHICK, P. C.; KEEFE, M. A.; WESTER, D. C.; HANNON, T.; MCCONNELL, D. The effects of autologous platelet gel on wound healing. **Ear Nose Throat Journal**. v. 82, n. 8, p. 598-602, 2003.

HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e Biologia das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Barueri, SP. Manole, p. 1785-1792, 2007.

INTINI, G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 4956–4966, 2009.

INTRAVIA, J.; ALLEN, D.A.; DURANT, T.J.; MCCARTHY, M.B.; RUSSELL, R.; BEITZEL, K.; COTE, M.P.; DIAS, F.; MAZZOCCA, A.D. In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. **Muscles Ligaments Tendons Journal**, v. 8, n. 4, Suppl. 1, p. 79-84, 2014.

JAIN, N.C. **Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, 1993. 417 p.

JAMESON, C.A. Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. **Laboratory Medicine**, v.38, p.39- 42, 2007.



JENNINGS, L. K. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, n. 2, p. 248–257, 2009.

JENSEN, T. B.; RAHNEK, O.; OVERGAARD, S.; SOBALLE, K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p. 653–658, 2004.

JOHNSON, J. A.; AUSTIN, C.; BREUR, G. J. Incidence of canine appendicular musculoskeletal disorders in 16 veterinary teaching hospitals from 1980 through 1989. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 7, n. 56, p. 56-69, 1994.

KANTHAN, S. R.; KAVITHA, G.; ADDI, S.; CHOON, D. S.; KAMARUL, T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. **Injury**, v. 42, n. 8, p. 782–789, 2011.

KERR, M.G. Plaquetas (trombócitos) e fatores de coagulação, p.45-59. In: Ibid. (Ed.), **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. São Paulo: Rocca, 2003.

KIEL, M.J.; ACAR, M.; RADICE, G.L.; MORRISON, S.J. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 2, p. 170-179, 2009.

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

KNOX, P.; CROOKS, S.; RIMMER, C. S. Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots. **Journal of Cell Biology**. v. 102, n. 1, p. 2318-2323, 1986.

KOEFFLER, H.P.; YELTON, L.; PROKOCIMER, M.; HIRIJI, K. Study of differentiation of fresh myelogenous leukemic cells by compounds that induce a human promyelocytic leukemic line (HL-60) to differentiate. **Leukemia Research**, v. 9, n. 1, p. 73-81, 1985.

KOLENKIN, S.M. Automatic blood platelet count. A method for controlling correctness of an analyzer performance. **Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika**, v.8, p.33-35. 2002.

KUBOTA, S.; KAWATA, K.; YANAGITA, T.; DOI, H.; KITO, T.; TAKIGAWA, M. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. **Journal of Biochemistry**, v.136, n.3, p.279-282, 2004.

LEMOS, J.J. **Utilização de PRP em enxertos ósseos – Proposta de um protocolo de obtenção simplificado**. 2002. Online. Disponível em: [<http://www.dentaria.com/artigos/ver/?art=58>]. Acesso em: 08 de dezembro de 2016.

LEVEN, E.R. Megakaryocytes. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, et al (eds) **Schulman's veterinary hematology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, p. 443-447, 2000.

LEVY, O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2664-2672, 2000.

LIPPI, G., IPPOLITO, L., ZOBBI, V., SANDEI, F., & FAVALORO, E. J. Sample collection and platelet function testing: influence of vacuum or aspiration principle on PFA-100 test results. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.24, n.6, p. 666-669, 2013.

LÓPEZ, C; GIRALDO, C.E.; CARMONA, J.U. Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 44, p. 109-115, 2012.

LOZADA, J. L. CAPLANIS, N. PROUSSAEFS, P.; WILLARSEN, J.; KAMMEYER, G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I – Background and processing techniques. **Journal of Oral Implantology**. v. 27, n. 1, p. 38-42, 2001.

MAALA, C. P.; CELO, E. M. A study on the anatomical locations, incidence and causes of fractures in dogs. Philippine **Journal Veterinary Medicine**, v. 14, n. 137, p. 137-143, 1975.

MARSOLAIS, D.; FRENETT, J. Inflammation and tendon healing. **Médecine Sciences**, Paris, v. 21, n. 2, p. 180-186, 2005.

McCARRREL, T.; FORTIER, L.A. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, thehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **Journal of Orthopaedic Research**, v.27, p.1033-1042, 2009.

MCCARREL, T.; MINAS, T.; FORTIER, L.A. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. **The Journal of Bone e Joint Surgery**, v. 94, n. 143, p. 141-148, 2012.

MACEDO, A.P. **Plasma rico em plaquetas: uma análise quantitativa e qualitativa de dois protocolos de obtenção**. 2004. 64f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MALYSZKO, J., URANO, T., TAKADA, Y., TAKADA, A. Stress-dependent changes in fibrinolysis, serotonin and platelet aggregation in rats. **Life Sciences**. v.54, p. 1275-80, 1994.

MARIANI, E.; FILARDO, G.; CANELLA, V.; BERLINGERI, A.; BIELLI, A.; CATTINI, L.; LANDINI, M.P.; KON, E.; MARCACCI, M.; FACCHINI, A. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. **Cytotherapy**, v. 16, n. 9, p. 1294-304, 2014.

MARX, R.E. Platelet-rich plasm: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.62, p.489-496, 2004.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS. J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasm: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**. v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In.: **The sinus bone graft**. Colorado: Quintessense, p.183-189, 1999.

MARX, R. E. Platelet-rich plasm: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.

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.

MATRAS, H. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 10, p. 617-622, 1982.

MAZZUCCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E.; BORZINI, P.; Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. **Vox sanguinis**, v. 94, n. 3, p. 202–208, 2008.

MAZZUCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E.; GUASCHINO, R.; BORZINI, P. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. **Vox sanguinis**, v. 97, n. 2, p. 110–118, 2009.

MAZZUCCO, L.; MEDICI, D.; SERRA, M.; PANIZZA, R.; RIVARA, G.; ORECCHIA, S.; LIBENER, R.; CATTANA, E.; LEVIS, A.; BETTA, P. G.; BORZINI, P. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. **Transfusion**. v. 44, n. 7, p. 1013-1018, 2004.

MILLIS, D. L.; JACKSON, A.M. Uniões tardias, Não-uniões e Más-uniões. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Barueri, SP. Manole, p. 1849-1861, 2007.

MONTEIRO, S. O.; LEPAGE, O. M.; THEORET, C. L. **Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses**. American Journal of Veterinary Research. v. 70, n. 2, p. 277-282, 2009.

MOOJEN, D.J.; EVERTS, P.A.; SCHURE, R.M.; OVERDEVEST, E.P.; VAN ZUNDERT, A.; KNAPE, J.T.; CASTELEIN, R.M.; CREMERS, L.B.; DHERT, W.J. Antimicrobial activity of plateletleukocyte gel against Staphylococcus aureus. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, p. 404-410, 2008.

NAGATA, M. J. H.; MESSORA, M. R.; FURLANETO, F. A. C. Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. **European Journal of Dentistry**. v. 4, n. 4, p. 395–402, 2010.

NUNAMAKER, D. Osteomyelitis. In: NEWTON, C.; NUNAMAKER, D. **Textbook of Small Animal Orthopaedics**. J. B. Lippincott, Philadelphia, p. 499, 1985.

OLIVEIRA C.M.B.; SAKATA, R.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

ORTEL, T. L.; MERCER, M. C.; THAMES, E. H.; MOORE, K. D.; LAWSON, J. H. Immunologic impact and clinical outcomes after surgical exposure to bovine thrombin. **Annals of surgery**, v. 233, n. 1, p. 88–96, 2001.

PEREIRA, R. C. F. **Avaliação de sete protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP)**. 2012. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Santa Maria, RS, Brasil:Universidade Federal de Santa Maria- Centro de Ciências Rurais, 2012.

PEREZ, A.G.; LANA, J.F.; RODRIGUES, A.A.; LUZO, A.C.; BELANGERO, W.D.; SANTANA, M.H. Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. **International Scholarly Research Notices: Hematology**. vol. 2014, Article ID 176060, p.1-8, 2014.

PIERCE, G.F.; MUSTOE, T.A.; ALTROCK, B.W.; DEUEL, T.F.; THOMASON, A. Role of platelets-derived growth factoring wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v.45, n.4, p.319-326, 1991.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Delayed union and nonunion. In: PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. **Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair**. 3. ed. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 154, 1997.

PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento. São Paulo: Santos, 308p, 2003.

RAEBURN, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A.; ARYA, J.; HARKEN, A.H. Cytokines for surgeons. **American Journal of Surgery**, v. 183, p. 268-273, 2002.

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

REED, G. L.; FITZGERALD, M. L.; POLGAR, J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. **Blood**. v. 96, n. 10, p. 3334-3342, 2000.

ROBERTS, D. E.; MCNICOL, A.; BOSE, R. Mechanism of Collagen Activation in Human Platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19421–19430, 2004.

RODAK, B.F.; FRITSMA, G.A., KEOHANE, E.M. **Hematology: clinical principles and applications**. 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2011. 864p.

ROSELLÓ, M. G. LÓPEZ, M. D. C. POVEDA, J. M. C.; BALLETBÓ, M. G.; SAEGUSA, A. W.; BERTOMEU, R. C. La ingeniería tisular en traumatología. In: POVEDA, J. M. C.; ZARAGOZA, M. R. **Manual práctico de traumatología y ortopedia en pequeños animales**. Inter-médica, p 247-268, 2013.

ROSIER, R.N. O'KEEFE, R.J.; HICKS, D.G. The potential role of transforming growth factor beta in fracture. **Healing.Clinical Orthopaedics Related Research**, Philadelphia, Suppl.355, p.294-300, 1998.

ROSSI, R. **Modificação do protocolo simplificado para obtenção do PRP**. 2001. Capturado em 12 jun. 2015. Online. Disponível na Internet: <http://www.dentalnet.com.br/bibliotecageral.htm>

RUGGERI, Z.M. Mechanisms initialing platelet thrombus formation. **Thrombosis and Haemostasis**, v.78, n.1, p.611-616, 1997

SÁNCHEZ, M.; AZOFRA, J.; ANITUA, E.; ANDIA, I.; PADILLA, S.; SANTISTEBAN, J.; MUJIKA, I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 10, p. 1648–1652, 2003.

SÁNCHEZ, A.R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L.I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **Int. J. Oral Maxillofacial Implants**, v.18, n. 1, p.93-103, 2003.

SCHLIEPHAKE, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Guildford, v.31, n.5, p.469-484, 2002.

SCHNABEL, L.V., MOHAMMED, H.O., MILLER, B.J., MCDERMOTT, W.G., JACOBSON, M.S., SANTANGELO, K.S. AND FORTIER, L.A. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopedic Research**, v. 25, p: 230–240, 2007.

SCHOENECKER, J. G.; JOHNSON, R. K.; LESHER, A. P.; DAY, J. D.; LOVE, S. D.; HOFFMAN, M. R.; ORTEL, T. L.; PARKER, W.; LAWSON, J. H. Exposure of mice to topical

bovine thrombin induces systemic autoimmunity. **The American journal of pathology**, v. 159, n. 5, p. 1957–1969, 2001.

SENZEL, L.; GNATENKO, D.V.; BAHOU, W.F. The platelet proteome. *Current Opinion. Hematology*, v.5, p.329-333, 2009.

SHEN, W.; LI, Y.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. **The American Journal of Pathology**. v.167, p.1105–1117, 2005.

SILVA, R. F.; ÁLVAREZ, M. E.; RÍOS, D. L.; LÓPEZ, C.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. Evaluation of the effect of calcium gluconate and bovine thrombin on the temporal release of transforming growth factor beta 1 and platelet-derived growth factor isoform BB from feline platelet concentrates. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 212, p. 7, 2012.

SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. 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.

SIMPSON, D. J.; LEWIS, D. D. Fraturas do fêmur. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Barueri, SP. Manole. p 2059-2086, 2007.

SIMON, R. Fixação Interna das Fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Barueri, SP. Manole, p 1798- 1817, 2007.

SINGH, R. P.; MARWAHA, N.; MALHOTRA, P.; DASH, S. Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. **Asian Journal of Transfusion Science**, v.3, n.2, p.86–94, 2009.

SINK, C. A.; FELDMAN, B. F. **Urinálise e Hematologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

STEENFOS, H.H. Growth factors and wound healing. **Scandinavian Journal Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, Göteborg, v.28, n.2, p.95-105, 1994.

SUTTER, W.W.; KANEPS, A.J.; BERTONE, A.L. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. **American Journal Veterinary Research**, v.65, n.7, p.924-930. 2004.

SZPADERSKA, A.M.; EGOZI, E.I.; GAMELLI, R.L.; DIPIETRO, L.A. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 6, p. 1130-1137, 2003.

TAMAE, P. E. **Avaliação da neoformação óssea do alvéolo dentário com plasma rico em plaquetas (PRP) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

TANG, Y.Q.; YEAMAN, M.R.; SELSTED, M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. **Infection and Immunity**, v. 70, p.6524-6533, 2002.

TAYAPONGSAK, P.; O'BRIEN, D. A.; MONTEIRO, C. B.; ARCEO-DIAZ, L. Y. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 52, n. 2, p. 161–165, 1994.

TAYLOR, D.W., PETRERA, M., HENDRY, M., THEODOROPOULOS, J.S. A systematic review of the use of platelet-rich plasma in sports medicine as a new treatment for tendon and ligament injuries. **Clinical Journal of Sport Medicine**. v.21, n.4, p.344-52, 2011

TEIXEIRA, A. A. M. **Otimização da obtenção de plasma rico em plaquetas no gato**. 2014. 122 f. Dissertação mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Lisboa. 2014.

TOFLER, G.H. Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. **The New England Journal of Medicine**. v.316, p.1514-8, 1987.

TRAVLOS, G.S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 548-565, 2006.



TRIER, D.A.; GANK, K.D.; KUPFERWASSER, D.; YOUNT, N.Y.; FRENCH, W.J.; MICHELSON, A.D.; KUPFERWASSER, L.I.; XIONG, Y.Q.; BAYER, A.S.; YEAMAN, M.R. Platelet antistaphylococcal responses occur through P2X(1) and P2Y(12) receptor-induced activation and kinocidin release. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 5706-5713, 2008.

UBEZIO, G.; GHIO, M.; CONTINI, P.; BERTORELLO, R.; MARINO, G.; TOMASINI, A.; TRIPODI, G. Bio-modulators in platelet-rich plasma: a comparison of the amounts in products from healthy donors and patients produced with three different techniques. **Blood Transfusion**. v.12, Suppl.1, p.214–220, 2014

VEGA, J. A.; SUÁREZ, O. G.; ALMAGRO, A. M. Cartílago articular y factores de crecimiento (I parte). **Mapfre Medicina**. v. 11, n. 3, p. 212-225, 2000.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRA, M.S.; FRANCO, T.R. PRP e FC: 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.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v. 24, n. 2, p. 212-218, 2009.

VENDRUSCOLO, C. P.; WATANABE, M. J.; MAIA, L.; CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L. G. Plasma rico em plaquetas: uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. **Veterinária e Zootecnia**. v. 19, n. 1, p. 33-43, 2012.

VILELLA, D.L. **Terapia tópica de úlceras crônicas de perna com PRP(PR): Revisão sistemática da literatura**. 154f., 2007. Dissertação (Mestrado em Enfermagem), Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, SP.

WEISS, D.J., WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2010, 1232p.

WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A.G.; SIEVERT, A.N.; SISTINO J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, v.23, p.283-289, 2008.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L. A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 56, n. 10, p. 1217-1218, 1998.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**. v. 55, n. 11, p. 1294-1299, 1997.

WILTFANG, J.; KLOSS, F. R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZE-MOSQAU, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHELEGEL, K. A. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. **Clinical Oral Implants Research**, v.15, n.2, p.187-193, 2004.

YOU, T.-M.; CHOI, B.-H.; LI, J.; JUNG, J.-H.; LEE, H.-J.; LEE, S.-H.; JEONG, S.-M. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 103, n. 4, p. 8–12, 2007.

YUAN, T.; GUO, S. C.; HAN, P.; ZHANG, C. Q.; ZENG, B. F. Applications of leukocyte-and platelet-rich plasma (L-PRP) in trauma surgery. **Current pharmaceutical biotechnology**, v.13, n.7, p.1173-1184, 2012.

ZANDIM, B. M.; de SOUZA, M. V.; MAGALHÃES, P. C.; BENJAMIN, L. A.; MAIA, L.; OLIVEIRA, A. C.; PINTO, J. O.; JÚNIOR, J. I. R. Platelet activation: Ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 83–92, 2012.

ZHOU, Y.; ZHANG, J.; WU, H.; HOGAN, M. V.; WANG, J. H.C. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. **Stem Cell Research & Therapy**, v.6, n.1, p.173, 2015.



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**  
Instituto de Veterinária



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comparação entre protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas em cães: Estudo celular", protocolada sob o CEUA nº 1827171016, sob a responsabilidade de **Heloisa Justen Moreira de Souza e equipe; André William Masseaux Vidal Júnior; Ana Paula Lopes Marques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 26/04/2017.

We certify that the proposal "Comparison of obtaining plasma rich platelet protocols in dogs: Cell Study", utilizing 20 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1827171016, under the responsibility of **Heloisa Justen Moreira de Souza and team; André William Masseaux Vidal Júnior; Ana Paula Lopes Marques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 04/26/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2017 a 05/2017**

Área: **Clínica Médica**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **1 a 7 anos**

N: **20**

Linhagem: **não importa a raça**

Peso: **10 a 25 kg**

**Resumo:** O plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo é um derivado sanguíneo com grande número de plaquetas em pouca quantidade de plasma. Os T-grânulos sintetizam e liberam fatores de crescimento que modulam diversos processos de ativação, diferenciação, mitogênese e angiogênese. Objetiva-se padronizar uma técnica manual para a obtenção de PRP em cães para uso na prática clínica e em seguida efetuar um estudo citológico para definição da aplicabilidade do preparado. O sangue (8 mL) de vinte cães será separado em alíquotas para avaliar 2 protocolos de centrifugação dupla que variarão quanto a velocidade e o tempo de centrifugação. Amostras de PRP obtidas a partir de cada protocolo serão diluídas e homogeneizadas para contagem de plaquetas, hemácias e leucócitos em câmara de Neubauer e ambos os protocolos serão avaliados na capacidade em concentrar plaquetas, diferenciação celular em lâmina (leucócitos), quantidade de hemácias e avaliação qualitativa da morfologia das plaquetas em esfregaço. A partir do número de plaquetas íntegras capazes de liberar fatores de crescimento e demais tipos celulares encontrados, ambos os PRP terão seu uso direcionado para as variadas aplicações como infecções, cicatrizações, estimulação e/ou supressão de reações inflamatórias.

**Local do experimento:** As coletas sanguíneas serão realizadas no Hospital Veterinário de Pequenos Animais. O processamento de PRP e as análises quantitativas e qualitativas no Laboratório de Pesquisas Clínicas.

Seropédica, 27 de abril de 2017

Prof. Dr. Fábio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro