

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PROTÓCOLOS PARA A PREPARAÇÃO DE
CONCENTRADOS AUTÓLOGOS DE TROMBÓCITOS EM
AVES**

Laís Lucas Fernandes

Botucatu – SP

Mai/2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PROTÓCOLOS PARA A PREPARAÇÃO DE
CONCENTRADOS AUTÓLOGOS DE TROMBÓCITOS EM
AVES**

Laís Lucas Fernandes

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Animais Selvagens para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Titular Sheila
Canevese Rahal

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Fernandes, Laís Lucas, 1984-
F363p Protocolos para a preparação de concentrados autólogos de trombócitos em aves / Laís Lucas Fernandes. - Botucatu : [s.n.], 2018
74 f.: grafs., tabs.

Dissertação(Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018

Orientador: Sheila Canevese Rahal
Inclui bibliografia

1. Animais selvagens. 2. Protocolos Clínicos. 3. Papagaio(Ave). 4. Tucano. 5. Galinha. 6. Trombócitos I. Rahal, Sheila Canevese. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

LAÍS LUCAS FERNANDES

**Protocolos para a preparação de concentrados autólogos de trombócitos
em aves**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Titular Sheila Canevese Rahal

Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Profa Dra Alessandra Melchert

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa Dra Natalie Bertelis Merlini

Profa Adjunta Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Medicina Veterinária

UEM - Maringá

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, que me presenteou com a vida e que não me deixou fraquejar nos momentos de dificuldades.

Agradecimentos

A presente dissertação não poderia existir sem o precioso apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar quero agradecer minha orientadora Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal, que com o seu dom, paciência e humanidade me recebeu carinhosamente, acreditou e embarcou comigo de alma e coração em uma pesquisa de veras desafiadora. Muito obrigada por me corrigir e orientar sem nunca me desmotivar, obrigada por desconstruir a imagem manchada que carregava em minha alma e com temor dos intitulados orientadores, que a senhora continue sendo exemplo ao mundo, do que realmente é ser um profissional completo.

Desejo agradecer a todos os meus colegas selvagens do Mestrado que fizeram dos meus dias uma verdadeira aventura, além dos professores maravilhosos que tive a honra, de receber o que há de mais precioso, conhecimento!

Muito obrigada Roger William de Labio, biomédico do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Marília, me acolheu, me pegou pelas mãos e me fez dar os primeiros passos nesta pesquisa.

Agradeço em especial, Jacqueline Muniz, Alícia Hipólito e Bruno Bergamini, pessoas especiais, que sem medir esforços me deram a mão e no momento em que eu dizia, vamos? Eles simplesmente se jogavam com a mais pura e bela dedicação, independente do dia e hora, e juntos fazíamos os resultados nascerem.

Toda minha gratidão, carinho e amor por Inajara Nakamura Hirota, minha Friezinha, amiga irmã, que sempre se mantém firme ao meu lado, me joga pra frente e agarra as minhas dificuldades, e as torna um pouco mais simples para muitas vezes me tranquilizar...

Aos meus filhos amados, Biju, Malu, Lis, Simba e Flor, que muitas vezes precisei deixa-los para poder continuar e minha caminhada, meu amor por vocês é incondicional.

Por último, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio que me proporcionaram, especialmente aos meus pais, irmã e primas, pelas palavras de motivação, além dos meus queridos colegas de trabalho do Hospital Veterinário Casa do Criador, que com compreensão e paciência permitiram minha ausência da rotina.

Sumário

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	10
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
2. TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	12
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
Animais e ambiente de experimentação	15
Protocolos para o L-PRT.....	16
Análise estatística	20
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS	27
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODO	33
Animais e ambiente de experimentação	33
Protocolo para confecção de membranas de L-TRF	34
Análise estatística	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	50
REVISÃO DA LITERATURA	51
Aplicações dos PRP	51
Preparação do PRP.....	53
Cuidados na preparação do PRP	56
Algumas considerações sobre o PRP	57
Produção e características do PRF	59
4. REFERÊNCIAS	63
REFERÊNCIAS	64
5. ANEXOS	69

Lista de Abreviaturas

CEMPAS - Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens

CPDA - Citrato fosfato dextrose adenosina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

g – Gravidade

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos recursos naturais renováveis

LP-PRP - Plasma rico em plaquetas e pobre em leucócitos

L-PRP - Plasma rico em plaquetas e leucócitos

ML - mililitros

MM - milímetro

nº - número

° C – Graus Celsius

pH – potencial Hidrogeniônico

P-PRF - Pura fibrina rica em plaquetas

P-PRP - Puro plasma rico em plaquetas

PPT – Plasma pobre em trombócitos

PRF – Plasma rico em fibrina

PRP – Plasma rico em plaquetas

PRT – Plasma rico em trombócitos

Rpm – Rotação por minuto

SISBIO – Sistema de autorização e informação em biodiversidade

Unesp – Universidade estadual paulista

µl – Microlitro

Lista de Tabelas

Tabela 1 Valores dos trombócitos no sangue total (μl), de acordo com o Grupo (G1 – papagaio, G2 - tucano-toco, G3 - galinha doméstica) e Protocolos 1 ou 2	21
Tabela 2 Aumento da concentração de trombócitos em relação ao sangue total, de acordo com o Grupo (G1 – papagaio, G2 - tucano-toco, G3 - galinha doméstica) e Protocolos 1 ou 2.....	21
Tabela 3 Comparação das concentrações de trombócitos para plasma rico em trombócitos e leucócitos (L-PRT) em protocolos 1 e 2, de acordo com os Grupo (G1 – papagaio, G2 - tucano-toco, G3 - galinha doméstica).....	22

Lista de Figuras

TRABALHO CIENTÍFICO nº. 1

Figura 1 Descarte de 1/3 do sobrenadante após primeira centrifugação com auxílio de pipeta (Protocolo 1).....	17
Figura 2 Descarte das hemácias após primeira centrifugação (Protocolo 2)...	18
Figura 3 Microtubos contendo amostras de descarte e plasma rico em trombócitos e leucócitos dos protocolos 1 e 2.....	19
Figura 4 Esfregaços confeccionados com 5µl de amostra e corado com Panótico Rápido®.	19

TRABALHO CIENTÍFICO nº. 2

Figura 1 Coágulo de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, obtido de tucano-toco.	34
Figura 2 Membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, obtida de Arara-canindé após compressão.	35
Figura 3 Membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, obtida de Arara-canindé e fixada em formol a 10%.	35
Figura 4 Corte histológico de membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos. Observe área composta somente de fibrina (seta). Hematoxilina-Eosina (40x).	36
Figura 5 Quantidade de trombócitos por área em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).	38
Figura 6 Quantidade de leucócitos por área em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).	38
Figura 7 Quantidade de fibrina X células em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).	39
Figura 8 Relação trombócitos X leucócitos em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).	39
Figura 9 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de araras (Grupo 1). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x).....	40

- Figura 10 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de galinhas domésticas (Grupo 2). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x). 41
- Figura 11 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de papagaios (Grupo 3). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x). 42
- Figura 12 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de toco tucanos (Grupo 4). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x). 43

FERNANDES, L.L. Protocolos para a preparação de concentrados autólogos de trombócitos em aves. Botucatu, 2018. 108p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O estudo visou comparar e avaliar protocolos de produtos autógenos sanguíneos em aves, com base naqueles existentes para mamíferos. No Experimento 1 foram analisados dois protocolos para obtenção de plasma rico em trombócitos e leucócitos (L-PRT). Utilizaram-se 30 aves divididas em três Grupos equitativos: G1 - papagaios; G2 - tucanos-toco; G3 - galinhas domésticas. No protocolo 1, a primeira centrifugação foi a 220 gravidade (g) durante 10 minutos e a segunda a 660 g por 10 minutos. Após a segunda centrifugação, foi descartado 2/3 do sobrenadante, permanecendo apenas o L-PRT. No protocolo 2, a primeira centrifugação foi a 120 g durante 5 minutos e a segunda a 240 g por 5 minutos. Concluiu-se que houve diferenças na concentração de trombócitos entre as espécies, porém independente do protocolo a maior concentração foi nas galinhas, e entre os Protocolos o 2 foi o mais efetivo. No Experimento 2 foram produzidas e avaliadas histologicamente membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos (L-TRF). Empregaram-se 40 aves divididas em quatro grupos equitativos: G1 – araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco. Para cada ave foi coletado 0,5 ml de sangue, que foi depositado em tubo de vidro sem anticoagulante e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Membranas de L-TRF obtidas pela compressão dos coágulos com gaze foram processadas para análise histológica. Foi possível concluir que é possível produzir membranas de L-TRF nas espécies de aves estudadas, porém histologicamente as proporções dos elementos avaliados foram similares apenas nas galinhas domésticas e papagaios.

Palavras-chave: Animal selvagem; Concentrado plaquetário; Centrifugação, Sangue.

FERNANDES, L.L. Protocols for the preparation of autologous thrombocyte concentrates in birds. Botucatu, 2018. 108p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aimed to compare and evaluate protocols of autogenous blood products in birds, based on protocols developed for mammals. In Experiment 1, two protocols were evaluated for obtaining Leukocyte- and Thrombocyte-Rich Plasma (L-TRP). Thirty birds were divided into three equally sized groups: G1 - parrots; G2 - toco toucans; G3 - domestic chickens. In Protocol 1 the first centrifugation was at 220 gravity (g) for 10 minutes and the second one at 660 g for 10 minutes. After the second centrifugation, 2/3 of the supernatant was discarded, leaving only the L-TRP. In protocol 2, the first centrifugation was at 120 g for 5 minutes and the second one at 240 g for 5 minutes. In conclusion, there were differences in thrombocyte concentration among the species, but independently of the protocol, the highest concentration was in chickens. Between the protocols, Protocol 2 was the most effective. In Experiment 2, Leukocyte- and Thrombocyte-Rich Fibrin (L-TRF) membranes were developed and assessed histologically. Forty birds were divided into four equally sized groups: G1 – macaws, G2 - domestic chickens, G3 – parrots, G4 - toco toucans. A total of 0.5 mL of blood was collected from each bird, which was put into glass tube without anticoagulant and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. L-TRF membranes produced after compression of the clot were processed for histological analysis. In conclusion, L-TRF membranes can be produced in the evaluated avian species, but the ratio of the elements evaluated histologically were similar only in domesticated chickens and parrots.

Key words: Wild animal; Platelet concentrate; Centrifugation; Blood.

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Ao se considerar os problemas ortopédicos em aves, é necessário observar as particularidades inerentes a espécie, tais como pequena quantidade de osso esponjoso, ossos com corticais finas e quebradiças e pouca cobertura de tecidos moles sobre os ossos (BENNET e KUZMA, 1992; FORBES, 1998; HELMER e REDIG, 2006). Desta forma, o emprego de bioprodutos que pudessem estimular a consolidação e regeneração óssea, em especial nas fraturas complexas ou com perdas óssea, é fundamental para aumentar a possibilidade de recuperação e, no caso de aves de vida livre, a reintrodução.

Diversos tipos de concentrados plaquetários autólogos têm sido usados como método alternativo conservativo, ou como adjuvante de procedimentos cirúrgicos, em diversas condições ortopédicos de forma clínica ou experimental (SOOMEKH, 2011; GIANAKOS et al., 2015; WU et al., 2016; SHETH et al., 2017). Há uma ampla variedade de técnicas de preparação desses concentrados para uso em pacientes humanos (DHURAT e SUKESH, 2014; MAUTNER et al., 2015; LANSDOWN e FORTIER, 2017) e alguns relatos em cães (FRANKLIN et al., 2015; CARR et al., 2016; FRANKLIN et al., 2017; SAUNDERS et al., 2018). Contudo, a metodologia ainda foi pouco explorada em aves (MUDROŇOVÁ et al., 2014).

Sendo assim, de maneira geral, o presente estudo visou comparar e avaliar protocolos de produtos autólogos sanguíneos, em aves de diferentes espécies, com base nos protocolos existentes para mamíferos. Para tanto, a pesquisa foi dividida em duas abordagens, sendo uma referente ao plasma rico em trombócitos (Trabalho científico 1 - Comparação de protocolos de plasma rico em trombócitos e leucócitos em aves) e a outra relativa a fibrina rica em trombócitos (Trabalho científico 2 - Produção e avaliação de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos em aves).

2. TRABALHOS CIENTÍFICOS

TRABALHO CIENTÍFICO NO. 1

Comparação de protocolos de plasma rico em trombócitos e leucócitos em aves

RESUMO

Foram avaliados dois protocolos para obtenção de plasma rico em trombócitos e leucócitos (L-PRT) em aves de três diferentes famílias. Foram utilizadas 30 aves adultas, divididas em três Grupos compostos por 10 indivíduos cada: G1 - papagaios (*Amazona aestiva*); G2 - tucanos-toco (*Ramphastos toco*); G3 - galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*). Mediante contenção física foi coletado 1 mL de sangue, que foi distribuído em microtubos com citrato fosfato dextrose. No protocolo 1 realizou-se uma primeira centrifugação a 220 gravidade (g) durante 10 minutos, 1/3 do sobrenadante foi descartado e efetuou-se nova centrifugação a 660 g por 10 minutos. Após a segunda centrifugação, foi descartado 2/3 do sobrenadante, permanecendo apenas o L-PRT. No protocolo 2, a primeira centrifugação foi a 120 g durante 5 minutos e a segunda a 240 g por 5 minutos. Com relação à concentração de trombócitos, no protocolo 1 foram detectadas diferenças estatísticas entre G1 e G3, G1 e G2, e entre G2 e G3, sendo numericamente $G3 > G1 > G2$. Por sua vez, no protocolo 2 foram observadas diferenças estatísticas entre G1 e G3, e G2 e G3, mas sem diferenças entre G1 e G2, sendo numericamente $G3 > G1 > G2$. Ao se comparar os dois protocolos em cada espécie foram detectadas diferenças significativas em todos os Grupos, com maior concentração de trombócitos no protocolo 2. Concluiu-se que houve diferenças na concentração de trombócitos entre as espécies, porém independente do protocolo a maior concentração foi na espécie *Gallus gallus domesticus*, e entre os Protocolos o 2 foi o mais efetivo.

INTRODUÇÃO

Os concentrados autólogos de plaquetas têm sido usados como métodos alternativos conservativos, ou como adjuvante de procedimentos cirúrgicos, em diversas condições ortopédicas (SOOMEKH, 2011; GIANAKOS et al., 2015; WU et al., 2016; SHETH et al., 2017). Em defeitos de tamanho crítico induzidos experimentalmente nos ossos longos de vários animais, incluindo coelhos, ratos, porcos, ovelhas, cabras e cães foi possível verificar efeitos benéficos no reparo ósseo, seja por avaliação histológica, radiográfica e na qualidade biomecânica (GIANAKOS et al., 2015).

Do ponto de vista clínico é um método considerado vantajoso por ser de baixo risco, autólogo, de fácil utilização e boa tolerabilidade (SOOMEKH, 2011). Há vários protocolos e técnicas para a produção de concentrados plaquetários para pacientes humanos, inclusive com o uso de sistemas comerciais automatizados de separação, porém não há ainda consenso do melhor (SOOMEKH, 2011; DHURAT e SUKESH, 2014; DEGEN et al., 2017). O tempo e o número de centrifugações, o alcance de aceleração da centrífuga e número de rotações contribuem para as diferenças metodológicas e resultados (SOOMEKH, 2011; DHURAT e SUKESH, 2014; WU et al., 2016), assim como a concentração de plaquetas obtidas, o volume injetado e o número total de plaquetas entregue a região afetada, a presença ou não de células brancas sanguíneas e o uso de ativadores (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013; MAUTNER et al., 2015).

O mesmo se repete em Medicina Veterinária, especialmente para cães (FRANKLIN et al., 2015; CARR et al., 2016; FRANKLIN et al., 2017; SAUNDERS et al., 2018), com resultados conflitantes com relação ao valor dos concentrados plaquetários na consolidação óssea (FRANKLIN et al., 2017). Com relação às aves, o uso é ainda mais incipiente (MUDROŇOVÁ et al., 2014). O fato pode estar relacionado a algumas características da espécie, como coagulação sanguínea efetuada pelos trombócitos, que são células nucleadas originadas de células tronco (CAMPBELL, 1994; MITCHELL e

JOHNS, 2008; JONES, 2015), e não pelas plaquetas como em mamíferos, que são não nucleadas e derivadas de megacariócitos (SOOMEKH, 2011).

As aves estão sujeitas a várias desordens ortopédicas, sendo que os princípios básicos no reparo de fraturas se assemelham a de outras espécies (HELMER e REDIG, 2006). Contudo, há várias particularidades que precisam ser consideradas, tais como: a pequena quantidade de osso esponjoso, o que faz infrequente o uso de enxerto; ossos com corticais finas e quebradiças; a pouca cobertura de tecidos moles sobre os ossos, favorecendo a ocorrência de fraturas expostas; além da necessidade de rápida restauração do suporte de peso, visto a locomoção ser bipedal (BENNET e KUZMA, 1992; FORBES, 1998; HELMER e REDIG, 2006). Desta forma, o emprego de concentrados de trombócitos nas doenças ortopédicas, em especial nas fraturas complexas ou com perdas óssea, poderia ser uma opção para estimular a consolidação e a regeneração óssea.

Sendo assim, o presente estudo visou avaliar dois protocolos para obtenção de plasma rico em trombócitos e leucócitos (L-PRT) em aves de três diferentes famílias, incluindo *Psittacidae*, *Ramphastidae* e *Phasianidae*. A hipótese foi que pode ocorrer variações no produto final de acordo com o protocolo e entre as espécies avaliadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu, segundo no. 79/2016 - CEUA (Anexo I). O projeto obteve também autorização do Sistema de Informação e Autorização de Biodiversidade – SISBIO, divisão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA sob nº 53876-1 (Anexo II).

Foram utilizadas 30 aves adultas, divididas em três Grupos: G1 - 10 papagaios (*Amazona aestiva*); G2 - 10 tucanos-toco (*Ramphastos toco*); G3 -

10 galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*), oriundos do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS), Unesp – Campus Botucatu. Para avaliação da higidez, as aves foram submetidas a exame físico e hemograma completo.

Protocolos para o L-PRT

Mediante contenção física e prévia assepsia local, foi coletado vagorosamente 1 mL de sangue da veia jugular direita, com o uso de agulha descartável estéril de 0,55 mm de diâmetro por 20 mm de comprimento estéreis (24-gauge $\frac{3}{4}$) (BD Vacutainer®) acoplada a seringa de 3 mL (Descarpack®). Nenhuma ave foi mantida em jejum. Para a realização dos protocolos o sangue foi distribuído em microtubos do tipo eppendorf estéril 1,5 mL graduado neutro (Cral®) contendo anticoagulante citrato fosfato dextrose adenosina (CPDA) (Vacuette®), na proporção de 1 parte (50 μ l), para 9 partes (450 μ l) de sangue, totalizando 500 μ l de sangue acrescido de CPDA por frasco. Além disso, foi realizado um esfregaço do sangue (5 μ l), que foi corado com panótico rápido (Romanowski) para a contagem de trombócitos.

No protocolo 1 os tubos foram armazenados ao abrigo de luz em temperatura ambiente (média de 25°C), durante 30 minutos, e posteriormente centrifugados a 220 gravidade (*g*) durante 10 minutos. Na sequência, 1/3 do sobrenadante foi descartado (Figura 3) e o restante transferido para tubos tipo eppendorf de 1,5 mL estéreis e centrifugados novamente a 660 *g* por 10 minutos. Após a segunda centrifugação, foi descartado 2/3 do sobrenadante, sendo este o plasma pobre em trombócitos (PPT), permanecendo apenas o L-PRT, o qual foi homogeneizado cuidadosamente (MERLINI, 2014).



Figura 1 Descarte de 1/3 do sobrenadante após primeira centrifugação com auxílio de pipeta (Protocolo 1).

No segundo protocolo os tubos foram mantidos em descanso sob abrigo da luz por 5 minutos. Em seguida foram centrifugados a 120 g durante 5 minutos. Ao fim da primeira centrifugação foram descartadas as hemácias sedimentadas, mantendo o botão leucocitário (Figura 4). Os frascos foram novamente mantidos sob abrigo de luz por mais 5 minutos, o plasma remanescente foi centrifugado a 240 g por 5 minutos. Após a segunda centrifugação, descartou-se 50% do plasma da porção superior, ou seja, o PPT, permanecendo apenas o L-PRT (CARMONA et al., 2007).



Figura 2 Descarte das hemácias após primeira centrifugação (Protocolo 2).

A centrifugação do sangue para os dois protocolos foi realizada com equipamento da marca Fanem®, centrífuga Excelsa Baby 206. Um único pesquisador manipulou as amostras e foi responsável pela produção do L-PRT. Após cada centrifugação de ambos os protocolos, a alíquota que deveria ter sido descartada foi depositada individualmente em microtubos do tipo eppendorf estéril 1,5 mL graduado neutro (Cral®) e identificada de acordo com o grupo, o número do indivíduo, volume do descarte e protocolo correspondente. O L-PRT foi também cuidadosamente identificado (Figura 5). Após esta manipulação, esfregaços foram confeccionados usando um volume de 5 μ l de cada amostra, secos ao ar e corados com Panótico Rápido LB® (Figura 6).

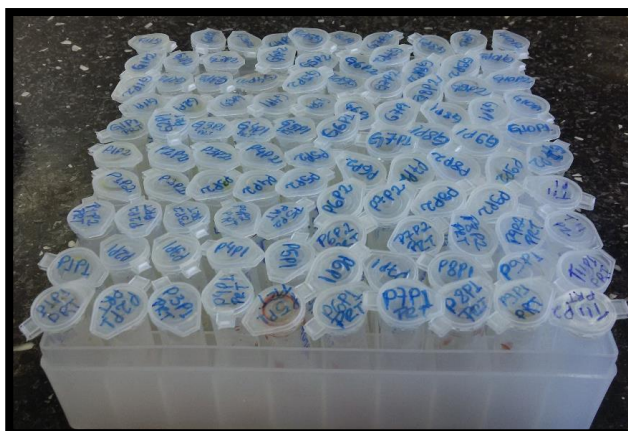


Figura 3 Microtubos contendo amostras de descarte e plasma rico em trombócitos e leucócitos dos protocolos 1 e 2.



Figura 4 Esfregaços confeccionados com 5 μ l de amostra e corado com Panótico Rápido®.

Em ambos os protocolos foi realizada a contagem estimada de trombócitos, tanto do esfregaço do sangue total de cada indivíduo, quanto do L-PRT e alíquotas de descarte. A contagem estimada de trombócitos foi obtida utilizando a mesma fórmula empregada para a estimativa da contagem de leucócitos totais em esfregaço sanguíneo indicada por Campbell (2015), contando o número médio de trombócitos em cinco campos em óleo de imersão (1.000x) e aplicando a uma fórmula para se obter o número estimado de trombócitos por μ l. Também foi verificada a presença ou não de células nas

porções descartadas em cada fase de cada protocolo, usando a mesma metodologia de contagem.

$$\text{Trombócitos estimados}/\mu\text{l} = \frac{\text{Média de trombócitos em 5 campos} \times 3.500.000}{1.000}$$

Análise estatística

Para comparação da contagem de trombócitos no sangue total entre as três espécies, bem como realizar a comparação do protocolo 1 e do protocolo 2 entre as três espécies, foi utilizada Análise de variância para amostras independentes (ANOVA One-way), seguida pelo teste de Tukey-Kramer. Para realizar a comparação das contagens de trombócitos entre sangue total com o protocolo 1 e sangue total com o protocolo 2, bem como dos dois protocolos utilizados (protocolo 1 X protocolo 2), em cada uma das espécies, foi utilizado o teste de “T” não pareado. A normalidade dos dados foi avaliada pelo método de Kolmogorov e Smirnov. Foi considerado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Para a realização dos protocolos empregou-se 500µl de volume de sangue total para todas as aves. Inicialmente foi avaliada todas as alíquotas de descarte de cada fase dos protocolos, constatando que não houve perda de células do composto sanguíneo, nestas porções. Para o protocolo 1, o volume obtido de L-PRT foi de aproximadamente 100µL, para todas as espécies, e no protocolo 2 aproximadamente 200µL.

Na comparação da contagem de trombócitos no sangue total entre as três espécies foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os Grupos 1 e 2 ($P < 0,05$) e entre os Grupos 1 e 3 ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os Grupos 2 e 3 ($P > 0,05$). A maior média de contagem de trombócitos foi do Grupo 3, seguida pelo Grupo 2 e por último pelo Grupo 1 (Tabela 1).

Tabela 1 Valores dos trombócitos no sangue total (μ l), de acordo com o Grupo (G1 – papagaio, G2 - tucano-toco, G3 - galinha doméstica) e Protocolos 1 ou 2

Grupos	Média \pm Desvio Padrão	95% do Intervalo de Confiança
1	9,240 \pm 2,13	7,714 – 10,766
2	14,840 \pm 3,45	12,367 – 17,313
3	18,830 \pm 7,33	13,587- 24,073

O protocolo 2 concentrou mais trombócitos comparativamente ao protocolo 1 em 90% das aves nos Grupos 1 e 3, e em 100% das aves no grupo 2. Na Tabela 2 estão descritos as Médias (\pm Desvio padrão) do aumento em vezes das concentrações de trombócitos em relação ao sangue total, de acordo com o grupo.

Tabela 2 Aumento da concentração de trombócitos em relação ao sangue total, de acordo com o Grupo (G1 – papagaio, G2 - tucano-toco, G3 - galinha doméstica) e Protocolos 1 ou 2.

Grupos	Protocolo 1 (Média \pm Desvio Padrão)	Protocolo 2 (Média \pm Desvio Padrão)
1	4,4 vezes \pm 1,3	6,3 vezes \pm 2,0
2	1,7 vezes \pm 0,6	3,1 vezes \pm 1,0
3	4,5 vezes \pm 1,3	8,6 vezes \pm 5,6

Ao se comparar a contagem de trombócitos no sangue total e após a realização do protocolo 1 foram observadas diferenças extremamente significativas ($P < 0,0001$) para todos os Grupos, mostrando maior número de trombócitos com o protocolo 1. O mesmo foi detectado com o protocolo 2.

Ao se comparar o protocolo 1 entre as 3 espécies de aves foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre Grupo 1 e Grupo 3 ($P < 0,001$), Grupo 1 e Grupo 2 ($P < 0,05$) e entre Grupo 2 e Grupo 3 ($P < 0,001$).

Com relação à concentração de trombócitos neste protocolo, essa foi maior no Grupo 3, seguida pelo Grupo 1 e por último pelo Grupo 2.

Na comparação do protocolo 2 entre as 3 espécies de aves foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre Grupo 1 e Grupo 3 ($P < 0,001$) e entre Grupo 2 e Grupo 3 ($P < 0,001$). Não foram detectadas diferenças entre os Grupos 1 e 2 ($P > 0,05$). Com relação à concentração de trombócitos neste protocolo, essa foi maior no Grupo 3, seguida pelo Grupo 1 e por último pelo Grupo 2.

Por sua vez, ao se comparar os dois protocolos em cada espécie detectou-se diferença significativa no Grupo 1 ($P = 0,0480$), e diferenças extremamente significativas no Grupo 2 ($P < 0,0001$) e no Grupo 3 ($P < 0,0001$) (Tabela 3). Em todos os Grupos o protocolo 2 mostrou maior concentração de trombócitos que o protocolo 1.

Tabela 3 Comparação das concentrações de trombócitos para plasma rico em trombócitos e leucócitos (L-PRT) em protocolos 1 e 2, de acordo com os Grupo (G1 – papagaio, G2 - tucano-toco, G3 - galinha doméstica).

Grupos	Tipos de Protocolo	Média ± Desvio Padrão	Intervalo de Confiança de 95%	Valor de P
1	Protocolo 1	40.040 ± 14.03	30.001 - 50.079	0.0480
	Protocolo 2	56.980 ± 20.99	41.964 - 71.996	
2	Protocolo 1	24.220 ± 4.04	21.327 - 27.113	<0.0001
	Protocolo 2	44.240 ± 9.309	37.581 - 50.899	
3	Protocolo 1	78.610 ± 18.99	65.022 - 92.198	<0.0001
	Protocolo 2	132.65 ± 26.69	113.56 - 151.74	

DISCUSSÃO

Embora exista uma ampla variedade de técnicas de preparação de concentrados plaquetários, particularmente em humanos (EHRENFEST et al., 2009), no atual estudo optou-se pelo L-PRT, visto a dificuldade de separação dos leucócitos dos trombócitos em aves, já que se tratam de células nucleadas (CAMPBELL, 1994; MITCHELL e JOHNS, 2008; JONES, 2015). A padronização de cada fase da preparação do concentrado plaquetário é essencial para que haja reprodutibilidade e possibilidade de comparação entre estudos, sendo que cada uma delas será discutida abaixo.

No presente estudo empregou-se a agulha 24-gauge, cujo calibre foi adequado para a coleta e compatível com a veia jugular direita das três espécies de aves. Antes do processamento do concentrado plaquetário, vários cuidados têm sido indicados em paciente humanos, tais como, aspiração vagarosa do sangue, já que a velocidade pode influenciar na qualidade da plaqueta, e uso de agulhas de 21G (0,8X25mm) ou maiores, já que com agulhas de menor calibre pode ocorrer ativação prematura das plaquetas (LANSDOWN e FORTIER, 2017).

O tubo utilizado para a preparação das plaquetas foi o de polipropileno, considerado melhor quando comparado ao de vidro e o de poliestireno, que podem promover ativação prematura ou alterações de morfologia das plaquetas (LANSDOWN e FORTIER, 2017). Embora existam diversos anticoagulantes, optou-se pelo citrato fosfato dextrose adenosina. O citrato previne a coagulação, ao passo que a dextrose e outros componentes auxiliam no metabolismo e viabilidade das plaquetas (ALSOUSOU et al., 2009). Anticoagulantes com citrato e citrato de sódio-dextrose são mais indicados do que o EDTA, visto este último ter o potencial de danificar a membrana plaquetária (ALSOUSOU et al., 2009; DHURAT e SUKESH, 2014).

O volume coletado de sangue total está diretamente correlacionado com a quantidade de plaquetas disponíveis (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). Isso é uma dificuldade em aves, desde que o valor máximo seguro para coletas sanguíneas é fixado em 1% do peso vivo total, correspondendo a 10% do

sangue total dos animais, e a venopunção é o método de escolha para obtenção de amostras sanguíneas em aves grandes (FUDGE, 2000). O volume de 1mL coletado para cada espécie do atual estudo permitiu a adequada avaliação dos protocolos, sem risco aos indivíduos.

Os dois protocolos de preparação do L-PRT foram efetuados exclusivamente pelo método de separação gravitacional, usando sistema de centrífuga de mesa (ALSOUSOU et al., 2009). Um estudo em galinhas o preparado foi realizado primeiro pelo isolamento das células mononucleares do sangue periférico, com o uso de meio de separação de linfócitos (MUDROŇOVÁ et al., 2014). Embora existam vários sistemas comerciais de centrifugação automatizados, que separam as plaquetas do sangue total (FRANKLIN et al., 2015; CARR et al., 2016; DEGEN et al., 2017; FITZPATRICK et al., 2017), esses são específicos para mamíferos.

Outro fator de influência nos resultados é o método utilizado para medir a concentração de plaquetas (ALSOUSON et al., 2009). No atual estudo a contagem foi de forma manual. Contudo, um dos problemas da contagem celular em aves é o fato dos trombócitos serem nucleados (CAMPBELL, 1994). Embora um estudo com galinhas tenha empregado a citometria de fluxo (MUDROŇOVÁ et al., 2014), essa se mostrou inviável no atual estudo, visto não haver antígenos específicos para papagaios e tucanos.

Em ambos os protocolos foi realizada uma primeira centrifugação em baixa força, para separar o sangue em três camadas, e a segunda numa rotação mais elevada. Para pacientes humanos a primeira centrifugação tem sido de 200 g a 600 g e a segunda de 700 g a 2,300 g (PICCIN et al., 2017). Essa centrifugação se assemelha ao protocolo 1 (220 g na primeira e 660 g na segunda), que permitiu a obtenção de aproximadamente 100µL para todas os grupos. Por sua vez, o protocolo 2 (120 g na primeira e 200 g na segunda) gerou um volume de aproximadamente 200µL, provavelmente associado ao peso do trombócito.

O gradiente de concentração é influenciado pelo tamanho das plaquetas, diferenças entre indivíduos e variabilidade do hematócrito (DHURAT e SUKESH, 2014; PICCIN et al., 2017). No atual estudo, a contagem de

trombócitos no sangue total não variou estatisticamente entre os Grupos 2 e 3, embora a maior média tenha sido do Grupo 3 e a menor do Grupo 1. Por outro lado, ao se analisar os protocolos entre as três espécies, foram observadas diferenças entre os grupos, com exceção entre os Grupos 1 e 2 que se comportaram de forma similar no protocolo 2. Contudo, a concentração de trombócitos, tanto no protocolo 1 como no 2, foi maior no Grupo 3, seguida pelo Grupo 1 e por último pelo Grupo 2. Esses achados podem ter sido influenciados pelas diferenças de tamanho de trombócitos entre as espécies, mas também pelo número de trombócitos do sangue periférico em cada espécie.

Com respeito ao conteúdo de plaquetas, em medicina humana tem sido sugerido usar concentrações de plaquetas no PRP que estejam 4 a 6 vezes maior ao observado no sangue total, sendo que concentrações muito maiores podem proporcionar nenhum efeito adicional ou mesmo promover inibição (WU et al., 2016). Nos Grupos 1 e 3 a concentração de trombócitos em relação ao sangue total foi de aproximadamente 4,4 vezes maior no protocolo 1. Já no protocolo 2 foi 6,3 e 8,6 maiores, respectivamente, para os Grupos 1 e 3. Comparativamente o Grupo 2 mostrou uma menor concentração, 1,7 e 3,1 respectivamente para os protocolos 1 e 2. Deste modo, o protocolo 2 foi mais eficiente para concentrar trombócitos nas três espécies de aves avaliadas, porém o tucano foi o que mostrou a menor concentração a despeito do protocolo, o que pode indicar menor eficiência do L-PRT nesta espécie com esses protocolos.

Uma limitação do atual estudo é que, embora todas as aves fossem adultas, o sexo não foi determinado. Contudo, em pacientes humanos, a idade e o sexo aparentemente não influenciam na concentração de plaquetas, ou na concentração dos fatores de crescimento (DHURAT e SUKESH, 2014). O mesmo precisaria ser avaliado em aves.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

a - A maior concentração de trombócitos foi com o protocolo 2.

b - Houve diferença na concentração de trombócitos entre as espécies avaliadas, porém independente do protocolo a maior concentração foi na espécie *Gallus gallus domesticus*.

REFERÊNCIAS

- ALSOUSOU, J.; THOMPSON, M.; HULLEY, P.; NOBLE, A.; WILLETT, K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, v.91-B, p.987-96, 2009.
- ARNOCZKY S.P.; SHEBANI-RAD, S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Med. Arthrosc. Rev.*, v.21, p.180–185, 2013.
- BENNETT, R.; KUZMAN, A. Fracture management in birds. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.23, n.1, p.5-38, 1992.
- CAMPBELL, TW. Hematology. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Avian medicine: principles and applications*. Lake Worth: Wingers Publishing, p.176–98, 1994.
- CARR, B.J.; SHERMAN O. CANAPP JR, S.O.; DAVID R. MASON, D.R.; , COX, C.; HESS, T. Canine platelet-rich plasma systems: a prospective analysis. *Front. Vet. Sci.*, v.2, p.1-8, 2016.
- CARMONA, J.U.; ARGUELES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J. Equine Vet. Sci.*, v.27, n.4, p.167-170, 2007.
- COLES, E.H. *Patologia clínica veterinária*. 3ed. São Paulo: Editora Manole, 1984, 565 p.
- DEGEN, R.M.; BERNARD, J.A.; OLIVER, K.S.; DINES, J.S. Commercial separation systems designed for preparation of platelet-rich plasma yield differences in cellular composition. *HSS Journal*, v. 13, p.75–80, 2017.
- DHURAT, R.; SUKESH, M.S. Principles and methods of preparation of platelet rich plasma: a review and author's perspective. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, v.7, n.4, p.189-197, 2014.

EHRENFEST, D.M.D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*, v.27, n.3, p.158-167, 2009.

FITZPATRICK, J.; BULSARA, M.K.; MCCRORY, P.R.; RICHARDSON, M.D.; ZHENG, M.H. Analysis of platelet-rich plasma extraction: variations in platelet and blood components between 4 common commercial kits. *Orthop. J. Sports Med.*, v.5, n.1, p.1-8, 2017.

FORBES, N.A. Avian orthopedics. *Vet. Quarterly*, v.20, p. S69-S70, 1998.

FRANKLIN, S.P.; GARNER, B.C.; COOK, J.L. Characteristics of canine platelet-rich plasma prepared with five commercially available systems. *Am. J. Vet. Res.*, v.76, n.9, p.822-827, 2015.

FRANKLIN, S.P.; BURKE, E.E.; HOLMES, S.P. The effect of platelet-rich plasma on osseous healing in dogs undergoing high tibial osteotomy. *PLoS ONE*, v.12, n.5, p.1-18, 2017.

FUDGE, M.E. Avian blood sampling and artifact considerations. In: FUDGE, A.M. *Laboratory medicine avian and exotic pets*. Philadelphia. W.B. Saunders, 2000, 347p.

GIANAKOS, A.; ZAMBRANA, L.; SAVAGE-ELLIOTT, I.; LANE, J.M.; KENNEDY, J.G. Platelet-rich plasma in the animal long-bone model: an analysis of basic science evidence. *Orthop.*, v.38, n.12, p.e1079-e1090, 2015.

HELMER, P.; REDIG, P.T. Surgical resolution of orthopedic disorders. In: HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, T.L. *Clinical avian medicine*. v.2, Palm Beach: Spix Publishing Inc. Publishing, 2006, p.761-774.

JONES, M.P. Avian Hematology. *Vet. Clin. North Am.: Exotic An. Pract.*, v.18, n.1, p.649-659, 2015.

LANSDOWN, D.A.; FORTIER, L.A. Platelet-Rich Plasma: formulations, preparations, constituents, and their effects. *Oper. Tech. Sports Med.*, v.25, p.7-12, 2017.

MAUTNER, K.; MALANGA, G.A.; SMITH, J.; SHIPLE, B.; IBRAHIM, V.; SAMPSON, S.; BOWEN, J.E. A call for a standard classification system for

future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM & R*, p.S52-S59, 2015.

MERLINI, N.B.; FONZAR, J.F.; PERCHES, C.S.; SERENO, M.G.; SOUZA, V.L.; ESTANISLAU, C.A.; RODAS, N.R.; RANZANI, J.J.T.; MAIA, L.; PADOVANI, C.R.; BRANDÃO, C.V.S. Uso de plasma rico em plaquetas em úlceras de córnea em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.66, n.6, p.1742-1750, 2014.

MITCHELL, E.B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, v.11, p.501–522, 2008.

MUDROŇOVÁ, D.; KOŽÁR, M.; MOLNÁR, L.; TRBOLOVÁ, A. Viability and discrimination of avian peripheral blood mononuclear cells and thrombocytes intended for improvement of wound healing in birds. *Acta Vet. Hung.*, v.62, n.3, p.334–339, 2014.

PICCIN, A.; DI PIERRO, A.M.; CANZIAN, L.; PRIMERANO, M.; CORVETTA, D.; NEGRI, G.; MAZZOLENI, G.; GASTL, G.; STEURER, M.; GENTILINI, I.; EISENDLE, K.; FONTANELLA, F. Platelet gel: a new therapeutic tool with great potential. *Blood Transfus.*, v.15, n.4, p.333-340, 2017.

SAUNDERS, W.B.; BEARDEN, R.N.; FRANKLIN, S.P. Platelet-rich plasma and autologous conditioned sera. In: TOBIAS, K.; JOHNSON, S. *Veterinary surgery: small animal*. chap. 4. St Louis: Missouri, 2018, p.40-48.

SHETH, U.; DWYER, T.; SMITH, I.; WASSERSTEIN, D.; THEODOROPOULOS, J.; TAKHAR, S.; CHAHAL, J. Does platelet-rich plasma lead to earlier return to sport when compared with conservative treatment in acute muscle injuries? A systematic review and meta-analysis. *Arthroscopy*, p.1-8, 2017. In press.

SOOMEKH, D.J. Current concepts for the use of platelet-rich plasma in the foot and ankle. *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, v.28, p.155–170, 2011.

WU, P.I-K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-rich plasma. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, v.27, p.825–853, 2016.

TRABALHO CIENTÍFICO NO. 2

Produção e avaliação de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos em aves

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi produzir e avaliar histologicamente membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos (L-TRF) produzidas com sangue de quatro espécies de aves. Foram empregadas 40 aves adultas, clinicamente saudáveis, divididas em quatro grupos, com 10 indivíduos em cada um: Grupo 1 – araras (*Ara ararauna*), Grupo 2 - galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*), Grupo 3 – papagaios (*Amazona aestiva*), Grupo 4 - tucanos-toco (*Ramphastos toco*). Para cada ave foi coletado 0,5 ml de sangue, que foi depositado em tubo de vidro seco (sem anticoagulante) e centrifugado imediatamente após a coleta a 3000 rpm por 10 minutos. Membranas de L-TRF obtidas pela compressão dos coágulos com gaze foram processadas para análise histológica. Os Grupos 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças significativas no número de trombócitos/área. Por sua vez, o Grupo 1 diferiu estatisticamente do Grupo 2, sendo que o Grupo 1 concentrou maior número de trombócitos/área. Em relação à quantidade de leucócitos por área, os quatro grupos não apresentaram diferenças estatísticas. Quanto à relação fibrina x células, os Grupos 1, 2 e 3 não apresentaram diferenças estatísticas, porém o Grupo 4 diferiu dos demais. A relação trombócitos x leucócitos mostrou que os Grupos 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Diferenças foram observadas apenas entre os Grupos 1 e 2. Foi possível concluir que é possível produzir membranas de L-TRF nas espécies de aves avaliadas, porém histologicamente as proporções dos elementos avaliados foram similares apenas nas galinhas domésticas e papagaios.

INTRODUÇÃO

A fibrina rica em plaquetas (PRF) consiste de uma matriz de fibrina autóloga, que tem por vantagens a mais fácil preparação, com tempo e custo inferiores ao plasma rico em plaquetas (PRP), além de não requerer manipulação química do sangue por anticoagulante, trombina bovina ou cloreto de cálcio, sendo assim adequado para a prática diária (EHRENFEST et al., 2009; BORIE et al., 2015; GIANNINI et al., 2015; MIRON et al., 2017). Em essência o PRF é formado por fibrina, plaquetas, fatores de crescimento e vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células-tronco (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a). Quando aplicado no tecido, o PRF dissolve vagarosamente, com isso há liberação de fatores de crescimento e citocinas por um período de 10 dias (MIRON et al., 2017). A conformação espacial da fibrina obtida no PRF serve como substrato para plaquetas e atua com um sinal quimiotático para a células tronco (GIANNINI et al., 2015).

A produção da PRF é também fundamentada na centrifugação do sangue total, mas o objetivo final é a produção de um biomaterial baseado em fibrina e não uma suspensão de plaqueta líquida (BIELECKI e EHRENFEST, 2012). As características da centrífuga e protocolos possuem impacto significativo nas células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b).

A PRF pode ser usada na forma de gel ou na forma de membrana, com o intuito de promover a cicatrização de feridas, crescimento ósseo, estabilização de enxerto e hemostasia, entre outros (SALUJA et al., 2011). A arquitetura tridimensional da matriz de fibrina proporciona uma membrana com grande densidade, elasticidade, flexibilidade e força, facilitando a manipulação e sutura (GIANNINI et al., 2015; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016c). O PRF tem sido utilizado em pacientes humanos em cirurgias orais, maxilofaciais, plásticas, e de orelha, nariz e garganta (EHRENFEST et al., 2009). Os produtos podem ser classificados em PRF puro (P-PRF) ou em Plasma Rico em Fibrina e Leucócitos (L-PRF), de acordo com a ausência ou presença de leucócitos nas preparações (DHURAT e SUKESH, 2014; MAUTNER et al., 2015; LANSDOWN e FORTIER, 2017).

As aves estão sujeitas a várias injúrias, tais como fraturas e perdas de tecido por projétil balístico, trauma, predação, acidentes domésticos (FORBES e GUZMAN, 2017), entre outros, que poderiam ser beneficiadas pelo uso deste tipo de produto. No entanto, antes da utilização é importante determinar parâmetros de efetividade do biomaterial, já que estudos relativos ao uso de concentrados sanguíneos em aves são bastante escassos (MUDROŇOVÁ et al., 2014). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi produzir e avaliar histologicamente membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos (L-TRF) produzidas com sangue de araras canindé, galinhas domésticas, papagaios e tucanos-toco. A hipótese é que mesmo seguindo o mesmo protocolo, a qualidade pode variar entre as espécies.

MATERIAL E MÉTODO

Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu, segundo no. 79/2016 - CEUA (Anexo I). O projeto obteve também autorização do Sistema de Informação e Autorização de Biodiversidade – SISBIO, divisão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA sob nº 53876-1 (Anexo II).

Foram empregadas 40 aves adultas, clinicamente saudáveis, divididas em quatro grupos, com 10 indivíduos em cada um: Grupo 1 – araras (*Arara ararauna*), Grupo 2 - galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*), Grupo 3 – papagaios (*Amazona aestiva*), Grupo 4 - tucanos-toco (*Ramphastos toco*). As aves foram procedentes do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS), Unesp – Campus Botucatu. As aves foram consideradas clinicamente saudáveis, por base no exame físico e hemograma completo.

Protocolo para confecção de membranas de L-TRF

Para cada ave foi coletado vagarosamente 0,5 ml de sangue da veia jugular direita, mediante contenção física, utilizando seringas (3 ml) e agulhas (20x5,5mm) estéreis. Não foi realizado jejum.

O sangue foi depositado em tubo de vidro seco (sem anticoagulante) e centrifugado imediatamente após a coleta a 3000 rpm por 10 minutos (centrifuga Excelsa Baby 206, marca Fanem®). Os coágulos de L-TRF foram recuperados delicadamente com auxílio de pinça anatômica e a porção concentrada de glóbulos vermelhos foi removida parcialmente removida com uso de lâmina de bisturi esterilizada nº 11 (marca Solidor®). Em seguida, os coágulos foram mantidos entre duas compressas estéreis umidecidas com solução fisiológica, a fim de se obter membranas de fibrina (Figuras 1 e 2). Na sequência, as membranas foram fixadas em formol a 10%, por 48 horas, e depois transferidas para frascos contendo álcool 70°, por mais 48 horas (Figura 3).



Figura 1 Coágulo de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, obtido de tucano-toco.



Figura 2 Membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, obtida de Arara-canindé após compressão.



Figura 3 Membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, obtida de Arara-canindé e fixada em formol a 10%.

Posteriormente, as membranas foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 4 micrômetros de espessura foram obtidos e corados pela Hematoxilina-Eosina (Figura 4).

As análises morfométricas foram realizadas conforme padronização já estabelecida por Fabro et al, (2015) com as adaptações necessárias. Resumidamente, as lâminas coradas pela Hematoxilina & Eosina foram analisadas para avaliar a celularidade em termo de área total em microscópio óptico, equipado com um analisador de imagem. O sistema utilizado consistiu

de uma câmera CCD Sony acoplada a um microscópio Olympus BX51, a partir do qual as imagens foram visualizadas no monitor. Por meio de um sistema digital inserido em computador (Pentium3 300Mhz), as imagens foram processadas por um software Image ProPlus. Então, foram selecionados aleatoriamente 10 campos, visualizados sob um aumento de 400 vezes. A área total medida pelo analisador em cada campo foi de 68.265,680 mm². A presente área correspondente a diferentes morfologias celulares no campo analisado foi medido por meio da seleção manual destas áreas correspondentes às células em estudo, com posterior medida de área digitalizada.

As membranas foram analisadas quanto à quantidade de células por área, para identificação mais precisa da composição da membrana. Avaliou-se especificamente, trombócitos por área, leucócitos por área, relação fibrina x células e relação trombócitos x leucócitos.



Figura 4 Corte histológico de membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos. Observe área composta somente de fibrina (seta). Hematoxilina-Eosina (40x).

Análise estatística

Para a análise estatística descritiva, foram calculadas as médias, desvios padrões, medianas, mínimos, máximos e coeficientes de variância de todas variáveis contínuas para cada um dos grupos. Foram construídos gráficos Box-plot para as variáveis contínuas estudadas para se observar a

distribuição dos dados, verificando simetria ou assimetria dos mesmos. Considerando a análise estatística univariada, as variáveis contínuas foram analisadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA) para detectar diferenças nas médias dos grupos, considerando o nível de significância do teste de 5%. Quando existiu diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas (Teste de Dunnett - comparação múltipla das médias dos grupos tratados).

RESULTADOS

As membranas obtidas em todos os grupos mostraram-se flexíveis e aparentemente resistentes.

Os Grupos 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças significativas no número de trombócitos/área. Por sua vez, o Grupo 1 diferiu estatisticamente do Grupo 2, sendo que o Grupo 1 concentrou maior número de trombócitos/área (Figura 5). Em relação à quantidade de leucócitos por área, os quatro grupos não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 6). Quanto à relação fibrina x células, os Grupos 1, 2 e 3 não apresentaram diferenças estatísticas, porém o Grupo 4 diferiu dos demais (Figura 7). A relação trombócitos x leucócitos mostrou que os Grupos 2, 3 e 4, não apresentaram diferenças estaticamente significantes. Diferenças foram observadas apenas entre os Grupos 1 e 2 (Figura 8).

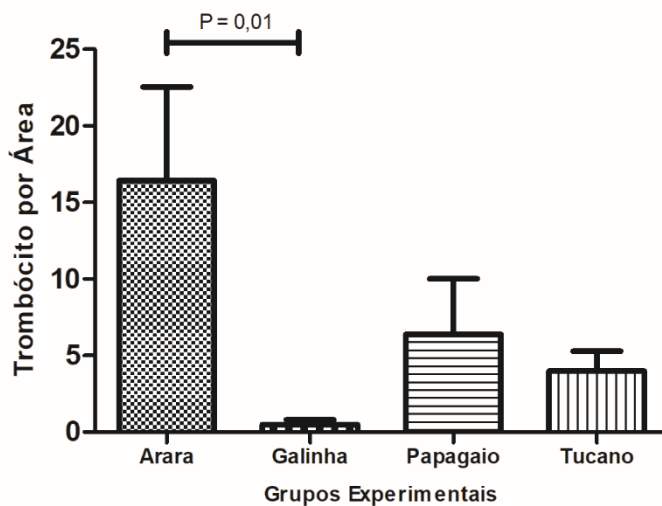


Figura 5 Quantidade de trombócitos por área em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).

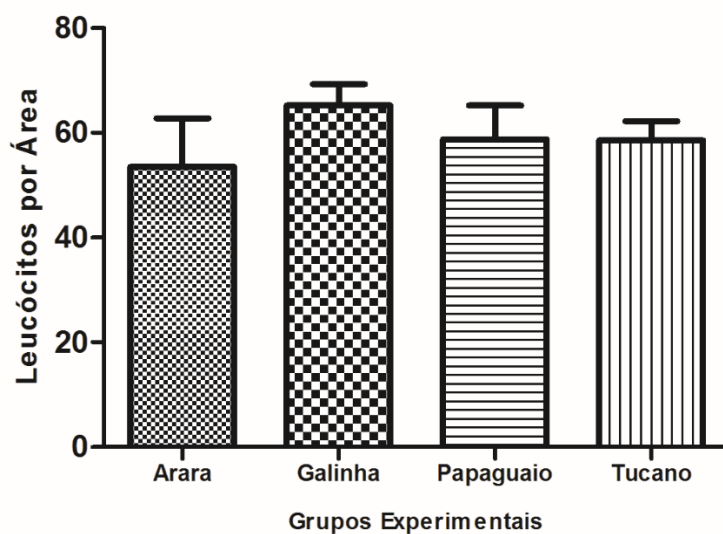
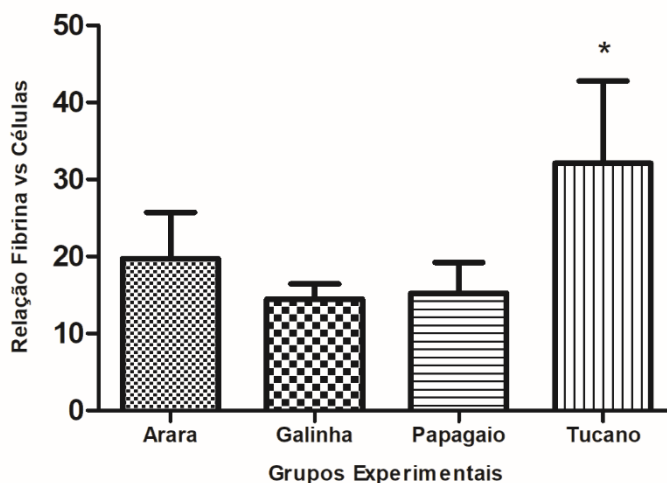


Figura 6 Quantidade de leucócitos por área em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).



* $P < 0,05$

Figura 7 Quantidade de fibrina X células em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).

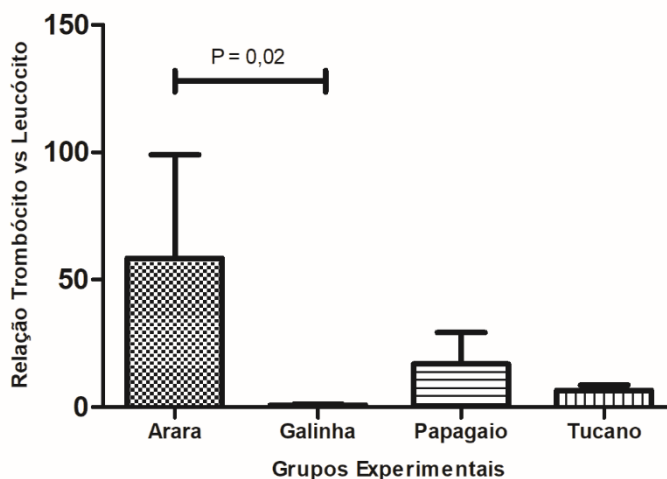


Figura 8 Relação trombócitos X leucócitos em membrana de fibrina rica em trombócitos e leucócitos, conforme o grupo (G1 - araras, G2 - galinhas domésticas, G3 – papagaios, G4 - tucanos-toco).

Pela análise histológica das membranas (Figuras 9, 10, 11 e 12) não foi possível delimitar individualmente as camadas celulares. Em algumas imagens a identificação dos leucócitos foi dificultada pelo fato de estarem dispersos e entremeados aos eritrócitos. A fibrina foi facilmente identificada, uma vez que se mostrava como uma camada densa e rosa (Figuras 9, 10, 11 e 12). Os

trombócitos também foram de fácil identificação, já que sempre estavam agrupados.

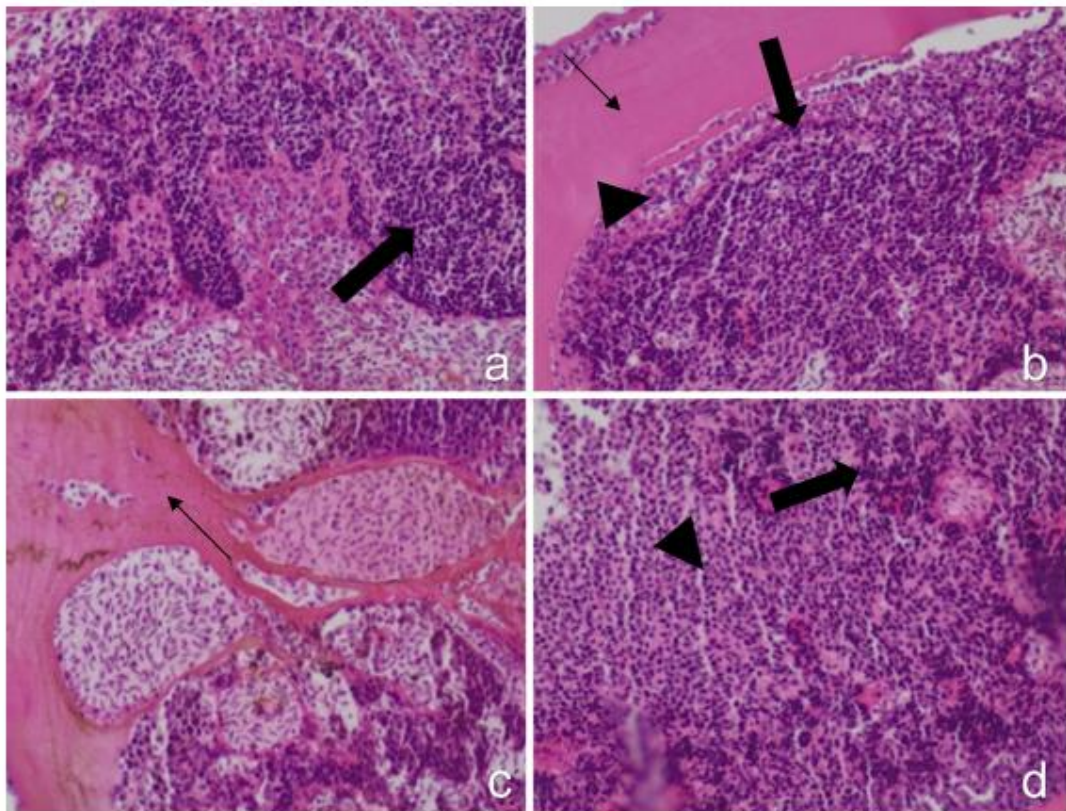


Figura 9 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de araras (Grupo 1). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x).

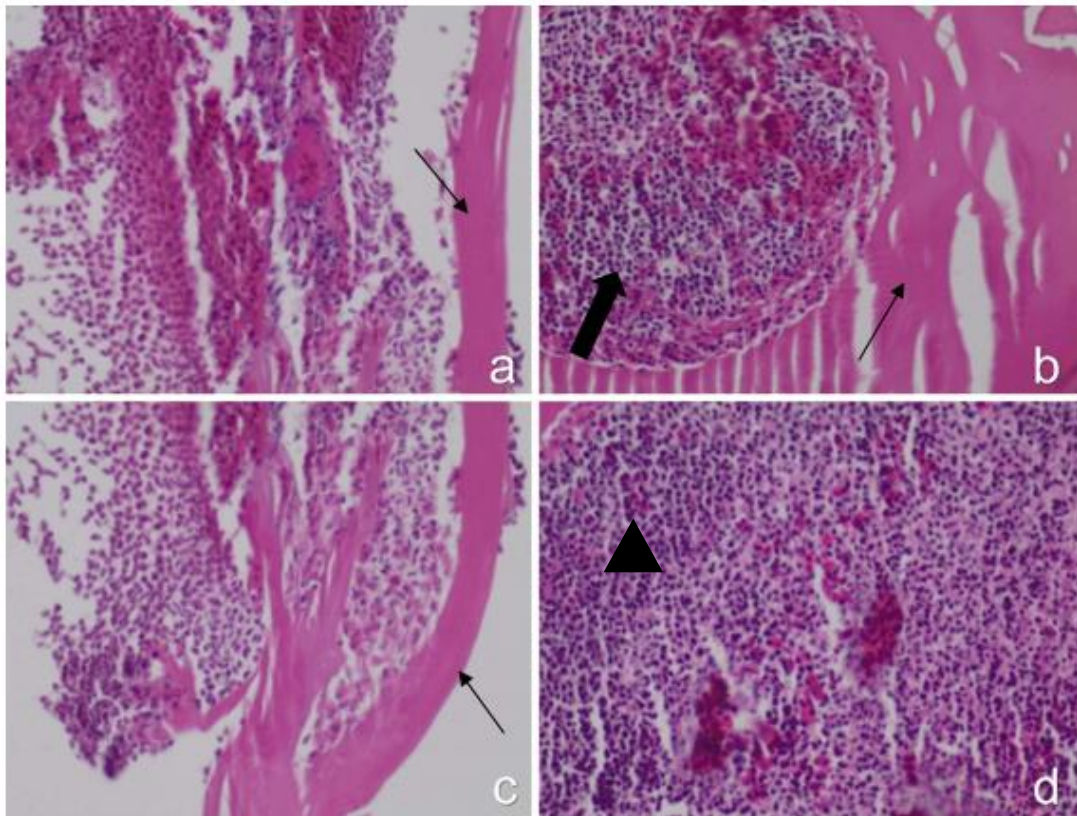


Figura 10 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de galinhas domésticas (Grupo 2). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x).

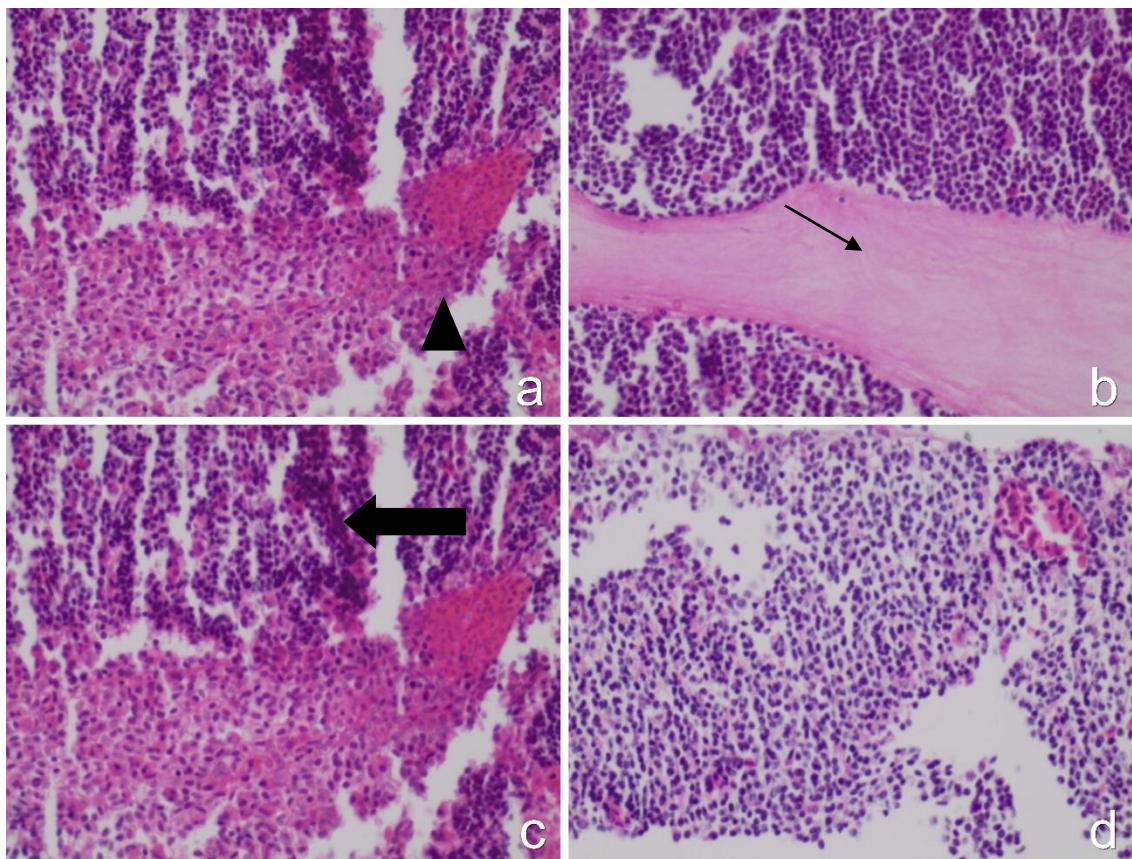


Figura 11 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de papagaios (Grupo 3). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x).

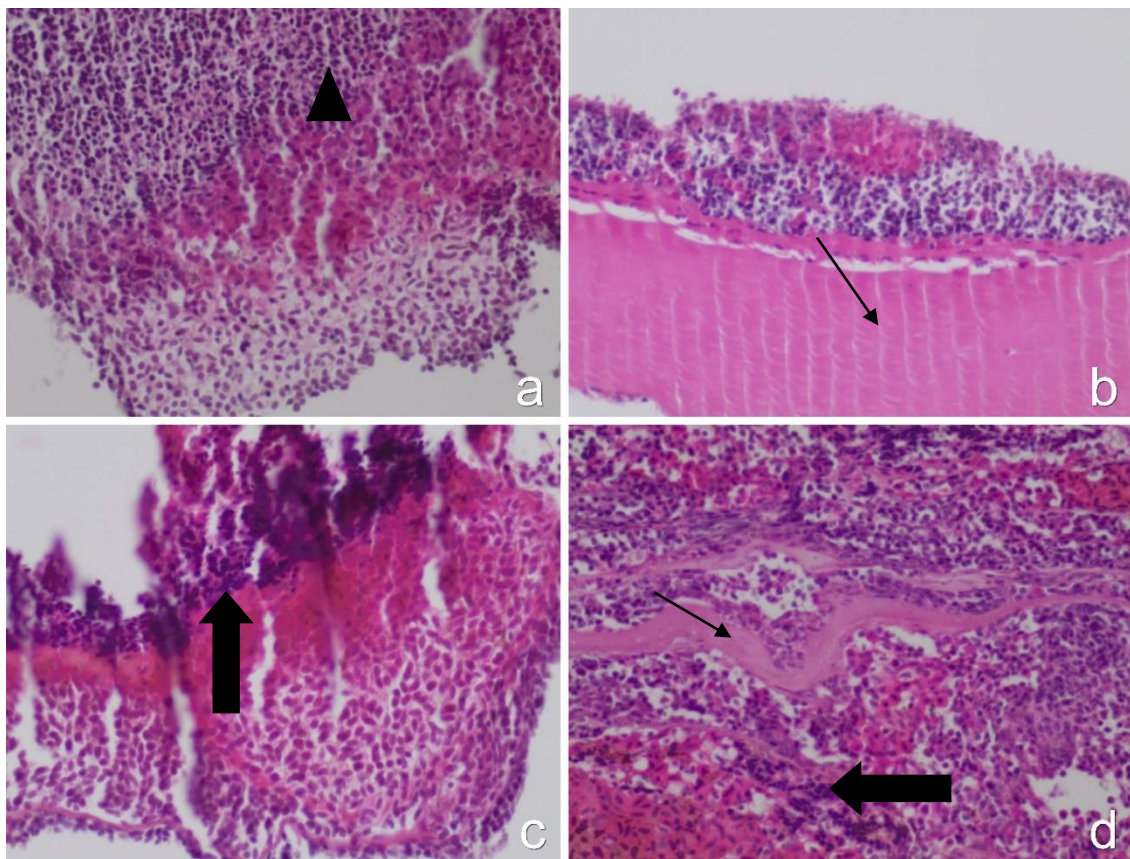


Figura 12 Aspectos de membranas de fibrina rica em trombócitos e leucócitos de toco tucanos (Grupo 4). Observe fibrina (seta pequena), trombócitos (seta grande) e leucócitos (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (40x).

DISCUSSÃO

Mesmo com uso somente de contenção física, a coleta de sangue pela veia jugular direita, que é de maior calibre que a esquerda em aves (CAMPBELL, 1994), permitiu a transferência do sangue para o tubo de vidro seco sem que ocorresse prévia coagulação. O sucesso da produção do PRF é dependente da velocidade da coleta do sangue e transferência para a centrífuga; se a manipulação não for rápida, a fibrina polimerizará de uma forma difusa no tubo e apenas um pequeno coágulo sem consistência será obtido (DOHAN et al., 2006).

As características da centrífuga e protocolos de centrifugação têm impacto significativo na célula, nos fatores de crescimento e arquitetura da fibrina, seja de uma membrana ou coágulo de L-PRF (EHRENFEST et al., 2018). No atual estudo a centrifugação foi a 3000 rpm por 10 minutos, em

centrífuga de bancada, possibilitando a formação inicialmente de um coágulo. Há vários processos de centrifugação, que influenciam da produção do PRF: o protocolo original ou método de Choukroun, o sangue venoso é coletado em tubo de vidro seco sem anticoagulante e centrifugado a velocidade de 3000 rpm, aproximadamente 400 g, por 10 minutos; no protocolo Leucócito e PRF (L-PRF), a velocidade é 2700 rpm por 12 minutos; no PRF Choukroun avançado (A-PRF), enriquecido com leucócitos, a velocidade é 1300 rpm por 8 minutos; no i-PRF Choukroun (solução/gel) é usado 700 rpm por 3 minutos (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). Embora a centrifugação do presente estudo simule o protocolo original de Choukroun, pela análise histológica foram observados leucócitos, sugerindo uma membrana não pura, que foi determinada como (L-PRT).

No atual estudo tomou-se o cuidado para preservar uma pequena camada de células sanguíneas vermelhas na extremidade do coágulo, como indicado por outros autores, já que a porção do coágulo sanguíneo unido ao coágulo de fibrina contém as células-tronco (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). Vale ainda citar que, segundo outros estudos, as plaquetas não ficavam distribuídas igualmente dentro e na superfície do coágulo de PRF (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). Pela análise histológica, isso também foi comprovado no atual estudo.

Ao ser prensado entre duas gazes, o coágulo de PRF torna-se uma membrana (EHRENFEST et al., 2009; GIANNINI et al., 2015), como observado no atual estudo. Para paciente humanos, há também caixas desenhadas especificamente (BoX grid) para coleta e transformação do coágulo em membrana, sob condições estéreis (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). Contudo, essas ainda não foram testadas para aves.

Em todos os grupos, as membranas mostraram-se flexíveis e aparentemente resistentes. Em geral, é citado que a arquitetura tridimensional da matriz de fibrina proporciona uma membrana com grande densidade, elasticidade, flexibilidade e força, facilitando a manipulação e sutura (GIANNINI et al., 2015). Para melhor comprovar essas premissas nas membranas das

diferentes espécies avaliadas, torna-se necessário a realização de estudos biomecânicos.

Independente da espécie, histologicamente não foi possível distinguir individualmente as camadas celulares nas membranas. Por sua vez, em estudo sobre padrões de rede de fibrina em coágulo de PRF, foi possível observar histologicamente uma camada mais externa de hemácias, seguida de uma camada de rede de fibrina densa com um número máximo de plaquetas e leucócitos aprisionados e uma camada mais interna com rede de fibrina frouxa e com reduzido aprisionamento de plaquetas e leucócitos (YAJAMANYA et al., 2016).

Em estudo sobre influência da centrifuga na qualidade da membrana PRF, foi detectado que diferentes membranas mostraram uma organização similar pela análise histológica, ou seja, 75% da maioria dos corpos celulares se concentraram no um terço proximal da membrana, o remanescente no terço central e apenas os corpos residuais no terço distal (EHRENFEST et al., 2018).

Entre os elementos ativos do PRF em humanos, que são responsáveis pela regeneração e cicatrização tecidual, incluem-se a fibrina, as plaquetas e células (leucócitos e células-tronco) (HARTSHORNE e GLUCKMA, 2016a). Extrapolando esses dados, no atual estudo avaliou-se comparativamente entre as membranas, a quantidade de fibrina, leucócitos e trombócitos.

Com relação a proporção de fibrina x células, essa foi maior no Grupo 4, sem diferenças entre os demais. Esse é um dado importante, já que a fibrina serve como uma matriz de suporte e tem influencia direta na biologia dos biomateriais autólogos baseados em fibrina (EHRENFEST et al., 2018).

Por sua vez, o número de leucócitos por área não diferiu entre os grupos. Embora os leucócitos sejam responsáveis pela ação antibacteriana e atividade osteocondutiva (HARTSHORNE e GLUCKMA, 2016a), a importância dos mesmos na biologia do PRF é ainda controverso (EHRENFEST et al., 2009). Vale salientar que estudos in vitro que tem atestado a superioridade ou inferioridade dessas preparações, não tem ainda sido validados em experimentos clínicos (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b).

O maior número de trombócitos/área foi verificado nas membranas do Grupo 1, sendo que nos demais grupos apresentaram números similares. Em mamíferos, o número de plaquetas nas membranas é um valor importante, já que as plaquetas são ricas em fatores de crescimento (EHRENFEST et al., 2010; HARTSHORNE e GLUCKMA, 2016a). Essa extrapolação deve ser realizada com cuidado em aves, visto que a coagulação sanguínea se deve aos trombócitos, que são células nucleadas ao invés de fragmentos citoplasmáticos como as plaquetas (CAMPBELL, 1994). Diferente das plaquetas em mamíferos, os trombócitos aviários são originados de células tronco e não de megacariócitos (MITCHELL e JOHNS, 2008; JONES, 2015). A função dos trombócitos não está completamente esclarecida, mas além da hemostasia e produção de tromboplastina, possuem também ação fagocítica (MITCHELL e JOHNS, 2008; JONES, 2015). Desta forma, o maior número de trombócitos nas membranas das araras (Grupo 1), provavelmente indica um fator de positividade.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que é possível produzir membranas de L-TRF nas espécies de aves avaliadas, porém histologicamente as proporções dos elementos avaliados foram similares apenas nas galinhas domésticas e papagaios.

REFERÊNCIAS

BIELECKI, T.; EHRENFEST, D.M.D. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.13, p.1121-1130, 2012.

BORIE, E.; OLIVÍ, D.G.; ORSI, I.A.; GARLET, K.; BWEBER, B.; BELTRÁN, V.; FUENTES, R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, v.8, n.5, p.7922–7929, 2015.

CAMPBELL, TW. Hematology. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Avian medicine: principles and applications*. Lake Worth: Wingers Publishing, p.176–98, 1994.

DHURAT, R.; SUKESH, M.S. Principles and methods of preparation of platelet rich plasma: a review and author's perspective. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, v.7, n.4, p.189-197, 2014.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.101, p.E37-44, 2006.

EHRENFEST, D.M.D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*, v.27, n.3, p.158-167, 2009.

EHRENFEST, D.M.D. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.110, n.3, p.275-278, 2010.

EHRENFEST, D.M.D.; PINTO, N.R.; PEREDA, A.; JIMÉNEZ, P.; DEL CORSO, M.; KANG, B.S.; NALLY, M.; LANATA, N.; WANG, H-L.; QUIRYNEN, M. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, v.29, n.2, p.171-184, 2018.

FABRO, A.T.; SILVA, P.H.R.Q; ZOCOLARO, W.S.; ALMEIDA, M.S.; RANGEL, M.P.; OLIVEIRA, C.C.; MINATEL, I.O.; PRANDO, E. D.C.; RAINHO, C.A.; TEODORO, W.R.; VELOSA, A.P.P.; SABER, A.M.A.; PARRA-CUENTAS, E.R.; POPPER, H.H.; CAPELOZZI, V.L. The Th17 pathway in the peripheral lung microenvironment interacts with expression of collagen V in the late state of experimental pulmonary fibrosis. *Immunobiology*, v.220, p.124–135, 2015.

FORBES, N.A.; GUZMAN, D.S-M. *Avian medicine and surgery: self-assessment color review*. Boca Raton: CRC Press, 2017. 364p.

GIANNINI, S.; CIELO, A.; BONANOME, L.; RASTELLI, C.; DERLA, C.; CORPACI, F.; FALISI, G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, v.19, p.927-930, 2015.

HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part 1: Definition, development, biological characteristics and function. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.14-24, 2016a.

HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part II: Preparation, optimization, handling and application, benefits and limitations of PRF. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.34-48, 2016b.

HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part III: Clinical indications of PRF in implant dentistry, periodontology, oral surgery and regenerative endodontics. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.64-79, 2016c.

JONES, M.P. Avian Hematology. *Vet. Clin. North Am.: Exotic An. Pract.*, v.18, n.1, p.649-659, 2015.

LANSDOWN, D.A.; FORTIER, L.A. Platelet-Rich Plasma: formulations, preparations, constituents, and their effects. *Oper. Tech. Sports Med.*, v.25, p.7-12, 2017.

MAUTNER, K.; MALANGA, G.A.; SMITH, J.; SHIPLE, B.; IBRAHIM, V.; SAMPSON, S.; BOWEN, J.E. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM & R*, p.S52-S59, 2015.

MITCHELL, E.B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, v.11, p.501–522, 2008.

MIRON, R.J.; ZUCHELLI, G.; PIKOS, M.A.; SALAMA, M.; LEE, S.; GUILLEMETTE, V.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; BISHARA, M.; ZHANG, Y.; WANG, H.L.; CHANDAD, F.; NACOPOULOS, C.; SIMONPIERI, A.; AALAM, A.A.; FELICE, P.; SAMMARTINO, G.; GHANAATI, S.; HERNANDEZ, M.A.; CHOUKROUN, J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin. Oral Investig.*, v.21, n.6, p.1913-1927, 2017.

MUDROŇOVÁ, D.; KOŽÁR, M.; MOLNÁR, L.; TRBOLOVÁ, A. Viability and discrimination of avian peripheral blood mononuclear cells and thrombocytes intended for improvement of wound healing in birds. *Acta Vet. Hung.*, v.62, n.3, p.334–339, 2014.

SALUJA, H.; DEHANE, V.; AND UMA MAHINDRA. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *Ann. Maxillofac. Surg.*, v.1, n.1, p.53–57, 2011.

YAJAMANYA, S.R.; CHATTERJEE, A.; BABU, C.N.; KARUNANITHI, D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. *J. Indian Soc. Periodontol.* v.20, n.2, p.151-156, 2016.

3. REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Aplicações dos PRP

As plaquetas são fundamentais na cascata de coagulação e nos processos de cicatrização (SOOMEKH, 2011; BIELECK e EHRENFES, 2012). São designadas em mamíferos como células não nucleadas derivadas de megacariócitos e formadas na medula, sendo consideradas um tipo de célula branca sanguínea (SOOMEKH, 2011; WILLITS et al., 2013).

Em aves, a coagulação sanguínea se deve aos trombócitos, que são células nucleadas ao invés de fragmentos citoplasmáticos como as plaquetas (CAMPBELL, 1994). Diferente das plaquetas em mamíferos, os trombócitos aviários são originados de células tronco e não de megacariócitos (MITCHELL e JOHNS, 2008; JONES, 2015). A função dos trombócitos não está completamente esclarecida, mas além da hemostasia e produção de tromboplastina, possuem também ação fagocítica (MITCHELL e JOHNS, 2008; JONES, 2015). Desta forma, os trombócitos, juntamente com granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos) e células mononucleares estão inclusos como leucócitos em aves (JONES, 2015).

Os trombócitos maduros são classificados como células pequenas ovais, que parecem ser mais redondas do que os eritrócitos, com núcleo picnótico (cromatina nuclear densa) e citoplasma cinza pálido ou levemente azul (CAMPBELL, 1994; JONES, 2015). Esse último pode conter um ou mais grânulos vermelhos e vacúolos pequenos ou espaços claros (CAMPBELL, 1994; MITCHELL e JOHNS, 2008).

BERTRAM (1998) identificou trombócitos de pato em células mononucleares do sangue periférico purificadas a partir do sangue total, usando gradientes de densidade de Ficoll-Paque, por meio de esfregaços tingidos dessas células. Segundo o autor, os trombócitos podem ser purificados de linfócitos pelo aumento da dispersão lateral. Os trombócitos foram considerados similares aos da galinha tanto em aparência como função.

As plaquetas possuem vários fatores de crescimento, tais como fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento transformante e fatores de crescimento derivados das plaquetas, que são liberados das plaquetas no

momento da ativação, ou ao serem secretadas, ou mesmo agregadas por colágeno ou epinefrina (FREYMILLER e AGHALOO, 2004; WU et al., 2016). A racionalidade do uso terapêutico do PRP é que as moléculas bioativas liberadas das plaquetas ativadas promove a recuperação do tecido danificado por recrutamento e proliferação celular, ou morfogênese e modulação da inflamação (PIUZZI et al., 2017). Desta forma, as propriedades do PRP se baseiam na produção e liberação de múltiplos fatores de crescimento e diferenciação, quando as plaquetas são ativadas (ALSOUSOU et al., 2009). Basicamente o PRP é usado com o intuito de aumentar a concentração de plaquetas no local alvo (SOOMEKH, 2011).

O primeiro uso clínico do PRP em pacientes humanos foi em 1987, nos Estados Unidos, com o intuito de facilitar a cicatrização de ferida após cirurgia cardíaca (MAUTNER et al., 2015). O potencial de aplicações do PRP é considerado amplo (DHURAT e SUKESH, 2014) e já tem sido aplicado na cicatrização de feridas, bem como em procedimento cirúrgicos nas áreas de plástica, coluna vertebral, oral e maxilofacial, ortopédica e pediátrica, cirurgia cardiovascular, entre outros (SOOMEKH, 2011; ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013; WILLITS et al., 2013; MAUTNER et al., 2015; WU et al., 2016). Uma outra possível vantagem das terapias ricas em plaquetas é o efeito bactericida e fungicida que apresentam (WILLITS et al., 2013). Apesar disso, há uma série de fatores que contribuem para a variabilidade dos resultados, que precisam ser melhor compreendidos (LANSDOWN e FORTIER, 2017).

Em estudo de meta-análise, efetuado por Gianakos et al. (2015), sobre o uso do PRP em modelos defeitos ósseos críticos em ossos longos de animais (porco, rato, coelho, cabra, ovelha, cão) foi observado que em 89% deles houve melhora da consolidação óssea pela avaliação histológica/morfológica, 100% mostrou aumento significativo na formação óssea pela avaliação radiográfica e 80% pela microtomografia, 100% teve maior rigidez torcional.

Sheth et al. (2017) ao efetuarem revisão sistemática e meta-análise para avaliar o tempo de retorno ao esporte e taxa de nova injúria, após o uso de PRP em pacientes humanos com distensões musculares grau I e II, concluíram

haver sugestões de retorno precoce ao esporte nos indivíduos que se valeram da terapia sem significativo aumento de nova injúria no seguimento de 6 meses.

Em aves, o primeiro estudo sobre concentrados “plaquetários” foi desenvolvido por Mudroňová et al. (2014), que avaliaram a citometria de fluxo e testaram carreadores para aplicação do produto.

Preparação do PRP

A preparação do PRP é considerada relativamente simples e, na realidade, trata-se de um preparado obtido por filtração, ou por centrifugação diferencial do sangue de um paciente, em que a força da aceleração é ajustada para sedimentar certos constituintes celulares, de acordo com a gravidade específica (FREYMILLER e AGHALOO, 2004; SOOMEKH, 2011; DHURAT e SUKESH, 2014). Pelo processo de plasmaferese, as partículas de maior diâmetro, como as células sanguíneas vermelhas e células sanguíneas brancas, se acomodarão mais rapidamente que as plaquetas quando sujeitas a força gravitacional, de forma que as plaquetas ficarão seletivamente suspensas no plasma (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). Na tecnologia de filtração seletiva, as plaquetas são capturadas por um filtro e depois coletadas, sem a necessidade de centrifugação (ALSOUSOU et al., 2009).

Mudroňová et al. (2014), avaliaram a citometria de fluxo para contagem de trombócitos e leucócitos mononucleares, bem como testaram carreadores para aplicação em feridas. Para a análise foi utilizado 1 ml de sangue, obtido da veia jugular em 15 *Gallus domesticus* com aproximadamente 1,5 anos de idade. O sangue foi coletado em tubo contendo heparina e as células mononucleares do sangue periférico foram isoladas por meio de separação de linfócitos (LSM 1077). Os tubos foram centrifugados durante 25 minutos ($600 \times g$) e, na sequência, a interface de células mononucleares do sangue periférico foi transferida para outro tubo (12 ml). As células foram lavadas por duas vezes com salina tamponada com fosfato e centrifugadas por 2 min ($250 \times g$), finalizando com a ressuspensão do sedimento de células mononucleares do sangue periférico em 0,5 ml de salina tamponada com fosfato. Segundo os autores, a citometria de fluxo foi considerada como um método rápido de

contagem de trombócitos, linfócitos, eventualmente monócitos ou debris. O melhor carreador foi uma esponja de gelatina (Gelaspon) por apresentar o maior número e viabilidade celular.

Há uma ampla variedade de técnicas de preparação de concentrados plaquetários para uso em pacientes humanos e, entre os sistemas de classificação, pode ser citado o desenvolvido por Ehrenfest et al. (2009), que dividiram em quatro categorias: Puro Plasma Rico em Plaquetas (P-PRP) ou PRP pobre em leucócitos (LP-PRP) – preparações sem leucócitos e com baixa densidade de rede de fibrina após ativação; Leucócitos e PRP (L-PRP) – preparações com leucócitos e com baixa densidade de rede de fibrina após ativação; Pura Fibrina Rica em Plaqueta (P-PRF) ou PRF pobre em leucócitos – preparações sem leucócitos e com alta densidade de rede de fibrina; Leucócitos e PRP (L-PRP) (PRF Choukroun) – preparações com leucócitos e com alta densidade de rede de fibrina (DHURAT e SUKESH, 2014; MAUTNER et al., 2015; LANSDOWN e FORTIER, 2017). Contudo, essa classificação não informa sobre as células sanguíneas vermelhas ou proporciona informação relativa à subpopulação de células brancas sanguíneas/leucócitos, como os neutrófilos (MAUTNER et al., 2015).

No método P-PRP o sangue é coletado com anticoagulante e utiliza-se uma centrifugação inicial suave para separar as células vermelhas do sangue (DHURAT e SUKESH, 2014). São formadas três camadas, a superior que contém principalmente plasma acelular (plasma pobre em plaquetas), a camada intermediária fina conhecida como “buffycoat” (contém a maior proporção de plaquetas e leucócitos) e a camada inferior que consiste principalmente de células vermelhas do sangue (SOOMEKH, 2011; DHURAT e SUKESH, 2014; WU et al., 2016). Embora ocorra variações, geralmente para a produção do P-PRP as camadas superior e intermediária são transferidas para um tubo estéril (sem anticoagulante) e realiza-se centrifugação mais potente (DHURAT e SUKESH, 2014). Em humanos a primeira centrifugação tem sido de 200 g a 600 g e a segunda de 700 g a 2,300 g (PICCIN et al., 2017).

A porção superior composta de plasma pobre em plaquetas é descartada (DHURAT e SUKESH, 2014; PIUZZI et al., 2017). O P-PRP então

consiste de uma fração do “buffycoat” suspenso em algum plasma rico em fibrina (DHURAT e SUKESH, 2014; PIUZZI et al., 2017).

Para produção do L-PRP, segundo Piuzzi et al. (2017), após a centrifugação leve, a camada inteira de “buffycoat” e algum resíduo da camada inferior são transferidos para outro tubo. A centrifugação mais potente é efetuada e o plasma pobre em plaquetas é descartado, sendo o L-PRP formado do “buffycoat”, que contem principalmente plaquetas e leucócitos, e algum resíduos de células sanguíneas vermelhas suspenso em algum plasma rico em fibrina.

Há também processos de centrifugação automatizados, que separam as plaquetas do sangue total (SOOMEKH, 2011). Em estudo sobre a preparação do PRP humano, usando cinco sistemas comerciais de separação, foi demonstrado que a concentração de plaqueta e eficiência de captura foram semelhantes, porém ocorreram diferenças com relação as células brancas do sangue, neutrófilos, concentração de células sanguíneas vermelhas e pH (DEGEN et al., 2017). Outra pesquisa, também com sangue humano, avaliou quatros sistemas comerciais de separação e mostrou haver variações de plaquetas, células sanguíneas vermelhas, leucócitos, pH e glicose (FITZPATRICK et al., 2017). Em 15 cães foi comparado o PRP obtido por cinco sistemas comerciais, tendo sido observado diferenças substanciais na quantidade de sangue processado, método de preparação, quantidade de PRP produzido e concentrações de eritrócitos, leucócitos e plaquetas (FRANKLIN et al., 2015). Outro estudo com 10 cães utilizando cinco sistemas comerciais, também mostrou diferenças com relação a concentração de plaquetas (CARR et al., 2016).

Um fato importante é que uma vez o PRP tenha sido preparado, este se mantém estável no estado anticoagulado por 8 horas ou mais, o que permite o seu processamento antes de um procedimento cirúrgico (ALSOUSOU et al., 2009).

Após o PRP ser produzido, este pode ou não ser ativado por outro produto, porém não há ainda consenso sobre o assunto (SOOMEKH, 2011; DHURAT e SUKESH, 2014; WU et al., 2016). O objetivo da ativação exógena

do PRP é gerar o PRF, de modo a assegurar que os fatores de crescimento estejam disponíveis imediatamente (LANSDOWN e FORTIER, 2017). A ativação pode ser realizada com trombina ou cálcio (SOOMEKH, 2011; DHURAT e SUKESH, 2014; LANSDOWN e FORTIER, 2017). A trombina atua de forma mais rápida que o cálcio e, geralmente, é utilizada com o cloreto de cálcio (MAUTNER et al., 2015). Por sua vez, a ativação endógena depende da exposição do PRP ao colágeno, ou fatores de coagulação expressados após a injeção (LANSDOWN e FORTIER, 2017). Apesar do processo de ativação, segundo Mautner et al. (2015), com o PRP ativado será formada uma rede de fibrina e o plasma iniciará a solidificar, de forma a criar um coágulo ou membrana de fibrina. Se o PRP for superativado a rede de fibrina ficará instável, porém se ativado de forma mais fisiológica, a rede será estável e permitirá a aderência de células e fatores de crescimento.

O PRP sem ativação pode ser utilizado, por exemplo, no tratamento de tendões, músculos e outros tecidos moles, ao passo que o ativado dentro de um gel ou selante de fibrina pode ser aplicado, clinicamente ou durante o procedimento cirúrgico, para o aumento ósseo e cicatrização de feridas (SOOMEKH, 2011).

Cuidados na preparação do PRP

De acordo com Lansdown e Fortier (2017), em pacientes humanos é indicado o uso de agulha calibre 21 ou mais para a coleta do sangue, visto que com agulhas de menor calibre pode ocorrer ativação prematura das plaquetas. Além disso, a aspiração do sangue deve ser vagarosa, porque a velocidade pode influenciar na qualidade da plaqueta. Acrescenta-se ainda que uso de anestésicos locais junto com o PRP deve ser cuidadosamente avaliado, visto a função da plaqueta ser afetada pelo pH de qualquer aditivo.

A temperatura durante o processamento é importante para evitar a ativação plaquetária, sendo recomendado entre 21°C-24°C, durante a centrifugação (DHURAT e SUKESH, 2014).

Tubos de polipropileno são considerados os melhores para a preparação do PRP e estocagem, comparado ao vidro e poliestireno, que podem promover

ativação prematura ou alterações de morfologia das plaquetas (LANSDOWN e FORTIER, 2017). Anticoagulantes como citrato e citrato de sódio-dextrose são mais indicados do que o EDTA, visto este último ter o potencial de danificar a membrana plaquetária (DHURAT e SUKESH, 2014). Há também autores que recomendam o citrato dextrose-A e o citrato fosfato dextrose (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013). Contudo, há citações que embora o citrato fosfato dextrose seja similar ao citrato dextrose-A, há menos ingredientes de suporte e, por isso, pode ser menos efetivo em manter a viabilidade plaquetária (ALSOUSOU et al., 2009).

A idade e o sexo em pacientes humanos aparentemente não influenciam na concentração de plaquetas, ou na concentração dos fatores de crescimento (DHURAT e SUKESH, 2014). Contudo, o hematócrito e a contagem total de plaquetas influenciam na concentração de plaquetas no PRP (DHURAT e SUKESH, 2014; PICCIN et al., 2017).

Deve-se ainda considerar, segundo Alsouson et al. (2009), que o resultado pode ser influenciado pelo método utilizado para medir a concentração de plaquetas. As contagens manuais registrarão as plaquetas individuais, ao passo que a varredura automatizada, como por exemplo com Coulter Counter, pode contar aglomerados de plaquetas como uma plaqueta única, subestimando o número.

Algumas considerações sobre o PRP

Embora de um ponto de vista genérico os protocolos para preparação do PRP acompanhem uma mesma sequência, há variações do volume sanguíneo, número de rotações, tempo de centrifugação, número de centrifugações, alcance de aceleração da centrífuga e volume injetado (SOOMEKH, 2011; DHURAT e SUKESH, 2014; WU et al., 2016). Desta forma, as técnicas empregadas e a forma de preparo têm contribuído para os resultados conflitantes quanto aos benefícios ou não do procedimento (FREYMILLER e AGHALOO, 2004). Contudo, vale citar que o concentrado final de plaquetas dependerá do volume inicial de sangue removido, a eficiência da técnica utilizada para recuperação das plaquetas e o volume final do plasma utilizado

para suspender o concentrado de plaquetas (ARNOCZKY e SHEBANI-RAD, 2013).

Com respeito ao conteúdo de plaquetas, em medicina humana tem sido sugerido usar concentrações de plaquetas no PRP que estejam 4 a 6 vezes maior ao observado no sangue total, sendo que concentrações maiores podem proporcionar nenhum efeito adicional ou mesmo promover inibição (WU et al., 2016). Por sua vez, Mautner et al. (2015) citaram que a concentração “ideal” de plaquetas permanece desconhecido em paciente humanos, visto que depende também do parâmetro alvo, o tecido a ser tratado e o estágio da doença ou de cicatrização da ferida. Além disso, para obter parâmetros comparativos, os autores recomendam que os pesquisadores explicitem a concentração de plaquetas, o volume injetado e o número total de plaquetas entregue a região afetada.

Diversos fatores podem contribuir para o gradiente de concentração de plaquetas, incluindo o tamanho das plaquetas, diferenças entre indivíduos e variabilidade do hematócrito (DHURAT e SUKESH, 2014; PICCIN et al., 2017). Além disso, a qualidade do PRP pode ser estimada pela taxa de recuperação, integridade e vitalidade das plaquetas, que são influenciados pela aceleração da centrífuga e duração da centrifugação (PICCIN et al., 2017).

A presença ou ausência de leucócitos na formulação também influencia a função do PRP e, dependendo do propósito do tratamento e localização da injeção, o efeito pode ser positivo ou negativo (LANSDOWN e FORTIER, 2017). A preocupação com respeito aos leucócitos se deve aos possíveis efeitos pró-inflamatórios, em especial os neutrófilos (MAUTNER et al., 2015). Por exemplo, o uso de L-PRP no tratamento de injúria muscular aguda pode aumentar o risco de lesão muscular (LANSDOWN e FORTIER, 2017). A excessiva inflamação pode também exacerbar mais do que aliviar a dor artrítica (MAUTNER et al., 2015). Por outro lado, segundo Arnoczky e Shebani-Rad (2013), produtos contendo células brancas sanguíneas mostraram potencial para inibir o crescimento de algumas bactérias e melhorar a cicatrização de injúrias de tecidos moles infectadas. Sendo assim, segundo esses autores, o efeito positivo ou negativo não pode ser generalizado para todos os tecidos e

todas condições clínicas, de forma que preparações contendo células brancas sanguíneas podem ser mais benéficos em certas condições.

Um fato importante é que em aplicações intra-articulares as concentrações de células vermelhas sanguíneas devem ser reduzidas ou eliminadas, visto que sinoviócitos humanos tratados com concentrado de células sanguíneas apresentaram morte celular e degradação da cartilagem (WU et al., 2016).

Produção e características do PRF

O PRF consiste de uma matriz de fibrina autóloga, que tem por vantagens a mais fácil preparação, com tempo e custo inferiores ao PRP, além de não requerer manipulação química do sangue por anticoagulante, trombina bovina ou cloreto de cálcio, sendo assim adequado para a prática diária (EHRENFEST et al., 2009; BORIE et al., 2015; GIANNINI et al., 2015; MIRON et al., 2017). Em essência o PRF é formado por fibrina, plaquetas, fatores de crescimento e vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células-tronco (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a). Quando aplicado no tecido, o PRF dissolve vagarosamente, com isso há liberação de fatores de crescimento e citocinas por um período de 10 dias (MIRON et al., 2017). A conformação espacial da fibrina obtida no PRF serve como substrato para plaquetas e atua com um sinal quimiotático para a células tronco (GIANNINI et al., 2015).

A produção da PRF é também fundamentada na centrifugação do sangue total, mas o objetivo final é a produção de um biomaterial baseado em fibrina e não uma suspensão de plaqueta líquida (BIELECKI e EHRENFEST, 2012). As características da centrífuga e protocolos possuem impacto significativo nas células, fatores de crescimento e arquitetura da fibrina (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). O método foi desenvolvido na França por Choukroun e colaboradores em 2001, para o uso em cirurgias orais e maxilofaciais (SALUJA et al., 2011).

As matrizes de fibrina ricas em plaquetas têm por vantagem o desenvolvimento de uma construção bioativa, em que o arcabouço provisório de fibrina atua como uma matriz condutiva para migração de células, bem

como um reservatório de fatores de crescimento (ARNOCZKY e SHEBANIRAD, 2013; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016a). A rede de fibrina formada apresenta uma organização homogênea tridimensional, sendo que o PRF provavelmente é capaz de liberar progressivamente citocinas durante a remodelação de matriz de fibrina (DOHAN et al., 2006b). Desta forma, a fibrina guia e regula o balanço proliferação/diferenciação (BIELECK e EHRENFES, 2012),

A PRF pode ser usada na forma de gel ou na forma de membrana, com o intuito de promover a cicatrização de feridas, crescimento ósseo, estabilização de enxerto e hemostasia, entre outros (SALUJA et al., 2011). O PRF tem sido utilizado em cirurgias orais, maxilofaciais, plásticas, e de orelha, nariz e garganta (EHRENFEST et al., 2009).

Segundo Piuzzi et al. (2017), para a produção da Pura Plaqueta Rica em Fibrina (P-PRF) ou a Plaqueta Rica em Fibrina Pobre em Leucócito (LP-PRF), o sangue total é coletado sem anticoagulante e imediatamente centrifugado, gerando um processo de coagulação natural, sem requerer modificação bioquímica. A cascata de coagulação ocorre quando as plaquetas se ativam ao entrarem em contato com o tubo (DOHAN et al., 2006a; GIANNINI et al., 2015). A P-PRF e a L-PRF são biomateriais ricos em plaquetas ativadas, respectivamente, com ou sem leucócitos, apresentando uma forte arquitetura em fibrina (BIELECKI e EHRENFEST, 2012).

Por sua vez, Hartshorne e Gluckman (2016b) citaram que há vários processos de centrifugação, que influenciam da produção do PRF: o protocolo original ou método de Choukroun, o sangue venoso é coletado em tubo de vidro seco sem anticoagulante e centrifugado a velocidade de 3000 rpm, aproximadamente 400g, por 10 minutos; no protocolo Leucócito e PRF (L-PRF), a velocidade é 2700 rpm por 12 minutos; no PRF Choukroun avançado (A-PRF), enriquecido com leucócitos, a velocidade é 1300 rpm por 8 minutos; no i-PRF Choukroun (solução/gel) é usado 700 rpm por 3 minutos. Vale salientar que estudos in vitro que tem atestado a superioridade ou inferioridade dessas preparações, não tem ainda sido validados em experimentos clínicos.

O sucesso da produção do PRF é dependente da velocidade da coleta do sangue e transferência para a centrífuga; se a manipulação não for rápida, a fibrina polimerizará de uma forma difusa no tubo e apenas um pequeno coágulo sem consistência será obtido (DOHAN et al., 2006a). Além disso, um estudo desenvolvido por Ehrenfest et al. (2017), empregando a centrífuga original L-PRF (Intra-Spin) e três outras centrífugas de laboratório, mostrou que as características da centrífuga e protocolos de centrifugação têm impacto significativo na célula, nos fatores de crescimento e arquitetura da fibrina, seja de uma membrana ou coágulo de L-PRF.

Após a centrifugação, formam-se três camadas: a de células vermelhas do sangue na base, uma camada de plasma acelular no topo, e uma camada intermediária de coágulo de PRF no meio (EHRENFEST et al., 2009; PIUZZI et al., 2017). Ao ser prensado entre duas gazes, o coágulo de PRF torna-se uma membrana (EHRENFEST et al., 2009; GIANNINI et al., 2015). A pressão deve ser vagarosa, gentil e homogênea (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). Há também caixas desenhadas especificamente (BoX grid) para coleta e transformação do coágulo em membrana, sob condições estéreis (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). A caixa de PRF permite uma preparação homogênea das membranas, com maior conteúdo de fatores de crescimento, evita a desidratação ou morte dos leucócitos, e previne o encolhimento da arquitetura da matriz de fibrina (EHRENFEST, 2010).

De acordo com Hartshorne e Gluckman (2016b), aparentemente o tipo de vacotubo (vidro seco ou tubo de plástico coberto de vidro) e processo de compressão do coágulo não parecem influenciar na arquitetura do biomaterial, porém pode ocorrer influência no conteúdo do fator de crescimento e propriedades da matriz. É recomendado não remover todo o plasma contido nos coágulos originais, para melhor preservação das plaquetas e fatores de crescimento.

A arquitetura tridimensional da matriz de fibrina proporciona uma membrana com grande densidade, elasticidade, flexibilidade e força, facilitando a manipulação e sutura (GIANNINI et al., 2015; HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016c). As plaquetas não ficam distribuídas igualmente dentro e na superfície

do coágulo de PRF (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b). Desta forma, é importante preservar uma pequena camada de células sanguíneas vermelhas na extremidade do coágulo. Isso é feito com tesoura e é operador dependente (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b).

Se adequadamente preparadas a membranas permanecem estáveis por muitas horas, porém quantidades significantes de fatores de crescimento são liberadas durante os primeiros 20 minutos após a preparação (HARTSHORNE e GLUCKMAN, 2016b).

No caso do Leucócito - PRF (L-PRF), no método de Choukroun, o sangue venoso é coletado em tubo de vidro seco e centrifugado a baixa velocidade (3000 rpm, aproximadamente 400 g, por 10 minutos, sem anticoagulante (DOHAN et al., 2006a; PIUZZI et al., 2017), usando centrífuga PC-O2 (DOHAN et al., 2006a).

Um estudo sistemático em odontologia regenerativa humana, efetuado por Miron et al. (2017), mostrou ser o método PRF promissor para o reparo periodontal de defeitos de furca e intraósseos, bem como para cobertura de raiz dentária em retrações gengivais. Há ainda evidência que o PRF seja capaz de diminuir a infecção seguinte a extração dentária e limitar as mudanças dimensionais seguinte a perda da raiz. Na regeneração de defeitos ósseos, há pontos que precisam ser esclarecidos. Por sua vez, outro estudo sistemático mostrou ser o PRF efetivo no aumento do assoalho dos sinos e no tratamento de defeitos peri-apical e endo-periodontal (BASTAMI e KHOJASTEH, 2016).

Acar et al. (2014) ao avaliarem o PRF na regeneração óssea de defeitos ósseos, induzidos na calota craniana de coelhos, observaram um efeito positivo quando usado sozinho ou em combinação com hidroxiapatita/fosfato beta tricálcico.

Sam et al. (2015) ao compararem as propriedades mecânicas de membranas de PRF com membranas de colágenos disponíveis comercialmente, concluíram que embora as membranas de PRF sejam de fácil preparação, a falta de rigidez e a degradação mais rápida são limitações para a aplicação das mesmas nos procedimentos de regeneração óssea guiada.

4. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACAR, A.H.; YOLCU, Ü.; GÜL, M.; KELEŞ, A.; ERDEM, N.F.; KAHRAMAN, S.A. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch. Oral Biol.*, v.60, n.4, p.606-14, 2014.

ALSOUSOU, J.; THOMPSON, M.; HULLEY, P.; NOBLE, A.; WILLETT, K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, v.91-B, p.987-96, 2009.

ARNOCZKY S.P.; SHEBANI-RAD, S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Med. Arthrosc. Rev.*, v.21, p.180–185, 2013.

BASTAMI, F.; KHOJASTEH, A. Use of leukocyte-and platelet-rich fibrin for bone regeneration: a systematic review. *Regeneration Reconstr. Restor.*, v.1, n.2, p.47-68, 2016.

BERTRAM, E.M. Characterisation of duck thrombocytes. *Res. Vet. Sci.*, v.64, p.267-270, 1998.

BIELECKI, T.; EHRENFEST, D.M.D. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.13, p.1121-1130, 2012.

BORIE, E.; OLIVÍ, D.G.; ORSI, I.A.; GARLET, K.; BWEBER, B.; BELTRÁN, V.; FUENTES, R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, v.8, n.5, p.7922–7929, 2015.

CAMPBELL, TW. Hematology. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Avian medicine: principles and applications*. Lake Worth: Wingers Publishing, p.176–98, 1994.

CARR, B.J.; SHERMAN O. CANAPP JR, S.O.; DAVID R. MASON, D.R.; , COX, C.; HESS, T. Canine platelet-rich plasma systems: a prospective analysis. *Front. Vet. Sci.*, v.2, p.1-8, 2016.

DEGEN, R.M.; BERNARD, J.A.; OLIVER, K.S.; DINES, J.S. Commercial separation systems designed for preparation of platelet-rich plasma yield differences in cellular composition. *HSS Journal*, v. 13, p.75–80, 2017.

DHURAT, R.; SUKESH, M.S. Principles and methods of preparation of platelet rich plasma: a review and author's perspective. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, v.7, n.4, p.189-197, 2014.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.101, p.E37-44, 2006a.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.101, p.E45-50, 2006b.

EHRENFEST, D.M.D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*, v.27, n.3, p.158-167, 2009.

EHRENFEST, D.M.D. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.110, n.3, p.275-278, 2010.

FITZPATRICK, J.; BULSARA, M.K.; MCCRORY, P.R.; RICHARDSON, M.D.; ZHENG, M.H. Analysis of platelet-rich plasma extraction: variations in platelet and blood components between 4 common commercial kits. *Orthop. J. Sports Med.*, v.5, n.1, p.1-8, 2017.

FRANKLIN, S.P.; GARNER, B.C.; COOK, J.L. Characteristics of canine platelet-rich plasma prepared with five commercially available systems. *Am. J. Vet. Res.*, v.76, n.9, p.822-827, 2015.

FREYMILLER, E.G.; AGHALOO, T.L. Platelet-rich plasma: ready or not? *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.62, p.484-488, 2004.

GIANAKOS, A.; ZAMBRANA, L.; SAVAGE-ELLIOTT, I.; LANE, J.M.; KENNEDY, J.G. Platelet-rich plasma in the animal long-bone model: an analysis of basic science evidence. *Orthop.*, v.38, n.12, p.e1079-e1090, 2015.

GIANNINI, S.; CIELO, A.; BONANOME, L.; RASTELLI, C.; DERLA, C.; CORPACI, F.; FALISI, G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, v.19, p.927-930, 2015.

HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part 1: Definition, development, biological characteristics and function. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.14-24, 2016a.

HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part II: Preparation, optimization, handling and application, benefits and limitations of PRF. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.34-48, 2016b.

HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part III: Clinical indications of PRF in implant dentistry, periodontology, oral surgery and regenerative endodontics. *Int. Dentistry Afr. Ed.*, v.6, n.5, p.64-79, 2016c.

JONES, M.P. Avian Hematology. *Vet. Clin. North Am.: Exotic An. Pract.*, v.18, n.1, p.649-659, 2015.

LANSDOWN, D.A.; FORTIER, L.A. Platelet-Rich Plasma: formulations, preparations, constituents, and their effects. *Oper. Tech. Sports Med.*, v.25, p.7-12, 2017.

MAUTNER, K.; MALANGA, G.A.; SMITH, J.; SHIPLE, B.; IBRAHIM, V.; SAMPSON, S.; BOWEN, J.E. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM & R*, p.S52-S59, 2015.

MITCHELL, E.B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, v.11, p.501-522, 2008.

MIRON, R.J.; ZUCHELLI, G.; PIKOS, M.A.; SALAMA, M.; LEE, S.; GUILLEMETTE, V.; FUJIOKA-KOBAYASHI, M.; BISHARA, M.; ZHANG, Y.; WANG, H.L.; CHANDAD, F.; NACOPOULOS, C.; SIMONPIERI, A.; AALAM, A.A.; FELICE, P.; SAMMARTINO, G.; GHANAATI, S.; HERNANDEZ, M.A.; CHOUKROUN, J. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin. Oral Investig.*, v.21, n.6, p.1913-1927, 2017.

MUDROŇOVÁ, D.; KOŽÁR, M.; MOLNÁR, L.; TRBOLOVÁ, A. Viability and discrimination of avian peripheral blood mononuclear cells and thrombocytes intended for improvement of wound healing in birds. *Acta Vet. Hung.*, v.62, n.3, p.334–339, 2014.

PICCIN, A.; DI PIERRO, A.M.; CANZIAN, L.; PRIMERANO, M.; CORVETTA, D.; NEGRI, G.; MAZZOLENI, G.; GASTL, G.; STEURER, M.; GENTILINI, I.; EISENDLE, K.; FONTANELLA, F. Platelet gel: a new therapeutic tool with great potential. *Blood Transfus.*, v.15, n.4, p.333-340, 2017.

PIUZZI, N.S.; CHUGHTAI, M.; KHLOPAS, A.; HARWIN, S.F.; MINIACI, A.; MONT, M.A.; MUSCHLER, G.F. Platelet-Rich Plasma for the treatment of knee osteoarthritis: A review. *J. Knee Surg.*, v.30, n.7, p.627-633. 2017.

SALUJA, H.; DEHANE, V.; AND UMA MAHINDRA. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *Ann. Maxillofac. Surg.*, v.1, n.1, p.53–57, 2011.

SAM, G.; VADAKKEKUTTICAL, R.J.; AMOL, N.V. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. *J. Indian Soc. Periodontol.*, v.19, n.1, p.32-36, 2015.

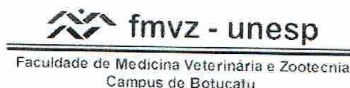
SHETH, U.; DWYER, T.; SMITH, I.; WASSERSTEIN, D.; THEODOROPOULOS, J.; TAKHAR, S.; CHAHAL, J. Does platelet-rich plasma lead to earlier return to sport when compared with conservative treatment in acute muscle injuries? A systematic review and meta-analysis. *Arthroscopy*, p.1-8, 2017. In press.

SOOMEKH, D.J. Current concepts for the use of platelet-rich plasma in the foot and ankle. *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, v.28, p.155–170, 2011.

WILLITS, K.; KANIKI, N.; BRYANT, D. The use of platelet-rich plasma in orthopedic injuries. *Sports Med. Arthrosc. Rev.*, v.21, p.225–230, 2013.

WU, P.I-K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-rich plasma. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, v.27, p.825–853, 2016.

5. ANEXOS

Anexos:**A T E S T A D O**

Atesto que o Projeto de Pesquisa "Padronização do plasma rico em plaquetas em diferentes espécies de aves da fauna brasileira e sua aplicabilidade na rotina clínica e cirúrgica" **Protocolo CEUA 76/2016**, a ser conduzido por **Laís Lucas Fernandes**, orientadora Prof^a. Sheila Canevese Rahal, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	01/06/2016 a 01/07/2017
Finalidade	Pesquisa Científica
Espécie/Linhagem	Aves Silvestres
Nº de animais	24
Peso/Idade	Variado/Adulta
Sexo	Indefinido
Origem	FMVZ-Unesp-Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 13/05/2016

Prof.ª Ass. Dr.ª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 53876-1	Data da Emissão: 19/05/2016 09:53	Data para Revalidação*: 18/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Laís Lucas Fernandes	CPF: 325.298.908-54
Título do Projeto: Padronização do plasma rico em plaquetas (PRP) em diferentes espécies de aves da fauna brasileira e sua aplicabilidade na rotina clínica	
Nome da Instituição: Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina veterinária	CNPJ: 57.750.184/0001-24

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	desenvolvimento do piloto	05/2016	06/2016
2	coleta e padronização das amostras	07/2016	10/2016
3	coleta de dados	11/2016	02/2017
4	análise dos dados	12/2016	03/2017
5	redação científica	04/2017	07/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BOTUCATU	SP	UNESP campus Botucatu	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Amazona aestiva, Ramphastos toco, Ara ararauna, Tyto alba

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38796864



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 53876-1	Data da Emissão: 19/05/2016 09:53	Data para Revalidação*: 18/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Lucas Fernandes	CPF: 325.298.908-54
Título do Projeto: Padronização do plasma rico em plaquetas (PRP) em diferentes espécies de aves da fauna brasileira e sua aplicabilidade na rotina clínica	
Nome da Instituição : Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina veterinária	CNPJ: 57.750.184/0001-24

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Aves)	Puça

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina veterinária	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38796864



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 53876-1	Data da Emissão: 19/05/2016 09:53	Data para Revalidação*: 18/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Laís Lucas Fernandes	CPF: 325.298.908-54
Título do Projeto: Padronização do plasma rico em plaquetas (PRP) em diferentes espécies de aves da fauna brasileira e sua aplicabilidade na rotina clínica	
Nome da Instituição : Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina veterinária	CNPJ: 57.750.184/0001-24

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 38796864



Página 4/4