

SÍLVIA BANDIERA BORGES

“Plasma Rico em Plaquetas de Ratos Wistar”

Araçatuba – São Paulo

2019

SILVIA BANDIERA BORGES

“Plasma Rico em Plaquetas de Ratos Wistar”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Suely Regina Mogami Bomfim

Araçatuba – São Paulo

2019

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B732p Borges, Silvia Bandiera.
 Plasma rico em plaquetas de ratos Wistar / Silvia Bandiera
 Borges. - Araçatuba, 2019
 79 f. : il. ; tab.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Odontologia, Araçatuba
 Orientadora: Profa. Suely Regina Mogami Bomfim

 1. Plasma rico em plaquetas 2. Protocolos 3. Biotecnologia
 4. Plaquetas 5. Ratos 6. Ratos Wistar I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico ao meu esposo Ademir José Borges, com amor, admiração, gratidão. Por sua compreensão, carinho, presença incansável e apoio ao longo do período da elaboração deste.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que me permitiu conquistar na vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Doutora Suely Regina Mogami Bomfim, minha querida orientadora, pela atenção e apoio durante o processo de definição e acompanhamento desta dissertação.

Às Professoras Doutoras Doris Hissako Sumida e Rita de Cássia Menegati Dornelles, pela generosidade e conselhos nos momentos mais difíceis.

À minha mãe e ao meu pai (in memoriam), os quais amo muito, pelo exemplo de caráter, garra e dedicação em tudo que se proporcionam a cumprir e me transmitiram seus ensinamentos.

Aos meus três filhos amados, Bruna, Laís e Gustavo que são a razão de meu viver, pelo carinho e eterno afeto, impulsionando-me a concluir meus objetivos.

A todos(as) os(às) Professores(as), discentes e colaboradores(as) do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” da cidade de Araçatuba.

Aos meus amigos queridos Ângela Cristina de Nicola, Fernanda Fernandes, Fernando Marani, Mitzí Hass Wakamatsu, Rodrigo Martins dos Santos e Thaís Verônica Saori Tsosura, que me acompanharam durante essa jornada dando-me forças, ajudando-me a ampliar meus conhecimentos e me estimulando a cada momento. Bons amigos que nunca serão esquecidos.

“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve a satisfação que poucos homens conhecerão.”

Thomas Wolfe

Bandiera, B. S. “**Plasma Rico em Plaquetas de Ratos Wistar**”, 2019. 79 f. Dissertação - Mestrado Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, 2018

RESUMO

Uma das biotecnologias com propósito relevante à saúde humana é o plasma rico em plaquetas (PRP) o qual, não há registro protocolar padronizado para *Rattus norvegicus* (Wistar). De fato, a falta de padronização do método leva pesquisadores à dúvida sob qual protocolo seguir para os melhores resultados referente as concentrações e mudanças morfológicas plaquetárias. Tal indeterminação promove morosidade nas pesquisas científicas. Frente a conjectura, usou-se o mínimo de animais possíveis em experimentação duplo-cego, retirando-se 3,2 mL de sangue de cada animal por pulsão cardíaca o qual posteriormente, foi testado em três protocolos distintos. Cada protocolo foi designado como P1; P2; P3 e o grupo controle designado PSP. Desta forma, i. P1 foi submetido a uma única centrifugação de 160G por 6min resultando em 100 µL de PRP; ii. P2 foi ressignado a dupla centrifugação sendo a primeira etapa 160G por 20min e a segunda etapa 400G por 15 min, resultando em 100 µL de PRP e iii. P3 destinado a dupla centrifugação sendo a primeira etapa 300G por 10 min e a segunda etapa 640G por 10 min, resultando em 100 µL de PRP. Obtivemos maiores concentrações plaquetárias dos protocolos P2 e P3 com concentrações superiores a 519%. Quanto a visualização morfológica plaquetária por esfregaço, os três protocolos apresentaram boa visualização, no entanto P3 sobressaiu-se aos demais quanto ao tempo global de preparo e menor inclusão eritrocitária. Assim, padronizamos um modelo animal *in vivo* para futuras investigações científicas interessadas na utilização do PRP de *Rattus norvegicus* (Wistar).

Palavras chave: desenvolvimento protocolar, protocolos, biotecnologia, padronização de métodos, morfologia plaquetária, concentração plaquetária, *Rattus norvegicus*, Wistar.

Bandiera, B. S. **"Platelet-rich plasma of wistar rats"** 2019. 79 f. Centers Postgraduate Program in Physiological Sciences (PMPGCF) of the Paulista State University "Julio de Mesquita Filho" - UNESP, Araçatuba, 2018

ABSTRACT

One of the biotechnologies with a relevant human health purpose is platelet rich plasma (PRP), which has no standardized protocol record for *Rattus norvegicus* (Wistar). In fact, the lack of standardization of the method leads researchers to doubt which protocol to follow for the best results regarding platelet concentrations and morphological changes. Such indeterminacy promotes slowness in scientific research. In view of the conjecture, how few animals were used in a double-blind experiment and 3.2 mL of blood was drawn from each animal by heartbeat and subsequently tested in three separate protocols. Each protocol was designated as P1; P2; P3 is the control group designated PSP. i. P1 was subjected to a single 160G centrifugation for 6min resulting in 100 µL of PRP, ii. P2 was resigned to double centrifugation with the first stage 160G for 20min and the second stage for 400G for 15 min, resulting in 100 µL of PRP and iii. P3 intended for double centrifugation with the first stage of 300G for 10 min and the second stage of 640G for 10 min, resulting in 100 µL of PRP. We obtained higher platelet concentrations of protocols P2 and P3 with concentrations higher than 519%. Regarding the morphological visualization of platelet smears, the three protocols presented good visualization, but P3 stood out for the others in terms of total preparation time and less erythrocyte invasion. Thus, we standardized an in vivo animal model for future scientific investigations interested in the use of PRP *Rattus norvegicus* (Wistar).

Keywords: Protocols, biotechnology, method standardization, platelet morphology, platelet concentration, *Rattus norvegicus*, Wistar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Preparo do plasma rico em plaquetas.....	4
Figura 2 - Origem e morfologia estrutural de uma plaqueta	5
Figura 3 – Algumas vias sinalizadoras por receptores plaquetários.....	11
Figura 4 - Ilustração do protocolo de Anitua (1999).....	27
Figura 5 - Ilustração do protocolo de Sonleitner et.al., (2000).....	28
Figura 6 - Ilustração do protocolo Vendramin et al., (2009).....	29
Figura 7- Protocolo de esfregaço do PRP	31
Figura 8 - Coleta de amostra sanguínea por punção cardíaca.....	33
Figura 9 - Obtenção do PRP conforme P1.	34
Figura 10 - Obtenção do PRP conforme protocolo Sonleitner et al., (2000).....	34
Figura 11 - Obtenção do PRP conforme protocolo de Vendramin et al. (2006).....	36
Figura 12 - Plaquetometria vista por câmara de Neubauer	38
Figura 13 - Contagem plaquetária dos protocolos testados em Rattus novergicus (linhagem Wistar).	39
Figura 14 - Esfregaço do Sangue Periférico.....	40
Figura 15 - Esfregaço plasma rico em plaquetas amostra do protocolo P1	40
Figura 16 - Esfregaço plasma rico em plaquetas amostra do protocolo P2	41
Figura 17 - Esfregaço plasma rico em plaquetas amostra do protocolo P3	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Receptores plaquetários dependentes e independentes da GPCR	9
Tabela 2 - Origem e desempenho dos principais FCs plaquetários	13
Tabela 3 - Células liberadoras de PDGF	15
Tabela 4 - Diversificações de protocolos para obtenção do PRP em humanos	23
Tabela 5 - Parâmetros dos valores expressos em média e desvio padrão da plaquetometria e concentração de PRP de Rattus novergicus (Wistar)	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α – Alfa

AA - Ácido araquidônico

β – Beta

°C - Célsius, escala de grau

5HT:5 – Serotonina

ADP - Difosfato de adenosina

AMPC - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP - Adenosina trifosfato

ATP -Trifosfato de adenosina

bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico

BMPs - Proteínas morfogenéticas ósseas

Ca²⁺ - Cálcio

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPD - Citrato/fosfato/dextrose

CPDA-1 - fosfato monobásico de sódio/dextrose anidra/ácido cítrico

CTAD - Solução de citrato de sódio, teofilina, adenosina e dipiridamol

CTGF - Fator de crescimento de tecido conjuntivo

DAG - 1,2-diacilglicerol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

e.g. - De *exempli gratia*, locução latina que significa "por exemplo"

EGF - Fator de crescimento epitelial

et al. - Do Latim, *et alii*. Significado "e outros"

FC - Fatores de crescimento

FcRy - receptor do fator de crescimento da cadeia y para imunoglobulina G

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

FvW - Fator de von Willebrand

GDFS - Fatores de crescimento de diferenciação

GDP - Guanosina difosfato

G.O.T.O. - G=glutaraldeído, O=ósio, T=tânico ou tiocarbohidrazida.

GPCR - receptores acoplados à proteína G

GP1b-IX-V - Glicoproteína IbIXV -.

GPVI - Glicoproteína VI -

GTP - Guanosina trifosfato

HGF - Fator de crescimento de hepatócitos

i.e. - Do Latim que significa “isto é; ou seja”

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 β - Interleucina 1 β

I.P. – Intraperitoneal

IP₃ - Inositol 1,4, 5-trifosfato

kD – Kilodaltons

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

Mg²⁺ - Magnésio

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NO - óxido nítrico

P₂O₇ - Pirofosfato

PAF - Fator ativador de plaquetas

PAR-1 - Receptor ativado por proteinases

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas

PDGF-AA - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-AA

PDGF-AB - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-AB

PDGF-BB - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-BB

PECAM-1 - Moléculas de adesão celular endotelial plaquetária

PF4 - Fator 4 plaquetário

PIC - Complexos poliônicos

PIP₂ - Inositol fosfolípídeo

PKC - Proteína quinase C

PPP - Plasma pobre em plaquetas

PRP - Plasma rico em plaquetas

PTI - Púrpura trombocitopênica idiopática

P2Y₁ - Receptor purinérgico 1

P2Y₁₂ - Receptor purinérgico 12

SCA - Sistema canicular aberto

S.P. - Sangue periférico

STD - Sistema tubular denso

TGF- β - Fator de crescimento transformador β

TNF- α - Fator de necrose tumoral IL-1

TXA₂ - Tromboxano A₂

VASP - Fosfoproteína vasodilatadora

VASP-P - Fosfoproteína vasodilatadora desfosforilada

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. PARÂMETROS E PROTOCOLOS DIFERENCIADOS NA ELABORAÇÃO DO PRP	3
2.1 <i>Plaquetas: Morfologia, Função, Ativação e Receptores</i>	4
2.1.1. Morfologia Estrutural	4
2.1.2 Função	7
2.1.3 Ativação	7
2.1.4 Receptores.....	8
2.2 <i>Fatores de Crescimento (FC)</i>	12
2.2.1 Fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	14
2.2.1.1 Diferenças entre os PDGF	15
2.2.2 Fator de crescimento transformador β (TGF- β)	16
2.2.3 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	17
2.2.4 Fator de crescimento epidérmico (EGF)	18
2.3 <i>Plaquetas como Alvos Terapêuticos</i>	19
2.4 <i>Plasma Rico em Plaquetas (PRP)</i>	21
2.4.1 Protocolos de PRP em destaque	26
2.4.1.1 Anitua (1999)	26
2.4.1.2 Protocolo de Sonnleitner et. al., (2000).....	27
2.4.1.3 Protocolo Vendramin et al., (2006)	28
2.4.1.4 Protocolo de Yazigi et. al. (2015).....	29
2.5 <i>Esfregaço</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 <i>Procedimento ético</i>	32
3.2 <i>Local de realização da pesquisa</i>	32
3.3 <i>Animais</i>	32

3.4 <i>Delineamento Experimental</i>	33
3.4.1 Anestesia	33
3.4.2 Coleta de Amostra	33
3.4.3. Preparo do PRP por três protocolos distintos	33
3.4.3.1 Preparo de P1	33
3.4.3.2 Preparo de P2.....	34
3.4.3.3 Preparo de P3.....	35
3.5. <i>Análises Laboratoriais</i>	36
3.5.1 Plaquetometria do Sangue Periférico.....	36
3.5.1 Plaquetometria dos Protocolos	36
3.5.2 Análise Morfológica por Esfregaço.....	36
3.5.3 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras pesquisas científicas ligadas a área da saúde utilizam várias espécies de animais como modelos experimentais. Entretanto, a preferência se dá aos roedores por apresentarem características próprias relacionadas ao tamanho, prole numerosa, fácil domesticação, adaptação a ambientes variados e por possuírem características fisiológicas que mimetizam os seres humanos (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Os modelos experimentais *in vivo* possibilitam a compreensão dos eventos relativos ao desenvolvimento de métodos e/ou protocolos científicos (LIMA et al., 2014). Nesse contexto, a busca por novos procedimentos que acelerem o entendimento de mecanismos metabólicos, assim como para processos terapêuticos regenerativos é cada vez maior.

O uso das engenharias e suas biotecnologias têm trazido grandes resultados na reparação e regeneração celular por meio de modelos experimentais (CARVALHO et al., 2010). A capacidade de reconstrução tecidual está ligada ao tipo celular biológico, local afetado e aos sinalizadores que desencadeiam estímulos necessários teciduais (LACOSTE; MARTINEAU; 2003; FERREIRA; BOMFIM; ANDRADE, 2012). Sendo assim, o processo de reparação consiste em uma restauração sem que este apresente as características biológicas gênicas, promovendo a manutenção das características existentes do tecido e sua similaridade original (LENHARO et al., 2004; CHEN; ZHANG; WU, 2010). Assim, uma das tecnologias estudadas com propósito regenerativo, buscando promover a hemostasia e a sobrevivência do organismo é o plasma rico em plaquetas (PRP) (DUSSE et al., 2008; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2018). O PRP deve ser definido como uma concentração autóloga, isto é, um número ideal de plaquetas obtidas por meio do sangue do próprio paciente com predados para a regeneração e reestruturação tecidual (MAN; PLOSKER; WINLAND-BROWN, 2001; YAZIGI et al., 2015). Foi elaborado como uma alternativa viável para minimizar as complicações alérgicas decorrentes do uso da cola de fibrina (SIERRA, 1993; SILVER; WANG; PINS, 1995; WHITMAN; BERRY; GREEN, 1997). Desta forma, apresenta poder de cicatrização advindo das funções plaquetárias e seus constituintes, os fatores de crescimento (FC) (MARX et al., 1998).

Os mecanismos terapêuticos do PRP medeiam a ativação mitogênica e os fatores de crescimento que facilitam a angiogênese, a reepitelização e a proliferação de fibroblastos (ANTONIADES, 1981; MARX, 2001, 2004; LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002;

VENDRAMIN et al., 2006; BARRIENTOS et al., 2008). Além do mais, as plaquetas do PRP apresentam proteínas osteocondutoras que auxiliam na migração epitelial responsável pela formação óssea e de tecido conectivo por meio dos fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator transformador do crescimento β (TGF- β) (EVERTS et al., 2006; VENDRAMIN et al., 2006; DeROSSI et al., 2009). Outros fatores também são liberados pelas plaquetas como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento epitelial (EGF), o fator de angiogênese derivado da plaqueta (PAF) e o fator plaquetário (PF4) (DUSSE et al., 2008; DeROSSI et al., 2009; COSTA; SANTOS, 2016).

Com tantas expressões moleculares, pesquisadores do âmbito da saúde vêm empregando o PRP em diversas terapias e pesquisas para melhor compreensão dos fragmentos plaquetários. Terapeuticamente, os odontólogos se destacaram inicialmente na utilização do PRP, acumulando grande experiência neste segmento (MARX, 2001). Tal postura chamou a atenção de outros profissionais da área da saúde, estimulando-os a buscar novos desafios e novas aplicabilidades para o PRP (DUSSE et al., 2008; PAZZINI et al., 2016). Assim, o plasma rico em plaquetas passou a ser amplamente utilizado em cirurgias plásticas (EVERTS et al., 2006), na estética como “*anti-aging*” (HEBA et al., 2017), na consolidação óssea (LUCARELLI et al., 2005), em lesões por queimaduras (PALLUA; WOLTER; MARKOWICZ, 2010), restabelecimento de tendinopatias, injúrias musculares (MISHRA et al., 2009), implantes dentários, cirurgias periodontais (DEMIR et al., 2007; KECALI et al., 2008) e para estudos de novos fármacos antiplaquetários ou fármacos antitrombóticos hiporresponsivos (CASTRO et al. 2006; SILVA; D'AMICO, 2010; SOARES et. al., 2010)

Devido a amplo utilização e grandes variações metodológicas descritivas para obter o PRP, delineamos três protocolos distintos designados P1; P2 e P3. Desta forma, objetivamos oferecer a comunidade científica um protocolo animal de *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar) com menor tempo global para a execução, maior concentração plaquetária e boa visualização morfológica.

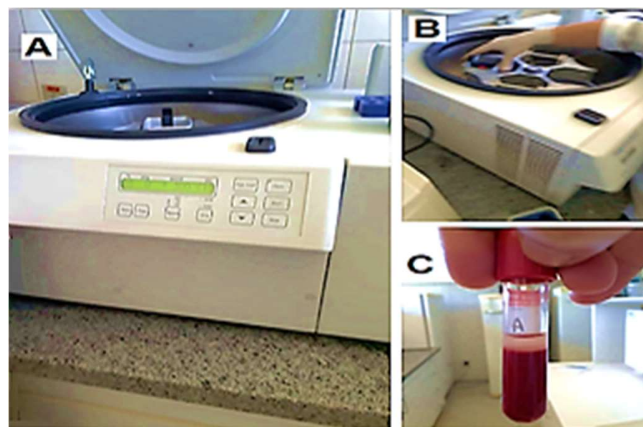
2. PARÂMETROS E PROTOCOLOS DIFERENCIADOS NA ELABORAÇÃO DO PRP

A literatura relata que tanto as condições operacionais, quanto a padronização das etapas envolvidas na elaboração do PRP, ainda são diversificadas. O sucesso e insucesso estão intimamente ligados à padronização do método empregado e os estudos demonstram a falta da uniformização dos protocolos que, no geral, apresentam diferentes concentrações de plaquetas e fatores de crescimento (FCs) (PEREZ; SANTANA 2013).

Durante todo o período de utilização do PRP, vários procedimentos técnicos foram desenvolvidos para sua obtenção, podendo ser por meio de “kits” ou método aberto (figura 1) (COSTA; SANTOS, 2016). Em ambos os casos, os protocolos metodológicos se diferem tanto na questão qualitativa quanto na questão quantitativa para obtenção de concentrações viáveis plaquetárias e, conseqüentemente, seus FCs (MARQUES et al., 2014). Os procedimentos utilizados e descritos na literatura conduzem a diferentes produtos, com diferentes atividades fisiológicas e oscilações de 3 a 27 vezes na concentração de fatores de crescimento e na cinética de liberação. Como são muitas as variáveis envolvidas, os PRPs são preparados e obtidos diferencialmente uns dos outros (PEREZ; SANTANA 2013). Isto posto, observa-se que não há uma padronização linear, apesar da suma importância clínica/científica para a obtenção do produto final. O conhecimento e a padronização dos parâmetros metodológicos para cada espécie é importante, principalmente nas que mimetizam condições em seres humanos (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

A literatura demonstra que os valores de referência hematológicos dos ratos da linhagem Wistar são similares aos valores de referência para humanos, com exceção da quantidade de hemácias e de plaquetas. Os ratos possuem uma quantidade maior destes dois parâmetros, o que confere maior viscosidade ao sangue e rápida coagulação (MELO et al., 2012). Desta forma, escolhas protocolares errôneas podem induzir a resultados falsos, além da perda de tempo e gastos econômicos (LIMA, et al., 2014). Com tantas informações e parâmetros diferentes, não é de se admirar que um investigador possa ter dúvidas sobre qual metodologia seguir para atingir uma concentração final com os melhores resultados (MARX et al., 2004, CHEN; ZHANG; WU, 2010).

Figura 1- Preparo do plasma rico em plaquetas



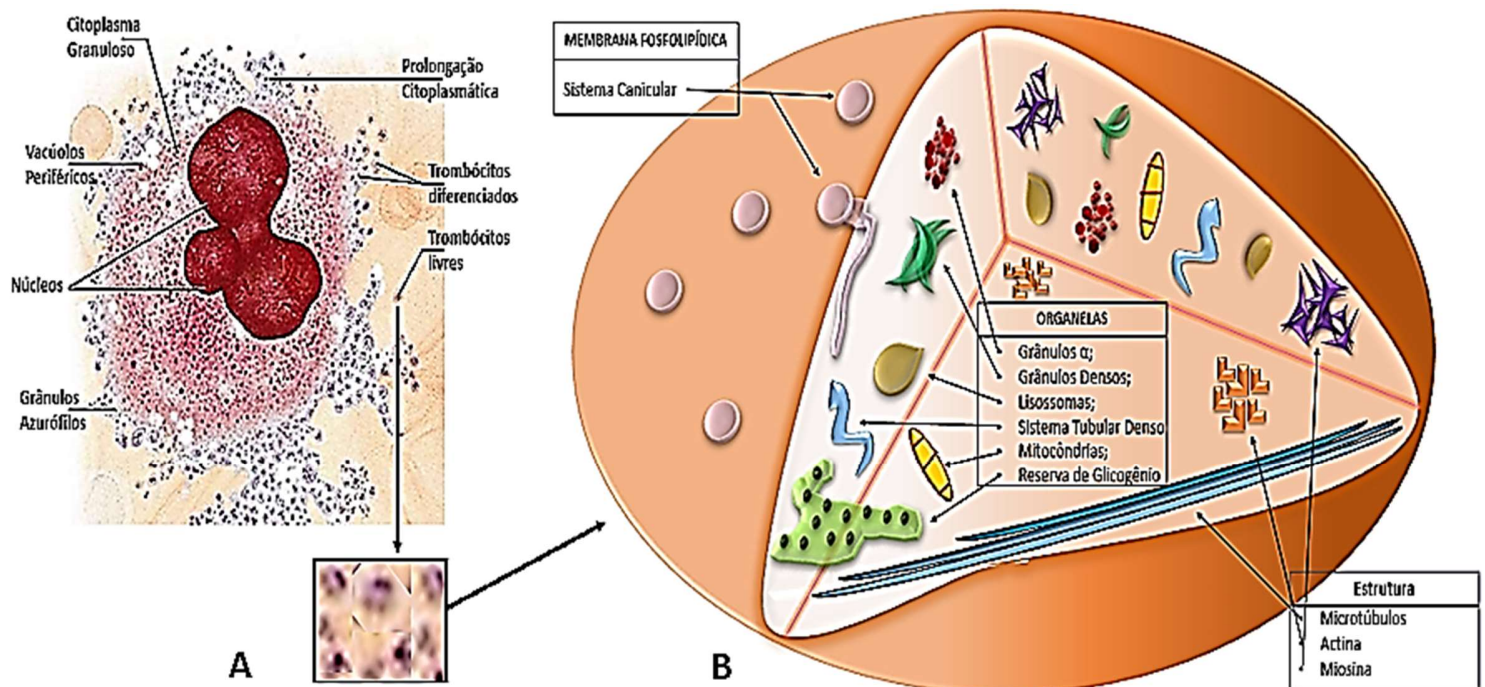
(A) Centrífuga; **(B)** preparação para a centrifugação; **(C)** obtenção de três frações celulares sanguíneas.
Fonte: Pelo autor.

2.1 Plaquetas: Morfologia, Função, Ativação e Receptores

2.1.1. Morfologia Estrutural

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, originam-se de pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados dos megacariócitos (figura 2) (KAJIHARA et al., 2007; COLLIER et al., 2010; COCCO, 2016). Nos mamíferos, cada megacariócito produz entre 1 a 2 mil plaquetas anucleadas, sendo heterogêneas quanto ao tamanho, densidade e reatividade (WENDLAND; FARIAS; MANFROI, 2009). As plaquetas possuem forma discoide e membrana trilaminar composta por uma camada externa e outra camada interna (CASTRO et al., 2006). A porção externa (fosfolipídica) é constituída por um sistema canicular aberto (SCA), responsável pela troca molecular plaquetária com o meio externo e ativação de plaquetas vizinhas, quando ocorre aumento da concentração citoplasmática de cálcio (Ca^{2+}) (GONÇALVES, 2012). Desta forma, ocorre a liberação do conteúdo dos α -grânulos e grânulos densos através do SCA (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Tal sistema também funciona como uma reserva, para que durante a ativação plaquetária haja emissão de pseudópodes, permitindo dessa forma, a libertação dos componentes contidos nos grânulos intracelulares (ITALIANO et al., 1999; CASTRO et al., 2006; COCCO, 2016).

Figura 2 - Origem e morfologia estrutural de uma plaqueta



(A) Megacariócito: liberação de fragmentos (plaquetas). **(B)** Morfologia Plaquetária: Membrana Fosfolipídica com sistema canicular aberto. Organelas: α -grânulos, grânulos densos, lisossomas, sistema tubular denso, mitocôndrias, reservas de glicogênio, microtúbulos, actina e miosina.

Fonte: Adaptado de McKenzie; Williams (2014) e Seoane et al. (2002).

Quanto a porção interna, o citoplasma é claro, com poucas organelas e organizado com lisossomos; peroxissomos; complexo de spliceossomo; proteassomo; ubiquitina; grânulos de glicogênio; mitocôndrias e microtúbulos que estão localizados ao redor da periferia celular em um citoesqueleto bem definido e altamente especializado (EVERTS et al., 2006; GONÇALVES, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; COCCO, 2016). O citoesqueleto é formado a base de espectrina, actina, miosina e anel marginal de microtúbulos espirais (MEHTA; WATSON, 2008). Esta estrutura é a responsável pelo formato discoide da plaqueta em repouso ou possibilita o rearranjo conformacional quando ativada (GONÇALVES, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Os α -grânulos são as organelas mais abundantes no citosol plaquetário, mantenedoras das proteínas relevantes para a função hemostática (OLIVEIRA et al., 2013). São subdivididos em duas classes α -grânulos que contêm um número maior de fibrinogênio e o α -grânulos que expressam maior quantidade do fator de von Willebrand (FvW)

(SEHGAL; STORRIE, 2007; SEMPLÉ; ITALIANO; FREEDMAN, 2011; STOCKHAM; SCOTT, 2011;). Os α -grânulos contribuem para a homeostasia por meio dos fatores mitogênicos, fatores de coagulação, fatores de adesão, fator V, quimiocinas, 1P -selectinas, moléculas de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1), fator 4 plaquetário, β -tromboglobulina, trombospondina e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (CASTRO et al., 2006; GONÇALVES, 2012). Colaboram também quanto ao armazenamento e exposição da glicoproteína GPIIb/IIIa, importante durante a interação celular plaquetária por sustentar a adesão e, subsequentemente, a agregação (OLIVEIRA et al., 2013; BARBALHO et al., 2015). Mas, quando o estímulo plaquetário é muito intenso e o reservatório da glicoproteína GPIIb/IIIa é consumido, as plaquetas iniciam um processo de síntese de proteínas por meio do ácido ribonucleico mensageiro (mRNAs) herdados de suas células de origem, os megacariócitos (KAJIHARA et al., 2007; COLLIER et al., 2010). Desta forma, ocorre o aumento das reservas da glicoproteína GPIIb/IIIa nas plaquetas (WENDLAND; FARIAS; MANFROI, 2009).

Por outro lado, os grânulos densos são as organelas em menor número e após a ativação, o conteúdo dos grânulos é disponibilizado vagarosamente para propiciar ainda mais a adesão e agregação plaquetária (GONÇALVES, 2012). Apresentam Ca^{2+} , magnésio (Mg^{2+}), serotonina (5HT:5), noradrenalina (Nor), pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$), α 2-antiplasmina (inibidor da plasmina), guanosina difosfato (GDP), difosfato de adenosina (ADP) e trifosfato de adenosina (ATP), que serão liberados lentamente para promover ainda mais a agregação e adesão plaquetária (OLIVEIRA et al., 2013; CASTRO et al., 2006).

Além das organelas citadas, também é possível encontrar na porção interna o sistema tubular denso (STD) (YARDUMIAN; MACKIE; MACHIN, 1986; JAIN, 1993) formado a partir do retículo endoplasmático liso dos megacariócitos imaturos (JAIN, 1993; CASTRO et al., 2006; GONÇALVES, 2012). É por meio do STD que ocorre grande concentração de Ca^{2+} necessário para desencadear os eventos enzimáticos envolvidos na síntese de prostaglandinas e tromboxano, os quais são responsáveis pela contração plaquetária e, consequentemente, ativação interna (CASTRO et al., 2006; COLLIER et al. 2010).

Outros elementos celulares, como os lisossomos e mitocôndrias, além de conter uma boa quantidade de ATP/ADP, também participam dos processos metabólicos plaquetários e armazenam enzimas e outras moléculas críticas para os desígnios das funções

¹P-selectinas também são encontradas em associação com os grânulos densos, o qual permitem após a ativação plaquetária, o rolamento e a adesão de linfócitos nas vênulas endoteliais (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011).

plaquetárias (MURPHY; GARDNER, 1971; KATAOKA et al., 1978; BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995; CASTRO et al., 2006).

Em todos esses eventos plaquetários, não há lise celular durante a liberação dos FCs, mas sim, grandes mudanças conformacionais (JAIN, 1993; CASTRO et al., 2006; EVERTS et al., 2006).

2.1.2 Função

A principal função das plaquetas está ligada a hemostasia, ocluindo lesões em vasos em condições anormais, como na disfunção endotelial ou na sepse (YARDUMIAN; MACKIE; MACHIN, 1986; EVERTS et al., 2006; GONÇALVES, 2012). São responsáveis por cessar temporariamente o fluxo sanguíneo após lesão vascular, aderindo-se rapidamente ao colágeno exposto e desencadeando uma série de reações para reparar o dano sofrido no leito (BAKER, 2007). Depois de ativadas, as plaquetas podem mudar sua forma de disco, projetando pseudópodes para expandir a agregação plaquetária e posteriormente liberar o conteúdo dos grânulos através do sistema canalicular aberto (YARDUMIAN; MACKIE; MACHIN, 1986; EVERTS et al., 2006; BAKER, 2007). Entretanto, há evidências de outras funções plaquetárias não convencionais, como a capacidade de programar efetivamente a morte celular mesmo sendo anucleadas; a habilidade de condensar proteínas; apresentar engrenagens inesperadas de *splicing*²; envolver-se com sinalização de células-tronco; interagir com células endoteliais e com leucócitos durante o processo de adesão, agregação, formação do tampão plaquetário e durante a retração do coágulo em sítios danificados vascularmente (LENHARO et al., 2004; DENIS et al., 2005; BOILARD et al., 2010; SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011; OLIVEIRA, et al., 2013).

2.1.3 Ativação

As plaquetas podem ser ativadas por diversos mecanismos ao contrair em resposta ao sistema imune de forma adaptativa ou em sítios inflamatórios (YARDUMIAN; MACKIE; MACHIN, 1986; OLIVEIRA, et al., 2013). A ativação pode ser realizada na presença de receptores agonistas do ácido araquidônico (AA) e na conversão do tromboxano A₂ (TXA₂); por passagem independente da via AA por meio da trombina e do colágeno; por PAF ou por demais ativadores plaquetários que elevam rapidamente a quantidade de Ca²⁺ livre com a

² Processo que remove os íntrons e une os éxons depois da transcrição do RNA. Os *splicing* ocorrem apenas em células eucarióticas. É a estrutura fundamental para clivar essas ligações entre os nucleotídeos é o spliceossomo (DENIS et al., 2005).

liberação das substâncias contidas nos grânulos (YARDUMIAN; MACKIE; MACHIN, 1986; EVERTS et al., 2006). A ativação plaquetária também pode ser desencadeada na circulação sanguínea através da P-selectina, secreção de quimiocinas, citocinas e FCs (CASTRO et al., 2006; OLIVEIRA, et al., 2013; COCCO, 2016). Em resposta, ocorre aceleração plaquetária da síntese de interleucina 1 β (IL-1 β), ocorrendo desta maneira, uma das vias de sinalização para o início da fase de adesão plaquetária (OLIVEIRA, et al., 2013).

2.1.4 Receptores

O termo receptor é intitulado a proteínas que permitem a interação de determinadas substâncias, promovendo o agonismo (ativação) ou antagonismo (inativação) dos mecanismos celulares. Na membrana fosfolipídica plaquetária, encontram-se vários tipos de receptores acoplados à proteína G (GPCR) que constituem a maior superfamília de proteínas codificadas pelo genoma humano (HOELZ et al., 2013) e receptores, que são ativados por glicoproteínas independentes da GPCR (tabela 1). (BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995). Em geral, a ativação plaquetária por meio de seus receptores, busca desencadear mudanças conformacionais ativando a glicoproteína GpIIb/IIIa, a qual pertence à família das integrinas, sendo a mais abundante da superfície plaquetária, 50.000 cópias por plaqueta (CASTRO et al., 2006; LANDI; MARQUES; LEITE, 2003).

Integralmente, após a conexão de um agonista, e. g., epinefrina, trombina, tromboxano, receptor ativado por proteinases-1 (PAR-1), PAF, ADP, entre outros, a ativação propiciará uma cascata metabólica que resultará, conforme a ligação do alusivo receptor, mudanças intrínsecas nos fragmentos plaquetários (CASTRO; et al. 2006). Caso o agonista ative o receptor ligado a proteína G, está em resposta, irá liberar guanosina trifosfato (GTP) uma enzima geradora de sinal, ativando a fosfolipase C (KATAOKA et al., 1978). Por sua vez, a fosfolipase C hidrolisará o precursor inositol fosfolipídio (PIP₂) nos segundos mensageiros: (1) inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃), causando uma rápida liberação de cálcio das reservas intracelulares e (2) 1, 2-diacilglicerol (DAG), que irá atuar aumentando a afinidade da proteína quinase C (PKC) e o aumento de Ca²⁺ intracelular (VANNI, et al. 2007). Dessa forma, será possível alterar o aspecto morfológico plaquetário com o surgimento de pseudópodes que promoverão a adesão e/ou a agregação plaquetária (CASTRO et al., 2006; OLIVEIRA, et al., 2013).

Tabela 1 – Receptores plaquetários dependentes e independentes da GPCR

a) Receptores agonistas plaquetários acoplados à proteína g					b) Receptores antagonistas plaquetários acoplados à proteína G		
Receptor	Agonista	Peso molecular	Número de Receptores nas plaquetas	Principal enzima acoplada ao receptor	Receptor	Agonista	Número de receptores em plaquetas
Trombina	Trombina	47 kDa	1.700-1.800	PLC (+); AC (-)	A ₂	Adenosina	5.500
α2	Epinefrina	64 kDa	200- 300	AC (+); PKC (+)	PGI ₂	PGI ₂ ; PGE ₁	22.000 100-3.000 >3.000 1.410
5HT ₂	Serotonina	232 kDa	20-2.500	PLC (+)	PGD ₂	PGD ₂	200-800
PAF	PAF	220 kDa	150-2.000	PLC (+)			
TxA ₂	TxA ₂ , PGH ₂ , PGG ₂	37 kDa	1.200	PLC (+); AC (-)			
V ₁ AR	Vasopressina	125 kDa	170	PLC (+)			
c) Glicoproteínas independentes de GPCR							
Receptor		Agonista		Peso molecular		Número de Receptores nas plaquetas	
Glicoproteína GPIb/IX		FvW		143 α - 22 kDa; 143 β - 22 kDa		25.000	
Glicoproteína GPIIa (α ₂ β ₁)		Colágeno		153/130 kDa		1.000-2.000/7.000	
Glicoproteína GPIc/IIa (α ₅ β ₁)		Fibronectina		160/130 kDa		~7.000	
Glicoproteína GPIc'/IIa (α ₆ β ₁)		Laminina		160/130 kDa		~7.000	
Glicoproteína GPIIbIIIa (α _{IIb} β ₃) (α _v β ₃)		Fibrinogênios, Trombospondia, vitronectina, FvW		125 α -22 kDa; β - 95 kDa		40.000 – 80.000	
Glicoproteína GPIV (ou IIIb)		Trombospondia / colágeno		88 kDa		1.500	
Glicoproteína GPVI		Colágeno		62 kDa		-	
d) Outros receptores plaquetários							
Agonistas				Receptor caraterístico			
ADP				Tipo receptor de purinas da super família P ₂			
PGE ₁				Liga-se a PKC			

Abreviaturas/Siglas: Alfa 2 (α₂); 5-hidroxitriptamina-2 (5HT₂); fator ativado plaquetário (PAF); tromboxano A₂ (TxA₂); Prostaglandina H₂ (PGH₂); Prostaglandina G₂ (PGG₂); Receptor Vasopressina 1A (V₁AR); fosfolipase C (PLC); adenilato ciclase (AC); proteína quinase C (PKC); difosfato de adenosina (ADP); Prostaciclina (PGL₂); prostaglandina E₁ (PGE₁); prostaglandina D₂ (PGD₂); receptores metabotrópico 2 de adenosina (A₂); fator von Willebrand (FvW). **Atividade estimulada:** (+) maior; (-) menor.

Fonte: Adaptado de Blockmans; Deckmyn; Vermynen, (1995).

Em conjectura da injúria vascular, o colágeno irá se ligar a glicoproteína VI (GpVI) fazendo com que o complexo glicoproteico Ib-IX-V (GPIb-IX-V) atue como um receptor para o FvW e para a trombina. Ambas as ativações elaboradas por meio do FvW e pela trombina, aumentam a expressão das integrinas plaquetárias $\alpha_2\beta_1$ que irão se ligar ao colágeno, ao mesmo tempo que promoverão a ligação da integrina $\alpha IIb\beta_3$ ao FvW e fibrinogênio, desta forma, será possível aumentar os níveis de Ca^{+2} intrínseco e a agregação plaquetária (figura 3) (BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995; PARK et al., 1997; CASTRO; et al. 2006). Neste aspecto, o colágeno também poderá se ligar ao principal receptor envolvido na ativação plaquetária, o receptor do fator de crescimento da cadeia γ para imunoglobulina G (FcR γ) que pertence à superfamília das imunoglobulinas (CASTRO; et al. 2006; VANNI, et al. 2007; OLIVEIRA, et al., 2013).

A ativação dos receptores da família P2, é de extrema importância para a agregação, pois estão envolvidos na amplificação da reatividade plaquetária (PURI; COLMAN, 1997). Em resposta a ativação mediada pelo ADP, o receptor metabotrópico purinérgico acoplado a uma proteína G do receptor 1 (P2Y₁), promoverá a mobilização de Ca^{+2} intrínseco das reservas plaquetárias com uma transitória agregação, ocorrendo assim, alterações conformacionais (HOURANI; HALL, 1994; GACHET et al., 1995; YUAN et al., 2006). Outro receptor da família P2, detectado na superfície plaquetária, é o receptor metabotrópico purinérgico acoplado a uma proteína G do receptor 12 (P2Y₁₂), que está tal qual P2Y₁, incluído na ampliação plaquetária induzido por todos os agonistas plaquetários, apesar do ADP ser seu agonista natural (PURI; COLMAN, 1997; FALCÃO et al., 2003; OLIVEIRA, et al., 2013). Neste caso, a forma não fosforilada da fosfoproteína vasodilatadora (VASP) será mantida por meio da regulação da via da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), perdurando o tempo de ativação plaquetário. Para cessar a ação, o antagonismo de ADP promove a desativação P2Y₁₂, e a desfosforilação da (VASP) que não é fosforilada em estado basal, para a forma fosforilada de fosfoproteína vasodilatadora desfosforilada (VASP-P) (FALCÃO et al., 2003). A forma VASP está associada ao agonismo de P2Y₁₂ enquanto, a forma VASP-P está associada ao antagonismo do receptor (GACHET et al., 1995; YUAN et al., 2006; OLIVEIRA, et al., 2013). Por esta razão, os receptores da família P2 são os principais

subsequentemente a agregação plaquetária (BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995).

2.2 Fatores de Crescimento (FC)

Os fatores compreendidos na reparação e regeneração tecidual via plaquetas, são conhecidos como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (KAPLAN et al., 1979; FRIESEL; MACIAG; 1995); fator de crescimento transformador β (TGF- β) (ASSOIAN et al., 1983; PIERCE et al., 1991); fator de crescimento tipo insulina (IGF-1) (KAREY; SIRBASKU, 1989; WEIBRIC et al., 2002); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MARTIN; HOPKINSON-WOOLLEY; MCCLUSKY, 1992; BANKS et al., 1998); fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) (HOM; MAISEL, 1992; MAIA; SOUZA, 2009) fator de crescimento epidérmico (EGF) (COHEN, 1962; CANALIS; MCCARTHY; CENTRELLA, 1989) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (BRUNNER et al., 1993; WANG, 1996).

Os FCs são proteínas que atuam como agentes sinalizadores para as células e estão presentes em diferentes tecidos (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002). Podem ser produzidos autocrinamente por célula alvo ou liberados através da membrana plasmática das células adjacentes (TAKAHASHI et al., 2007). Por serem multifacetados, podem se manifestar como quimiotáticos, mitogênicos, morfogênicos, apoptóticos e moduladores de atividades metabólicas (tabela 2) (WHITE, 1979; CHEN; ZHANG; WU, 2010). Sua ação dependerá da concentração e/ou tempo de exposição sobre o sítio celular (BAUER et al., 1985). Com papel crucial na transferência de informações entre diferentes populações celulares, atua no processo de cicatrização e regeneração por meio de três ações: (1) autócrina, na qual o fator de crescimento influencia a célula de origem ou outras células de fenótipo idêntico; (2) parácrina, na qual o fator de crescimento atua em uma célula vizinha que tenha fenótipo diferente da célula de origem e (3) endócrina, na qual o fator de crescimento afeta uma célula com fenótipo diferente da célula de origem em um local remoto (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002; EVERTS et al., 2006; RIEDEL et al., 2006; BARRIENTOS et al., 2008). Portanto, o nível de expressão dessas moléculas determinam a sensibilidade e ação no núcleo celular por meio de interações físicas diretas e/ou indiretas, que resultarão em estímulos como

divisão, crescimento e diferenciação celular (CHEN; ZHANG; WU, 2010; FORTIER et al., 2011).

Tabela 2 - Origem e desempenho dos principais FCs plaquetários

Fator de Crescimento	Fonte	Desempenho Metabólico	Referências
bFGF	Plaquetas, macrófagos, células mesenquimais, osteoblastos, condrócitos,	Desenvolvimento e caracterização de condrócitos e osteoblastos; mitogênico para células mesenquimais, condrócitos, osteoblastos, fibroblastos e mioblastos; inibe síntese de colágeno tipo 1	Brunner et al., (1993); Wang, (1996)
CTGF	Originário da endocitose por plaquetas na medula óssea	Ativa a reestruturação cartilágnea, a angiogênese, fibrose e adesão plaquetária	Hom; Maisel (1992); Maia; Souza, (2009)
EGF	Plaquetas, células renais, macrófagos, monócitos e glândulas submandibular	Acondiciona secreção de collagenase; incita angiogênese e quimiotaxia em células endoteliais; acrescenta expressão de fibroblastos, pré-osteoblastos e précondrócitos	Cohen, (1962); Canalis; Mccarthy; Centrella, (1989)
IGF	Fibroblastos, plasma, células hepáticas, epiteliais, endoteliais, e do músculo liso; matriz óssea, osteoblastos	Proporciona a síntese, aumento e migração de osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno pelos osteoblastos; desenvolvimento de matriz óssea, proliferação e diferenciação de células condrogênicas, adipogênicas, miogênicas e neurogênicas	Karey; Sirbasku, (1989); Weibric et al., (2002)
PDGF	Plaquetas, macrófagos, monócitos, células endoteliais, osteoblastos	Estimula a mitogênese de tecidos conjuntivos e células de linhagem mesenquimal; quimiotático para fibroblastos, células musculares, neutrófilos e células mononucleares; excita fagocitose dos neutrófilos, síntese de colágeno e acondiciona collagenase.	White, (1979); Kaplan et al., (1979); Friesel; Maciag, (1995)
TGFβ	Plaquetas, matriz extracelular e cartilaginosa óssea, células helper (Th1) ativas e natural killer, neutrófilos e macrófagos/monócitos	Promove a migração celular, neovascularização e angiogênese; melhora síntese e inibe a degradação da matriz extracelular; regula síntese de colágeno e secreção de collagenase; ação mitogênica sobre outros FC, inibe proliferação de macrófago e linfócitos	Assoian et al., (1983); Pierce et al., (1991)
VEGF	Plaquetas, células endoteliais	Estimula a mitogênese para células endoteliais e contribui consideravelmente com a angiogênese e permeabilidade vascular.	Martin; Hopkinson-Woolley; Mcclusky, (1992); Banks et al., (1998)

Fonte: Adaptado de Everts et al. (2006); Maia; Souza (2009) e Seidel, (2017).

2.2.1 Fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O PDGF é o principal fator de crescimento das plaquetas e foi o primeiro a ser identificado como um componente obtido do soro humano (WHITE, 1979; KAPLAN et al., 1979; ANTONIADES, 1981). Sendo uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 30 kD (Kilodaltons), possui duas cadeias polipeptídicas designadas de “A” e “B” e três isoformas; (1) Fator de crescimento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA); (2) Fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) e (3) Fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB) (ANTONIADES, 1981; ROSS, 1987; MARX et al., 1998; HELDIN; WESTERMARK, 1999; BARRIENTOS et al., 2008). O principal local de armazenamento é nos α -grânulos plaquetários, apesar de estudos mostrarem que outros tipos de células também o sintetizam (tabela 3) (MARX et al., 1998; ANITUA, 1999). O PDGF tem ação primária em todas as fases de reparação tecidual guiando a revascularização, a síntese de colágeno e a neoformação óssea quando necessário (EVERTS et al., 2006). Desta forma possuem como alvo regenerativo, um amplo espectro de células derivadas do mesoderma como os fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, células da glía ou células mesangiais que se encontram no mesângio do corpúsculo renal (HELDIN; WESTERMARK, 1999; RAICA; CIMPEAN, 2010). Neste contexto, uma série de eventos intracelulares ocorre após exposição ao PDGF, podendo ser imediata ou após algumas horas (ROSS, 1987). Entre os eventos comuns, encontra-se a primeira etapa na transmissão intracelular de sinais, iniciada pela ligação de fatores de crescimento à superfície celular por meio da autofosforilação do receptor PDGF (RAICA; CIMPEAN, 2010). O fator de crescimento derivado de plaquetas aciona a elevação de Ca^{2+} ativando a via de sinalização da fosfolipase C; gera sítios de ligações para proteínas adicionais; transmite a cascata intracelular dos receptores ativados; aumenta o volume dos fosfolipídeos de membrana; proporciona a fosforilação dos resíduos de tirosina dentro do domínio catalítico e predispõem síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) (BAUER et al., 1985; FREDRIKSSON, L.; ERIKSSON, 2004; BARBIERI; RAMALHO; COSTA; 2006; COSTA; SANTOS, 2016; HUANG et al., 2018).

Quanto à modulação, referente a outros fatores de crescimento, o PDGF opera sozinho ou em combinação (BARBIERI; RAMALHO; COSTA, 2006). Induz a produção e secreção do fator de crescimento transformador β (TGF- β), conduz a ativação do fator 4

plaquetário (PF-4); a produção de várias moléculas da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, ácido hialurônico, proteoglicanas; estimula a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); está presente na ilação, ou seja, interfere na angiogênese e na ação das β -tromboglobulinas, podendo assim, persuadir a quimiotaxia de células durante a lesão (CANALIS; McCARTHY; CENTRELLA, 1989; BAUER et al., 1985; BARRIENTOS et al., 2008).

Tabela 3 - Células liberadoras de PDGF

Tipos de Células	Expressão do PDGF-A	Expressão do PDGF-B
Fibroblastos	+	+
Queratinócitos	+	+
Citotrofoblastos placentais	+	+
Células de Leydig	+	+
Células mesangiais renais	+	+
Mioblastos esqueléticos	+	ND
Células musculares lisas vasculares	+	+
Células endoteliais vasculares	+	+
Astrócitos	+	ND
Neurônios	+	+
Células de Schwann	+	+
Oócito, blastócito	+	ND
Miométrio/endométrio uterinos	+	+
Células epiteliais de mamíferos	+	+
Células epiteliais de pigmento da retina	+	+
Macrófagos	+	+
Megacariócitos/ plaquetas	+	+

Abreviatura: não determinado (ND)

Fonte: Barbieri; Ramalho; Costa (2006).

2.2.1.1 Diferenças entre os PDGF

O PDGF-BB é mais mitogênico que o PDGF-AB e este, por sua vez, tem ação marcadamente maior do que o PDGF-AA (RAICA; CIMPEAN, 2010). As plaquetas e o plasma são ricos em PDGF-AB e BB, enquanto os tecidos periféricos esqueléticos e não esqueléticos contêm principalmente PDGF-AA (CANALIS; McCARTHY;

CENTRELLA, 1989). Por ser um dímero, o PDGF se liga a duas moléculas de receptores, α e β (FREDRIKSSON; ERIKSSON, 2004). O receptor α se liga com alta afinidade às cadeias de PDGF A e B, enquanto o receptor β se liga com alta afinidade somente na cadeia B (ANITUA, 1999; BARBIERI; RAMALHO; COSTA, 2006).

O PDGF está portanto, envolvido no recrutamento de células em todas as fases da regeneração, reparação tecidual e em boa parte das etapas da angiogênese, por meio de estímulos epiteliais e endoteliais celulares, na formação da matriz e na modulação das atividades de outros fatores de crescimento (RIEDEL et al., 2006).

2.2.2 Fator de crescimento transformador β (TGF- β)

O fator transformador do crescimento β (TGF- β), é formado por um grupo de proteínas com peso molecular aproximado de 25 kD (MARX et al., 1998; EVERTS et al., 2006). Constituída por mediadores locais, que regulam a proliferação e a função da maioria das células, possui cinco isoformas (1) TGF- β 1; (2) TGF- β 2; (3) TGF- β 3; (4) TGF- β 4 e (5) TGF- β 5, sendo TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, predominantes na cicatrização cutânea, reparação do tecido conjuntivo e regeneração óssea (MARX et al., 1998; LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002). Além das isoformas, o TGF também apresenta proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (EVERTS et al., 2006; LENHARO et al., 2004; BARRIENTOS et al., 2008).

O TGF- β sintetizado pela maioria das células do organismo, e. g., macrófagos, fibroblastos, plaquetas e queratinócitos durante e pós injúria (RIEDEL et al, 2006). Está envolvido em grande parte dos processos fisiológicos, com 95% sendo liberado pela degranulação plaquetária (SEIDEL, 2017). Apesar de não exercer papel inibitório nas células tronco mesenquimais onde há maior proliferação (EVERTS et al., 2006), relaciona-se a ação mitogênica sobre FCs, resposta inflamatória, angiogênese, neovascularização, reepitelização, deposição e remodelação da matriz extracelular pela promoção da síntese de colágeno e proteoglicanos (ASSOIAN et al., 1983). Também possui efeito inibitório no crescimento celular de vários tecidos, principalmente na atividade de proteases, proliferações de macrófago e linfócitos durante a exacerbação da reparação tecidual por antagonismo (PIERCE et al., 1991; RIEDEL et al., 2006; BARRIENTOS et al., 2008).

A fonte mais rica de TGF- β é encontrada nas plaquetas, ossos e cartilagens (SEIDEL, 2017). Enquanto TGF- β 1 tem o maior potencial durante o reparo ósseo, pois tanto os condrócitos quanto os osteoblastos são enriquecidos com seus receptores (DALUISKI; EINHORN, 2002), TGF- β 2 apresenta alto estímulo para a diferenciação de células mesenquimais, combate a degradação de colágeno e potencializa o processo de formação de cartilagem pelos condrócitos (condrogênese) (RIEDEL et al., 2006). Por outro lado, TGF- β 3 é mais potente como mediador fibrinogênico sendo capaz de atuar no crescimento, proliferação e diferenciação de fibroblastos (EVERTS et al., 2006; BARRIENTOS et al., 2008). De fato, os TGF- β podem contribuir para a consolidação óssea em todos os estágios e, em conjunto com os outros fatores de crescimento (PDGF, EGF, IGF-I e bFGF), promovem a regeneração através da osteogênese, osteoindução e osteocondução (SZACHOWICZ, 1995).

2.2.3 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 45 kD sintetizado por células estromais, epiteliais do endométrio, endotélio vascular, queratinócitos, células da musculatura lisa dos fibroblastos, neutrófilos, macrófagos e plaquetas (BARRIENTOS et al., 2008). Estudos mostram que *in vitro*, o VEGF e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), aumentam consideravelmente após exposição ao conjunto dos FCs liberados pelas plaquetas, sugerindo desta forma, que eles aceleram a proliferação celular e estimulam a síntese de colágeno tipo I (SAMPSON; GERHARDT; MANDELBAUM, 2008). Por conseguinte, a literatura relata que 24h sob condição de hipóxia também *in vitro*, há aumento de secreção de VEGF por ambas as células estromais e epiteliais isoladas do endométrio humano de 2 a 6 vezes (FÁTIMA; PAPA, 2010). Por conseguinte, experimentos *in vivo*, com úteros de ratas, demonstraram que sua produção pode ser ativada via estradiol por meio da produção e recrutamento do fator induzido por hipóxia 1 α . Neste caso, após a hipóxia os níveis do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do VEGF aumentaram 1,8 vezes nas células estromais e 3,4 vezes nas células epiteliais glandulares (SHARKEY et al., 2000). Assim, observa-se que a produção de VEGF está intimamente ligada com a hipóxia (FÁTIMA; PAPA, 2010).

O VEGF, possuindo cinco isoformas (1) VEGF-A, importante na cicatrização por promover eventos iniciais da angiogênese e particularmente a migração de células endoteliais, sendo regulador chave na formação de vasos sanguíneos cutâneos (YEBRA et al., 1996); (2) VEGF-B, regulador da fisiologia dos vasos sanguíneos, com papel no direcionamento endotelial de lipídios para tecidos periféricos (HAGBERG et al., 2010); (3) VEGF-C, primariamente liberado por macrófagos, importante durante o estágio inflamatório da cicatrização e estimulante da angiogênese (BARRIENTOS et al., 2008; WEICKHARDT et al., 2015); (4) VEGF-D, estruturalmente e funcionalmente semelhante ao EGF, estimula a angiogênese (WEICKHARDT et al., 2015) e por fim; (5) VEGF-E, que incentiva a formação de queratinócitos, células endoteliais e vasos sanguíneos (WISE et al., 2012). Portanto, não há dúvidas que o VEGF restaura a angiogênese, melhora a reepitelização e está intimamente associado à formação e aumento de vasos sanguíneos (BARRIENTOS et al., 2008).

2.2.4 Fator de crescimento epidérmico (EGF)

A regeneração epidérmica depende da mitose e migração dos queratinócitos (SAMPSON; GERHARDT; MANDELBAUM, 2008). Sabe-se que o fator de crescimento epidérmico estimula o crescimento de queratinócitos *in vitro* e, restabelece a cicatrização (ROSS, et al. 1974; BROWN, et al. 1986, WEICKHARDT et al., 2015). O EGF é secretado pelas plaquetas, macrófagos e fibroblastos, atuando de forma parácrina sobre os queratinócitos (BARRIENTOS et al., 2008). Interagem com o receptores celulares da epiderme e com receptores dos fibroblastos estimulando a secreção de collagenase e agindo na remodelação dos tecidos (RIEDEL et al., 2006). Atuam ainda, na angiogênese, tornando a cicatrização mais rápida e eficiente (VENDRAMIN et al., 2006). O EGF, é um dos fatores de crescimento mais relacionado à cicatrização para eventual restabelecimento do tecido tegumentar (BARRIENTOS et al., 2008). Por outro lado, a literatura aponta que as plaquetas também expressam proteínas do receptor de EGF para uma ativação autócrina e, por esta razão, podem estar envolvidas na inclusão de células escamosas oral cancerígenas dependentes da estimulação promovida por EGF (CHEN, et al., 2018). Tal relato, apesar de parecer conclusivo, necessita de mais estudos para maior elucidação.

2.3 Plaquetas como Alvos Terapêuticos

As plaquetas possuem participações importantes em várias síndromes e são incluídas como alvos terapêuticos para o desenho de novos agentes antitrombóticos (BERNARDI; MOREIRA, 2004). Análises clínicas laboratoriais como o tempo de sangramento são utilizados para identificar e relacionar as falhas na hemostasia e na função plaquetária em seres humanos (ZUCKER, 1989). Outro teste, o de agregação, é realizado mediante a utilização de uma série de agonistas por meio do PRP (MUSTARD, J. F.; PACKHAM, 1970). Neste caso, os agonistas estimulam a agregação, provocando uma mudança de turbidez no plasma rico em plaquetas, gerando uma curva que indica a transmissão de luz por unidade de tempo em um equipamento conhecido como agregômetro (CASTRO et al., 2006). O equipamento por meio do PRP relata a 1ª onda de agregação primária reversível (BITHELL, 1988) e a 2ª onda de agregação secundária irreversível (ZUCKER, 1989), possibilitando a verificação não somente de patologias relacionadas a agregação, mas também, medeia a ação antiplaquetária de fármacos que possam ser hiporresponsivos (KANAYAMA, 2003; FUCHS et al., 2013),

Vários tipos de patologias são descritas na literatura, podendo estar relacionadas com o aumento ou queda do número plaquetário, assim como excesso ou falta de adesão (ABILDGAARD et al. 1980). Algumas patologias são bem definidas, como as síndromes ligadas a vários tipos de púrpuras (púrpura neonatal, púrpura trombocitopênica trombótica, púrpura transfusional e púrpura trombocitopênica idiopática (PTI)) (GODEAU; PROVAN; BUSSE, 2007). Neste contexto, Krettli et al. (2011) caracterizou a PTI por meio da lise plaquetária por autoanticorpos que promovem o desenvolvendo da plaquetopenia intensa manifestada por púrpuras na pele (petéquias e equimoses), epistaxes (sangramento de origem mucosa nasal) e em mulheres com presença de menorragia (sangramento fora do período menstrual).

Por outro lado, a patologia de von Willebrand, também relacionada às plaquetas, é transmitida por via autossômica dominante causando problemas qualitativos ou quantitativos no FvW (MARQUES; LEITE, 2003). O FvW tem por função mediar e estabilizar a atividade da coagulação por meio do colágeno subendotelial, intercedendo nas interações plaqueta/plaqueta, atuando como uma “*ponte*” entre as membranas plaquetárias (ABILDGAARD et al. 1980).

Sabe-se que há significativa importância fisiológica na ligação do FvW e a heparina, mas o mecanismo desta ligação ainda não está totalmente elucidado (JOÃO, 2001). Mesmo assim, o resultado patológico de von Willebrand é a interferência no processo de coagulação, levando a um quadro persistente de hemorragias, que podem ser classificadas em leves (hemorragias ligeiras cutâneas), hemartroses (extravasamento de sangue para o interior das articulações com presença de dor e edema) ou hematomas intramusculares dissecantes graves (JOÃO, 2001; MARQUES; LEITE, 2003).

Dados científicos mostram que na arteriosclerose, outra síndrome plaquetária, há elevação dos níveis de fibrinogênio que estão envolvidos na injúria de células endoteliais (BERGSTROM; LINDHOLM, 1998). Entretanto, existem outros fatores ligados aos processos ateroscleróticos responsáveis pelas patologias isquêmicas, como a deficiência de carnitina, hipertensão arterial e hiperparatireoidismo secundário, que respondem pela ativação dos mecanismos de agregação plaquetária e consequentemente, com a formação da trombose arterial (LIAO et al., 1991; CARVALHO; SOUSA, 2001). A deficiência de óxido nítrico (NO) também é considerada como eventual causadora da agregação plaquetária (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; BECKER, 1999). Sua produção deficiente auxilia na disfunção endotelial e na formação de placas ateroscleróticas com consequente aumento na formação de trombos e deposição de plaquetas (FURCHGOTT et al., 1987; IGNARRO et al., 1987; BARBALHO et al., 2015). A própria hiperatividade do PDGF, associa-se a múltiplas desordens, incluindo arteriosclerose e fibrose de vários órgãos (RAICA; CIMPEAN, 2010). Esta hiperatividade é vista em diferentes tipos de tumores em humanos, como tumores do sistema gastrointestinal e do sistema nervoso central (ALVAREZ; KANTARJIAN; CORTES, 2006; BARBIERI; RAMALHO; COSTA, 2006; (RAICA; CIMPEAN, 2010). Portanto, acontecimentos que medeiam a injúria e promovem a descontinuação da capa endotelial encorajam a adesão, ativação e agregação plaquetária, resultando na formação de trombos arteriais ou venosos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; ANDRADE; BORGES, 2017). Assim, as plaquetas estão diretamente envolvidas em diversas patologias importantes e por meio do PRP de *Rattus norvegicus* podem ser avaliadas e testadas como possíveis alvos terapêuticos (CASTRO et al., 2006).

2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

No início da década de 70, o PRP autólogo foi desenvolvido como um subproduto de aférese sanguínea sendo reconhecido como um importante agente adesivo e hemostático (ROSENTHAL, et al. 1975). Em 1987, Ferrari et al. usaram o PRP em cirurgia cardíaca aberta para evitar transfusão excessiva de itens sanguíneos homólogos, ocorrendo assim, a confirmação da potência autóloga dos fatores de crescimento do plasma rico em plaquetas. A partir de então, ampliou-se intensivamente a utilização do PRP principalmente nas cirurgias buco-maxilo-faciais, mas sem especificações padronizadas metodológicas para sua obtenção (LINS, 2014).

O plasma rico em plaquetas tem sido considerado uma grande ferramenta na aceleração e cicatrização de tecidos ósseos e moles (NIKIL; GULATI, 2016). Sua biotecnologia é relativamente nova e faz parte do crescente interesse da terapêutica tecidual e celular (MARX, 2001). Trata-se de um pequeno volume de plasma autólogo, com uma concentração de plaquetas acima do valor inicial (LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000; WANG; AVILA, 2007; CHEN; ZHANG; WU, 2010) e por ser desenvolvido a partir do sangue do próprio paciente, o PRP não transmite patologias infectocontagiosas ou desencadeia rejeições por parte do organismo (OBARRIO et al., 2000; MARX, 2001; DUGRILLON; EICHLER; KERN, 2002). A Cruz Vermelha Americana define PRP como sendo $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas/50mL ou 1100×10^3 plaquetas μL^{-1} (EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, T. 2009; SHIN; WOO; KANG, 2017). Desta maneira, para que tenha eficácia, o PRP autólogo, deve concentrar 3 a 5 vezes o valor inicial plaquetário ou apresentar um aumento mínimo de 338% de sua totalidade inicial (MARX et al., 1998; PALLUA; WOLTER; MARKOWICZ, 2010).

No geral, o sangue autólogo é colhido com anticoagulante e submetido a centrifugação por tempo determinado, obtendo-se desta forma, níveis de precipitados (leucócitos, eritrócitos e plasma) que posteriormente irão dar origem ao PRP (LENHARO et al., 2004). Vários protocolos já foram testados (tabela 4 e 5) para sua obtenção e nesta universalidade, muitos autores preconizam protocolos mais simples com apenas uma centrifugação (ANITUA, 1999), enquanto outros afirmam que a dupla centrifugação concentra mais plaquetas e por isso, o PRP obtido é mais eficaz (MARX, 2001).

A literatura também expressa preocupação quanto ao uso de substâncias sintéticas durante a preparação do PRP. Landesberg et. al. (2000), salientaram sobre o uso do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. Os autores enfatizam que o EDTA, não pode ser usado por causar fragmentação plaquetária e nesse caso, o uso do fosfato-citrato (solução tampão) e/ou citrato/fosfato/dextrose/ (CPD) seriam melhores como anticoagulantes para preservar a integridade da membrana plaquetária. Ainda relembram que os fatores de crescimento do PRP são obtidos por extrusão durante a exocitose enquanto ocorre o processo da formação da estrutura terciária. Assim, o EDTA eleva a fragmentação liberando maior quantidade de fatores de crescimento na solução, mas com a estrutura terciária totalmente alterada e portanto, a atividade e a eficácia do PRP passam a ser diminuídas (ZANDIM et al., 2012). Em contrapartida, o trabalho de Macey et al. (2002), preocupou-se com o tempo de armazenamento do sangue retirado do paciente, sugerindo que após a coleta a amostra pode ser armazenada em 4°C e ali permanecer entre 60 a 180 minutos com a adição de CTAD (solução de citrato de sódio, teofilina, adenosina e dipiridamol), proporcionando estabilidade e aumento na rentabilidade de fatores plaquetários.

Como dito anteriormente, por meio dos principais FC encontrados no PRP como PDGF; TGF- β ; VEGF e EGF (MARX et al., 1998; LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000), liberados a partir do coágulo (MARLOVITS et al., 2004; MARX, 2001; PALLUA; WOLTER; MARKOWICZ, 2010), torna o plasma rico em plaquetas um emanado natural terapêutico para acelerar processos gênicos e reparadores (ANTONIADES, 1981; LENHARO et al., 2004; COSTA; SANTOS, 2016). Desta forma, o plasma rico em plaquetas, passa a ser considerado o iniciador universal orgânico da maior parte dos processos cicatriciais das estruturas teciduais, desde que, usado por meio de protocolos linearmente padronizados (LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000).

Tabela 4 - Diversificações de protocolos para obtenção do PRP em humanos

HUMANO												
Esp.	N.	Vol. Sg.	Substância Presente	Centrif.	Tempo Centrif. (Min)	Rpm/ Força G	Método	Concentração Final plaquetária	Enriq. PRP (100%)	Tempo Preparo PRP	Aplicação clínica	Ref.
Hum	16	22,5 mL	EDTA; Citrato de Sódio (3,2%)	Simples	7min	1600rpm	Aberto	747.875/ μ L	N/i	N/i	Av. Prot.	Aguirre et al., (2017).
Hum	6	60 mL	Ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose (DCA)	Simples	15min	3200rpm	Gpsiii® (biomet)	606.33 x 10^3 / μ L	N/i	N/i	Av. Prot.	Pochini et al., (2016).
Hum	6	26 mL	N/i	Centrifugação automatizada	17min	610G/4min; 1,240G/6min	Magellan®	1.630,25 x 10^3 / μ L	N/i	N/i	Av. Prot.	Pochini et al., (2016).
Hum	56	20 mL	Cloreto de cálcio; trombina homóloga; gluconato de cálcio	Dupla	5min / 5min	1.500rpm / 3.500rpm	Aberto	1.200.000/ μ L	600	40	Cicatrização de úlceras em pé diabético	Ahmed, et. al, (2016).
Hum	5	150 mL	Cloreto de cálcio; trombina autóloga	Centrifugação automatizada	17min	1 ciclo 610G/4min; 1,240G/6min	Magellan®	152.1 x 10^4 / μ L	N/i	N/i	Av. Prot.	Kushida et al., (2014).
Hum	5	100 mL	Ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose (ACD)	Simples	15min	1100G	Gpsiii® (biomet)	566.200 x 10^3 / μ L	N/i	N/i	Av. Prot.	Castillo et al., (2010).
Hum	63	10 mL	Citrato de sódio/ fosfato monobásico de sódio/dextrose anidra/ácido cítrico (CPDA-1); gluconato de cálcio; trombina humana;	Dupla	10min/ 10min	400G/ 800G	Aberto	N/i	570	45	Av. Prot.	Vendramin; Franco, D.; Franco, T., (2009).
Hum	100	40 mL	Cloreto de cálcio	Dupla	8min / 6min	3000rpm/ 1000rpm	Aberto	837x 10^3 / mL	469	N/i	Reconstrução do ligamento cruzado anterior primário	Nin et al., (2009)
Hum	20	150 mL	Cloreto de cálcio	Dupla	15min/ 10min	1800rpm/ 3500rpm	Aberto	6.8x 10^6 / mL	600	N/i	Tendinite patelar crônica	Kon et al., (2008)
HUMANOS												

Tabela 5 - (continuação)

Esp.	N	Vol. Sg.	Substância Presente	Centrif.	Tempo Centrif (Min)	Rpm/ Força G	Método	Concentração Final plaquetária	Enriq. PRP (100%)	Tempo Preparo PRP (min)	Aplicação clínica	Ref.
Hum	12	40 mL	Cloreto de cálcio	Simples	8min	640G	Aberto	$634 \times 10^3/\mu\text{L}$	310	N/i	Reparação cirúrgica do tendão de Aquiles	(2009) Sanchez et al., (2007)
Hum	30	10 mL	Trombina autóloga; gluconato De cálcio a 10%	Dupla	10mi/ 10mim	300G/ 640G	Aberto	N/i	496	45	Av. Prot.	Vendramin et al., (2006).
Hum	140	55 mL	N/i	Simples	15mim	3200rpm	Aberto	$3.31 \times 10^6/\text{mL}$	539	N/i	Epicondilite lateral (dor)	Mishra; Pavelko (2006).
Hum	25	60 mL	Cloreto de cálcio; Trombina	Dupla	13min	Autom.	Smartprep®	$1016 \times 10^3/\mu\text{L}$	400	15	Av. Prot.	Kevy; Jacobson (2004)
Hum	10	55 mL	Citrato de dextrose; trombina bovina; cloreto de cálcio	Dupla	12min/ 5min	3200rpm/ 3200rpm	Gpsiii® (biomet)	$1.603.000/\mu\text{L}$	850	N/i	Cirurgia estética	Eppley et al. (2004)

Abreviaturas/Siglas: Espécie (Esp.); Número de participantes (N); ³Volume Sanguíneo (Vol. Sg.); Centrifugação (Centrif.); Enriquecimento do Plasma Rico em Plaquetas (Enriq. PRP); Referências (Ref.); Humanos (Hum.); Não informado (N/i); Avaliação de protocolos (Av. Prot.); milímetro (mL).
Fonte: Adaptado de Kevy; Jacobson (2004); Marques et al., 2014.

Tabela 5 - Diversificações de protocolos para obtenção do PRP em animais

VETERINÁRIO												
Esp.	N	Vol. Sg.	Substância Presente	Centrif	Tempo Centrif (Min)	Rpm/ Força G	Método	Concentração Final plaquetária	Enriq. PRP (%100x)	Tempo Preparo PRP (min)	Aplicação clínica	Ref.
Equino	6	81 mL	Citrato de sódio; cloreto de cálcio	Dupla	5min / 5min	120G/ 473G	Aberto	500.000/ μL^{-1}	N/i	N/i	Tendinite do TFDS	Maia et al., (2009)
Cam. (C57BL/6)	32	20 mL	Isoflurano; citrato de sódio; gluconato de cálcio	Dupla	5min / 5min	1500rpm / 1500rpm	Aberto	$2.0 \times 10^7 / \mu\text{L}^{-1}$	N/i	N/i	Porção Parietal do Crânio	Monteiro; Menke (2010)
Bov. (Holstein)	12	54 mL	Citrato de sódio	Dupla	5min / 5min	720G/ 720G	Aberto	$882.00 \times 10^3 / \mu\text{L}$	129	N/i	Av. Prot.	López; Giraldo; Carmona, (2012)
Equino	5	27 mL	Citrato de sódio	Dupla	5min / 5min	120G/ 240G	Aberto	$343.905 \mu\text{L}^{-1}$	218	N/i	Osteoartrite Equina	Vendruscolo et al., (2012)
Equino	10	35 mL	CPDA-1	Dupla	10min/ 10min	400G/ 800G	Aberto	$618.757 / \mu\text{L}$	480	N/i	Av. Prot.	Pereira, et al., (2013).
Bov. (Red Angus)	9	30 mL	CPDA-1	Dupla	10mi/ 10min	400G/ 800G	Aberto	$4.129,78 \times 10^3 / \mu\text{L}$	890	N/i	Av. Prot.	Marques et al., (2014)
Coelho (Nova Zelândia)	30	10 mL	Citrato de sódio; gluconato de cálcio	Dupla	10mi/ 10min	1600rpm / 2000rpm	Aberto	$1.176.933 / \mu\text{L}$	805	40	Av. Prot.	Pazzini et al., (2016)
Cães (Beagles)	12	90 mL	Citrato de sódio; citrato de dextrose (ACD); cloreto de cálcio	Dupla	05min/ 15 min	1000G/ 1500G	Aberto	$1.748 \times 10^3 / \mu\text{L}$	610	N/i	Av. Prot.	Shin; Woo; Kang, (2007)
Equino	9	55 mL	N/i	N/i	N/i	N/i	¹² Filtro E-PET	$950.944 / \mu\text{L}$	536	14	Av. Prot.	Conceição et al., (2017)

Abreviaturas/Siglas: Espécie (Esp.); Número de participantes (N); ³Volume Sanguíneo (Vol. Sg.); Centrifugação (Centrif.); Enriquecimento do Plasma Rico em Plaquetas (Enriq. PRP); Referências (Ref.); Tendinite do tendão flexor digital superficial (TFDS); Camundongos linhagem C57BL/6 (Cam.); Bovinos (Bov.); Avaliação de protocolos (Av. Prot.); Terapia de melhoramento de plaquetas equinas (E-PET), milímetros (mL)
 Fonte: Adaptado de Kevy; Jacobson (2004); Marques et al., 2014.

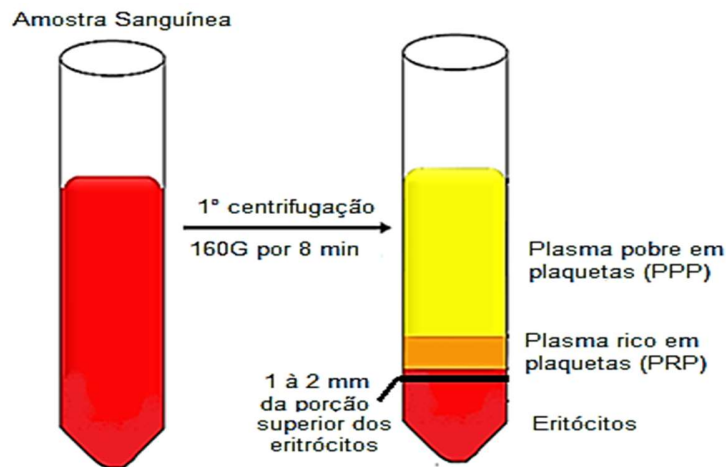
2.4.1 Protocolos de PRP em destaque

Há diversos protocolos para obtenção do PRP, mas existem fatores comuns entre eles como a necessidade de centrifugação; a utilização de anticoagulantes e na maioria das vezes o uso de trombina autóloga e cloreto de cálcio para ativação dos FC plaquetários (COSTA; SANTOS, 2016). Os protocolos também descrevem as densidades diferenciais das células sanguíneas do PRP e por muitas vezes referenciam a amostra de sangue anticoagulado que contém a maioria das células da série branca e plaquetas após a centrifugação como "*buffy coat*" (NUNES; SOARES; ALVES, 1979; Marx et al., 1998; MUSTARD, J. F.; PACKHAM, 1970; ZUCKER, 1989; DUSSE et al., 2008). Desta forma, alguns autores como Anitua (1999); Sonnleitner et. al., (2000); Vendramin et. al., (2006; 2009) que delinearam protocolos para humanos, assim como o estudo de Yazigi et. al. (2015) que prosseguiu com protocolos para ratos da linhagem Wistar Kyoto (SHR), nos chamaram a atenção por seus achados. Por esta razão, seus protocolos foram escolhidos para nos orientar durante nossa experimentação. A partir de então, podemos confeccionar a padronização de PRP de ratos Wistar, originando os protocolos 1 (P1); 2 (P2) e 3 (P3). A seguir, serão considerados a metodologia de Anitua (1999); Sonnleitner et. al., (2000); Vendramin et. al., (2006; 2009) e Yazigi et. al., (2015).

2.4.1.1 Anitua (1999)

O procedimento de Anitua, (1999) (figura 4), consiste em obter amostra sanguínea autóloga do paciente antes de qualquer ação farmacológica. Inicia-se coletando volume sanguíneo entre 10 a 20 mL em tubo pré-preparado com solução de citrato trissódico a 10% como anticoagulante. Após a coleta, os tubos são centrifugados a 160G por 6 minutos, separando o sangue em três frações: eritrócitos (porção inferior do tubo), plasma (porção média do tubo) e PPP (porção superior do tubo). Após a separação, descarta-se 1mL de cada tubo de PPP, colhendo-se o plasma restante juntamente com 1 a 2 mm da porção superior dos eritrócitos, utilizando-se posteriormente, para ação terapêutica. Por promover uma metodologia simples, pode ser realizado em ambulatório com o uso de uma microcentrífuga.

Figura 4 - Ilustração do Anitua (1999)

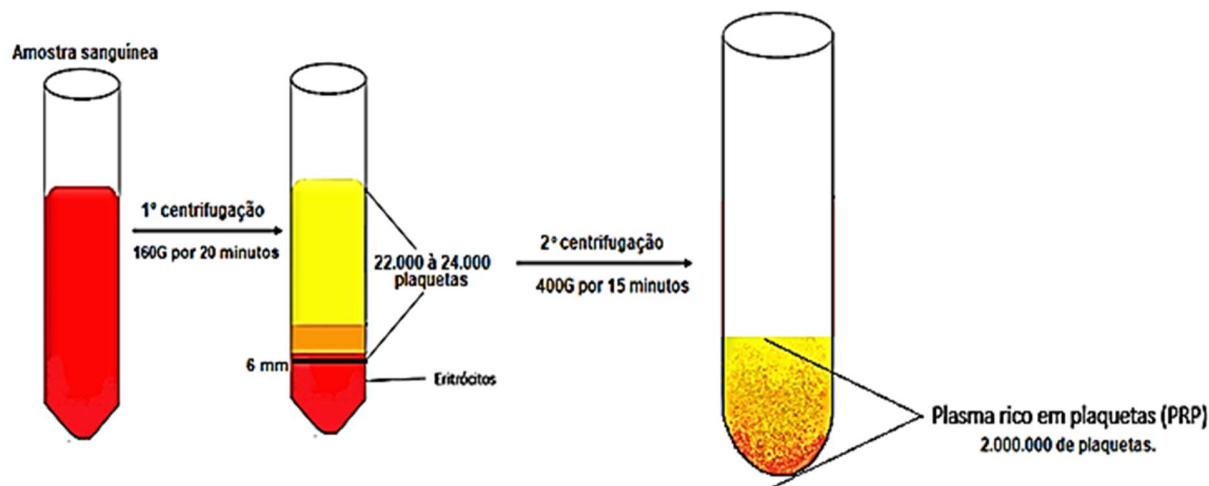


Fonte: Pelo autor

2.4.1.2 Protocolo de Sonnleitner et. al., (2000)

Neste método, o PRP é obtido a partir de duas etapas de centrifugações (figura 5). Na primeira etapa, 6 mL de sangue são retirados do paciente e centrifugados por 20 minutos à 160G, usando uma centrífuga de bancada. Após a centrifugação, três frações celulares sanguíneas são obtidas: eritrócitos (porção inferior do tubo), plasma (porção média do tubo) e PPP (porção superior do tubo). Após a primeira separação, Sonnleitner et. al. (2000), retiraram 6mm da porção inferior em conjunto com o plasma para mais uma centrifugação de 400G por 15 minutos, sem a adição de anticoagulantes. Posteriormente à segunda centrifugação, pipetaram a fração superior, descartando-a e considerando o produto restante (0,5 mL) como PRP. Mensurações detalhadas durante o estudo expuseram após a primeira centrifugação, concentrações plaquetárias de 250.000 plaquetas por μL , enquanto na segunda centrifugação, obteve-se 2.000.000 de plaquetas/ μL .

Figura 5 - Ilustração do protocolo de Sonnleitner et.al., (2000)



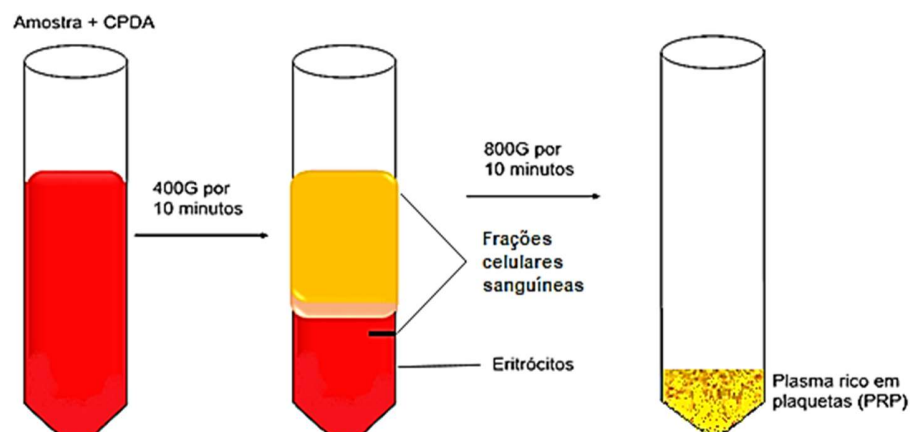
Fonte: Pelo autor

2.4.1.3 Protocolo Vendramin et al., (2006)

Metodologicamente, Vendramin et al. (2006) fundamentaram-se em coletar 10 mL de amostra sanguínea autóloga por punção venosa periférica, submetendo-a a duas etapas de centrifugações. Na 1ª etapa, a amostra foi centrifugada a 300G por 10 minutos, resultando em três frações como nos demais métodos. Na 2ª etapa, o equipamento foi regulado para 640G por 10 minutos. Com este protocolo, Vendramin et al. (2006) obtiveram aumento de 454% de plaquetas na primeira centrifugação, enquanto que na segunda centrifugação a concentração foi de 496%.

Apesar de ter uma boa reprodutibilidade, em 2009 Vendramin et al. adaptaram sua própria metodologia (figura 6). Retiraram 5mL diretamente da bolsa de sangue contendo fosfato monobásico de sódio/dextrose anidra/ácido cítrico (CPDA-1) e submeteram a amostra à 400G por 10 minutos de centrifugação. Após a primeira etapa, o conteúdo do *buffy coat* foi aspirado com 2mm da camada de eritrócitos e submetido à uma nova centrifugação de 800G por 10 minutos. Posterior à segunda etapa, $\frac{2}{3}$ do volume plasmático foram retirados e desprezados. O produto restante foi então homogeneizado para a finalização do PRP. Com este novo protocolo, Vendramin et al. (2009) aumentaram a concentração plaquetária em 570%.

Figura 6 - Ilustração do protocolo Vendramin et al., (2009)



Fonte: Pelo autor

2.4.1.4 Protocolo de Yazigi et. al. (2015)

Yazigi et. al. (2015) usaram 40 ratos machos da linhagem isogênica SHR *i.e.*, animais que apresentam pressão arterial acima de 200mmHg a partir dos 3-4 meses de vida dividindo-os em grupos de 3. O primeiro grupo foi submetido ao controle, sangue total sem centrifugação e única centrifugação; o segundo grupo sangue total submetido a uma única centrifugação e o terceiro grupo sangue total submetido a uma centrifugação, seguido de coleta do plasma total e realizado uma centrifugação. Desta forma, pressupõem um $n = 13$ para cada grupo. Retiraram 3ml de sangue de cada animal por meio de punção cardíaca e as amostras foram acondicionadas com citrato de sódio a 3,2%. Em seguida as amostras foram centrifugadas em (1) 200G por 10 minutos, seguida de 200G por 10 minutos; (2) centrifugação a 200G por 10 minutos e 400G por 10 minutos; (3) centrifugação em 200G por 10 minutos e 800G por 10 minutos; (4) centrifugação a 400G por 10 minutos e 400G por 10 minutos; (5) centrifugação a 400G por 10 minutos, seguida e 800G por 10 minutos; (6) centrifugação única em 200G por 10 minutos e (7) centrifugação única em 400G por 10 minutos. Em finalização, o estudo concluiu que a dupla centrifugação com repetições de tempo e força G (400G por 10 minutos seguida de 400G por 10 minutos), aumentou a concentração média plaquetária em confronto ao grupo controle em 11,30 vezes.

2.5 Esfregaço

Esfregaço, distensão sanguínea ou ainda extensão sanguínea é um método elaborado para enumeração e identificação morfológica dos componentes sanguíneos (CASTRO, et al., 2006). O protocolo do esfregaço consiste na extensão em ângulo de 45° de uma fina camada de sangue ou PRP sobre uma lâmina que, após corada, será analisada em microscópio óptico (Figura 7) (RODAK; FRITSMAN; KEAOHANE, 2012). A contemplação da morfologia plaquetária por PRP pode ser observada pela técnica de esfregaço por meio da coloração de panótico rápido (Diff-Quick®), coloração pelo método Wright, Giemsa®, entre outros (SCHWEIRGERT et al., 2010). O uso de coloração possibilita tornar mais nítida a estrutura morfológica e a visualização das aglutinações citoplasmáticas e/ou mudanças conformacionais plaquetárias (MACHADO, 1973).

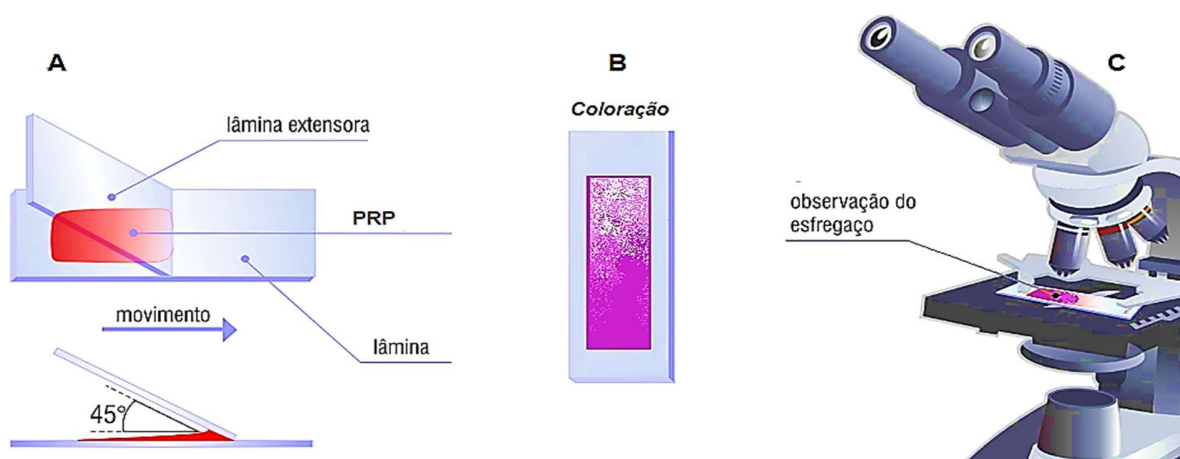
Rotineiramente, exames laboratoriais como hemograma e o coagulograma são utilizados para a verificação da hemostasia e função plaquetária, mas complementarmente, há a necessidade de se produzir o esfregaço do sangue periférico para a verificação da morfologia das plaquetas (CASTRO, et al. 2006). Além de um método simples, rápido e barato, a literatura descreve o protocolo por esfregaço de PRP como uma metodologia também quantitativa de boa sensibilidade, sendo-lhe conferindo status de alta eficácia quando comparado a aparelhos automatizados, e. g., QBC Vet Autoread® (SCHWEIRGERT et al., 2010).

Morfologicamente, plaquetas não ativadas no PRP são vistas no esfregaço em forma discoide e aparecem na maioria das vezes arredondadas, ovais ou alongadas sem coloração exagerada dos grânulos (CASTRO et al., 2006; GONÇALVES, 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Substâncias como anticoagulantes a base de citrato, tornam as plaquetas do PRP esferoides e mais comumente arredondadas (COSTA; SANTOS, 2016). Mudanças conformacionais podem ser visíveis quando a força G for excessiva para manufatura do PRP (BORGES et al. 2013) tal qual, quando condições de estímulos de trombopoiese provocados *in vitro*, mostrará no esfregaço plaquetas alongadas que provavelmente representam segmentos de pseudópodes de megacariócitos não divididos (*proplaquetas*) (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Mas, se os grânulos não são observados fora dos remanescentes citoplasmáticos, assim como não se verifica sua presença na região adjacente do esfregaço, serão consideradas plaquetas

ativas, mas porém inertes (SILVA et al., 2007; ZANDIM et al., 2012). Neste caso, a inércia só será descartada quando for possível observar os α -grânulos gigantes na membrana citoplasmática coloridos de vermelho intenso ou róseo, *i. e.*, promovendo a liberação dos FCs (MURPHY; GARDNER, 1971).

Ressalvas sobre a técnica do esfregaço devem ser observadas. Para uma boa visualização morfológica, o procedimento de extensão sob lâmina precisa ser padronizado quanto a coleta, o anticoagulante, coloração e a técnica mecânica em si (SILVA et al., 2007). Stockham; Scott (2011), descrevem que amostras heparinizadas para observações em esfregaço não são viáveis, pois a agregação plaquetária ocorre com frequência nesse meio, assim como, as plaquetas podem ser facilmente hiperativadas durante a colheita de sangue, em razão da demora ou de técnica incorreta de venopunção aplicada no animal. Sob outra perspectiva, o esfregaço deve ser realizado por profissional qualificado para evitar pressão desigual na lâmina extensora e bordas irregulares que possa comprometer a morfologia plaquetária (SILVA et al., 2007). Além do mais, pipetar uma gota muito pequena de sangue, gotejar concentradamente no meio da lâmina ou, produzir a gota seca, advinda da demora na produção da fixação da lâmina, pode comprometer a obtenção da monocamada plaquetária (RODAK; FRITSMAN; KEAOHANE, 2012). Portanto, o sucesso do resultado final por esfregaço, depende de todas as fases e pormenores da padronização metodológica (ALMEIDA, 2011).

Figura 7- Protocolo de esfregaço do PRP



(A) Movimento permitindo que a gota do PRP se difunda uniformemente, por capilaridade; **(B)** coloração da lâmina do esfregaço de PRP; **(C)** observação morfológica plaquetária por microscopia óptica. Fonte: Adaptado de Vidraria de laboratório

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimento ético

Tratando-se de pesquisas envolvendo animais de qualquer espécie e raça, individuais e coletivas, devem ser respeitados a legislação, os princípios e normas éticas relacionadas ao tema (UNESP, código de ética). Assim, conforme as diretrizes de “*ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research*” (2010), os procedimentos envolvendo os animais foram planejados e executados com as devidas considerações de sua relevância para a saúde humana e o bem estar da espécie estudada. Usou-se o número mínimo de animais para obter resultados válidos para o avanço do conhecimento. Todo o experimento, esteve sob a estreita supervisão de médico veterinário garantindo o conforto dos *Rattus norvegicus* (Linhagem Wistar).

3.2 Local de realização da pesquisa

O experimento foi desenvolvido nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil.

3.3 Animais

Foram utilizados 11 *Rattus norvegicus* machos, adultos, linhagem Wistar, com peso corpóreo médio de 425g, escolhidos aleatoriamente por sorteio em uma população de 90 indivíduos definindo-se a quantidade de animais e o intervalo a ser sorteado. Todos os animais após o sorteio foram triados e submetidos a exame físico geral, sendo considerados aptos para o experimento. Os roedores foram divididos em trios e acondicionados em caixas de polipropileno (40x33x16,5 cm) sob condições ambientais padronizadas com ciclo de 12h claro/escuro, temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa do ar controlada $55 \pm 10\%$. As caixas foram forradas com maravalha irradiada (10 kGy) e trocadas em dias alternados. A alimentação foi proveniente de ração convencional para ratos e a água foi potável, não havendo restrições para o seu fornecimento ou consumo.

3.4 Delineamento Experimental

3.4.1 Anestesia

Cada animal foi anestesiado previamente com Ketamina 80mg/Kg intraperitoneal (I.P.) e Xilazina 13Mg/Kg I.P., conforme Canadian Council on Animal Care, (1993). A Ketamina associada a Xilazina, produziu sedação hábil em 20 min.

3.4.2 Coleta de Amostra

Após anestesia, coletou-se 3,2 mL de sangue periférico (S.P.) (figura 8), por meio de pulsão cardíaca, em seringa previamente preparada com 640µL de CPDA-1 (JP Industria Farmacêutica S/A – Brasil). Ao final da punção, o conteúdo total da seringa foi homogeneizado delicadamente para evitar ativação plaquetária e imediatamente transferido para tubos siliconados (BD Vacutainer®, Brasil) (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 25°C (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Germany) para a obtenção do PRP.

Figura 8 - Coleta de amostra sanguínea por punção cardíaca



Fonte: Pelo autor

3.4.3. Preparo do PRP por três protocolos distintos

Todos os métodos averiguados durante a experimentação foram executados em triplicata e duplo-cego. Os protocolos efetivados foram denominados de P1; P2 e P3

3.4.3.1 Preparo de P1

Após coleta sanguínea, 1 mL da amostra com CPDA-1 foi transferida para tubo siliconado e submetida a uma única centrifugação em 160G por 6 min. Ao final do

procedimento, ocorreu a separação do sangue em três frações: eritrócitos, plasma e leucócitos. Colhe-se todo o plasma em conjunto com 1 mm da porção superior dos eritrócitos, totalizando 100µL de PRP (figura 9).

Figura 9 – Obtenção do PRP conforme P1.

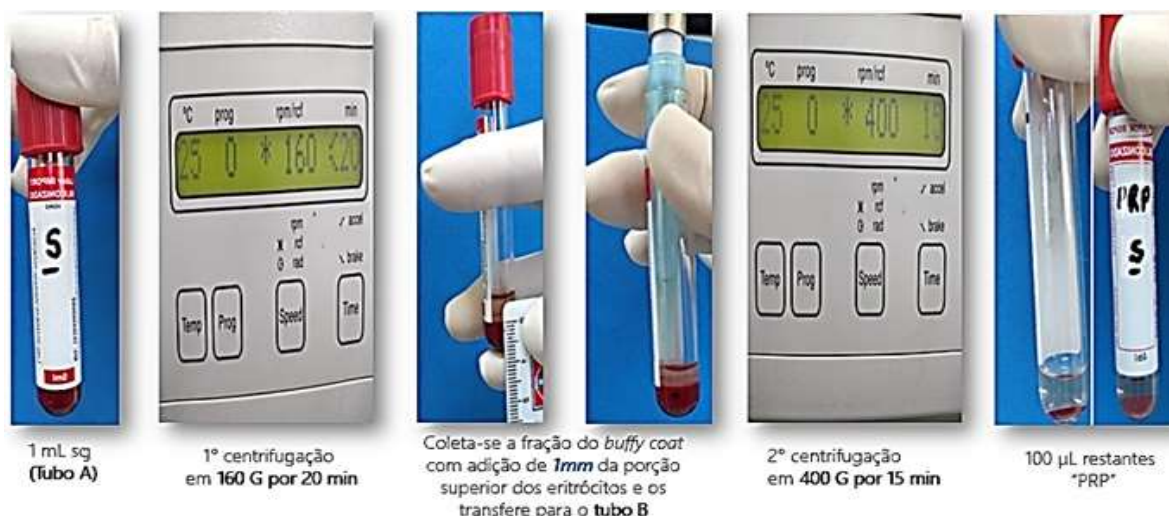


Fonte: Pelo autor

3.4.3.2 Preparo de P2

Este protocolo estabelece duas etapas diferentes de centrifugações. Na primeira etapa (Tubo A), acondiciona-se 1 mL da amostra sanguínea com CPDA-1 em tubo siliconado e o submete-se à força de 160 G por 20 min. Ao final do tempo, ocorre a separação sanguínea em três frações: eritrócitos, plasma e leucócitos. O *buffy coat* e mais 1mm da porção superior dos eritrócitos foram aspirados com uma pipeta automática de volume variável (100 µL a 1000 µL), sendo acondicionados em um segundo tubo siliconado (tubo B). Na segunda etapa de centrifugação, o tubo B foi submetido à força de 400 G por 15 min. Ao final do tempo, descartamos aproximadamente $\frac{2}{3}$ da fração superior do Tubo B, considerando os 100 µL restantes como o PRP (figura 10).

Figura 10 - Obtenção do PRP conforme protocolo Sonnleitner et al., (2000).

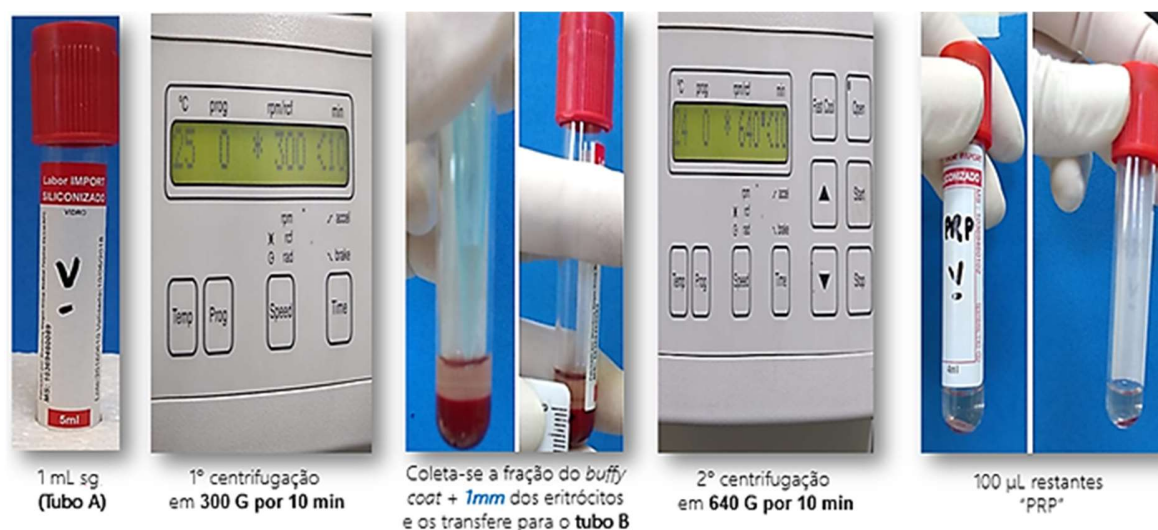


Fonte: Pelo autor

3.4.3.3 Preparo de P3

Este protocolo, assim como P2, estabelece duas etapas diferentes de centrifugações. Na primeira etapa (Tubo A), acondiciona-se 1 mL da amostra sanguínea com CPDA-1 em tubo siliconado e o submete-se à força de 300 G por 10 min. Ao final do tempo, ocorreu a separação sanguínea em três frações: eritrócitos, plasma e leucócitos. O *buffy coat* e mais 1mm da porção superior dos eritrócitos foram aspirados com uma pipeta automática de volume variável (100 µL a 1000 µL), sendo acondicionados em um segundo tubo siliconado (tubo B). Na segunda etapa de centrifugação, o tubo B foi submetido à força de 640G por 10 min. Ao final do tempo, descartamos aproximadamente $\frac{2}{3}$ da fração superior do Tubo B, considerando os 100 µL restantes como o PRP (Figura 11).

Figura 11 - Obtenção do PRP conforme protocolo de Vendramin et al. (2006)



Fonte: Pelo autor

3.5. Análises Laboratoriais

3.5.1 Plaquetometria do Sangue Periférico

A amostra do S. P. na quantidade de 0,2 mL foi diluída na proporção de 1/100 em pipeta de Thoma com solução de Brecher (oxalato de amônio 1%) e homogeneizada por 5 min. Ao final do tempo, a amostra por capilaridade foi colocada em câmara de Neubauer e deixada em repouso por 20 min em câmara úmida para posterior contagem plaquetária em microscópio óptico binocular Euromex® (400x). Todo o procedimento foi executado em duplo-cego.

3.5.1 Plaquetometria dos Protocolos

As amostras de cada protocolo pós obtenção dos 100 µL de PRP foram colocadas por capilaridade em câmara de Neubauer e deixadas em repouso por 20 min em câmara úmida para posterior contagem plaquetária em microscópio óptico binocular Euromex® (1000x). Todos os procedimentos foram executados em duplo-cego.

3.5.2 Análise Morfológica por Esfregaço

As amostras do SP e as amostras de PRP obtidas de cada protocolo foram utilizadas para a confecção de esfregaço em lâmina de vidro (Stockham; Scott, 2011) e posteriormente coradas com Panótico rápido Diff-Quick® (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil).

A morfologia plaquetária foi avaliada com objetiva de imersão, aumento de 100x, em microscópio óptico binocular Euromex®. A escolha do campo para observação baseou-se em uma igualdade distributiva das plaquetas, permitindo, desta forma, avaliar as diferenciações das partículas não-celulares ou debris plaquetários (MACHADO, 1973). As plaquetas foram classificadas em estados morfológicos: plaquetas inativas em formato alongado ou discoide e plaquetas ativadas, com presença de pseudópodes e grânulos corados (CASTRO, et al., 2006).

3.5.3 Análise Estatística

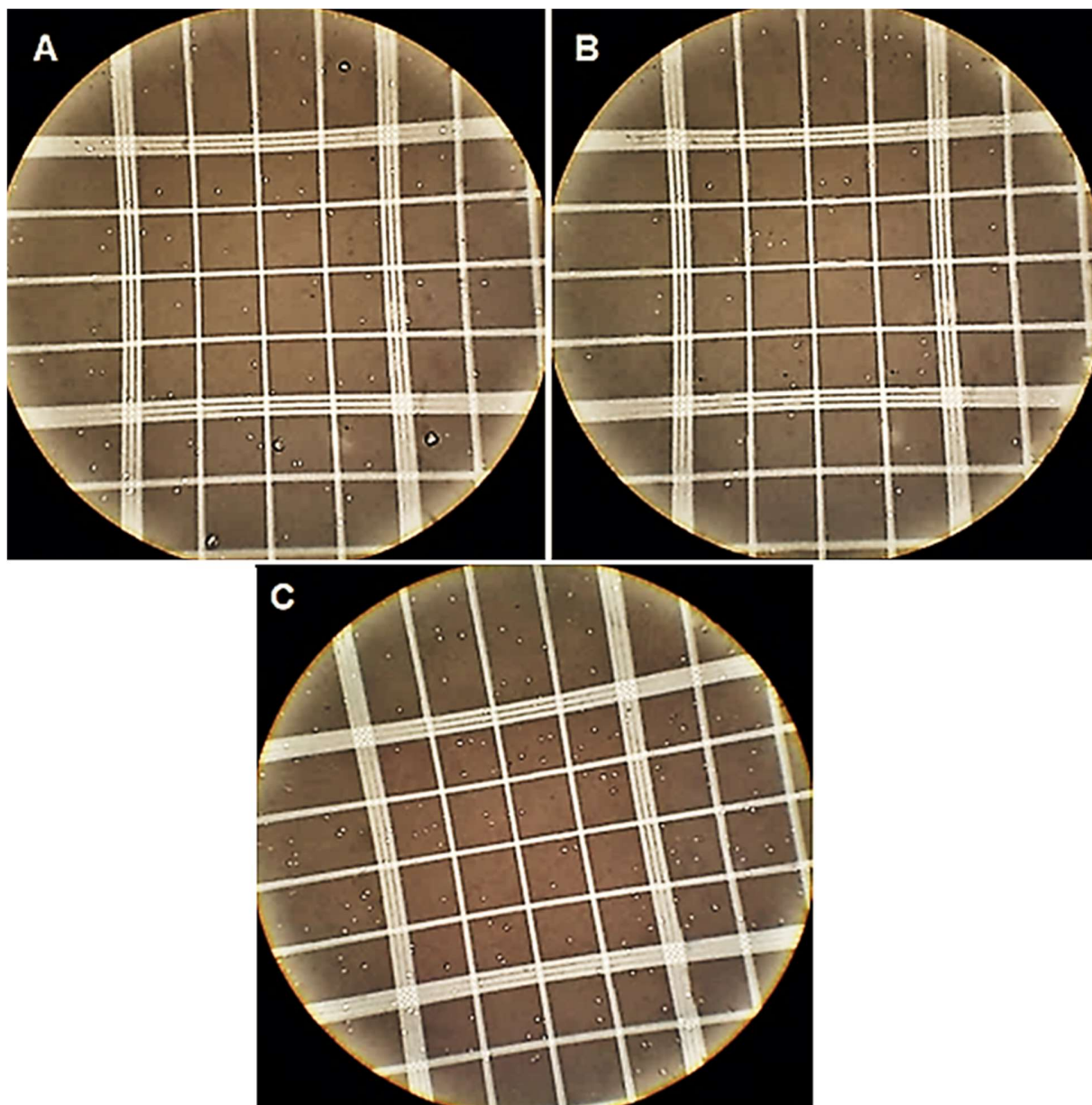
Após análise das variáveis quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilk), as diferenças entre os grupos foram verificadas pelos testes de Friedmann com pós-teste de Dunn (Plaquetas), ANOVA com medidas repetidas e pós-teste de Tukey (Concentração). Média e desvio-padrão foram as ferramentas da estatística descritiva utilizada para melhor apresentar os dados do experimento. Todas as análises estatísticas foram efetuadas em programa computacional (GraphPad Prism, v.6.00 para Windows), sendo consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Em nosso experimento, os três protocolos de PRP concentraram plaquetas de forma significativa em relação ao sangue periférico (figura 12, 13 e tabela 5). No entanto, os protocolos de P2 e P3 quanto a concentração plaquetária, não apresentaram relevância estatística entre si ($P < 0,0001$), mas foram superiores a P1.

No tocante a avaliação morfológica plaquetária, todas as amostras de PRP apresentaram mudanças nas características conformacionais em esfregaço quando comparados com o sangue periférico (figura 14). Foi visível maior grau de ativações, nos protocolos de P2 (figura 15) e P3 (figura 16), do que em P1. Por outro lado, o protocolo de P1 apresentou maior quantidade de elementos eritrocitários (figuras 15). Neste aspecto, o protocolo P3 foi o que apresentou menor incursão eritrocitária, ínfimo número de debris plaquetário e no quesito tempo global para preparação, permaneceu em segundo plano atrás de P1.

Figura 12 – Plaquetometria vista por câmara de Neubauer



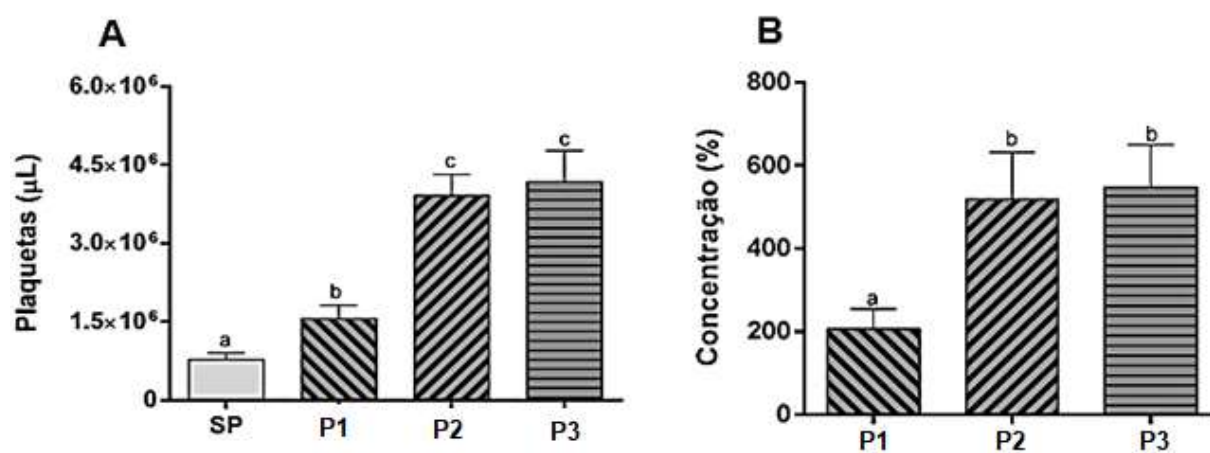
Plaquetometria em câmara de Neubauer: **(A)** protocolo P2; **(B)** protocolo P1; **(C)** protocolo P3.
Fonte: Pelo Autor

Tabela 5 - Parâmetros dos valores expressos em média e desvio padrão da plaquetometria e concentração de PRP de Rattus novergicus (Wistar)

Plaquetometria (μL)				
Índice estatístico	S.P.	P1	P2	P3
MÉDIA	777.393	1.564.357	3.911.786	4.177.857
DESVPAD	131.309	245.761	403.950	594.671
Concentração (%)				
Índice estatístico	P1	P2	P3	
MÉDIA	207	519	549	
DESVPAD	48	112	101	

Fonte: Pelo autor

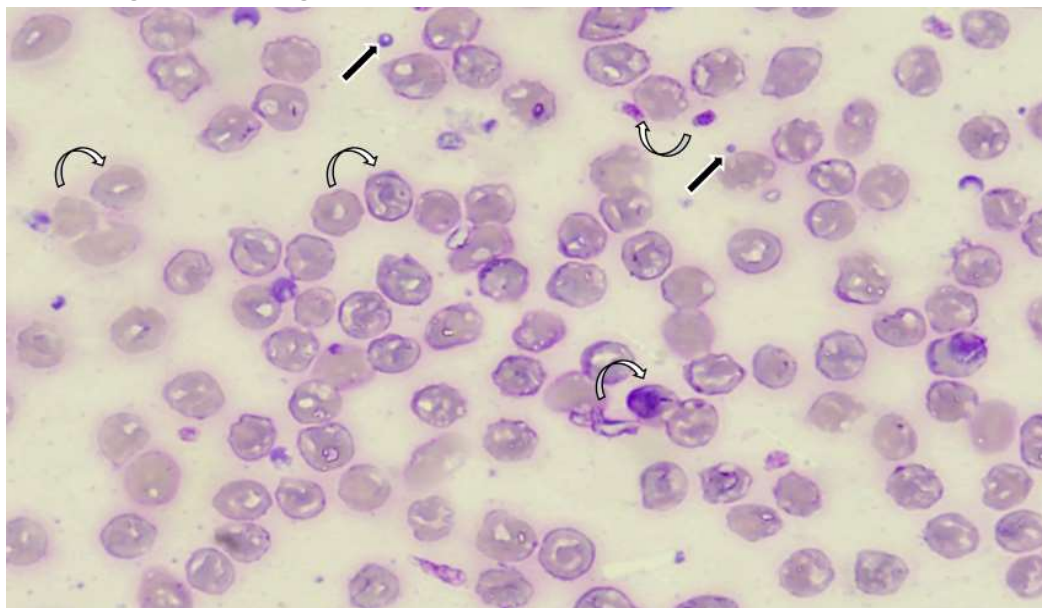
Figura 13 - Contagem plaquetária dos protocolos testados em Rattus novergicus (linhagem Wistar).



(A) Comparativo das concentrações dos protocolos de PRP com SP.

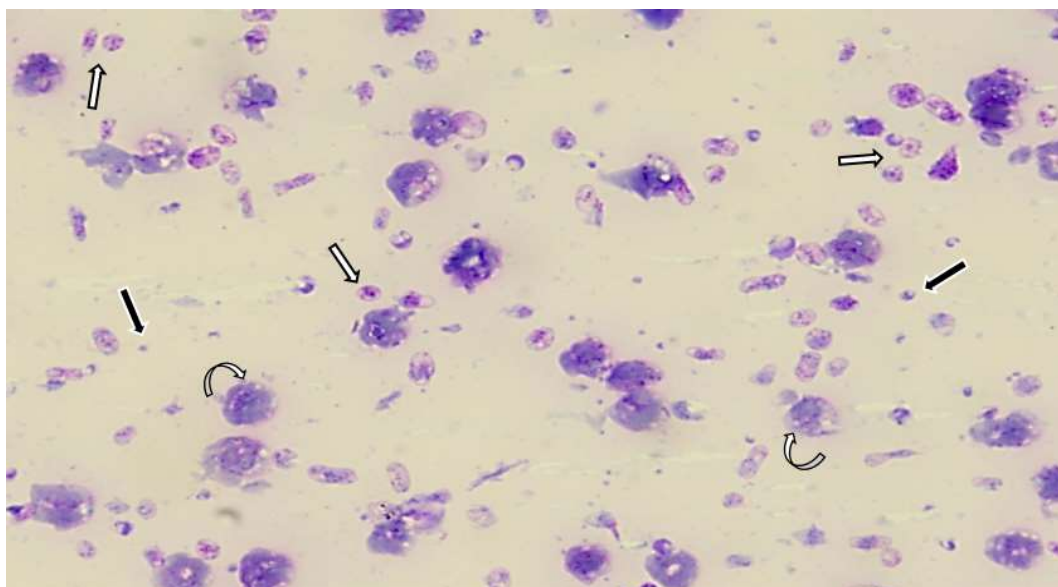
(B) concentração do PRP dos dois protocolos de dupla em relação a uma única centrifugação ($P < 0,0001$). Presença de letras distintas indica as diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Fonte: Pelo autor

Figura 14 - Esfregaço do Sangue Periférico



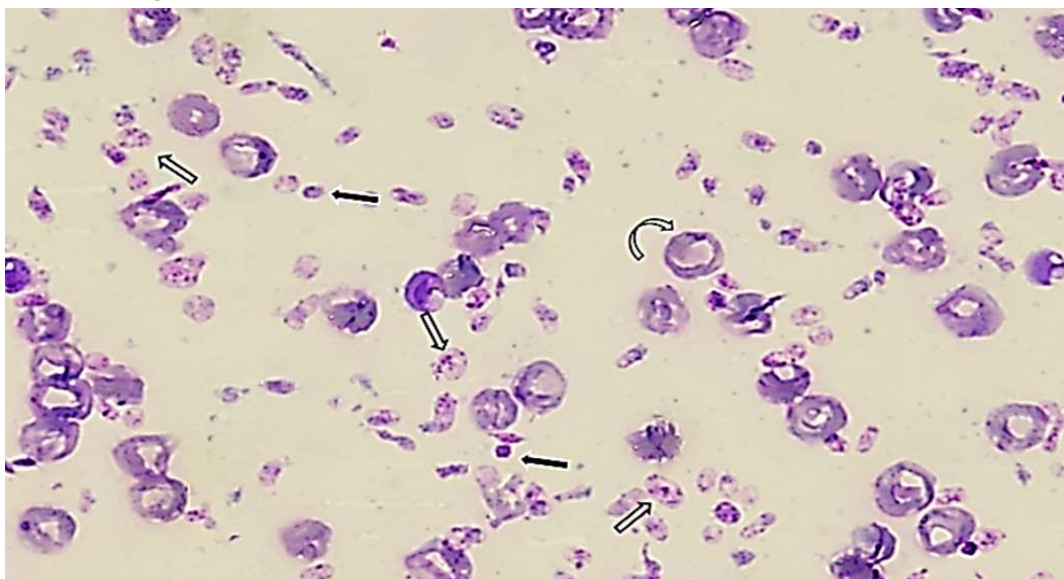
Morfologia plaquetária avaliada com objetiva de imersão em microscópio óptico binocular com aumento de 1000x. Coloração, panótico rápido (Diff-Quick®). Setas pretas: plaquetas em formato discoide. Setas brancas curvadas: leucócitos, leucócitos fragmentados ou hemácias. Fonte: Pelo autor.

Figura 15 - Esfregaço plasma rico em plaquetas amostra do protocolo P1



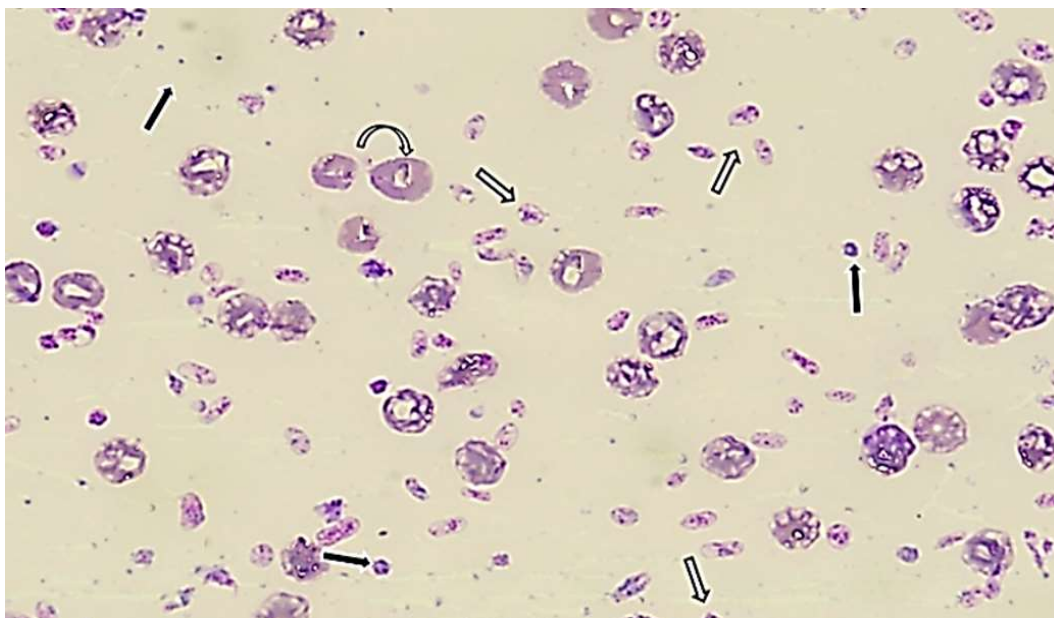
Morfologia plaquetária avaliada com objetiva de imersão em microscópio óptico binocular (1000x). Coloração, panótico rápido (Diff-Quick®). Setas pretas: plaquetas inertes em formato alongado ou discoide. Setas brancas retas: plaquetas ativadas, com presença de pseudópodes e grânulos corados em rosa. Seta curvada branca: incursão celular. Fonte: Pelo autor

Figura 16 - Esfregaço plasma rico em plaquetas amostra do protocolo P2



Morfologia plaquetária avaliada com objetiva de imersão em microscópio óptico binocular (1000x). Coloração, panótico rápido (Diff-Quick®). Setas pretas: plaquetas inertes em formato alongado ou discoide. Setas brancas retas: plaquetas ativadas, com presença de pseudópodes e grânulos corados em rosa. Seta curvada branca: incursão celular. Fonte: Pelo autor

Figura 17 - Esfregaço plasma rico em plaquetas amostra do protocolo P3



Morfologia plaquetária avaliada com objetiva de imersão em microscópio óptico binocular (1000x). Coloração, panótico rápido (Diff-Quick®). Setas pretas: plaquetas inertes em formato alongado ou discoide. Setas brancas retas: plaquetas ativadas, com presença de pseudópodes e grânulos corados em rosa. Seta curvada branca: incursão celular. Fonte: Pelo autor

5. DISCUSSÃO

Os valores hematológicos observados nos ratos Wistar machos apresentam-se mais elevados quanto a quantificação de hemácias em relação às fêmeas, mas não apresentam diferenças quantitativas entre as plaquetas (DINIZ, et al. 2006). Desta forma torna-se necessário estipular em estudo a identidade do gênero (macho, fêmea) para uma melhor avaliação da incursão de eritrócitos em PRP.

Os PRPs P1, P2 e P3 advém de animais que possuem volume sanguíneo entre 6% a 8% do seu peso corporal (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; LIMA et al., 2014). Portanto, seria inviável coletar entre 6 mL à 20 mL de sangue por pulsão cardíaca ou aspirar 2 mm do *buffy coat* em conjunto com a camada superficial eritrocitária após centrifugações conforme os protocolos de Anitua (1999), Sonleitner et al. (2000) e Vendramin et al. (2006). Desta forma, coletou-se 3,2 mL de sangue dos animais devido à baixa quantidade amostral proporcionada por estes conforme Yazigi et al. (2015).

A obtenção do PRP por centrifuga exige escolha da velocidade, tempo e vezes de centrifugação para se definir o melhor resultado (MARQUES et al., 2014). A tonalidade dos PRPs P2 e P3 de dupla centrifugação apresentaram-se em róseo claro enquanto P1 de única centrifugação resultou na cor palha (MARX et al., 1998). O peso e tamanho das plaquetas é o fator determinante para uma concentração ótima de PRP em cada espécie (LÓPEZ et al., 2012).

A contagem plaquetária do sangue periférico dos ratos Wistar apresentou-se dentro dos valores de referência normais para a espécie de 638 à $1.177 \times 10^3 \mu\text{L}$ (LIMA et al., 2014). Os três protocolos de PRP concentraram plaquetas em comparação ao dado referencial. Os protocolos P2 e P3 apresentaram valores superiores preconizados por Marx et al. (1998) e Jadhav et al. (2012) que demonstraram efetividade do PRP quando a concentração plaquetária está acima de 338%. Embora P3 tenha permitido um acréscimo de 266.071 plaquetas em comparação a P2, os achados permitem classificar ambos os protocolos com boa qualidade para concentração plaquetária acima de 338% (figura 12, 13; tabela 5). Por outro lado, P1 demonstrou 207% de concentração plaquetária. Provavelmente o insucesso está ligado a uma única centrifugação (MARX, 2004). Em uma dupla centrifugação, como em P2 e P3 as amostras passaram por duas etapas *soft* e *hard spin*, diferente de P1 que passou apenas por uma etapa *soft spin*. A

primeira etapa de centrifugação é conhecida como *soft spin*, um giro suave separando eritrócitos, leucócitos, plaquetas e a segunda *hard spin*, uma rotação mais rápida e robusta com concentração plaquetária, separando-as mais efetivamente dos leucócitos e eritrócitos residuais (DOHAN, et. al., 2006). A literatura esclarece que em geral, o protocolo apresentado com apenas uma etapa de centrifugação não produz um verdadeiro PRP e sim, reduzida concentração plaquetária com PPP (MARX et al., 1998).

Quanto ao tempo de execução, o procedimento em P1 foi finalizado em 10 minutos, mas pela baixo acréscimo plaquetário (figura 13; tabela 5) e maior quantidade de eritrócitos visíveis (figura 15) em comparação a P2 e P3 descartamos a viabilidade de P1 para obtenção do PRP de ratos Wistar. A empregabilidade da força G deve separar efetivamente plaquetas de hemácias além de proporcionar uma boa concentração plaquetária (MARX, 2004). Por outro lado, P3 foi realizado em aproximadamente 25 minutos e P2 em torno de 40 minutos. Sabendo-se a importância do tempo para pesquisa científica, P3 seria o melhor indicado em comparação a P2.

Em um organismo, as plaquetas podem ser ativadas em resposta ao sistema imune adaptativa ou em sítios inflamatórios (WEISS et al., 2010). A ativação plaquetária pode ser realizada por muitos mecanismos, e. g., na conversão do tromboxano A₂ (TXA₂), por passagem independente da via do AA, pela trombina, colágeno, por ativadores plaquetários que elevam rapidamente o Ca⁺² livre que auxilia na liberação das substâncias dos grânulos ou, pela força G empregada durante processo de centrifugação (WEISS et al., 2010; CHEN; ZHANG; WU, 2010). A força G pode ativar prematuramente as plaquetas com extrusão dos FCs resultando em PRP terapeuticamente inativo (WEISS et al., 2010). A plenitude plaquetária pós centrifugação deve ser mantida durante a exocitose onde estará completando a estrutura terciária das proteínas dos FCs (YAZIGI et al., 2015). Neste contexto, estudos sugerem que as plaquetas tornem-se ativadas próximo ao instante da execução terapêutica, antes da primeira hora, para se garantir uma concentração apropriada dos FCs no local da lesão, pois após o tempo determinado, 70% a 100% dos fatores serão liberados (MARX, 2001; MAIA, 2009). No entanto, a eficácia terapêutica dos PRPs podem estar no tempo de vida das plaquetas. De fato, os FCs são disponibilizados 10 minutos após a ativação plaquetária com 95% pré-sintetizados e, em uma hora, todos já passaram pela extrusão. Porém as plaquetas

continuarão a sintetizar e liberar fatores proteicos adicionais durante 5 a 10 dias, *i. e.*, até sua apoptose (SALDALAMACCHIA, 2004). A força G deve ser adequada para não provocar a destruição das plaquetas, assim como, outros fatores devem ser observados para não inviabilizar a preparação do PRP como, descomedida pipetagem durante a aspiração do *buffy coat*, gotejamentos incorretos sob a lâmina, pressão exagerada durante a preparação do esfregaço, anticoagulantes errôneos e a hiperatividade das plaquetária durante a colheita do sangue periférico em razão da demora ou de técnica incorreta de venopunção aplicada no animal (BARRIENTOS; STOJADINOVIC; GOLINKO, 2008; STOCKHAM; SCOTT, 2011; RODAK; FRITSMAN; KEAOHANE, 2012).

O uso incorreto de anticoagulante, pode levar à modificação morfológica plaquetária tal qual como eleva a ativação e extrusão dos FCs no PRP (CASTRO, et al., 2006). O EDTA interfere na estrutura terciária das plaquetas (STOCKHAM; SCOTT, 2011), provoca ativação plaquetária por meio de autoanticorpos plasmáticos (IgG, IgM, IgA) (VIEIRA et al., 2010) e induz a aglutinação por diminuir os níveis de Ca^{+2} na amostra promovendo ativação da glicoproteína GPIIb/IIIa alterando desta forma, a morfologia plaquetária (MORENO; MENKE, 2002). Por conseguinte, as amostras heparinizadas em PRP causam frequentemente agregação plaquetária (PAVANELLIA; SPITZNERB, 2011). A heparina apresenta alta densidade de carga negativa ligando-se diretamente à plaqueta, que por sua vez, possui alta densidade de carga positiva resultando em agregação (FRANCHINI, 2005). Significativa importância fisiológica é denotada na ligação do FvW com a heparina, apesar do mecanismo desta ligação ainda não estar totalmente elucidado (JOÃO, 2001). Em ambos os casos, quer seja pelo uso de EDTA, quer seja pela heparinização, o PRP poderá não ser viável (LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000).

O CPDA-1 foi escolhido como anticoagulante por preservar a viabilidade plaquetária sem causar danos estruturais aos seus componentes, não permitir proliferação bacteriana nas amostras (VENDRAMIN et al., 2009) e tornar as plaquetas mais comumente arredondadas (SECCHI, 2010; COSTA; SANTOS, 2016). Tubos contendo CPDA-1 fornecem fatores de inibição plaquetária que ajudam reduzir a ativação das plaquetas *in vitro* (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Como o componente básico do CPDA-1 é o citrato de sódio, este reage com o Ca^{+2} livre impedindo a efetivação do

mecanismo de coagulação estabilizando a atividade plaquetária (VIEIRA et al., 2010). Em sua composição, também há adenina e dextrose, que promovem o aumento das reservas nucleotídicas no interior celular e amplificam adenilato, que será utilizado como substrato pelos fragmentos plaquetários (LANDESBURG; ROY; GLICKMAN, 2000, VENDRAMIN et al., 2009).

Optou-se pela plaquetometria manual por câmera de Neubauer pela tendência que os analisadores automáticos hematológicos possuem em superestimar a contagem plaquetária (SEGAL et al., 2005; SILVA et. al., 2007). Os contadores por impedância, *i. e.*, por meio da oposição que um circuito elétrico faz na passagem da corrente quando é submetido a uma tensão têm imperícia em diferenciar eritrócitos de plaquetas assim como, falha em diferenciar detritos celulares dos fragmentos plaquetários resultando em trombocitose quando não há (KNOLL; ROWELL, 1996, SILVA et. al., 2007; STOCKHAM; SCOTT, 2011). O inverso também pode ocorrer, quando o aparelho não distingue hemácias de macroplaquetas ou plaquetas gigantes indicando trombocitopenia (SILVA et. al., 2007).

Quando há atividade excessiva plaquetária, os α -grânulos apresentam-se gigantesco e manchados de vermelho ou rosa forte com o corante panótico rápido (STOCKHAM; SCOTT, 2011) provavelmente liberando os FCs (MURPHY; GARDNER, 1971; CASTRO, et al., 2006; SILVA, 2009; ZANDIM et al., 2012). Morfologicamente, plaquetas não ativadas são vistas na maioria das vezes, na cor púrpura, em formato discoides, ovais ou alongadas (CASTRO et al., 2006; GONÇALVES, 2012; OLIVEIRA et al., 2013) acreditando-se que nesta fase não ocorra liberação dos FCs ou a extrusão é baixíssima (BLOCKMANS; DECKMYN; VERMYLEN, 1995, EVERTS et al., 2006; SILVA, 2007). De acordo com a literatura, tal reação de liberação do conteúdo dos grânulos ocorre sem lise celular, com inalteração da integridade da membrana e baixa extrusão dos FCs (CASTRO; et al. 2006). Neste contexto, foi possível observar alterações morfológicas plaquetárias nos três protocolos testados (Figura 15; Figura 16 e Figura 17) em comparação ao sangue periférico (Figura 14).

Alguns investigadores alegam que a presença de constituintes celulares no PRP, concede agonismo natural melhorando as expectativas da terapêutica humana, parecendo haver analogia positiva entre leucócitos, interleucina-1 (IL-1 β) e o fator de

necrose tumoral (TNF- α) na evolução infecciosa e/ou alérgica (MARQUES, et al., 2014). Por outro lado, outros pesquisadores definem as linhagens leucocitárias e eritrócitos como contaminantes em amostras de PRP (MARX et al., 1998). Deveras, nosso estudo preconiza a alta concentração plaquetária em PRP de *Rattus novergicus* como modelo animal e boa visualização morfológica plaquetária dos estágios conformacionais, com o mínimo de eritrócitos possíveis. Desta forma, acreditamos ser mais viável um protocolo que apresente alta concentração plaquetária, menor índice de incursão celular das séries sanguíneas, adicionando-se técnica simples, rápida e com uso de materiais corriqueiros (YAZIGI et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

O protocolo P3 apresentou alta concentração plaquetária (549% em relação ao sangue periférico) e boa visualização morfologia das plaquetas mediante procedimento acessível com equipamentos laboratoriais habituais e por meio de dupla centrifugação. Desta forma, proporciona-se protocolo padronizado para obtenção de PRP de *Rattus novergicus* (Wistar).

REFERÊNCIAS

- ABILDGAARD, C. F.; SUZUKI, Z.; HARRISON, J.; JEFcoat, K.; ZIMMERMAN, T. S. Serial Studies in von Willebrand's Disease: Variability Versus "Variants". **Journal Blood**; 56 (4): 712-716; 1980.
- AGUIRRE, A.; ARBILDO, H.; PERALTA, J. Comparative performance of the protocol of plasma rich in growth factors - universal 1 (PRGF-U1) for obtaining platelet rich plasma. **Journal Of Oral Research**, 16-18. Doi: 10.17126, 2017.
- AHMED, M.; REFFAT, S. A.; HASSAN, A.; ESKANDER, F. Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Clean Diabetic Foot Ulce. **Journal Annals of Vascular Surgery**. Vol 38, Pág. 206-211; Doi: 10.1016, 2016.
- ALMEIDA, M. T. S. C. Caracterização Avançada de Materiais Preparação de amostras para análise por MEV. **Workshop**, 12 de Julho, 2011.
- ALVAREZ, R. H.; KANTARJIAN, H. M.; CORTES, J. E. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. **Journal Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 9, p. 1241-1257, 2006.
- ANDRADE; P. B.; BORGES, L. S. R. Antiplatelet Agents in Acute Coronary Syndromes. **International Journal of Cardiovascular Sciences**; 30(5):442-451, 2017.
- ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, p. 529-535, 1999.
- ANTONIADES, H. N. Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 7314, 1981.
- ASSOIAN, R. K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C. A.; MILLER, D. M.; SPORN, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 258, n. 11, p. 7155-7160, 1983
- BANKS, R. E.; FORBES, M. A.; KINSEY, S. E.; STANLEY, A.; INGHAM, E.; WALTERS, C.; SELBY, P. J. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **British Journal of Cancer**, vol. 77, n. 6, p. 956-964, 1998.
- BARBALHO, S. M.; BECHARA, M. D.; QUESADA, K.; GABALDI, M. R.; GOULART, R. A.; TOFANO, R. J.; GASPARINI, R. G. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: tríade indissociável? **Jornal Vascular Brasileiro**; Doi: org/10.1590/1677-5449.04315 14(4):319-327; 2015.

BARBIERI, O. C. M.; RAMALHO, L. T. O.; COSTA, I. P. Efeito do fator de crescimento derivado de plaquetas humanas (pdgf) sobre o processo de regeneração óssea em tíbias de ratos (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área Imunologia). **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. 97 f., 2006

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S., BREM, H., CANIC, M. T. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen Journal**, vol. 16, p. 585-601, 2008

BAKER, D. C. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Roca, p. 172-173, 2007.

BAUER, E. A.; COOPER, T. W.; HUANG, J. S.; ALTMAN, J.; DEUEL, T. F. Stimulation of *in vitro* human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 82, p. 4132-4136, 1985.

BERGSTROM, J.; LINDHOLM, B. Malnutrition, cardiac disease, and mortality: an integrated point of view. **American Journal of Kidney Diseases**; 32(5):834-41, 1998.

BERNARDI, P. S. M.; MOREIRA, H. W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 26(4), 239-244, Doi: org/10.1590/S1516-84842004000400003, 2004.

BITHELL, T. C. A fisiologia da hemostasia primária. **Revista Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998a. v. 1, cap. 18, p.587-614

BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet actuation. **Blood Reviews**, 9(3), 143–156. Doi: 10.1016/0268-960x(95)90020-9, 1995.

BOILARD, E.; NIGROVIC, P. A.; LARABEE, K.; WATTS, G. F.; COBLYN, J. S.; WEINBLATT, M. E. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. **Journal Science**. 327(5965):580-3, 2010.

BORGES, M. D.; AGUILLERA, A. H.; BRILHANTE, J. J.; CAIXETA A. Achados de microscopia eletrônica de varredura de trombo em enxerto de veia safena em paciente com infarto agudo do miocárdio. *Journal Einstein*; 11(3):398-9, 2013.

BROWN, G. L.; CURTSINGER, L.; BRIGHTWELL, J. R.; ACKERMAN, D. M.; TOBIN, G. R.; POLK, H. C.; GEORGE-NASCIMENTO, C.; VALENZUELA, P.; SCHULTZ, G. S. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. **The Journal of experimental medicine**, 163 (5), 1319-24, 1986.

BRUNNER, G.; NGUYEN, H.; GABRILOVE, J.; RIFKIN, D. B.; WILSON, E. L. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. **Magazine Blood**, vol. 81, n. 3, p. 631–638, 1993

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, Arquivos Brasileiros**, São Paulo, vol. 20, n.1, 2018.

Canadian Council on Animal Care (CCAC) - Guide to the Care and Use of Experimental Animals. **Conseil canadien de protection des animaux**, Vol. 1, 2nd Edition, ISBN: 0-919087-18-3, 1993.

CANALIS, E.; MCCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. **Annual Review of Medicine**, v. 42, p. 17-24, 1989.

CARVALHO, A. C. C.; SOUSA, J. M. A. Cardiopatia isquêmica. **Revista Brasileira de Hipertensão** 8: 297-305, 2001.

CARVALHO, A. C. A.; PEREIRA, E. S. C.; COSTA C.; BARRETO I. C.; MADUREIRA, L. C.; PAIM, F. R. Bioengineered tissue regenerative strategies and ethical aspects. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. ISSN 1677-5090, 2010.

CASTILLO, T. N.; POULIOT, M. A.; KIM, H. J.; DRAGOO, J. L. Comparison of Growth Factor and Platelet Concentration From Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems. **American Journal of Sports Medicine**. 2011 Feb; 39 (2): 266-71. Doi: 10.1177/ 0363546510387517, 2010

CASTRO, C. H.; FERREIRA, B. L. A.; NAGASHIMA, T.; SCHUELER, A.; RUEFF, C.; CAMISASCA; SCOVINO, G.; BORGES, G.; LEAL, L.; FILGUEIRA, M.; PASCHOAL, M.; BOURGUINHON, P. B. V.; RODRIGUES, S.; RANGEL, C.; OLIVEIRA, S. D. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CATTANEO, M. Is hyperhomocysteinemia an important risk factor of cardiovascular disease? **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis** 33(5-6):345-7. Doi: 10.1159/000083826, 2003.

CHEN, F.-M.; ZHANG, M.; WU, Z. F. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. **Jornual Biomaterials**, v. 31, p. 6279-6308, 2010.

CHEN, R.; JIN, G.; LI, W.; MCINTYRE, T. M. Epidermal Growth Factor (EGF) Autocrine Activation of Human Platelets Promotes EGF Receptor-Dependent Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion, Migration, and Epithelial Mesenchymal Transition. **Journal Acta pathologica, microbiologica, immunologica**, 201(7):2154-2164, Doi: 10.4049/1800124, 2108.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, vol. 28, p 11-23, 2007

COCCO, R. Metabolismo das plaquetas. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, **Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 7 p, 2016.

COHEN, S. Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal. **The Journal of Biological Chemistry**, 237: 1555-1562; 1962.

COLLER, B. S.; ITALIANO, J. J. E.; SMYTH, S. S.; WHITEHEART, S. Platelet morphology, biochemistry and function. **Book Williams Hematology**. Ed. 8. The McGraw-Hills Companies, Inc. 2010.

CONCEIÇÃO, M. L.; ALVARENGA, M. L.; SOUZA, J. B.; MATTOS, L. H. L.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, M. J.; HUSSNI, C. A.; ALVES A. L. G. Plasma rico em plaquetas: estudo comparativo entre a dupla centrifugação e o filtro E-PET (Equine Platelet Enhancement Therapy). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Vol.37, n.3, pp.215-220; ISSN 0100-736X, 2017

COSTA, P. A.; SANTOS, P. Platelet-rich plasma: a review of its therapeutic use. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Doi: 10.21877/2448-3877.201600177; 2016

DEMIR, B.; DEMIRALP, B.; GÜNCÜ, G. N.; UYANIK, M. O.; CAĞLAYAN, F. Intentional replantation of a hopeless tooth with the combination of platelet rich plasma, bioactive glass graft material and non-resorbable membrane: a case report. **Journal Dental Traumatology**. v. 23, n. 3, p. 190-194, 2007.

DENIS, M. M.; TOLLEY, N. D.; BUNTING, M.; SCHWERTZ, H.; JIANG, H.; LINDEMANN, S. Escaping the nuclear confines: signal-dependent premRNA splicing in anucleate platelets. **Magazine Cell**. 122(3):379-91; 2005.

DeROSSI, R. L.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S.; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, G. G.; BRUM, K. B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirurgica Brasileira**, 24(4), 276-281. Doi.org/10.1590/S0102-86502009000400006; 2009.

DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; AGUIAR, F. B.; TOSCANO, M. G.; RIBEIRO, E. A. N. Haematological and Biochemical Parameter Standardization of Swiss Mice and Wistar Rats. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 171-176ISSN 1415-2177, 2006.

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 Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, 101: E37-44, 2006.

DUGRILLON, A.; EICHLER, H.; KERN, S. et al. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 31, p. 615-619, 2002.

DUSSE, L. M. S. A.; MACEDO, A. P.; BATSCHAUER, A. P.; CARVALHO, M. G. Plasma rico em plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia. **Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)**, v. 40, n.3, p.193-197, 2008.

EHRENFEST, D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). PMID: 19187989. **Trends in Biotechnology Publishes**. 2009 Mar;27(3):158-67. Doi: 0.1016/j.tibtech.2008.11.009, 2009

EPPLEY, B. L.; WOODILL, J. E.; HIGGINS, J. B. S. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. **American Society of Plastic Surgeons**; Vol.114, pp 1502-1508. 2004

EVERTS, P. A.; KNAPE, J. T.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J. P.; HOFFMANN, J.; OVERDEVEST, P. E.; CAIXA, H. Á.; VAN ZUNDERT, A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. **The Journal of the American Society of Extra-Corporeal Technology**. v. 38, p. 174-187. PMID: 16921694, 2006.

FALCÃO, F. J. A.; CARVALHO, L.; CHAN, M.; ALVES, C. M. R.; CARVALHO, A. C. C.; CAIXETA, A. M. Receptores plaquetários P2Y₁₂: importância na intervenção coronariana percutânea. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 101(3), 277-282. Epub, 2013.

FÁTIMA, L. A.; PAPA, P. C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**. ISSN 1984-5154, Doi: 10.7594/revbio; 2010.

FERRARI, M.; ZIA, S.; VALBONESI, M.; HENRIQUET, F.; VENERE, G.; SPAGNOLO, S.; GRASSO, M. A.; PANZANI, I. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. **Journal of Artificial Organs**. Jan;10(1):47-50. PMID:3570542,1987.

FERREIRA, V. B. C.; BOMFIM, M. R. S.; ANDRADE, L. A. Protocolo Para Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas de Cães. Tese (Mestrado em Ciência Animal - Fisiopatologia Médica e Cirúrgica). **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba. 52 f., 2012.

FORTIER, L. A.; BARKER, J. U.; STRAUSS, E. J.; McCARREL, T. M.; COLE, B. J. The role of growth factors in cartilage repair. **Journal Clinical Orthopaedics and Related Research**, vol. 489, n.10, p. 2706-2715, 2011.

FREDRIKSSON, L.; ERIKSSON, H. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoformas. **Journal Science Direct**, vol. 15, Pages 197-204, Doi: 10.1016/j.cytogfr; 2004.

FRIESEL, R. E.; MACIAG, T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. **The FASEB Journal**. 9:919–25; 1995.

FUCHS, A. M. M. C.; ALMEIDA, D. D.; FIALHO, F. P.; PERIM, G. C.; RUSTUM, M. D. Intrastent Thrombosis and Clopidogrel Resistance in Diabetic Patients. *Revista Brasileira de Cardiologia*; 26(1):58-61, 2013.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. Nov 27;288 (5789):373-6.45,1980.

FURCHGOTT, R. F.; CARVALHO, M. H.; KHAN, M. T.; MATSUNAGA, K. Evidence for endothelium dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. **Blood Vessels**, 24(3):145-9, 1987.

GACHET, C.; CATTANEO, M.; OHLMANN, P.; HECHLER, B.; LECCHI, A.; CHEVALIER, J.; CASSEL, D.; MANNUCCI, P. M.; CAZENAVE, J. P. Purinoceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. **British Journal of Haematology**, Doi: org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05319, 1995.

GIEMSA: corante. Doles Reagentes e Equipamento para Laboratórios Ltda. CNPJ: 01.085.513/0001-05. Rodovia BR 153, Km 493, Lt.07 Chácara Retiro, Conjunto Palmares. CEP: 74775-027 Goiânia/ GO/ Brasil. Disponível em: <<http://www.doles.com.br/produtos/instrucoes/GIEMSA.pdf>> Acesso em: 18 junho 2019.

GODEAU, B.; PROVAN, D.; BUSSE, J. Immune thrombocytopenic purpura in adults. **Current Opinion in Hematology - Journals**, 14:535-56, 2007.

GONÇALVES, M. C. “Long-lasting effect of nitric oxide on platelet aggregation”. 99 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2012.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Patologia clínica veterinária: texto introdutório. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 342 p. CDD 636.089607, 2008.

HAGBERG, C. E.; FALKEVALL, A.; WANG, X.; LARSSON, E.; HUUSKO, J.; NILSSON, I.; VAN MEETEREN, L. A.; SAMEN, E.; LU, L.; VANWILDEMEERSCH, M.; KLAR, J.; GENOVE, G.; PIETRAS, K.; STONE-ELANDER, S.; CLAEISSON-WELSH, L.; YIA-HERTTUALA, S.; LINDAHL, P.; ERIKSSON, U. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. **Nature**, 464: 917-921, 2010

HEBA, I.; GAWDAT, A. M.; TAWDY, R. A.; HEGAZY, M. M.; ZAKARIA, R.; ALLAM, S. Autologous platelet-rich plasma versus readymade growth factors in skin rejuvenation: A split face study. **Journal of Cosmetic Dermatology** 16:2, pages 258-264, 2017.

HELDIN, C. H.; WESTERMARK, M. Mechanisms of action an *in vivo* role of platelet-derived growth factor. **Physiological Reviews**. 79:1283–1316; 1999.

HOELZ, L. V. B.; FREITAS, G. B. L.; TORRES, P. H. M.; FERNANDES, T. V. A., ALBUQUERQUE, M. G.; SILVA, J. F. M.; PASCUTTI, P. G; ALENCASTRO; R. B. G-protein coupled receptors. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n. 5; Doi: 10.5935/1984-6835.20130071; 2013.

HOURLANI, S. M.; HALL, D. A. Receptors for ADP on human blood platelets. Apr;15(4):103-8. Doi: 10.1016/0165-6147(94)90045-0, 1994

HOM, D. B.; MAISEL, R. H. Angiogenic growth factors: Their effects and potential in soft tissue wound healing. **Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology**, 101:349–54, 1992.

HUANG, T. Y.; LIN, Y. H.; CHANG, H. A.; YEH, T. Y.; CHANG, Y. H.; CHEN, Y. F.; CHEN, Y. C.; LI, C. C.; CHIU, W. T. STIM1 Knockout Enhances PDGF-Mediated Ca²⁺ Signaling through Upregulation of the PDGFR-PLCγ-STIM2 Cascade. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(6), 1799. Doi: 10.3390/ijms19061799; 2018.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 84(24):9265-9, 1987.

ITALIANO J. J. E.; LECINE, P.; SHIVDASANI, R. A.; HARTWIG, J.H. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. **The Journal of Cell Biology**. v. 147, n. 6, p. 1299-1312, 1999

JAIN, N. C. The platelets. In: JAIN, N. C. **Book Essentials of Veterinary Hematology**. 1^a ed. Malvern, Pennsylvania: Lea & Febiger, p 105-132. 1993

JADHAV, G.; SHAH, N.; LOGANI, A. Revascularization with and without platelet-rich plasma in nonvital, immature, anterior teeth: a pilot clinical study. **Journal Endodontics** Dec; 38(12):1581-7, 2012.

JOÃO, C. Artigo de Revisão: Doença de von Willebrand. **Revista Medicina Interna**. Vol. 8, N. 1, 2001.

KAJIHARA, M.; OKAZAKI, Y.; KATO, S.; ISHII, H.; KAWAKAMI, Y.; IKEDA, Y.; KUWANA M. Evaluation of platelet kinetics in patient with liver cirrhosis: similarity to idiopathic thrombocytopenia púrpura. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**; v 22, p 112-118, 2007.

KANAYAMA, R. H. Agregação plaquetária: manual de procedimento técnico ALABO. PR. TE. 008. **Hospital Israelita Albert Einstein**, São Paulo, 5 p., 2003.

KAPLAN, D. R.; CHAO, F. C.; STILES, C. D.; ANTONIADES, H. N.; SCHER, C. D. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. **Magazine Blood**, vol. 53, n. 6, p. 1043–1052, 1979

KAREY, K. P.; SIRBASKU, D. A. Human platelet-derived mitogens. II. Subcellular localization of insulinlike growth factor I to the alpha-granule and release in response to thrombin. **Magazine Blood**, v. 74, n. 03, p. 1093–1100, 1989

KATAOKA, K.; AKAIKE, T.; SAKURAI, Y.; TSURUTA, T. Effect of Charge and Molecular Structure of Polyion Complexes on the Morphology of Adherent Blood Platelets. **Journal Macromolecular Chemistry**, 179, 1121-1124, 1978.

KECELI, H. G.; SENGUN, D.; BERBEROGLU, A.; KARABULUT, E. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: a randomized-controlled trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, p. 255-262, 2008.

KEVY, S. V.; JACOBSON, M. S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. **The Journal of Extra-corporeal Technology**, 36:28-35. PMID: 15095838, 2004.

KNOLL, J. S.; ROWELL, S. Clinical hematology in clinic analysis, quality control, reference values and system selection. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.26, n.5, p.981-1002, 1996.

KON, E.; FILARDO, G.; DELCOGLIANO, M.; PRESTI, M. L.; RUSSO, U. M.; BONDI, A.; DI MARTINO, U. M.; CENACCHI, U. M.; FORNASARI, P. M.; MARCACCI, M. Platelet-rich plasma: New clinical application. A pilot study for treatment of jumper's knee. **Injury**; 40(6):598-603, 2009

KRETTLI, W. S. C.; MOTA, B. C.; ANDRADE G. H. A.; GONTIJO, J.; SILVA, J. S.; LOPES, J. H. M.; LAFETÁ, L.; BRANDÃO, L. I.; ALVES, L.; SILVA, R. P. Púrpura trombocitopênica idiopática: etiopatogênese, diagnóstico e tratamento em adultos. **Revista Médica Minas Gerais**, 21 (04 Supl 6): S1-S143; 2011.

KUSHIDA, S.; KAKUDO, N.; MORIMOTO, N.; HARA, T.; OGAWA, T.; MITSUI, T.; KUSUMOTO, K. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. **Journal of Artificial Organs**. Vol. 17, Pages 186-192. Doi: org/10.1007/s10047-014-0761-5, 2014

LACOSTE, E.; MARTINEAU, I. Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. **Journal Periodontol**, 74:1498–507, 2003.

LANDESBERG, R.; ROY, M.; GLICKMAN, R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**; Vol. 58, Issue 3; Pages 297-300, 2000.

LANDI, E. P.; MARQUES J. J. F. C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 25, n. 1, p. 39-46, Mar. 2003

LENHARO, A.; COSSO, F.; MAGALHÃES, D.; PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento – **Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica**. 1ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda. p. 59-64, 165-185, 2004.

LIAO, J. K.; BETTMANN, M. A.; SANDOR, T.; TUCKER, J. I.; COLEMAN, S. M.; CREAGER, M. A. Differential impairment of vasodilator responsiveness of peripheral resistance and conduit vessels in humans with atherosclerosis. **Circulation Research**, 68(4):1027-34; 1991.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S.; SERAFINI, M. R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, vol. 10, num. 03. ISS: 034601; 2014.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 84-A, n. 6, p. 1032-1044, 2002.

LINS, C. F. A Aplicação de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em Lesões Musculoesqueléticas – Revisão de Literatura. **Rev. News: Artigos Cetrus**; ano VI, ed. 57, jul., 2014.

LÓPEZ, C.; GIRALDO, C. E.; CARMONA, J. U. Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: Estudio celular. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, 44:109-115, 2012.

LÖSCHE, W.; REDLICH, H.; KRAUSE, S.; HEPTINSTALL, S.; SPANGENBERG, P. Activation of leukocytes in whole blood samples by N-formyl-methionyl-leucyl-

phenylalanine (FMLP) enhances platelet aggregability but not platelet P-selectin exposure and adhesion to leukocytes. **Journal Platelets**, 9(3-4):219-21, Doi: 10.1080/09537109876726, 1998.

LUCARELLI, E.; FINI, M.; BECCHERONI, A. GIAVARESI, G.; DI BELLA, C.; ALDI, N. N.; DONATI, D. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. **Journal Clinical Ortop Relat**, n. 435, p.62-68, 2005.

MAIA, L.; SOUZA, M. V.; ALVES, G. E. S.; RIBEIRO, J. J. I.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, Y. F. R. S.; ZANDIM, B. M. Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite induzida em equinos: avaliação ultra-sonográfica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(3):241-245, 2009.

MAIA, L.; SOUZA, M. V. Componentes ricos em plaquetas na reparação de afecções tendo-ligamentosas e osteo-articulares em animais. **Revista Ciência Rural**, v. 39, n.04, p. 1279-1286, 2009.

MACEY, M.; AZAM, U.; MCCARTHY, D.; WEBB, L.; CHAPMAN, E. S.; OKRONGLY, D.; ZELMANOVIC, D.; NEWLAND, A. Evaluation of the Anticoagulants EDTA and Citrate, Theophylline, Adenosine, and Dipyridamole (CTAD) for Assessing Platelet Activation on the ADVIA 120 Hematology System. **Journal Hematology Clinical Chemistry** 48:6, 48, No. 6, 2002.

MACHADO, L. L. C. Modificação do método de Wright para coloração de esfregaços sanguíneos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 33: 41-43, 1973

MAHALUÇA, F. A. Estatística aplicada. **Statistic and MSc in Health Sciences**, vol.: 02, 2016.

MARQUES, C. P. M.; LEITE, T. S. E. Cuidados nos pacientes com hemofilia e doença de von Willebrand na cirurgia eletiva otorrinolaringológica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringo**; l.V.69, n.1, 40-6, 2003.

MARQUES, A. P. L.; BOTTEON, R. C. C. M.; CORDEIRO, M. D.; MACHADO, C. H.; BOTTEON, P. T. L.; BARROS, J. P. N.; SPÍNDOLA, B. F. Padronização de técnica manual para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(Supl.1):1-6, Doi: 10.1590/S0100-736X2014001300001, 2014.

MARLOVITS, S.; MOUSAVI, M.; GÄBLER, C.; ERDÖS, J.; VÉCSEI, V. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. **European Spine Journal**, v. 13, p. 102-106, 2004.

MARTIN, P.; HOPKINSON-WOOLLEY, J.; MCCLUSKY, J. Growth factors and cutaneous wound repair. **Progress in Growth Factor Research**, 4:25-44; 1992.

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

MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Journal Implant Dentistry**, v.10, n. 4, p.225-228, 2001.

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

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R. ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*, vol. 8, nº 4, PMID: 049903-1, 2012.

MCKENZIE S. B.; WILLIAMS, L. Clinical Laboratory Hematology. **Book Publisher Pearson Education**; 03 edition; Boston, United States. ISBN13 9780133076011; 2014.

MEHTA, S.; WATSON, J. T. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. **Journal of Orthopaedic and Trauma**; v. 22, n. 06, p. 433-438, 2008.

MISHRA, A.; PAVELKO, T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. **American Journal of Sports Medicine**; 34:1774–1778. PMID: 16735582, 2006

MISHRA, A.; TUMMALA, P.; KING, A.; LEE, B.; KRAUS, M.; TSE, V.; JACOBS, A. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. **Journal Tissue Engineering**, v. 15, n. 3, p. 431-435, 2009.

MONTEIRO, B. S.; DEL, C.; JUNQUEIRA, R.; ARGÔLO, N.; MARTINS, N.; BONFÁ, L. P.; VARGAS, V. M.; NEVES, C.D.; CARVALHO, P. H.; & BRITO, A. F. S. Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos. **Revista Ciência Rural**, 1590-1596, 2010

MORENO, A.; MENKE, D. Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. **Clinics in Laboratory Medicine**, 22(1), 193–213. Doi: 10.1016/s0272-2712(03)00072-6, 2002.

MURPHY, S.; GARDNER, F. H. Maintenance of platelet viability and functional integrity during storage, **Vox Sang**, 20(5):427-8, 1971.

MUSTARD, J. F.; PACKHAM, M. A. Factors influencing platelet function — adhesion, release and aggregation. **Journal Pharmacol**, 22(3): 97-187, 1970.

NIN, J. R.; GASQUE, G. M.; AZCARATE, A. V.; BEOLA, J. D.; GONZALEZ, M. H. Has platelet-rich plasma any role in anterior cruciate ligament allograft healing? **Journal Artroscopia**. nov; 25 (11): 1206-13, 2009

NIKIL, K. J.; GULATI, M. Platelet-rich plasma: a healing virtuoso. **Blood research**, vol. 51, 1: 3-5, 2016

NUNES, J. F.; SOARES, J. O.; ALVES, M. A. P. Micro-buffy coats of whole blood: a method for the electron microscopic study of mononuclear cells. **Stain Technology**, sep;54(5):257-60,1979.

OBARRIO, J. J.; ARAÚZ-DUTARI, J. I.; CHAMBERLAIN, T. M.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.20, n.5, p.487-497, 2000.

OLIVEIRA, I.; GIRÃO, M. J. B.; MISAKO, C.; SAMPAIO, U.; OLIVA, M. L. V.; ANDRADE, S. S. Plaquetas: Papéis tradicionais e não tradicionais na hemostasia, na inflamação e no câncer. **ABCS Health Sciences Journal**, 38(3):153-161. Doi: 10.7322/abcshs.v38i3.21, 2013.

PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. **Burns Journal- Elsevier**, v. 36, p. 4-8, 2010.

PALMER, L. C.; BRIGGS, S.; MCFADDEN, G.; ZINI, J.; BURTHEM, G.; ROZENBERG, M.; PROYTCHIEVA, S.; MACHIN, J. "ICSH Recommendations for the Standardization of Nomenclature and Grading of Peripheral Blood Cell Morphological Features." **International Journal of Laboratory Hematology** 37, no. 3, Doi: 10.1111/ijlh.12327, 2015

PANÓTICO: corante Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. CNPJ: 76.619.113/0001-31. Rua Cassemiro de Abreu, 521. CEP. 83.321-210 Pinhais/PR/ Brasil Disponível em: <<http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/>> Acesso em: 18 junho 2019

PARK, J. J.; SIDENTOP, K. H.; CHUNG, S.; SANCHEZ, B.; BHATTACHARYYA, T. Comparison of the bonding power of various autologous fibrin tissue adhesives. **American Journal Otology**, vol. 18, n. 5, p. 655-659, Sept. 1997.

PAZZINI, J. M.; NARDI, A. B.; HUPPES, R. R.; GERING, A. P.; FERREIRA, M. G. P.A.; SILVEIRA, C. P. B.; LUZZI, M. C.; OLIVEIRA, J. A. Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 108-118, 2016.

PEREIRA, R. C. F.; ZACARIAS, G. V. F.; CANTARELLI, C.; CORRÊA, M. M. B.; SILVA, G. B. B.; ANNA, L. T.; BRASS, K. E.; CÔRTE, F. D. L. Avaliação de sete protocolos para obtenção de plasma rico em plaquetas na espécie equina. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, v.43, n.6, p.1122-1127. ISSN 0103-8478, 2013.

PEREZ, A. G. M; SANTANA, M. H. A. Preparação, modulação, encapsulação e liberação controlada de plasma rico em plaquetas para aplicação em terapia regenerativa (Tese de Doutorado), "**Universidade Estadual de Campinas**". Faculdade de Engenharia Química, F. 231, REPOSIP/266597, 2013.

PIERCE, G. F.; MUSTOE, T. A.; ALTROCK, B. W.; DEUEL, T. F.; THOMASON A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. **Journal Cellular Biochemistry**. 45:319–26, 1991.

POCHINI, A. C.; ANTONIOLI, E.; BUCCI, D. Z.; SARDINHA, L. R.; ANDREOLI, C. V.; FERRETTI, M.; EJNISMAN, B.; GOLDBERG, A. C. Análise do perfil de citocinas e fatores de crescimento em plasma rico em plaquetas obtido por meio das metodologias do sistema aberto e colunas. Cohen, M. **Revista Einstein**. PMC5234752; Doi: 10.1590/S1679-45082016AO3548. 2016.

PURI, R. N.; COLMAN, R. W. ADP-induced platelet activation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 32(6):437-502; Doi: 10.3109/10409239709082000, 1997.

RAICA, M; CIMPEAN, A. M. Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. **Journal Pharmaceuticals**. 3: 572–599. Doi: 10.3390/ph3030572; 2010.

RIEDEL, K.; RIEDEL, F.; GOESSLER, U. R.; HOLLE, G.; GERMANN. G.; SAUERBIER, M. Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair (review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 17, p. 183-193, 2006.

RODAK, B. F; FRITSMAN, G. A.; KEAOHANE, E. M. Hematology: Clinical Principles and Applications, **Saunders**, 4th ED., St Louis, 2012.

ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B.; HARKER, L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 71(4):1207–1210. Doi: 10.1073/pnas.71.4.1207, 1974.

ROSS, R. Platelet-derived growth factor. **Annual Review of Medicine**, v. 38, p. 71-79, 1987.

ROSENTHAL, A. R.; HARBURY, C.; EGBERT, P. R.; RUBENSTEIN, E. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Invest Ophthalmol*, 14:872–5, 1975.

SALDALAMACCHIA, G.; LAPICE, E.; CUOMO, V.; DEFEOMEB, L.; D'AGOSTINO, E.; RIVELLESE, A. A.; RICCARDI, G.; VACCARO, O. Uso del gel di piastrine autologo per la cura delle ulcere del piede diabetico. **Giornale Italiano di Diabetologia Metabolismo**, v. 24, p. 103-105, 2004.

SAMPSON, S.; GERHARDT, M.; MANDELBAUM, B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. **Review Musculoskeletal Medicine**, 1:165–174, 2008.

SANCHEZ, M.; ANITUA, E.; AZOFRA, J.; ANDÍA, I.; PADILLA, S.; MUJICA, I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. **American Journal of Sports Medicine**, 35:245–251. 2007

SECCHI, P. **Bioquímica dos conservantes sanguíneos**, 2010. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/conservantes_secchi.pdf> Acessado em 19 junho de 2019.

SCHWEIRGERT, A.; REZENDE, H. F.; FANTONI, D. T.; MOROZ, L. R. Evaluation of platelet count by automatic blood counter QBC Vet Autoread® compared with blood smear estimative and count by hemocytometer. **Revista Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 1001-1008, 2010.

SEIDEL, S. R. T. Correlação entre concentrações plaquetárias e de fator de crescimento TGF- β presente no plasma rico em plaquetas de equinos. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2017.

SEHGAL, S.; STORRIE, B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02698, 2007.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO J. J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 264-274, 2011.

SEOANE, O. A.; MONSREAL, G. C.; CATALÁN, J. M. A.; OBREGÓN, A. D.; ÁNGEL, S. T. Atlas de Hematologia Abbott. Gráfica E.C.S.A. - Abott Lab. México S.A.; vol. 1, Ed. 1. ISSN 1666-7174, 2002

SHARKEY, A. M.; DAY, K.; MCPHERSON, A.; MALIK, S.; LICENCE, D.; SMITH, S. K.; CHARNOCK-JONES, D. S. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 85, 402-409, 2000.

SHIN, H. S.; WOO, H. M.; KANG, B. J. Optimisation of a double-centrifugation method for preparation of canine platelet-rich plasma. **BMC Veterinary Research Journal**. Vol 01. London. ISSN: 1746-6148, 2017.

SIERRA, D. H. S. Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical application. **Journal of Biomaterials Applications**, Vol. 7, issue 4, april, p 309-352; 1993.

SILVA, P. F. N.; BALARIN, M. R. S.; MARUCHI, H. P.; FLAIBAN, K. K. M. C.; MOROZ, L. R. Correlação entre o hemocítômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (H.V.-UEL). **Semina: Ciências Agrárias**, 28(4), 659. Doi:10.5433/1679-0359.2007v28n4p659, 2007.

SILVA, L. L.; D'AMICO, E. A. Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 32(6), 463-468. Doi.org/10.1590/S1516-84842010000600010, 2010.

SILVER, F. H.; WANG M. C.; PINS D. G. Preparation and use of fibrin glue in surgery. **Journal Biomaterials**, 891-9030 1995 16, 1995.

SOARES, J. S.; BRITO, F. C. F.; PENA, F. M.; MESQUITA, E. T.; MEDINA-ACOSTA, E. Pharmacogenetic Aspects Associated with Anti-Platelet Therapy Resistance in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Revista Brasileira de Cardiologia*; 23(2):131-142, 2010.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 15, p. 879-882, 2000.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. Editora Guanabara Koogan, 2ª edição, Rio de Janeiro, 215, 218, 225, 701, 744 p., 2011.

SZACHOWICZ, E. H. Facial bone wound healing. An overview. **Otolaryngologic Clinics of North America**. vol.28, p. 865-880, 1995.

TAKAHASHI, T.; OGASAWARA, T.; ASAWA, Y.; MORI, Y.; UCHINUMA; TAKATO, E.; HOSHI, K. Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. **Tissue Engineering**, vol. 13, p. 1583-1592, 2007.

VANNI, D. S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A. M.; DAHER, J. P. L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**, vol. 43, n3, p.181-189; 2007.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 1, p. 24-28, 2006.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; FRANCO, T.R. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Rev. Bras. Cir. Plástica**. Vol. 24, n 2; 24(2):212-218; 2009.

VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F.; MAIA, L.; QUEIROZ, D. L.; WATANABE, M. J, YAMADA, A. L.; ALVES, A. L. G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 106-110, 2012.

Vidraria de laboratório/ técnica de esfregaço. Disponível em: <<http://www.vidrariadelaboratorio.com.br/tecnica-esfregaco-sanguineo>> Acesso em: 07 de julho de 2019.

VIEIRA, Â.; BARBOSA, R.; MENEZES, F.; MALAGUTTI, W. Y; NOGUEIRA, R. Eficácia do citrato como anticoagulante na hemodiálise veno-venosa contínua com ciclo de 60 horas em unidade de terapia intensiva. **ConScientiae Saúde**, 9 (2): 187-193, 2010

WANG, J. S. Basic fibroblastic growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. ;269:1–33; 1996.

WANG, H.-L.; AVILA, G. Platelet rich plasma: myth or reality? **European Journal of Dentistry**, v. 01, p. 192-193, 2007.

WEICKHARDT, A. J.; WILLIAMS, D. S.; LEE, C. K.; CHIONH, F.; SIMES, J.; MURONE, C.; WILSON, K.; PARRY, M. M.; ASADI, K.; SCOTT, A. M.; PUNT, C. J.; NAGTEGAAL, I. D.; PREÇO, T. J.; MARIADASON, J. M.; TEBBUTT, N. C. Vascular endothelial growth factor D expression is a potential biomarker of bevacizumab benefit in colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, 113, pages37–45, 2015.

WEIBRIC, G; BUCH, R. S.; KLEIS, W. K.; HAFNER, L.; HITZLER, W. E.; WAGNER, W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. **Journal Factor Growth**, London, v.20, n.2, p.93-97, 2002.

WENDLAND, A. E; FARIAS, M. G.; MANFROI, W. C. Volume plaquetário médio e doença cardiovascular. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**. Vol 45; n. 5; p. 371-378; 2009.

WHITE, J. A. Current Concepts of Platelet Structure. **American Society of Clinical Pathologists**. p. 363-378, 1979.

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

WEISS, D. J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology. **Blackwell Publishing**, 6th ed. 1232p. 2010.

WISE, L. M.; INDER, M. K.; REAL, N. C.; STUART, G. S.; FLEMING, S. B.; MERCER, A. A. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by Orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. **Cellular Microbiology**, 14:1376–1390, 2012.

YARDUMIAN, D. A.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. **Journal of Clinical Pathology**, v. 39, p. 701-712, 1986.

YAZIGI, J.; JOÃO, A.; SANTOS, J. B. G.; XAVIER, B. R.; FERNANDES, M. A; VALENTE, S. G.; LEITE, V. M.I. Quantificação do número de plaquetas a partir de diferentes métodos de centrifugação em ratos da linhagem SHR. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 50(6), 729-738; Doi: org/10.1016/j.rboe.2015.10.008, 2015.

YEBRA, M.; PARRY, G. C.; STROMBLAD, S.; MACKMAN, N.; ROSENBERG, S.; MUELLER, B. M.; CHERESH, D. A. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin $\alpha v \beta 5$ -directed cell migration. **The Journal of Biological Chemistry**. 15;271(46):29393-9; 1996.

YUAN, S.; CHAN, H. C.; VOGEL, H.; FILIPEK, S.; STEVENS, R. C.; PALCZEWSKI, K. The Molecular Mechanism of P2Y₁ Receptor Activation. **Angewandte Chemie International Edition**, 55 (35): 10331-10335. Doi: 10.1002 / anie.201605147, 2006.

ZANDIM, B. M.; SOUZA, M. V.; MAGALHÃES, P. C., BENJAMIN, L. A.; MAIA, L.; OLIVEIRA, A. C.; PINTO, J. O.; RIBEIRO, J. J. Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(1), 83–92. Doi: 10.1590/s0100-736x2012000100014, 2012.

ZUCKER, M. B. Platelet aggregation measured by the photometric method. *Methods Enzymol* 1989, (169):117-133.